

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7315724号
(P7315724)

(45)発行日 令和5年7月26日(2023.7.26)

(24)登録日 令和5年7月18日(2023.7.18)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 14/435 (2006.01)

C 0 7 K 14/435

Z N A

C 0 7 K 9/00 (2006.01)

C 0 7 K 9/00

請求項の数 6 (全44頁)

(21)出願番号	特願2021-575448(P2021-575448)	(73)特許権者	314000442
(86)(22)出願日	令和2年6月17日(2020.6.17)		高麗大学校産学協力団
(65)公表番号	特表2022-538546(P2022-538546 A)		KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
(43)公表日	令和4年9月5日(2022.9.5)		大韓民国 0 2 8 4 1 ソウル ソンブクク
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/007816		アナムロ 1 4 5
(87)国際公開番号	WO2020/256392		1 4 5, Anam-ro Seongb
(87)国際公開日	令和2年12月24日(2020.12.24)		uk-gu Seoul 02841,
審査請求日	令和4年1月19日(2022.1.19)		Republic of Korea
(31)優先権主張番号	10-2019-0071635	(74)代理人	100108453
(32)優先日	令和1年6月17日(2019.6.17)		弁理士 村山 靖彦
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)	(74)代理人	100110364
			弁理士 実広 信哉
		(74)代理人	100133400

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 リシン置換を含む R o m o 1 由来抗菌ペプチドおよびその変異体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 4 のアミノ酸配列；

配列番号 2 4 のアミノ酸配列において 1 番目アミノ酸 K が T に置換されるか、または 1 2 番目アミノ酸 T が G に置換されたアミノ酸配列；または

配列番号 2 4 のアミノ酸配列において 2 番目アミノ酸が T に置換されたアミノ酸配列からなる抗菌ペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗菌ペプチドにおいて少なくとも 1 つのメチオニンがイソロイシンに置換された、抗菌ペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗菌ペプチドにおいて下記の (a) ～ (s) のいずれか 1 つの変異をさらに含む、抗菌ペプチド：

(a) 1 ～ 1 2、1 4 ～ 1 5、1 7 ～ 2 1 番目アミノ酸のいずれか 1 つのアミノ酸が欠損、

(b) 1 4 番目アミノ酸欠損；および 1 ～ 8、1 2、1 5、または 1 8 番目アミノ酸が欠損、

(c) 1 4 番目アミノ酸欠損；1 8 番目アミノ酸欠損；および 1 ～ 8、1 2、または 1 5 番目アミノ酸欠損、

(d) 1 4 番目アミノ酸欠損；1 5 番目アミノ酸欠損；および 3、4、または 1 2 番目

アミノ酸欠損、

(e) 1または2番目アミノ酸欠損；3または4番目アミノ酸欠損；および18番目アミノ酸欠損、

(f) 3、4、14、および18番目アミノ酸欠損、

(g) 3または4番目アミノ酸欠損；14番目アミノ酸欠損；18番目アミノ酸欠損；および5、6、7、8、12、または15番目アミノ酸欠損、

(h) 14番目アミノ酸欠損；15番目アミノ酸欠損；1または2番目アミノ酸欠損；および3、4、7、または8番目アミノ酸欠損、

(i) 1または2番目アミノ酸欠損；7または8番目アミノ酸欠損；14または15番目アミノ酸欠損；および18番目アミノ酸欠損、

(j) 5または6番目アミノ酸欠損；11番目アミノ酸欠損；15番目アミノ酸欠損；18番目アミノ酸欠損；および1または2、3または4、7または8、12、および14番目のいずれか1つのアミノ酸欠損、

(k) 1または2番目アミノ酸欠損；7または8番目アミノ酸欠損；および12、14、および15番目アミノ酸欠損、

(l) 5または6番目アミノ酸欠損；3および4番目アミノ酸欠損；および14、および18番目アミノ酸欠損、

(m) 3、4、14、および18番目アミノ酸欠損；5または6番目アミノ酸欠損；および7または8、12、および15番目のいずれか1つのアミノ酸欠損、

(n) 1または2番目アミノ酸欠損；7または8番目アミノ酸欠損；および12、14、15、および18番目アミノ酸欠損、

(o) 3、4、14、および18番目アミノ酸欠損；5または6番目アミノ酸欠損；および7または8、12、および15番目アミノ酸の中から選択された2個のアミノ酸欠損、

(p) 1または2番目アミノ酸欠損；5または6番目アミノ酸欠損；7または8番目アミノ酸欠損；および12、14、15、および18番目アミノ酸が欠損、

(q) 3、4、14、および18番目アミノ酸欠損；5または6番目アミノ酸欠損；および1または2、7または8、12、および15番目アミノ酸の中から選択された3個のアミノ酸欠損、

(r) 1または2番目アミノ酸欠損；3または4番目アミノ酸欠損；5または6番目アミノ酸欠損；7または8番目アミノ酸欠損；および12、14、15、および18番目アミノ酸欠損、

(s) 1または2番目アミノ酸欠損；3および4番目アミノ酸欠損；5または6番目アミノ酸欠損；7または8番目アミノ酸欠損；および12、14、15、および18番目アミノ酸欠損。

【請求項4】

請求項1に記載の抗菌ペプチドにおいて10および14番目アミノ酸対、または14および18番目アミノ酸対がステープル化された、抗菌ペプチド。

【請求項5】

前記ステープル化は、アミノ酸対がペンテニルアラニンまたはオクテニルアラニンに置換されて相互架橋結合したものである、

請求項4に記載の抗菌ペプチド。

【請求項6】

請求項1に記載の抗菌ペプチドにおいてC末端に連結されたアミノ酸配列をさらに含み、

前記C末端に連結されたアミノ酸配列は、RまたはKが1～3個繰り返す配列からなるものである、抗菌ペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Romolタンパク質由来の抗菌ペプチドに関し、具体的には、Romolタンパク質の2番目アルファヘリックス(α -helix 2)領域のアミノ酸配列を有す

10

20

30

40

50

る多様なペプチドにおいてグラム陽性、グラム陰性、および多剤耐性バクテリアに対する抗菌活性を確認して、前記各ペプチドと各ペプチドを含む抗菌用組成物などを提供する。

【背景技術】

【0002】

バクテリア感染に対する治療手段として使用されている抗生剤の最も大きな問題点は、バクテリアの抗生剤耐性獲得である。英国政府のウェルカムトラスト報告書によれば、2050年には既存の抗生剤で治療できないスーパーバクテリアによって世界的に死亡者数が1,000万人を超え、死亡原因においてスーパーバクテリア感染が癌を追い越す脅威になると見込まれる。

【0003】

また、世界保健機関（WHO）は、数多くの多剤耐性菌において危急段階（critical priority）にあるバクテリアとしては、カルバペネム耐性アシネトバクター菌（carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*）、カルバペネム耐性緑膿菌（carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*）、およびカルバペネム耐性腸内細菌属（carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* sp.）菌種を選定し、最後の抗生剤として知られたカルバペネム系抗生剤に耐性を示すグラム陰性スーパーバクテリアを最優先に解決しなければならないと発表した。

【0004】

一方、菌血症は、血液中に細菌が生きている場合をいい、感染の直接的または間接的な影響によって発生するのが敗血症である。すなわち、敗血症は人体に侵入した細菌が血液に感染することで現れる全身性炎症反応症候群であって、感染後6時間経過後には生存率が30%にならない疾病である。敗血症の原因菌は、連鎖状球菌、黄色ブドウ状球菌、大腸菌、肺炎菌、緑膿菌、真菌を含めて非常に多様であり、このような敗血症誘発原因菌の多様性によってその治療に困難がある。

【0005】

現在まで、敗血症の治療は、主に免疫反応を抑制したり血液凝固を阻害するなど症状の緩和を目的とする治療が最善であり、根本的な治療のためには、初期に患者が感染した菌種の確認のための細菌の同定が必要であるが、上述のように、敗血症による即刻の全身炎症反応によって細菌の同定にかかる時間が確保できないという点に問題がある。また、仮に敗血症原因菌の同定に成功したとしても、その原因菌が抗生剤に対して耐性を有する多剤耐性バクテリアの場合、その治療に適切な薬物がないという点に問題がある。そこで、敗血症原因菌に対する同定なしに広範囲な細菌に対する抗菌活性を有する抗生剤の開発が必要であり、特に、多剤耐性バクテリアに対する抗菌活性を有する抗生物質の開発が要求されている。

【0006】

上述のように、現在まで人類が使用している抗生剤の最も大きな問題点は、バクテリアの耐性獲得であり、これを解決するための多くの研究が進められており、特に、バクテリアの抗生剤耐性獲得を克服するために、抗菌ペプチド（antimicrobial peptide、AMP）の開発が活発に進められている。動物または人間の防御タンパク質（host defense protein）由来の多様な抗菌ペプチドが開発されたが、人体免疫体系内で耐性獲得の可能性がある、血液内で短い半減期と人体に呈する毒性の問題および既存の抗生剤と比較して制限的な薬効を示すなどの問題があって実用化できないのが現状である。一例として、マガイニン（magainin）は、1999年に米国で開発された抗菌ペプチドで、臨床第3相後にFDAの承認を要請したが、その薬効が従来の抗生剤と比較して優れておらず承認が拒否された。また、2003年にダプトマイシン（daptomycin）、2014年にオリタバンシン（oritavancin）が米国食品医薬品局から承認を受けたが、両ペプチドとも、グラム陽性菌でのみ抗菌活性を示し、皮膚感染疾患にのみ適用できた。

【0007】

10

20

30

40

50

上述のように、現在までその薬効と適用の制限によって、菌血症および敗血症などの細菌感染疾患の治療に適用可能な抗菌ペプチドは開発されておらず、本発明者らは、ミトコンドリア内膜に位置するRomolタンパク質の2番目アルファヘリックス構造がグラム陽性、グラム陰性、および多剤耐性バクテリアで抗菌活性を示し、広範囲な細菌感染疾患の治療に適用できることを確認して、本発明を完成した。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】WHO, Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics (2017. 2. 27)

Lee et al., J. Cell Biol., 217, 2059-2071, 2018

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明が達成しようとする技術的課題は、リシン置換を含むRomolタンパク質由来の抗菌ペプチドおよび前記ペプチドのアミノ酸の一部を置換 (substitution) または欠損 (deletion) させた、変形された抗菌ペプチドを提供することである。

【0010】

また、本発明は、前記抗菌ペプチドを有効成分として含む抗生剤と前記抗菌ペプチドを含む食品および飼料添加剤、化粧品組成物、生物農薬、および抗菌用医薬部外品組成物を提供することを目的とする。

【0011】

しかし、本発明が達成しようとする技術的課題は上記の課題に制限されず、言及されていないさらに他の課題は以下の記載から当該技術分野における通常の技術者に明確に理解されるであろう。

【課題を解決するための手段】

【0012】

一態様は、配列番号1で表されるアミノ酸配列で構成されたRomolタンパク質の配列のうち52～79番目アミノ酸領域から選択される任意のアミノ酸を基準としてカルボキシ (C-) 末端方向に連続した7～28個のアミノ酸配列を含む抗菌ペプチドを提供する。

【0013】

一実施形態として、前記抗菌ペプチドを構成する1つ以上のアミノ酸配列が置換 (substitution) または欠損 (deletion) した抗菌ペプチドを提供する。

【0014】

他の実施形態として、前記ペプチドは、配列番号2～15からなる群より選択されるいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。

【0015】

さらに他の実施形態として、前記ペプチドは、配列番号16、30、40、および45からなる群より選択されるいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。

【0016】

さらに他の実施形態として、前記配列番号16のアミノ酸配列からなるペプチドは、例えば、配列番号17～29からなる群より選択されたいずれか1つのアミノ酸配列からなるものであってもよい。

【0017】

さらに他の実施形態として、前記配列番号30のアミノ酸配列からなるペプチドは、例えば、配列番号31～39からなる群より選択されたいずれか1つのアミノ酸配列からなるものであってもよい。

10

20

30

40

50

【0018】

さらに他の実施形態として、前記配列番号40のアミノ酸配列からなるペプチドは、例えば、配列番号41～44からなる群より選択されたいずれか1つのアミノ酸配列からなるものであってもよい。

【0019】

さらに他の実施形態として、前記配列番号45のアミノ酸配列からなるペプチドは、例えば、配列番号46～47からなる群より選択されるいずれか1つのアミノ酸配列からなるものであってもよい。

【0020】

さらに他の実施形態として、好ましくは、配列番号17～25、27、34、37、39、42、および44からなる群より選択されるいずれか1つのアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるペプチドであってもよく、さらに好ましくは、配列番号22、23、および24からなる群より選択される1つのアミノ酸配列を含むか、前記アミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。

【0021】

さらに他の実施形態として、前記ペプチドは、配列番号13のアミノ酸配列；または配列番号13のアミノ酸配列に対して、下記の(a)～(h)の少なくとも1つのアミノ酸置換を含む配列からなる抗菌ペプチドであってもよい。(a)は1番目アミノ酸KをRに置換、(b)は2番目アミノ酸TをKまたはRに置換、(c)は5番目アミノ酸QをKまたはRに置換、(d)は6番目アミノ酸SをK、R、またはHに置換、(e)は9番目アミノ酸TをKまたはRに置換、(f)は10番目アミノ酸FをWに置換、(g)は16番目アミノ酸IをLに置換、(h)は20番目アミノ酸IをGまたはLに置換であってもよい。

【0022】

さらに他の実施形態として、前記抗菌ペプチドは、少なくとも1つのメチオニンがノルロイシンまたはイソロイシンに置換されたものであってもよい。

【0023】

さらに他の実施形態として、前記抗菌ペプチドは、3、4、5、7、8、9、11、17、18、および19番目アミノ酸のいずれか1つが欠損したか；または3または4番目アミノ酸、および7または8番目アミノ酸が欠損したものであってもよい。

【0024】

さらに他の実施形態として、前記抗菌ペプチドは、C末端に連結されたアミノ酸配列をさらに含み、前記C末端に連結されたアミノ酸配列は、RまたはKが1～3個繰り返す配列からなるものであってもよい。

【0025】

他の態様は、配列番号24のアミノ酸配列；または配列番号24のアミノ酸配列において1番目のKがTに置換されるか、または12番目アミノ酸TがGに置換されたアミノ酸配列；または配列番号24のアミノ酸配列において2番目アミノ酸がTに置換されたアミノ酸配列からなる抗菌ペプチドを提供する。

【0026】

一具体例によれば、前記抗菌ペプチドは、少なくとも1つのメチオニンがノルロイシンまたはイソロイシンに置換されたものであってもよい。

【0027】

一具体例によれば、前記抗菌ペプチドは、下記の(a)～(s)のいずれか1つの変異をさらに含むことができる。

(a) 1～12、14～15、17～21番目アミノ酸のいずれか1つのアミノ酸が欠損；(b) 14番目アミノ酸欠損；および1～8、12、15、または18番目アミノ酸が欠損；(c) 14番目アミノ酸欠損；18番目アミノ酸欠損；および1～8、12、または15番目アミノ酸欠損；(d) 14番目アミノ酸欠損；15番目アミノ酸欠損；および1、2、または12番目アミノ酸欠損；(e) 1または2番目アミノ酸欠損；3または

10

20

30

40

50

4 番目アミノ酸欠損；および 18 番目アミノ酸欠損；(f) 3、4、14、および 18 番目アミノ酸欠損；(g) 3 または 4 番目アミノ酸欠損；14 番目アミノ酸欠損；18 番目アミノ酸欠損；および 5、6、7、8、12、または 15 番目アミノ酸欠損；(h) 14 番目アミノ酸欠損；15 番目アミノ酸欠損；1 または 2 番目アミノ酸欠損；3、4、7、または 8 番目アミノ酸欠損；(i) 1、2、5、または 6 番目アミノ酸欠損；7、8、または 11 番目アミノ酸欠損；14 または 15 番目アミノ酸欠損；18 番目アミノ酸欠損；(j) 5 または 6 番目アミノ酸欠損；11 番目アミノ酸欠損；15 番目アミノ酸欠損；18 番目アミノ酸欠損；および 1 または 2、3 または 4、7 または 8、12、および 14 番目のいずれか 1 つのアミノ酸欠損；(k) 1 または 2 番目アミノ酸欠損；7 または 8 番目アミノ酸欠損；および 12、14、および 15 番目アミノ酸欠損；(l) 1、2、5、または 6 番目アミノ酸欠損；3 および 4 番目アミノ酸欠損；14、および 18 番目アミノ酸欠損；(m) 3、4、14、および 18 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；および 7 または 8、12 番目、および 15 番目のいずれか 1 つのアミノ酸欠損；(n) 1 または 2 番目アミノ酸欠損；7 または 8 番目アミノ酸欠損；および 12、14、15、および 18 番目アミノ酸欠損；(o) 3、4、14、および 18 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；および 7 または 8、12、および 15 番目アミノ酸の中から選択された 2 個のアミノ酸欠損；(p) 1 または 2 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；7 または 8 番目アミノ酸欠損；12、14、15、および 18 番目アミノ酸が欠損；(q) 3、4、14、および 18 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；および 1 または 2、7 または 8、12、および 15 番目アミノ酸の中から選択された 3 個のアミノ酸欠損；(r) 1 または 2 番目アミノ酸欠損；3 または 4 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；7 または 8 番目アミノ酸欠損；12、14、15、および 18 番目アミノ酸欠損；(s) 1 または 2 番目アミノ酸欠損；3 および 4 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；7 または 8 番目アミノ酸欠損；12、14、15、および 18 番目アミノ酸欠損。

【0028】

一具体例によれば、前記抗菌ペプチドは、10 および 14 番目アミノ酸対、または 14 および 18 番目アミノ酸対がステープル化されたものであってもよい。前記ステープル化は、アミノ酸対がペンテニルアラニンまたはオクテニルアラニンに置換されて相互架橋結合したものであってもよい。

【0029】

一具体例によれば、前記抗菌ペプチドは、C 末端に連結されたアミノ酸配列をさらに含むことができ、前記 C 末端に連結されたアミノ酸配列は、R または K が 1 ～ 3 個繰り返す配列からなるものであってもよい。

【0030】

さらに他の実施形態として、前記ペプチドは、1 つ以上のアミノ酸配列が変形 (modification) されたものであってもよい。

【0031】

さらに他の実施形態として、前記変異は、ペギレーション (PEGylation)、アセチレーション (acetylation)、カルボキシレーション (carboxylation)、リピデーション (lipidation)、またはアミデーション (amidation) であってもよい。

【0032】

さらに他の実施形態として、前記ペプチドを構成するアミノ酸は、それぞれ独立して L-型または D-型のアミノ酸であってもよいし、放射線または蛍光ラベルされたアミノ酸類似体であってもよい。

【0033】

さらに他の実施形態として、前記ペプチドは、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および多剤耐性菌からなる群より選択される 1 つ以上の細菌に対して抗菌活性を有することができる。

10

20

30

40

50

【0034】

さらに他の実施形態として、前記グラム陽性菌は、ブドウ状球菌属 (*Staphylococcus* sp.)、桿菌属 (*Bacillus* sp.)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus* sp.)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces* sp.)、およびストレプトコッカス属 (*Streptococcus* sp.) からなる群より選択される1つの属 (Genus) に属する細菌であってもよいし、好ましくは、前記グラム陽性菌は、黄色ブドウ状球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、エンテロコッカスフェシウム (*Enterococcus faecium*)、ストレプトマイセスシンデネンシス (*Streptomyces sindenensis*)、エンテロコッカスフェカリス (*Enterococcus faecalis*)、およびストレプトコッカスニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) からなる群より選択される1つ以上の細菌であってもよい。

10

【0035】

さらに他の実施形態として、前記グラム陰性菌は、大腸菌属 (*Escherichia* sp.)、クレブシエラ属 (*Klebsiella* sp.)、アシネトバクター属 (*Acinetobacter* sp.)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.)、およびエンテロバクター属 (*Enterobacter* sp.) からなる群より選択される1つの属 (Genus) に属する細菌であってもよいし、好ましくは、前記グラム陰性菌は、大腸菌 (*Escherichia coli*)、クレブシエラニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、アシネトバクターバウマニ (*Acinetobacter baumannii*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、およびエンテロバクターアエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) からなる群より選択される1つ以上の細菌であってもよい。

20

【0036】

さらに他の実施形態として、前記多剤耐性菌は、ペニシリン系 (penicillins)、カルバペネム系 (carbapenems)、セファロsporin系 (cephalosporins)、キノロン系 (quinolones)、マクロライド系 (macrolides)、テトラサイクリン系 (tetracyclins)、またはグリコペプチド系 (glycopeptides) に属する1種以上の抗生物質に対する耐性を有する前記グラム陽性菌またはグラム陰性菌であって、好ましくは、前記多剤耐性菌は、メチシリン耐性ブドウ状球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus* sp.)、多剤耐性シュードモナス属 (multidrug-resistant *Pseudomonas* sp.)、バンコマイシン耐性エンテロコッカス属 (vancomycin-resistant *Enterococcus* sp.)、多剤耐性クレブシエラ属 (multidrug-resistant *Klebsiella* sp.)、多剤耐性アシネトバクター属 (multidrug-resistant *Acinetobacter* sp.)、およびバンコマイシン耐性ブドウ状球菌 (vancomycin-resistant *Staphylococcus* sp.) からなる群より選択される1つの属 (Genus) に属する細菌であってもよい。

30

40

【0037】

さらに他の実施形態として、前記多剤耐性菌は、メチシリン耐性黄色ブドウ状球菌 (methicillin-resistant *S. aureus*)、多剤耐性緑膿菌 (multidrug-resistant *P. aeruginosa*)、多剤耐性アシネトバクターバウマニ (multidrug-resistant *A. baumannii*)、多剤耐性クレブシエラニューモニエ (multidrug-resistant *K. pneumoniae*)、バンコマイシン耐性エンテロコッカスフェシウム (vancomycin-resistant *E. faecium*)、およびバンコマイシン耐性黄色ブドウ状球菌 (vancomycin-resistant *S. aureus*) からなる群より選択される1つ以上の細菌であってもよい。

50

【0038】

さらに他の実施形態として、前記多剤耐性緑膿菌は、ピペラシリン (piperacilin)、ピペラシリンタゾバクタム (piperacilin-tazobactam)、セフトジジム (ceftazidime)、イミペネム (imipenem)、メロペネム (meropenem)、ゲンタマイシン (gentamicin)、アミカシン (amikacin)、およびシプロフロキサシン (ciprofloxacin) からなる群より選択される1種以上の抗生剤に対する耐性を有するものであってもよいし、前記多剤耐性アシネトバクターバウマニは、ピペラシリン、ピペラシリンタゾバクタム、セフトジジム、イミペネム、メロペネム、ゲンタマイシン、アミカシン、シプロフロキサシン、およびセフェピム (cefepime) からなる群より選択される1種以上の抗生剤に対する耐性を有するものであってもよく、前記多剤耐性クレブシエラニューモニエは、ピペラシリンタゾバクタム、セフトジジム、セフェピム、イミペネム、ゲンタマイシン、およびシプロフロキサシンからなる群より選択される1種以上の抗生剤に対する耐性を有するものであってもよい。

10

【0039】

さらに他の実施形態として、前記バンコマイシン耐性エンテロコッカスフェシウムは、バンコマイシンのほかにも、リファンピン (rifampin)、テトラサイクリン、ゲンタマイシン、エリスロマイシン (erythromycin)、ストレプトマイシン (streptomycin)、およびアンピシリン (ampicillin) からなる群より選択される1種以上の抗生剤に対する耐性を追加的に有するものであってもよいし、前記バンコマイシン耐性黄色ブドウ状球菌は、バンコマイシンのほかにも、オキサシリン (oxacillin)、ベンジルペニシリン (benzylpenicillin)、アンピシリン、およびセファゾリン (cefazolin) からなる群より選択される1種以上の抗生剤に対する耐性を追加的に有するものであってもよい。

20

【0040】

他の態様は、前記抗菌ペプチドを有効成分として含む抗生剤を提供する。

【0041】

さらに他の態様は、前記抗菌ペプチドを有効成分として含む細菌性感染疾患の予防または治療用薬学的組成物を提供する。

【0042】

さらに他の態様は、前記抗菌ペプチドを個体に投与するステップを含む細菌性感染疾患の予防または治療方法を提供する。

30

【0043】

さらに他の態様は、細菌性感染疾患の予防または治療用薬剤の製造のための前記抗菌ペプチドの用途を提供する。

【0044】

一実施形態として、前記細菌性感染疾患は、皮膚感染、食中毒、中耳炎、膀胱炎、腹膜炎、尿路感染、乳房炎、肺炎、心内膜炎、結膜炎、関節炎、子宮内膜炎、腺疫、菌血症、敗血症、およびニキビからなる群より選択される1つ以上の疾病であってもよく、好ましくは、肺炎または敗血症であってもよい。

40

【0045】

さらに他の態様は、前記抗菌ペプチドを含む抗菌用医薬部外品組成物、化粧品組成物、食品添加剤、および飼料添加剤を提供する。

【発明の効果】

【0046】

本発明の Romo 1 由来ペプチドおよびその変異体は、既存の抗生物質および抗生ペプチドより多様な種類の細菌に対して高い抗生能力を有することにより、細菌感染性疾患患者の血液内で多様な原因菌を初期に同時に除去することができる。特に、本発明のペプチドは、抗生剤耐性を有するバクテリアに対して高い抗菌能力を発揮し、既存の抗生剤適用の限界を超えて多剤耐性バクテリアによる感染性疾患の予防または治療剤として提供でき

50

る。また、本発明の R o m o 1 由来ペプチドおよびその変異体は、耐性獲得の可能性が低く、毒性が低く、特に血液内で既存の抗菌ペプチドより高い抗菌能力があるという点から、広範囲な細菌性感染疾患の予防または治療を目的として医薬用、医薬部外用、食品および飼料添加用、農業および化粧品添加用など多様な方面に利用されることが期待される。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】 K U - 5 8 7 8 と従来の抗菌ペプチド（L L - 3 7、マガイニン2、およびダブトマイシン）とのグラム陽性およびグラム陰性バクテリアに対する抗菌活性を比較確認した図である。

【図2】 K U - 5 8 7 8 と従来の抗菌ペプチド（L L - 3 7、マガイニン2、およびダブトマイシン）との多剤耐性バクテリアに対する抗菌活性を比較確認した図である。

10

【図3】 K U - 5 8 7 8 と従来の抗生物質（イミペネム）とのグラム陽性およびグラム陰性バクテリアに対する抗菌活性を比較確認した図である。

【図4】 K U - 5 8 7 8 と従来の抗生物質（イミペネム）との多剤耐性バクテリアに対する抗菌活性を比較確認した図である。

【図5】 K U - 5 8 7 8 と従来の抗菌ペプチド（マガイニン2およびメリチン）とのヒト血管内皮由来細胞株（H U V E C c e l l）に対する毒性を比較確認した図である。

【図6】 K U - 5 8 7 8 および K U - 5 8 7 8 変異体（K U - 5 8 7 8 - K 4 および K U - 5 8 7 8 - K 4 - D）と従来の抗菌ペプチド（L L - 3 7、マガイニン2、およびメリチン）とのマウスの赤血球細胞に対する毒性を、赤血球溶血現象の程度により比較確認した図である。

20

【図7】 i n v i v o における K U - 5 8 7 8 の無毒性を、マウス体重の観察結果を通して確認した図である。

【発明を実施するための形態】

【0048】

R o m o 1 (R e a c t i v e o x y g e n s p e c i e s m o d u l a t o r 1) タンパク質は、ミトコンドリアの内膜に位置する膜タンパク質であって、ミトコンドリアの活性酸素の生成、T N F - α 信号伝達、細胞老化、癌の進行および浸潤、およびミトコンドリア内部のタンパク質輸送などに関与することが知られている。R o m o 1 タンパク質の構造は2個のアルファヘリックスを含むタンパク質であって、1 番目アルファヘリックス (α - h e l i x 1) は主に疎水性アミノ酸で構成されており、2 番目アルファヘリックス (α - h e l i x 2) は親水性および疎水性の二面性を有する。

30

【0049】

本発明者らは、R o m o 1 タンパク質の α - h e l i x 1 領域は水に溶けにくい性質を有するので研究から排除し、 α - h e l i x 2 領域のアミノ酸配列 (5 2 - 7 9 a . a .) を有する多様な長さのペプチドを合成してその抗菌活性を確認し、前記ペプチドの変異体から抗菌活性を確認して、本発明を完成した。

【0050】

本発明の具体的な実施例において、本発明者らは、R o m o 1 タンパク質の 5 2 - 7 9 アミノ酸領域から選択される1つのアミノ酸を基準として、連続するアミノ酸配列を含みかつ、互いに長さが異なる数種のペプチドを合成し、緑膿菌および黄色ブドウ状球菌に対する前記各ペプチドの抗菌活性を、バクテリア殺菌最小濃度測定法を利用して確認した。その結果、R o m o 1 タンパク質の 5 2 - 6 2 アミノ酸領域において任意のアミノ酸を基準として連続した18個のアミノ酸配列を含むペプチドのすべてで緑膿菌と黄色ブドウ状球菌に対する抗菌活性を確認したが、なかでも特に、R o m o 1 タンパク質の 5 8 - 7 8 アミノ酸配列を含む K U - 5 8 7 8 ペプチドで優れた抗菌活性を確認することができた（実施例1参照）。

40

【0051】

このため、本発明者らは、R o m o 1 由来抗菌ペプチドを提供する。

【0052】

50

本明細書において、「R o m o 1 由来ペプチド」は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列で構成された R o m o 1 タンパク質の 5 2 - 7 9 アミノ酸領域内の連続するアミノ酸配列を含むペプチドであり、「ペプチド」は、ペプチド結合によってアミノ酸残基が互いに結合して形成された線状の分子を意味する。前記 R o m o 1 由来ペプチドは、R o m o 1 タンパク質を断片化して獲得することができ、当業界にて公知の化学的合成方法、特に固相合成技術または液相合成技術により製造できる。

【0053】

さらに、本発明の R o m o 1 由来ペプチドは、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列で構成された R o m o 1 タンパク質の配列のうち 5 2 ~ 7 9 番目アミノ酸領域において任意のアミノ酸を基準として連続したアミノ酸配列を含むものであれば、その長さ限定されるものではないが、好ましくは 7 ~ 2 8 m e r、さらに好ましくは 1 8 ~ 2 8 m e r であってもよい。

10

【0054】

より具体的には、前記抗菌ペプチドは、R o m o 1 タンパク質の配列のうち 5 2 - 6 2 アミノ酸領域において任意のアミノ酸を基準として連続した 1 8 個のアミノ酸配列を含むものであってもよいし、好ましくは、配列番号 2 - 1 5 からなる群、さらに好ましくは、配列番号 5、8、9、13、および 14 からなる群より選択されるいずれか 1 つのアミノ酸配列を含むものであってもよい。

【0055】

本明細書において、アミノ酸配列は、N-末端からC-末端の順に並べられており、R o m o 1 タンパク質の配列のうち特定領域から選択されるアミノ酸を基準として「連続するアミノ酸配列」とは、前記基準アミノ酸のC-末端方向に連続するアミノ酸配列を意味する。また、本明細書において、R o m o 1 タンパク質の特定領域から選択される任意のアミノ酸を基準として連続する 7 ~ 2 8 個のアミノ酸配列とは、前記 R o m o 1 タンパク質の特定領域から選択された基準アミノ酸を含み、前記基準アミノ酸のC-末端方向に連続するアミノ酸配列を含む計 7 ~ 2 8 個のアミノ酸配列を意味する。

20

【0056】

本発明の具体的な実施例において、本発明者らは、前記 R o m o 1 由来抗菌ペプチドの適用範囲を確認するために、配列番号 13 で表されるアミノ酸配列を含む K U - 5 8 7 8 ペプチドを代表に選定して、黄色ブドウ状球菌、枯草菌、腸内球菌、ストレプトマイセスシンデネンシス、エンテロコッカスフェカリス、ストレプトコッカスニューモニエ、大腸菌、クレブシエラニューモニエ、アシネトバクターバウマニ、緑膿菌、エンテロバクターアエロゲネス、メチシリン耐性黄色ブドウ状球菌、多剤耐性緑膿菌、多剤耐性アシネトバクターバウマニ、多剤耐性クレブシエラニューモニエ、バンコマイシン耐性エンテロコッカスフェシウム、およびバンコマイシン耐性黄色ブドウ状球菌に対する前記ペプチドの抗菌活性を確認した。その結果、本発明の R o m o 1 由来抗菌ペプチドは、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および多剤耐性バクテリアのすべてで広範囲な抗菌活性を示すことが分かった（実施例 2 参照）。

30

【0057】

また、より優れた抗菌活性を有するペプチドの探索のために、K U - 5 8 7 8 を構成する各アミノ酸を、その性質によって、 $X_1 X_1 M M X_1 X_1 G G X_1 F G X_1 F M A I G M G I R$ （配列番号 16）、 $K T X_2 X_2 Q S G G T F G T F X_2 A X_2 G X_2 G X_2 R$ （配列番号 30）、 $K T M M Q S G G T X_3 G T X_3 M A I G M G I R$ （配列番号 40）、および $K T M M Q S X_4 X_4 T F X_4 T F M X_4 I X_4 M X_4 I R$ （配列番号 45）に区分して、各 $X_1 \sim X_4$ のアミノ酸を置換したペプチドを合成してその抗菌活性を確認した。

40

【0058】

本発明の具体的な実施例において、本発明者らは、K U - 5 8 7 8 ペプチドにおいて親水性残基を含むアミノ酸を正電荷を含むアミノ酸に置換する場合に抗菌活性の変化を確認した。K U - 5 8 7 8 ペプチドにおいて親水性残基を含むアミノ酸の位置は、配列番号 16 において X_1 で表されており、 X_1 位置のアミノ酸をそれぞれ独立して置換した。R o

50

mo1タンパク質の α -helix 2領域において親水性アミノ酸を正電荷を含んでいるアミノ酸（R、H、またはK）または他の親水性アミノ酸（T、S、Q、またはN）に置換する場合でその抗菌活性の変化を確認した。その結果、抗菌活性が維持されるか、それより優れた抗菌活性を示すことが分かった（実施例4-1参照）。

【0059】

また、本発明の他の具体的な実施例において、本発明者らは、KU-5878ペプチドにおいてメチオニン（M）またはイソロイシン（I）を疎水性残基を含みその構造が類似するアミノ酸（M、L、I、V、またはNle）に置換する場合と、疎水性残基を含むもののその構造が異なるアミノ酸（F、Y、またはW）に置換する場合とでその抗菌活性の変化を確認した。KU-5878ペプチドにおいてメチオニン（M）およびイソロイシン（I）は、配列番号30においてX₂で表されており、X₂位置のアミノ酸は、それぞれ独立して置換された。その結果、メチオニンをノルロイシン（Nle）に置換する場合にその抗菌活性が維持され、また、イソロイシンをトリプトファン（W）に置換する場合に抗菌活性が減少した。一方、イソロイシンをグリシンに置換する場合、抗菌活性が向上したペプチドが得られることを確認した（実施例4-3参照）。

【0060】

また、本発明の他の具体的な実施例において、本発明者らは、KU-5878ペプチドにおいて疎水性残基を含むフェニルアラニン（F）を親水性アミノ酸またはその構造が類似する疎水性アミノ酸（F、Y、またはW）、またはその構造が異なる疎水性アミノ酸（M、L、I、V、またはNle）に置換する場合に、その抗菌活性の変化を確認した。KU-5878ペプチドにおいてフェニルアラニンは、配列番号40においてX₃で表されており、X₃位置のアミノ酸は、それぞれ独立して置換された。その結果、フェニルアラニンをトリプトファン（W）に置換する場合、抗菌活性が向上したペプチドが得られることを確認した（実施例4-4参照）。

【0061】

また、本発明の他の具体的な実施例において、本発明者らは、KU-5878においてアラニン（A）またはグリシン（G）をそれぞれグリシンまたはアラニンに置換する場合に、抗菌活性の変化を確認した。KU-5878ペプチドにおいてアラニンとグリシンは、配列番号45においてX₄で表されており、X₄位置のアミノ酸をそれぞれ独立して置換した。その結果、アラニンをグリシンに置換する場合、およびグリシンをアラニンに置換する場合、抗菌活性を示すが、KU-5878ペプチドと比較して減少した抗菌活性を示すことを確認した（実施例4-5参照）。

【0062】

上記から、本発明のRomo1由来ペプチドは、Romo1の52-79領域内において任意のアミノ酸を基準として連続する7-28個のアミノ酸配列を含みかつ、その抗菌活性を示す範囲内で1つ以上のアミノ酸置換（substitution）を含むことができる。

【0063】

本発明の具体的な実施例において、本発明者らは、KU-5878変異体の適用範囲を確認するために、KU-5878-K4を代表に選定し、多様な細菌に対する抗菌活性を確認した。その結果、KU-5878-K4も、KU-5878と同じく、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および多剤耐性バクテリアのすべてで広範囲な抗菌活性を示すことが分かった（実施例4-2参照）。

【0064】

また、本発明者らは、具体的な実施例により、KU-5878およびKU-5878-K4を構成するアミノ酸の一部または全部をD-型アミノ酸に置換したペプチドの場合にも、KU-5878と類似の抗菌活性を示し、特にウシ血清の存在下、KU-5878およびKU-5878-K4の場合に抗菌活性が大きく減少するが、D-型アミノ酸に置換された変異体の場合に抗菌活性の減少幅が少ないことが分かった（実施例4-6参照）。

【0065】

上記から、本発明の R o m o 1 由来ペプチドを構成するアミノ酸は、それぞれ独立して L ー形態または D ー形態であってもよいし、各アミノ酸は、アミノ酸類似体、放射線ラベリングアミノ酸、または蛍光タグアミノ酸であってもよい。

【0066】

一方、本発明の R o m o 1 由来ペプチドは、アミノ酸配列の一部部位を選定し、その活性を増加させるために、アミノ (N ー) 末端またはカルボキシ (C ー) 末端の変形を誘導することができる。このような変形により、本発明のペプチドは、生体内投与時の増加した半減期を有することができる。

【0067】

本発明者らは、具体的な実施例により、C ー末端がアミデーション (a m i d a t i o n) された K U ー 5 8 7 8 変異体の場合に抗菌活性が増加することを確認した (実施例 5 参照)。

【0068】

したがって、本発明の R o m o 1 由来ペプチドのアミノ末端は、アセチル基、フルオレニルメトキシカルボニル基、ホルミル基、パルミトイル基、ミリスチル基、ステアシル基、およびポリエチレングリコール (P E G) などの保護基が結合可能であり、ペプチドのカルボキシ末端は、ヒドロキシ基 (ー O H)、アミノ基 (ー N H₂)、アジド (ー N H N H₂) などに変形可能である。また、本発明のペプチドの末端またはアミノ酸の R ー残基 (R ー g r o u p) に脂肪酸 (f a t t y a c i d s)、糖鎖 (o l i g o s a c c h a r i d e s c h a i n s)、すべてのナノ粒子 (ゴールド粒子、リボソーム、ヘパリン、ヒドロゲルなど)、アミノ酸、担体タンパク質 (c a r r i e r p r o t e i n s) などを結合することができる。上述したアミノ酸の変形は、本発明のペプチドの力価 (p o t e n c y) と安定性を改善する作用をする。本明細書において、用語「安定性」は、生体内 (i n v i v o) の安定性だけでなく、保存安定性 (常温、冷蔵、冷凍保管時の保存安定性を含む) も意味する。

【0069】

一方、本発明の R o m o 1 由来抗菌ペプチドは、これを構成する 1 つ以上のアミノ酸配列が欠失したペプチドであってもよい。上記により、本発明の R o m o 1 由来ペプチドを構成する 1 つ以上のアミノ酸を置換 (s u b s t i t u t i o n)、変異 (m o d i f i c a t i o n)、または欠損 (d e l e t i o n) させたペプチドでも抗菌活性を確認できたことから、本発明は、R o m o 1 由来ペプチド変異体を抗菌ペプチドとして提供することができる。

【0070】

本発明において、「変異体」は、抗菌活性を示す範囲で前記 R o m o 1 由来ペプチドを構成する 1 つ以上のアミノ酸が置換 (s u b s t i t u t i o n)、変異 (m o d i f i c a t i o n)、および／または欠損 (d e l e t i o n) したペプチドを意味し、抗菌活性を示すものであれば、本発明の R o m o 1 由来ペプチドより優れた抗菌活性を示す変異体に制限されない。

【0071】

本発明の抗菌ペプチドは、配列番号 13 のアミノ酸配列；または配列番号 13 のアミノ酸配列に対して、下記の (a) ～ (h) の少なくとも 1 つのアミノ酸置換を含む配列からなるものであってもよい。

【0072】

前記 (a) は 1 番目アミノ酸 K を R に置換、(b) は 2 番目アミノ酸 T を K または R に置換、(c) は 5 番目アミノ酸 Q を K または R に置換、(d) は 6 番目アミノ酸 S を K、R、または H に置換、(e) は 9 番目アミノ酸 T を K または R に置換、(f) は 10 番目アミノ酸 F を W に置換、(g) は 16 番目アミノ酸 I を L に置換、(h) は 20 番目アミノ酸 I を G または L に置換であってもよい。実施例 8 および 9 によれば、本発明者は、K U ー 5 8 7 8 のアミノ酸配列を前記 (a) ～ (h) のいずれか 1 つに置換すれば、ペプチドの抗菌効果が向上することを確認した。

【0073】

さらに他の実施形態として、前記抗菌ペプチドは、少なくとも1つのメチオニンがノルロイシンまたはイソロイシンに置換されたものであってもよい。ノルロイシン (Norleucine) は、メチオニンと比較すれば、硫黄 (S) が炭素に置換されたことを除けば構造が同一であり、イソロイシンは、ノルロイシンと比較すれば、炭素数が同じアルキル置換基を有する共通点を有する。本発明者は、KU-5878のアミノ酸配列上にある4個のメチオニンのうち1～4個をノルロイシンに置換すれば抗菌活性が改善されることを確認した。(表13参照)

【0074】

さらに他の実施形態として、前記抗菌ペプチドは、3、4、5、7、8、9、11、17、18、および19番目アミノ酸のいずれか1つが欠損するか；または3または4番目アミノ酸、および7または8番目アミノ酸が欠損したものであってもよい。本願の実施例6、7によれば、KU-5878の3、4、5、7、8、9、11、17、18、および19番目アミノ酸のいずれか1つが欠損すると抗菌活性が増加し、KU-5878の一部のアミノ酸が置換されたペプチドに対しても同じ効果を期待することができる。

【0075】

さらに他の実施形態として、前記抗菌ペプチドは、C末端に連結されたアミノ酸配列をさらに含み、前記C末端に連結されたアミノ酸配列は、RまたはKが1～3個繰り返す配列からなるものであってもよい。実施例10によれば、本発明者は、KU-5878のC末端にRRRまたはKKからなるアミノ酸配列をさらに付加すると抗菌活性が増加することを確認した。

【0076】

他の態様は、配列番号24のアミノ酸配列；または配列番号24のアミノ酸配列において1番目のKがTに置換されるか、または12番目アミノ酸TがGに置換されたアミノ酸配列；または配列番号24のアミノ酸配列において2番目アミノ酸がTに置換されたアミノ酸配列からなる抗菌ペプチドを提供する。

【0077】

一具体例によれば、前記抗菌ペプチドは、少なくとも1つのメチオニンがノルロイシンまたはイソロイシンに置換されたものであってもよい。

【0078】

一具体例によれば、前記抗菌ペプチドは、下記の(a)～(s)のいずれか1つの変異をさらに含むことができる。

(a) 1～12、14～15、17～21番目アミノ酸のいずれか1つのアミノ酸が欠損；(b) 14番目アミノ酸欠損；および1～8、12、15、または18番目アミノ酸が欠損；(c) 14番目アミノ酸欠損；18番目アミノ酸欠損；および1～8、12、または15番目アミノ酸欠損；(d) 14番目アミノ酸欠損；15番目アミノ酸欠損；および1、2、または12番目アミノ酸欠損；(e) 1または2番目アミノ酸欠損；3または4番目アミノ酸欠損；および18番目アミノ酸欠損；(f) 3、4、14、および18番目アミノ酸欠損；(g) 3または4番目アミノ酸欠損；14番目アミノ酸欠損；18番目アミノ酸欠損；および5、6、7、8、12、または15番目アミノ酸欠損；(h) 14番目アミノ酸欠損；15番目アミノ酸欠損；1または2番目アミノ酸欠損；3、4、7、または8番目アミノ酸欠損；(i) 1、2、5、または6番目アミノ酸欠損；7、8、または11番目アミノ酸欠損；14または15番目アミノ酸欠損；18番目アミノ酸欠損；(j) 5または6番目アミノ酸欠損；11番目アミノ酸欠損；15番目アミノ酸欠損；18番目アミノ酸欠損；および1または2、3または4、7または8、12、および14番目のいずれか1つのアミノ酸欠損；(k) 1または2番目アミノ酸欠損；7または8番目アミノ酸欠損；および12、14、および15番目アミノ酸欠損；(l) 1、2、5、または6番目アミノ酸欠損；3および4番目アミノ酸欠損；14、および18番目アミノ酸欠損；(m) 3、4、14、および18番目アミノ酸欠損；5または6番目アミノ酸欠損；および7または8、12番目、および15番目のいずれか1つのアミノ酸欠損；(n)

10

20

30

40

50

1 または 2 番目アミノ酸欠損；7 または 8 番目アミノ酸欠損；および 1 2、1 4、1 5、および 1 8 番目アミノ酸欠損；(o) 3、4、1 4、および 1 8 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；および 7 または 8、1 2、および 1 5 番目アミノ酸の中から選択された 2 個のアミノ酸欠損；(p) 1 または 2 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；7 または 8 番目アミノ酸欠損；1 2、1 4、1 5、および 1 8 番目アミノ酸が欠損；(q) 3、4、1 4、および 1 8 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；および 1 または 2、7 または 8、1 2、および 1 5 番目アミノ酸の中から選択された 3 個のアミノ酸欠損；(r) 1 または 2 番目アミノ酸欠損；3 または 4 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；7 または 8 番目アミノ酸欠損；1 2、1 4、1 5、および 1 8 番目アミノ酸欠損；(s) 1 または 2 番目アミノ酸欠損；3 および 4 番目アミノ酸欠損；5 または 6 番目アミノ酸欠損；7 または 8 番目アミノ酸欠損；1 2、1 4、1 5、および 1 8 番目アミノ酸欠損。

【0079】

一具体例によれば、前記抗菌ペプチドは、10 および 14 番目アミノ酸対、または 14 および 18 番目アミノ酸対がステーブル化されたものであってもよい。前記ステーブル化は、アミノ酸対がペンテニルアラニンまたはオクテニルアラニンに置換されて相互架橋結合したものであってもよい。

【0080】

一具体例によれば、前記抗菌ペプチドは、C 末端に連結されたアミノ酸配列をさらに含むことができ、前記 C 末端に連結されたアミノ酸配列は、R または K が 1～3 個繰り返す配列からなるものであってもよい。

【0081】

本発明の Romo 1 由来ペプチドおよびその変異体は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および多剤耐性バクテリアに対する抗菌活性を有していることから、本発明は、前記抗菌ペプチドを有効成分として含む細菌感染性疾患の予防または治療用薬学的組成物を提供することができる。

【0082】

本発明の Romo 1 由来ペプチドおよびその変異体が増殖および／またはその生長を妨げる前記グラム陽性菌の非制限的な例としては、ブドウ状球菌属 (*Staphylococcus* sp.)、桿菌属 (*Bacillus* sp.)、エンテロコッカス属 (*Enterococcus* sp.)、ストレプトマイセス属 (*Streptomyces* sp.)、およびストレプトコッカス属 (*Streptococcus* sp.) などがあり、好ましくは、黄色ブドウ状球菌 (*Staphylococcus aureus*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*)、エンテロコッカスフェシウム (*Enterococcus faecium*)、ストレプトマイセスシンデネンシス (*Streptomyces sindenensis*)、エンテロコッカスフェカリス (*Enterococcus faecalis*)、および／またはストレプトコッカスニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*) であってもよい。

【0083】

また、本発明の Romo 1 由来ペプチドおよびその変異体が増殖および／またはその生長を妨げる前記グラム陰性菌の非制限的な例としては、大腸菌属 (*Escherichia* sp.)、クレブシエラ属 (*Klebsiella* sp.)、アシネトバクター属 (*Acinetobacter* sp.)、シュードモナス属 (*Pseudomonas* sp.)、およびエンテロバクター属 (*Enterobacter* sp.) などがあるが、好ましくは、大腸菌 (*Escherichia coli*)、クレブシエラニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、アシネトバクターバウマニ (*Acinetobacter baumannii*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、および／またはエンテロバクターアエロゲネス (*Enterobacter aerogenes*) であってもよい。

【0084】

さらに、本発明の Romo1 由来ペプチドおよびその変異体は、多剤耐性菌に対する抗菌活性を有していることから、Romo1 由来ペプチドおよびその変異体が増殖および／またはその生長を妨げる前記多剤耐性菌は、ペニシリン系 (penicillins)、カルバペネム系 (carbapenems)、セファロsporin系 (cephalosporins)、キノロン系 (quinolones)、マクロライド系 (macrolides)、テトラサイクリン系 (tetracyclins)、またはグリコペプチド系 (glycopeptides) に属する1種以上の抗生物質に対する耐性を有する前記グラム陽性菌またはグラム陰性菌であってもよいし、好ましくは、メチシリン耐性ブドウ状球菌属 (methicillin-resistant Staphylococcus sp.)、多剤耐性シュードモナス属 (multidrug-resistant Pseudomonas sp.)、バンコマイシン耐性エンテロコッカス属 (vancomycin-resistant Enterococcus sp.)、多剤耐性クレブシエラ属 (multidrug-resistant Klebsiella sp.)、多剤耐性アシネトバクター属 (multidrug-resistant Acinetobacter sp.)、および／またはバンコマイシン耐性ブドウ状球菌属 (vancomycin-resistant Staphylococcus sp.) であってもよい。

10

【0085】

本発明は、Romo1 由来ペプチドおよび／またはその変異体を有効成分として含む薬学的組成物、すなわち抗生剤を提供することができ、本発明の薬学的組成物が予防または治療の対象とする「細菌性感染疾患」は、前記グラム陽性菌、グラム陰性菌、および／または多剤耐性菌の感染による疾患であってもよいし、好ましくは、前記細菌感染によって誘発される皮膚感染、食中毒、中耳炎、膀胱炎、腹膜炎、尿路感染、乳房炎、肺炎、心内膜炎、結膜炎、関節炎、子宮内膜炎、腺疫、菌血症、敗血症、および／またはニキビなどであってもよく、さらに好ましくは、敗血症または肺炎であってもよい。

20

【0086】

また、本発明は、Romo1 由来ペプチドおよび／またはその変異体を個体に投与するステップを含む細菌性感染疾患の予防または治療方法を提供する。

【0087】

本発明において、「個体」とは、哺乳類であれば制限されないが、好ましくは、ヒトまたは家畜であってもよい。

30

【0088】

本発明において、予防とは、本発明による薬学的組成物の投与によって前記グラム陽性菌、グラム陰性菌、および／または多剤耐性細菌の感染を遅延させるか、その感染による疾病の発病を遅延させるすべての行為を意味し、治療とは、本発明による薬学的組成物の投与によって前記細菌感染による症状が好転したり有利に変更されるすべての行為を意味する。

【0089】

本発明において、薬学的組成物 (pharmaceutical composition) は、Romo1 由来ペプチドおよび／またはその変異体のほかに公知の抗生物質を1種以上さらに含むことができ、薬学的組成物の製造に通常使用される適切な担体、賦形剤、および希釈剤をさらに含むことができる。

40

【0090】

本発明において、「担体 (carrier)」とは、ビヒクル (vehicle) とも呼ばれ、細胞または組織内へのタンパク質またはペプチドの付加を容易にする化合物を意味するものであって、例えば、ジメチルスルホキシド (DMSO) は、生物体の細胞または組織内への多くの有機物の投入を容易にする通常使用される担体である。

【0091】

本発明において、「希釈剤 (diluent)」とは、対象タンパク質またはペプチドの生物学的活性形態を安定化させるだけでなく、タンパク質またはペプチドを溶解させる

50

水で希釈する化合物と定義される。バッファー溶液に溶解している塩は、当該分野にて希釈剤として使用される。通常使用されるバッファー溶液はホスフェートバッファー食塩水であり、これはヒト溶液の塩状態を模倣しているからである。バッファー塩は低い濃度で溶液のpHを制御できるため、バッファー希釈剤が化合物の生物学的活性を変形することは希である。これに使用されたアゼライン酸を含有する化合物は人間患者にそのものとして、または結合療法のように他の成分と共にまたは適当な担体や賦形剤と共に混合された薬剤学的組成物として、投与可能である。

【0092】

また、本発明によるR o m o 1由来ペプチドおよび／またはその変異体を有効成分として含む細菌性感染疾患の予防または治療用薬学的組成物は、それぞれ通常の方法により、散剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、懸濁液、エマルジョン、シロップ、エアロゾルなどの外用剤および滅菌注射溶液の形態に剤形化して使用可能であり、本発明の抗菌用組成物は、目的とする方法によって経口投与するか非経口投与（例えば、静脈内、皮下、腹腔内または局所に適用）することができ、投与量は、患者の状態および体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路および期間によって異なるが、当業者によって適宜選択可能であり、例えば、薬学的に許容可能な担体と混合された形態で約0.001mg～1000mg投与可能である。本発明の抗菌用組成物は、必要に応じて1日1回～数回に分けて投与することができ、単独で、または手術、ホルモン治療、薬物治療および生物学的反応調節剤を使用する方法と併用して使用可能である。

【0093】

また、本発明のR o m o 1由来ペプチドおよび／またはその変異体は、細菌感染疾患の予防または改善を目的とする医薬部外品組成物を提供することができ、本発明の医薬部外品組成物は、他の医薬部外品または医薬部外品成分と共に使用可能であり、通常の方法により適宜使用可能である。前記医薬部外品組成物は、消毒清潔剤、シャワーフォーム、うがい薬、ウェットティッシュ、洗剤石鹸、ハンドウォッシュ、加湿器充填剤、マスク、軟膏剤、またはフィルタ充填剤などに利用可能であるが、これに限定されるものではない。

【0094】

さらに、本発明のR o m o 1由来ペプチドおよび／またはその変異体は、化粧品組成物の形態で提供できる。本発明による化粧品組成物の剤形は、スキンローション、スキンソフナー、スキントナー、アストリンゼント、ローション、ミルクローション、モイスチャーローション、栄養ローション、マッサージクリーム、栄養クリーム、モイスチャークリーム、ハンドクリーム、ファウンデーション、エッセンス、栄養エッセンス、パック、石鹸、クレンジングフォーム、クレンジングローション、クレンジングクリーム、ボディローションまたはボディクレンザーの形態であってもよい。本発明の化粧品組成物には、前記必須成分とともに、必要に応じて通常の化粧品に配合される他の成分と共に配合可能である。

【0095】

同時に、本発明は、R o m o 1由来ペプチドおよび／またはその変異体を有効成分として含む食品組成物または飼料組成物を提供する。本発明のR o m o 1由来ペプチドおよび／またはその変異体を食品または飼料の添加物として使用する場合、前記R o m o 1由来ペプチドおよび／またはその変異体をそのまま添加するか他の食品、飼料、またはその成分と共に使用可能であり、通常の方法によって適宜使用可能である。有効成分の混合量は、使用目的（細菌の増殖および生長抑制による感染性疾患の予防、健康または治療的処置）によって好適に決定可能である。一般的に、飼料、食品または飲料の製造時、本発明のR o m o 1由来ペプチドおよび／またはその変異体は、原料に対して15重量%以下、好ましくは10重量%以下の量で添加される。しかし、健康および衛生を目的とするか、または健康調節を目的とする長期間の摂取の場合、前記量は前記範囲以下であってもよいし、安全性の面で何ら問題がないため、有効成分は前記範囲以上の量でも使用できる。前記食品および飼料の種類には特別な制限はない。

【0096】

本発明では、アミノ酸配列をIUPAC-IUB命名法により、以下のように略語で記載した。

アルギニン (Arg、R)、リシン (Lys、K)、ヒスチジン (His、H)、セリン (Ser、S)、トレオニン (Thr、T)、グルタミン (Gln、Q)、アスパラギン (Asp、N)、メチオニン (Met、M)、ロイシン (Leu、L)、イソロイシン (Ile、I)、バリン (Val、V)、フェニルアラニン (Phe、F)、トリプトファン (Trp、W)、チロシン (Tyr、Y)、アラニン (Ala、A)、グリシン (Gly、G)、プロリン (Pro、P)、システイン (Cys、C)、アスパラギン酸 (Asp、D)、グルタミン酸 (Glu、E)、ノルロイシン (Nle)

【0097】

本発明は、多様な変換が加えられて様々な実施例を有することができるが、以下、特定の実施例を図面に例示して詳細な説明に詳細に説明する。しかし、これは本発明を特定の実施形態に対して限定しようとするものではなく、本発明の思想および技術範囲に含まれるあらゆる変換、均等物乃至代替物を含むことが理解されなければならない。本発明を説明するにあたり、かかる公知の技術に関する具体的な説明が本発明の要旨をあいまいにしようと判断された場合、その詳細な説明を省略する。

【0098】

〔実施例〕

実施例1. Romo1由来ペプチドの抗菌活性の確認および最適なペプチドの探索

Romo1タンパク質は2個のアルファヘリックス (α -helix) を含んでいる。本発明者らは、親水性および疎水性の二面性を有する2番目アルファヘリックス (α -helix 2) 領域を合成し、バクテリア殺菌最小濃度測定法 (minimum bactericidal concentration: MBC) を利用してその抗菌活性を確認し、これをKU-5279 (Romo1タンパク質の52-79アミノ酸領域) と名付けた。次いで、人体適用に有利であり、抗菌活性に優れたペプチドを探索するために、Romo1タンパク質の52-79アミノ酸領域において任意のアミノ酸を基準として連続するアミノ酸配列を含む数種のペプチドを合成して、バクテリア殺菌最小濃度測定法により各ペプチドの抗菌活性を比較確認した (各ペプチドの情報は下記表1参照)。前記各ペプチドのバクテリア殺菌最小濃度測定法を利用した抗菌活性の確認は、具体的には下記のように行われた。

【0099】

まず、緑膿菌 (ATCC 27853) と黄色ブドウ状球菌 (ATCC 29213) を3% (w/v) TSB (Tryptic Soy Broth) 液体培地に37°C、200 rpmの条件で4時間培養した後、再度同一の条件で 5×10^6 CFU/mlの濃度となるように3時間2次培養した。前記2次培養した各菌株の最終濃度が 2×10^5 CFU/mlの濃度となるようにSP (Sodium phosphate buffer: 10mM Sodium phosphate、1% TSB) 溶液で希釈して菌株溶液を用意した。

【0100】

次いで、96-ウェルマイクロプレートの各ウェルに濃度を異ならせて ($0 \mu\text{g}/\text{ml}$ ~ $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチド) 各ペプチドを分注し、前記用意された菌株溶液を $100 \mu\text{l}$ (1×10^5 CFU/ml) を入れて、混合して、37°C恒温器で1時間反応させた。

【0101】

そして、TS (Tryptic Soy) 30 g/Lおよび寒天15 g/Lを蒸留水に溶かし、滅菌した後、100mmの円形プレートに25 mlを注いで、1日以上室温で固めて製造したTS寒天プレートに前記ペプチドと菌株との反応溶液を $10 \mu\text{l}$ ずつ一定の大きさに塗抹し、37°C恒温器で18時間培養した後、プレートでコロニーの生成を確認した。バクテリア殺菌最小濃度はコロニーがたった1つも生成されないペプチドの最小濃度と定義し、実験結果は下記表1の通りである。

【0102】

10

20

30

40

50

【表 1】

配列 番号	ペプチド	アミノ酸配列	黄色ブドウ状球菌 のMBC値 ($\mu\text{g/ml}$)	緑膿菌のMBC値 ($\mu\text{g/ml}$)
1	ロモ1	MPVAVGPYGGSQSPSCFDRVKMGFVMGCAVGMAAGALFGTFSC LRIGMRGRELMGGIGKTMMSGGTFGTFAIGMGIRC	不溶性	不溶性
2	KU-5278	LMGGIGKTMMSGGTFGTFAIGMGIR	300	300
3	KU-5279	LMGGIGKTMMSGGTFGTFAIGMGIRC	300	300
4	KU-5478	GGIGKTMMSGGTFGTFAIGMGIR	300	300
5	KU-5479	GGIGKTMMSGGTFGTFAIGMGIRC	200	300
6	KU-5678	IGKTMMSGGTFGTFAIGMGIR	300	300
7	KU-5679	IGKTMMSGGTFGTFAIGMGIRC	300	300
8	KU-5778	GKTMMSGGTFGTFAIGMGIR	280	300
9	KU-5779	GKTMMSGGTFGTFAIGMGIRC	250	280
10	KU-5875	KTMMMSGGTFGTFAIGM	>300	>300
11	KU-5876	KTMMMSGGTFGTFAIGMG	>300	>300
12	KU-5877	KTMMMSGGTFGTFAIGMGI	>300	>300
13	KU-5878	KTMMMSGGTFGTFAIGMGIR	100	100
14	KU-5879	KTMMMSGGTFGTFAIGMGIRC	150	150
15	KU-6079	MMMSGGTFGTFAIGMGIRC	>300	>300
48	pCM19	CLRIGMRGRELMGGIGKTM	250	300
49	pCM12	CLRIGMRGRELM	>300	>300

【0103】

前記表1に示すように、pCM19とKU-5279ペプチドは類似の殺菌力を示すが、pCM12の場合、低い殺菌力のため、バクテリア殺菌最小濃度測定法を利用して抗菌活性の測定が不可能であった。一方、21個のアミノ酸残基で構成されているKU-5878ペプチドの抗菌活性が最も優れており、KU-5878は、KU-5279より3倍優れた抗菌活性を有することを確認することができた。

【0104】

実施例2. KU-5878の抗菌活性の確認

2-1. 多様な細菌に対する抗菌活性の確認

前記実施例1で抗菌活性を確認したRomolタンパク質の52-79アミノ酸領域またはその一部領域を含むペプチドが殺菌力を発揮する細菌の種類を確認するために、前記表1に示した合成ペプチドのうちKU-5878を代表に選定して、下記表2に示した細菌に対する抗菌活性をバクテリア殺菌最小濃度測定法を利用して測定した。バクテリア殺菌最小濃度測定法は、前記実施例1の方法と同一である。

【0105】

具体的には、各細菌を3% (w/v) TSB液体培地に37℃、200rpmの条件で4時間培養した後、再度同一の条件で 5×10^6 CFU/mlの濃度となるように3時間2次培養した。前記2次培養した各菌株の最終濃度が 2×10^5 CFU/mlの濃度となるようにSP溶液で希釈して菌株溶液を用意した。

【0106】

次いで、96-ウェルマイクロプレートの各ウェルに濃度を異ならせて(0 $\mu\text{g/ml}$ ~ 300 $\mu\text{g/ml}$ のペプチド) KU-5878ペプチドを分注し、前記用意された各菌株を100 μL (1×10^5 CFU/ml)を入れて、混合して、37℃恒温器で1時間

反応させた。

【0107】

そして、TS寒天プレートに前記ペプチドと菌株との反応溶液を10μlずつ一定の大きさに塗抹し、37℃恒温器で18時間培養した後、プレートでコロニーの生成を確認した。バクテリア殺菌最小濃度はコロニーがたった1つも生成されないペプチドの最小濃度と定義し、実験結果は下記表2の通りである。

【0108】

一方、下記表2にて、多剤耐性緑膿菌、多剤耐性アシネトバクター、および多剤耐性クレブシエラは高麗大学アンアム病院の患者から分離した菌であって、多剤耐性緑膿菌の場合、ピペラシリン (piperacilin)、ピペラシリンタゾバクタム (piperacilin-tazobactam)、セフトジジム (ceftazidime)、イミペネム (imipenem)、メロペネム (meropenem)、ゲンタマイシン (gentamicin)、アミカシン (amikacin)、およびシプロフロキサシン (ciprofloxacin) 抗生剤に耐性を示し、多剤耐性アシネトバクターは、ピペラシリン、ピペラシリンタゾバクタム、セフトジジム、イミペネム、メロペネム、ゲンタマイシン、アミカシン、シプロフロキサシン、およびセフェピム (cefepime) 抗生剤に耐性を示し、多剤耐性クレブシエラは、ピペラシリンタゾバクタム、セフトジジム、セフェピム、イミペネム、ゲンタマイシン、およびシプロフロキサシン抗生剤に耐性を示すことを確認し、実験に用いた。

【0109】

10

20

30

40

50

【表 2】

グループ	敗血症と肺炎原因菌および多剤耐性菌	管理番号	KU-5878のMBC値 ($\mu\text{g/ml}$)
グラム陽性	黄色ブドウ状球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	100
	枯草菌 <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	90
	エンテロコッカスフェシウム (腸内球菌) <i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434	85
	ストレプトマイセスシンデネンシス <i>Streptomyces sindenensis</i>	ATCC 12392	95
	エンテロコッカスフェカリス <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	85
	ストレプトコッカスニューモニエ <i>Streptococcus pneumoniae</i>	NCCP 14585	100
グラム陰性	大腸菌 <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	85
	クレブシエラニューモニエ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	100
	アシネトバクターバウマニ <i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	100
	緑膿菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	100
	エンテロバクターアエロゲネス <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	90
多剤耐性菌	メチシリン耐性黄色ブドウ状球菌 methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	ATCC 33591	100
	多剤耐性緑膿菌 multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i>	-	110
	多剤耐性アシネトバクターバウマニ multidrug-resistant <i>A. baumannii</i>	-	110
	多剤耐性クレブシエラニューモニエ multidrug-resistant <i>K. pneumoniae</i>	-	100
	バンコマイシン耐性エンテロコッカス フェシウム vancomycin-resistant <i>E. faecium</i>	NCCP 11522	100
	バンコマイシン耐性黄色ブドウ状球菌 vancomycin-resistant <i>S. aureus</i>	NCCP 15872	120

【0110】

前記表 2 から確認できるように、KU-5878 は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および多剤耐性バクテリアのすべてで広範囲な抗菌活性を示すことが分かった。

【0111】

2-2. 公知の抗菌ペプチドと KU-5878 の抗菌活性の比較確認

In vitro における抗菌活性を確認した KU-5878 ペプチドが in vivo、特に動物の血管内での細菌に対する殺菌力を効果的に発揮するかを確認するために、グラム陽性菌としては黄色ブドウ状球菌、グラム陰性菌としては緑膿菌、多剤耐性菌としてはメチシリン耐性黄色ブドウ状球菌および多剤耐性緑膿菌を代表に選定して、下記の実験

を行った。

【0112】

具体的には、黄色ブドウ状球菌、メチシリン耐性黄色ブドウ状球菌、緑膿菌、または多剤耐性緑膿菌を3% (w/v) TSB液体培地に37℃、200rpmの条件で4時間培養した後、再度同一の条件で 5×10^9 CFU/mlの濃度となるように3時間2次培養した。前記2次培養した各菌株の最終濃度が 1×10^5 CFU/μlの濃度となるようにPBS溶液で希釈して菌株溶液を用意した。

【0113】

次いで、10週齢の雄マウス (C57BL/6) の尾静脈に各菌株100μlを静脈注射 (IV、Intravenous Injection) を実施した。1時間後にKU-5878を10mg/kgの濃度で静脈注射した。対照群としてはPBSを、陽性対照群としてはLL-37、マガイニン2、またはダプトマイシンをそれぞれ10mg/kgの濃度で静脈注射した。

【0114】

各薬物の静脈注射後40分後にマウスの尾の端の約1cmになる地点を手術用ハサミを用いて切断し、切断面の端の血液の10μlを採取してPBSで希釈させた。希釈させた血液サンプルは予め用意したTSB寒天プレートに塗抹し、37℃恒温器で18時間培養した後、生成されたコロニーを計数して比較した。

【0115】

その結果、図1および図2に示すように、マウス血管に残存するバクテリア数は薬物の静脈注射によって減少し、KU-5878の投与時に最も大きく減少することが分かった。上記から、KU-5878が抗菌活性を有することが公知のLL-37、マガイニン2、およびダプトマイシンより著しく優れた抗菌活性を示すことが分かった。

【0116】

2-3. 公知の抗生剤とKU-5878の抗菌活性の比較確認

前記実施例2-2に続き、in vivoにおけるKU-5878ペプチドの抗菌活性を確認するために、グラム陽性菌としては黄色ブドウ状球菌、グラム陰性菌としては緑膿菌、クレブシエラニューモニエ、およびアシネトバクターバウマニ、多剤耐性菌としては多剤耐性緑膿菌、メチシリン耐性黄色ブドウ状球菌、多剤耐性クレブシエラニューモニエ、多剤耐性アシネトバクターバウマニを選定して、下記の実験を行った。

【0117】

実験方法は前記実施例2-2の通りである。ただし、マウスに投与する各菌株の最終濃度は下記表3の通りであり、陽性対照群はマウスに前記各細菌を注射し、24時間経過後にカルバペネム系抗生物質であるイミペネム30mg/kgを腹腔注射 (IP、Intraperitoneal injection) し、以後、12時間間隔で計4回同量のイミペネムを腹腔投与した。各対照群と実験群の生存率を24時間間隔で測定した。

【0118】

10

20

30

40

50

【表 3】

細菌	最終濃度 (CFU)
黄色ブドウ状球菌	1×10^8
緑膿菌	2×10^7
クレブシエラニューモニエ	8×10^8
アシネトバクターバウマニ	4×10^8
メチシリン耐性黄色ブドウ状球菌	3×10^8
多剤耐性緑膿菌	8×10^7
多剤耐性アシネトバクターバウマニ	5×10^8
多剤耐性クレブシエラニューモニエ	8×10^8

10

【0119】

その結果、図3から確認されるように、グラム陽性またはグラム陰性バクテリアのみを注射したマウスの生存率は0-20%、KU-5878を注射したマウスの場合は60%、イミペネムを注射したマウスは約60-80%の生存率を示した。また、図4から確認できるように、多剤耐性バクテリアのみ注射したマウスは0-7%、KU-5878を注射したマウスの場合は60-67%、イミペネムを注射したマウスは7-27%の生存率を示した。

20

【0120】

実施例3. KU-5878の毒性の確認

前記実施例1および2でグラム陽性、グラム陰性、および多剤耐性細菌に対する殺菌力を確認したRomo1タンパク質の52-79アミノ酸領域またはその一部領域を含むペプチドが個体に適用可能であることを確認するために、その毒性を測定しようとした。以下の実験では、前記表1に示した合成ペプチドのうちKU-5878を代表に選定して、その毒性を確認した。

30

【0121】

3-1. 血管内皮細胞由来ヒューベック細胞 (HUV EC cells) に対する毒性の確認

ヒトの血管内皮細胞由来細胞株であるヒューベック細胞を96-ウェルマイクロプレートに培養し、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 試薬は2mg/mlの濃度でPBSに溶かした後、0.2 μm membrane filterで滅菌濾過して用意した。対照群としてPBSを使用した。

40

【0122】

ヒューベック細胞培地を新たに切り替え、KU-5878、メリチン、またはマガイニン2を濃度を異ならせて(0 μg/ml~300 μg/ml)分注した。次いで、各ウェルにMTT試薬を100 μl処理し、37℃で2時間恒温反応させた。次いで、細胞が分離されないように注意深く培地およびペプチドを除去し、DMSO (Dimethyl sulfoxide) 100 μlを添加し、分光光度計で570 nmの波長で吸光度を測定した。相対的細胞生存度を、対照群である非処理細胞の生存度の百分率として計算した。

【0123】

その結果、図5から確認されるように、KU-5878はヒューベック細胞において非常に低い毒性を示すことが分かった。

50

【0124】

3-2. 赤血球に対する毒性の確認

血液赤血球をPBSで希釈した後、900gで10分間3回繰り返し遠心分離して洗浄した。前記希釈した赤血球溶液（10% v/v PBS）を96-ウェルマイクロプレートに100μlずつ分注し、KU-5878、KU-5878-K4、KU-5878-K4-D、メリチン、マガイニン2、またはダプトマイシンを添加し、200μlとなるようにPBSで満たして、37℃のインキュベーション（incubation）で1時間培養して反応させた。次いで、前記反応溶液の上層液を分離し、分光光度計を用いて550nmの波長で吸光度を測定した。対照群としてPBSと0.1%トリトンX-100（Triton X-100）溶液を使用した。

10

【0125】

前記吸光度の測定結果に基づき、下記の数式1により赤血球細胞の破壊程度を計算して、その結果を図6に示した。

【0126】

【数1】

$$\% \text{ intact RBC} = 100 (\%) - [(\text{ペプチド処理赤血球溶液の吸光度} - \text{PBS処理赤血球溶液の吸光度}) / (\text{トリトンX-100処理赤血球溶液} - \text{PBS処理赤血球溶液の吸光度}) \times 100 (\%)]$$

20

【0127】

その結果、図6から確認されるように、KU-5878は、高い濃度でも溶血現象がほとんど現れないことを確認した。KU-5878と同じく、KU-5878-K4およびKU-5878-K4-Dも、マガイニン2、ダプトマイシン、およびメリチンと比較して赤血球の溶血現象がほとんど現れないことから、赤血球に対する毒性が非常に低いことが分かった。

【0128】

3-3. in vivoにおける毒性の確認

30

In vitroにおける無毒性を確認したKU-5878ペプチドがin vivo、特に動物（個体）の血管に注射した時、個体に毒性を呈しないかを確認するために、10週齢の雄マウス（C57BL/6）の尾静脈にKU-5878を100mg/kgの濃度で投与した。この時、注射用量の最大体積は150μlであった。注射後1時間マウスの行動を観察し、以後、24時間間隔で12日間マウスの体重変化を測定した。

【0129】

その結果、KU-5878を投与したマウスはすべて生存し、図7に示すように、KU-5878はマウスの体重には全く影響を与えないことを確認することができた。

【0130】

実施例4. KU-5878を構成する一部のアミノ酸が置換されたペプチドの抗菌活性の確認

40

4-1. 配列番号16のアミノ酸配列を含むKU-5878変異体の抗菌活性の確認

次いで、より抗菌活性に優れたペプチドを探索するために、KU-5878の親水性残基を含むアミノ酸を正電荷を含んでいるリシン（K）またはアルギニン（R）に置換した後、その変異体の抗菌活性をバクテリア殺菌最小濃度測定法を利用して比較確認した。実験は前記実施例1と同様の方法で行った。KU-5878変異体の具体的な情報および各細菌に対するMBC値は下記表4に示した。

【0131】

50

【表 4】

配列 番号	ペプチド	アミノ酸配列	黄色ブドウ 球菌の MBC 値 ($\mu\text{g/ml}$)	緑膿菌の MBC 値 ($\mu\text{g/ml}$)	メチシリ ン耐性黄 色ブドウ 球菌の MBC 値 ($\mu\text{g/ml}$)	多剤耐性 緑膿菌の MBC 値 ($\mu\text{g/ml}$)
13	KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMIR	100	100	100	110
17	KU-5878- T59K	KKMMQSGGTFGTFMAIGMIR	40	50	45	45
18	KU-5878- Q62K	KTMMKSGGTFGTFMAIGMIR	80	90	85	90
19	KU-5878- S63K	KTMMQKGGTFGTFMAIGMIR	50	60	60	60
20	KU-5878- T66K	KTMMQSGGKFGTFMAIGMIR	60	80	70	80
21	KU-5878- T69K	KTMMQSGGTFGKFMAIGMIR	130	140	150	150
22	KU-5878- K2 (T59K, Q62K)	KKMMKSGGTFGTFMAIGMIR	8	8	8	8
23	KU-5878- K3 (T59K, Q62K, S63K)	KKMMKKGTFGTFMAIGMIR	4	4	5	4
24	KU-5878- K4 (T59K, Q62K, S63K, T66K)	KKMMKKGKFGTFMAIGMIR	3	4	5	5
25	KU-5878- K58R	RTMMQSGGTFGTFMAIGMIR	120	120	130	120
26	KU-5878- K58A	ATMMQSGGTFGTFMAIGMIR	>300	>300	>300	>300
27	KU-5878- T59R	KRMMQSGGTFGTFMAIGMIR	25	30	30	35
28	KU-5878- R78A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMIA	>300	>300	>300	>300
29	KU-5878- R78K	KTMMQSGGTFGTFMAIGMIK	>300	>300	>300	>300

【0132】

前記表 4 から確認できるように、R o m o 1 タンパク質の 59、62、63、または 66 番目アミノ酸をリシンに置換したペプチドと 59 番目アミノ酸をアルギニンに置換したペプチドが、K U - 5878 より抗菌活性に優れていることが分かった。また、R o m o 1 タンパク質の 58 番目アミノ酸をアルギニンに置換した K U - 5878 変異体も、K U - 5878 と類似の抗菌活性を示すことが分かった。上記の結果から、R o m o 1 タンパク質の α -h e l i x 2 領域における親水性アミノ酸を正電荷を含んでいるアミノ酸、特にリシン (K) またはアルギニン (R) に置換する場合も、類似の抗菌活性を示すか、より優れた抗菌活性を示すことができることが分かる。

【0133】

上記の結果から、Romolタンパク質の α -helix2領域における親水性アミノ酸を正電荷を含んでいるアミノ酸、特にリシン（K）またはアルギニン（R）に置換する場合も、類似の抗菌活性を示すか、より優れた抗菌活性を示すことができることが分かる。

【0134】

4-2. KU-5878-K4の多様な細菌に対する抗菌活性の確認

前記実施例4-1で抗菌活性を確認したKU-5878変異体が殺菌力を発揮する細菌の種類を確認するために、前記表4に示したKU-5878変異体のうちKU-5878-K4を代表に選定して、下記表5に示した細菌に対する抗菌活性をバクテリア殺菌最小濃度測定法を利用して測定した。バクテリア殺菌最小濃度測定法は前記実施例1の方法と同様に行った。

【0135】

10

20

30

40

50

【表 5】

グループ	敗血症と肺炎原因菌および多剤耐性菌	管理番号	KU-5878-K4のMBC値 (μ g/ml)
グラム陽性	黄色ブドウ状球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	3
	枯草菌 <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	5
	エンテロコッカスフェシウム (腸内球菌) <i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 19434	5
	ストレプトマイセスシンデネンシス <i>Streptomyces sindenensis</i>	ATCC 12392	5
	エンテロコッカスフェカリス <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433	5
	ストレプトコッカスニューモニエ <i>Streptococcus pneumoniae</i>	NCCP 14585	4
グラム陰性	大腸菌 <i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	5
	クレブシエラニューモニエ <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 13883	5
	アシネトバクターバウマニ <i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606	4
	緑膿菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	4
	エンテロバクターアエロゲネス <i>Enterobacter aerogenes</i>	ATCC 13048	5
多剤耐性菌	メチシリン耐性黄色ブドウ状球菌 methicillin-resistant <i>S. aureus</i>	ATCC 33591	5
	多剤耐性緑膿菌 multidrug-resistant <i>P. aeruginosa</i>	-	5
	多剤耐性アシネトバクターバウマニ multidrug-resistant <i>A. baumannii</i>	-	4
	多剤耐性クレブシエラニューモニエ multidrug-resistant <i>K. pneumoniae</i>	-	5
	バンコマイシン耐性エンテロコッカス フェシウム vancomycin-resistant <i>E. faecium</i>	NCCP 11522	5
	バンコマイシン耐性黄色ブドウ状球菌 vancomycin-resistant <i>S. aureus</i>	NCCP 15872	6

【0136】

前記表 5 から確認できるように、KU-5878-K4 は、グラム陽性菌、グラム陰性菌、および多剤耐性細菌のすべてで広範囲な抗菌活性を示すことが分かった。

【0137】

4-3. 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む KU-5878 変異体の抗菌活性の確認

前記実施例 4-1 で KU-5878 の親水性残基を正電荷を含むアミノ酸に置換する場合にも、その抗菌活性が維持されるか、より優れた抗菌活性を示すことを確認し、次いで、KU-5878 の疎水性残基を含み残基の構造が類似するメチオニン (M) またはイソロイシン (I) を親水性または残基の構造が異なるアミノ酸に置換した後、抗菌活性を殺

菌最小濃度測定法を利用して比較確認した。実験は前記実施例 1 と同様の方法で行った。
 KU-5878 変異体の具体的な情報および各細菌に対する M B C 値は下記表 6 に示した。

【0138】

【表 6】

配列 番号	ペプチド	アミノ酸配列	黄色ブドウ状 球菌の M B C 値 (μ g/ml)	緑膿菌の M B C 値 (μ g/ml)
31	KU-5878-M60A	KT <u>A</u> MQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300
32	KU-5878-I73A	KTMMQSGGTFGTFMA <u>A</u> GMGIR	>300	>300
33	KU-5878-I73K	KTMMQSGGTFGTFMA <u>K</u> GMGIR	>300	>300
34	KU-5878-I73W	KTMMQSGGTFGTFMA <u>W</u> GMGIR	300	300
35	KU-5878-I77A	KTMMQSGGTFGTFMAIGM <u>G</u> AR	>300	>300
36	KU-5878-I77K	KTMMQSGGTFGTFMAIGM <u>K</u> AR	>300	>300
37	KU-5878-I77T	KTMMQSGGTFGTFMAIGM <u>T</u> AR	>300	>300
38	KU-5878-I77G	KTMMQSGGTFGTFMAIGM <u>G</u> AR	90	80
39	KU-5878-4N1e	KT (N1e) (N1e) QSGGTFGTF (N1e) AIG (N1e)) GIR	90	110

【0139】

前記表 6 から確認できるように、KU-5878 において疎水性残基を含み残基の構造が類似するメチオニンまたはイソロイシンのうちの 1 個を親水性アミノ酸に置換した場合、抗菌活性が減少した。これに対し、メチオニンを類似の残基構造を有するノルロイシン (N1e) に置換する場合、抗菌活性の変化が大きくなかった。また、イソロイシンをグリシン (G) に置換する場合、抗菌活性が増加することが分かった。

【0140】

4-4. 配列番号 40 のアミノ酸配列を含む KU-5878 変異体の抗菌活性の確認

次いで、KU-5878 の抗菌活性に相応するか、それを上回る抗菌活性を有する KU-5878 変異体を探索するために、KU-5878 において疎水性残基を含むフェニルアラニン (F) を親水性または残基の構造が異なるアミノ酸に置換した後、抗菌活性を殺菌最小濃度測定法を利用して比較確認した。実験は前記実施例 1 と同様の方法で行った。KU-5878 変異体の具体的な情報および各細菌に対する M B C 値は下記表 7 に示した。

【0141】

10

20

30

40

50

【表 7】

配列 番号	ペプチド	アミノ酸配列	黄色ブドウ状 球菌の MBC 値 ($\mu\text{g/ml}$)	緑膿菌の MBC 値 ($\mu\text{g/ml}$)
41	KU-5878-F67A	KTMMQSGGTAGTFMAIGMGIR	>300	>300
42	KU-5878-F67W	KTMMQSGGTWGTfMAIGMGIR	80	80
43	KU-5878-F70K	KTMMQSGGTAGTKMAIGMGIR	>300	>300
44	KU-5878-F70W	KTMMQSGGTAGTWMAIGMGIR	300	300

10

【0142】

その結果、表 7 から確認できるように、KU-5878 において疎水性残基を含む 67 番フェニルアラニンに類似の残基構造を有するトリプトファンに置換する場合、抗菌活性が増加することが分かった。

【0143】

4-5. 配列番号 45 のアミノ酸配列を含む KU-5878 変異体の抗菌活性の確認

前記実施例 4-4 に続き、KU-5878 においてアラニン (A) またはグリシン (G) をそれぞれグリシンまたはアラニンに置換した後、抗菌活性を殺菌最小濃度測定法を利用して比較確認した。実験は前記実施例 1 と同様の方法で行った。KU-5878 変異体の具体的な情報および各細菌に対する MBC 値は下記表 8 に示した。

20

【0144】

【表 8】

配列 番号	ペプチド	アミノ酸配列	黄色ブドウ状 球菌の MBC 値 ($\mu\text{g/ml}$)	緑膿菌の MBC 値 ($\mu\text{g/ml}$)
46	KU-5878-A72G	KTMMQSGGTFGTFMGIGMGIR	350	350
47	KU-5878-G76A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMAIR	>400	>400

30

【0145】

その結果、前記表 8 から確認できるように、KU-5878 においてアラニンをグリシンに置換またはグリシンをアラニンに置換したペプチドは抗菌活性を示してはいるものの、KU-5878 と比較して減少した抗菌活性を示すことが分かった。

【0146】

4-6. KU-5878 および KU-5878-K4 を構成するアミノ酸の一部または全部を D-型アミノ酸に置換したペプチドの抗菌活性の確認

前記実施例 1~5 に続き、KU-5878 および KU-5878-K4 を構成するアミノ酸を D-型アミノ酸に置換したペプチド (KU-5878-D (all) および KU-5878-K4-D) を合成してその抗菌活性を比較確認した。KU-5878-K4-D は、KU-5878-K4 において 59 番、62 番、63 番、66 番リシンアミノ酸残基を D-形態のアミノ酸に置換したペプチドであり、KU-5878-D (all) は、KU-5878 のすべてのアミノ酸を D-形態のアミノ酸に置換したペプチドである。

40

【0147】

ウシ血清 (bovine serum) の有無を異ならせて、前記実施例 1 の方法と同

50

様に各ペプチドの殺菌最初濃度の測定を行って、その結果を下記表 9 に示した。

【 0 1 4 8 】

【表 9】

ペプチドの種類	ウシ血清X		ウシ血清0	
	黄色ブドウ状球菌のMBC値 ($\mu\text{g/ml}$)	緑膿菌のMBC値 ($\mu\text{g/ml}$)	黄色ブドウ状球菌のMBC値 ($\mu\text{g/ml}$)	緑膿菌のMBC値 ($\mu\text{g/ml}$)
KU-5878	100	100	300	300
KU-5878-D (all)	300	300	>500	>500
KU-5878-K4	3	4	40	32
KU-5878-K4-D	3	3	25	20

10

【 0 1 4 9 】

前記表 9 から確認できるように、ウシ血清を追加した抗菌活性実験で KU-5878 と KU-5878-K4 は抗菌活性が低くなったが、KU-5878-K4-D の場合、KU-5878-K4 と比較して抗菌活性の減少幅が少ないことが分かった。

20

【 0 1 5 0 】

実施例 5. KU-5878 を構成する一部のアミノ酸が変異したペプチドの抗菌活性の確認

KU-5878 の優れた抗菌活性とより高い安定性を有するペプチドを探索するために、KU-5878 の C-末端をアミデーション (amidation) 後、ペプチドの抗菌活性をバクテリア殺菌最小濃度測定法を利用して比較確認した。実験は前記実施例 1 と同様の方法で行った。KU-5878 変異体の具体的な情報および各細菌に対する MBC 値は下記表 10 に示した。

30

【 0 1 5 1 】

【表 10】

ペプチド	アミノ酸配列	黄色ブドウ状球菌のMBC値 ($\mu\text{g/ml}$)	緑膿菌のMBC値 ($\mu\text{g/ml}$)
KU-5878-NH ₂	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	70	60

40

【 0 1 5 2 】

前記表 10 から確認できるように、KU-5878 の末端が変異したペプチドの場合、抗菌活性が増加することが分かった。

【 0 1 5 3 】

実施例 6. KU-5878 において 1 個のアミノ酸が欠損したペプチドの抗菌活性評価
KU-5878 (配列番号 13) のアミノ酸配列に対して 1 個のアミノ酸を欠損させた変異体を作製し、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 11 に開示されている。

【 0 1 5 4 】

その結果、KU05878 のアミノ酸の順序を 58 番～78 番にすれば、60、61、62、64、65、66、68、74、75、または 76 番目アミノ酸が欠損した場合、

50

抗菌活性が増加した。同一のアミノ酸が連続していることを考慮すれば、61番目のMの欠損は60番目のMの欠損と同一であり、65番目のGの欠損は64番目のGの欠損と同一である。

【0155】

配列番号13を基準とすれば、3、4、5、7、8、9、11、17、18、または19番目アミノ酸が欠損した場合、抗菌活性が増加した。

【0156】

【表11】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	100	
5878-d58K	-TMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	300	300	300	>300	
5878-d59T	K-MMQSGGTFGTFMAIGMGIR	150	150	150	150	
5878-d60M	KT-MQSGGTFGTFMAIGMGIR	90	90	90	100	0
5878-d61M	KTM-QSGGTFGTFMAIGMGIR	90	90	90	100	0
5878-d62Q	KTMM-SGGTFGTFMAIGMGIR	100	90	100	100	0
5878-d63S	KTMMQ-GGTFGTFMAIGMGIR	200	200	200	200	
5878-d64G	KTMMQS-GTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	100	0
5878-d65G	KTMMQSG-TFGTFMAIGMGIR	100	100	110	100	0
5878-d66T	KTMMQSGG-FGTFMAIGMGIR	90	90	100	90	0
5878-d67F	KTMMQSGGT-GTFMAIGMGIR	200	200	200	200	
5878-d68G	KTMMQSGGT-FMAIGMGIR	25	20	18	25	0
5878-d69T	KTMMQSGGTG-FMAIGMGIR	120	120	140	140	
5878-d70F	KTMMQSGGTFGT-MAIGMGIR	200	200	200	200	
5878-d71M	KTMMQSGGTGTF-AIGMGIR	250	250	300	300	
5878-d72A	KTMMQSGGTGTFM-IGMGIR	150	150	170	160	
5878-d73I	KTMMQSGGTGTFMA-GMGIR	>300	>300	>300	>300	
5878-d74G	KTMMQSGGTGTFMAI-MGIR	20	25	30	25	0
5878-d75M	KTMMQSGGTGTFMAIG-GIR	100	100	100	110	0
5878-d76G	KTMMQSGGTGTFMAIGM-IR	80	70	90	90	0
5878-d77I	KTMMQSGGTGTFMAIGM-R	>300	>300	>300	>300	
5878-d78R	KTMMQSGGTGTFMAIGMI-	300	300	>300	>300	

【0157】

実施例7. KU-5878において2個以上のアミノ酸が欠損したペプチドの抗菌活性評価

KU-5878（配列番号13）のアミノ酸配列に対して1つのアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表12に開示されている。

【0158】

60番目のM、64番目のGを欠損させた場合を除いて大部分抗菌活性が低下した。同一のアミノ酸が連続していることを考慮すれば、60番目のMの欠損は61番目のMの欠

損と同一であり、64番目のGの欠損は65番目のGの欠損と同一である。

【0159】

配列番号13を基準とすれば、3または4番目アミノ酸が欠損し、7または8番目アミノ酸が欠損した場合、抗菌活性が増加した。

【0160】

【表12】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状 球菌	CRPA	MRSA	
5878-d60M, d64G	KT-MQS-GTFGTFMAIGMGIR	100	100	100	110	0
5878-d71M, d75M	KTMMQSGGTFGTGTF-AIG-GIR	300	250	300	300	
5878-d60M, d72A, d75M	KT-MQSGGTFGTGTFM-IG-GIR	300	280	300	300	
5878-d64G, d71M, d76G	KTMMQS-GTFGTGTF-AIGM-IR	200	200	200	200	
5878-d60M, d64G, d72A, d75M	KT-MQS-GTFGTGTFM-IG-GIR	120	100	120	120	
5878-d60M, d64G, d71M, d72A, d75M	KT-MQS-GTFGTGTF- -IG-GIR	200	200	200	200	

10

20

【0161】

実施例8. KU-5878において1個のアミノ酸が置換されたペプチドの抗菌活性評価
KU-5878（配列番号13）のアミノ酸配列に対して1つのアミノ酸を置換させ、
抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表13に開示されている。

【0162】

配列番号13を基準とすれば、1番目アミノ酸KをRに置換、2番目アミノ酸TをKまたはRに置換、5番目アミノ酸QをKまたはRに置換、6番目アミノ酸SをK、R、またはHに置換、9番目アミノ酸TをKまたはRに置換、10番目アミノ酸FをWに置換、16番目アミノ酸IをLに置換、20番目アミノ酸IをGまたはLに置換した場合、抗菌活性が増加した。

30

【0163】

また、下記表13のKU-5878-4Nleを参照すれば、KU-5878の4個のメチオニンをすべてノルロイシン(Norleucine)に置換した結果、抗菌活性が改善されたことを確認した。これは、メチオニンとノルロイシンが硫黄が炭素に変更されたことを除けば、構造が同一であるためと推測される。

【0164】

40

50

【表 13-1】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状 球菌	CRPA	MRSA	
KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	110	
KU-5878-T59K	KKMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	50	40	50	50	0
KU-5878-Q62K	KTMMKSGGTFGTFMAIGMGIR	90	80	90	90	0
KU-5878-S63K	KTMMQKGGTFGTFMAIGMGIR	60	50	50	50	0
KU-5878-T66K	KTMMQSGGKFGTFMAIGMGIR	80	60	70	80	0
KU-5878-T69K	KTMMQSGGTFGKFMAIGMGIR	140	130	150	150	
KU-5878-T59R	KRMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	30	25	30	30	0
KU-5878-Q62R	KTMMRSGGTFGTFMAIGMGIR	80	80	80	90	0
KU-5878-S63R	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	20	15	20	25	0
KU-5878-T66R	KTMMQSGGRFGTFMAIGMGIR	80	90	80	90	0
KU-5878-T59H	KHMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-Q62H	KTMMHSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-S63H	KTMMQHGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	100	110	0
KU-5878-T66H	KTMMQSGGHFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T59S	KSMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-Q62S	KTMMSSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-S63T	KTMMQTGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T66S	KTMMQSGGSFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-K58A	ATMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T59A	KAMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	150	120	130	140	
KU-5878-Q62A	KTMMASGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-S63A	KTMMQAGGTFGTFMAIGMGIR	300	300	300	>300	
KU-5878-T66A	KTMMQSGGAFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-T69A	KTMMQSGGTFGAFMAIGMGIR	300	300	300	300	
KU-5878-K58R	RTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	120	120	120	120	
KU-5878-K58A	ATMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-R78A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIA	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-R78K	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIK	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-M60A	KTAMQSGGTFGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I73A	KTMMQSGGTFGTFMAAGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I73K	KTMMQSGGTFGTFMAKGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I73W	KTMMQSGGTFGTFMAWGMGIR	300	300	300	>300	
KU-5878-I77A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGAR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I77K	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGKR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-I77T	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGTR	>300	>300	>300	>300	

10

20

30

40

50

【表 13-2】

KU-5878-177G	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGGR	80	90	100	90	0
KU-5878-4N1e	KT (N1e) (N1e) QSGGTFGTF (N1e) AIG (N1e) GIR	110	90	100	100	0
KU-5878-F67A	KTMMQSGGTAGTFMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-F67W	KTMMQSGGTWGTGTFMAIGMGIR	80	80	80	90	0
KU-5878-F70K	KTMMQSGGTFGTKMAIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-F70W	KTMMQSGGTFGTWMAIGMGIR	300	300	300	>300	
KU-5878-A72G	KTMMQSGGTFGTFMGIGMGIR	>300	>300	>300	>300	
KU-5878-G76A	KTMMQSGGTFGTFMAIGMAIR	>300	>300	>300	>300	

10

【0165】

実施例 9. KU-5878 において 59 番アミノ酸置換に基づく多置換ペプチドの抗菌活性の確認

U-5878-T59K アミノ酸配列に対して Q62K、S63K、T66K の置換を順次に追加し、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 14 に開示されている。

20

前記 T59K、Q62K、S63K、T66K の置換位置は、配列番号 13 を基準として 2、5、6、9 番目アミノ酸に相当する。

【0166】

【表 14】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
KU-5878	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	100	100	110	110	
KU-5878-T59K	KKMMQSGGTFGTFMAIGMGIR	50	40	50	50	0
KU-5878-K2 (T59K, Q62K)	KKMMKSGGTFGTFMAIGMGIR	8	8	6	8	0
KU-5878-K3 (T59K, Q62K, S63K)	KKMMKGGGTFGTFMAIGMGIR	4	4	4	5	0
KU-5878-K4 (T59K, Q62K, S63K, T66K)	KKMMKGGGKFGTFMAIGMGIR	4	3	3	4	0

30

40

【0167】

実施例 10. C 末端にアミノ酸配列追加された KU-5878 の抗菌活性の確認

KU-5878 の C 末端にアミノ酸の繰り返し配列を追加し、抗菌活性度を評価した。下記表 15 によれば、KU-5878 の C 末端に R (arginine) 繰り返し配列または K (lysine) 配列を付加すると抗菌活性が増加した。

【0168】

50

【表 15】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
5878-3R	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGI ~~RRRR~~	8	8	8	10	0
5878-KK	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGI ~~RKK~~	15	16	16	16	0
5878-Q	KTMMQSGGTFGTFMAIGMGI ~~RQ~~	150	180	180	180	

10

【0169】

実施例 11. KU-5878-K4 変異体の抗菌活性の確認

KU-5878 の配列において T59K、Q62K、S63K、および T66K の変異を有する KU-5878-K4 に基づくアミノ酸変異時、抗菌活性の変化を確認した。KU-5878-K4 は以下に K4 と略称することができる。

【0170】

K4 の配列は配列番号 24 に開示されている。下記表 16 にて、K4-K58T は、配列番号 24 における 1 番目アミノ酸が T に置換されたペプチドを意味し、K4-4MI は、K4 の配列に存在する 4 個のメチオニンのすべてがイソロイシンに置換されたペプチドを意味し、K4-T69G は、配列番号 24 における 12 番目アミノ酸が G に置換されたペプチドを意味する。これらはすべて KU-5878 より抗菌活性が高かった。

20

【0171】

【表 16】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
K4-K58T	TKMMKGGKFGTFMAIGMGI ~~R~~	3	3	3	4	0
K4-4MI	KKI ~~IK~~ GGKFGTFIAIGIGIR	3	2	3	3	0
K4-T69G	KKMMKGGKFGGFMAIGMGI ~~R~~	2	2	2	3	0

30

【0172】

実施例 12. 1 個のアミノ酸が欠損した K4 ペプチドの抗菌活性

K4 のアミノ酸配列に対して 1 つのアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 17 に開示されている。

【0173】

下記表 17 によれば、配列番号 24 の 1 番目～12 番目アミノ酸、14～15 番目アミノ酸、17～21 番目アミノ酸のうちの 1 つのアミノ酸が欠損した場合、5878 より抗菌活性が高かった。

40

【0174】

50

【表 17】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状 球菌	CRPA	MRSA	
5878-K4-d58K (=d59K)	-KMMKGGKFGTFMAIGMIR	2	6	6	2	0
5878-K4-d60M (=d61M)	KK-MKGGKFGTFMAIGMIR	2	3	4	2	0
5878-K4-d62K (=d63K)	KKMM-KGGKFGTFMAIGMIR	2	6	6	6	0
5878-K4-d64G (=d65G)	KKMMKK-KGFGTFMAIGMIR	2	2	4	2	0
5878-K4-d66K	KKMMKGGG-FGTFMAIGMIR	4	6	4	4	0
5878-K4-d67F	KKMMKGGK-GTFMAIGMIR	4	6	5	4	0
5878-K4-d68G	KKMMKGGKF-TFMAIGMIR	4	4	6	4	0
5878-K4-d69T	KKMMKGGKFG-FMAIGMIR	4	2	3	2	0
5878 K4-d70F	KKMMKGGKFGT-MAIGMIR	100	140	160	110	
5878-K4-d71M	KKMMKGGKFGTF-AIGMIR	2	4	6	4	0
5878-K4-d72A	KKMMKGGKFGTFM-IGMIR	2	2	4	3	0
5878-K4-d73I	KKMMKGGKFGTFMA-GMIR	300	300	>300	>300	
5878-K4-d74G	KKMMKGGKFGTFMAI-MGIR	2	2	4	3	0
5878-K4-d75M	KKMMKGGKFGTFMAIG-GIR	2	2	4	2	0
5878-K4-d76G	KKMMKGGKFGTFMAIGM-IR	4	4	4	4	0
5878-K4-d77I	KKMMKGGKFGTFMAIGM-R	4	7	6	4	0
5878-K4-78R	KKMMKGGKFGTFMAIGMI-	4	10	8	4	0

【0175】

実施例13. 2個のアミノ酸が欠損したK4ペプチドの抗菌活性

K4のアミノ酸配列に対して2個のアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表18に開示されている。

【0176】

下記表18によれば、配列番号24の14番目アミノ酸が欠損し、1～8、12、15、および18番目アミノ酸のいずれか1つのアミノ酸がさらに欠損した場合、5878より抗菌活性が高かった。

【0177】

10

20

30

40

50

【表 18】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
K4-d58K-d71M	-KMMKGGKFGTF-AIGMGIR	10	8	10	10	0
K4-d60M-d71M	KK-MKKGGKFGTF-AIGMGIR	10	10	10	12	0
K4-d62K-d71M	KKMM-KGGKFGTF-AIGMGIR	12	12	12	12	0
K4-d64G-d71M	KKMMKK-GKFGTF-AIGMGIR	15	15	18	18	0
K4-d69T-d71M	KKMMKGGKFG-F-AIGMGIR	10	10	12	12	0
K4-d71M-d72A	KKMMKGGKFGTF--IGMGIR	20	20	20	20	0
K4-d58K-d75M	-KMMKGGKFGTFMAIG-GIR	150	150	160	180	
K4-d60M-d75M	KK-MKKGGKFGTFMAIG-GIR	200	200	200	210	
K4-d71M-d75M	KKMMKGGKFGTF-AIG-GIR	4	3	4	5	0
K4-d72A-d75M	KKMMKGGKFGTFM-IG-GIR	200	200	200	200	

10

【0178】

実施例 14. 3 個のアミノ酸が欠損した K4 ペプチドの抗菌活性

K4 のアミノ酸配列に対して 3 個のアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 19 に開示されており、5878 より抗菌活性が高かった。

【0179】

【表 19】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
d 58K 60M 75M	-K-MKKGGKFGTFMAIG-GIR	6	6	8	8	0
d 60M 71M 72A	KK-MKKGGKFGTF--IGMGIR	8	8	8	10	0
d 69T 71M 72A	KKMMKGGKFG-F--IGMGIR	2	2	3	4	0
d 60M 71M 75M	KK-MKKGGKFGTF-AIG-GIR	2	2	3	2	0
d 71M 72A 75M	KKMMKGGKFGTF--IG-GIR	2	3	2	3	0
d 58K 71M 75M	-KMMKGGKFGTF-AIG-GIR	4	3	2	4	0
d 62K 71M 75M	KKMM-KGGKFGTF-AIG-GIR	3	4	4	3	0
d 64G 71M 75M	KKMMKK-GKFGTF-AIG-GIR	2	3	3	3	0
d 69T 71M 75M	KKMMKGGKFG-F-AIG-GIR	2	2	3	2	0

30

40

【0180】

実施例 15. 4 個のアミノ酸が欠損した K4 ペプチドの抗菌活性

K4 のアミノ酸配列に対して 4 個のアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 20 に開示されている。

【0181】

50

【表 2 0】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状 球菌	CRPA	MRSA	
d 58K 60M 71M 72A	-K-MKGGKFGTF--IGMGIR	20	15	20	20	0
d 58K 64G 71M 72A	-KMMKK-GKFGTF--IGMGIR	8	8	8	10	0
d 58K 64G 72A 75M	-KMMKK-GKFGTFM-IG-GIR	6	6	8	8	0
d 62K 68G 72A 75M	KKMM-KGGKF-TFM-IG-GIR	1	1	2	3	0
d 60M 61M 71M 75M	KK--KGGKFGTF-AIG-GIR	2	1	2	2	0
d 60M 62K 71M 75M	KK-M-KGGKFGTF-AIG-GIR	2	2	3	3	0
d 60M 64G 71M 75M	KK-MKK-GKFGTF-AIG-GIR	2	1	2	2	0
d 60M 71M 72A 75M	KK-MKGGKFGTF--IG-GIR	2	1	2	3	0
d 60M 69T 71M 75M	KK-MKGGKFG-F-AIG-GIR	2	1	2	2	0

10

【0 1 8 2】

20

実施例 1 6 . 5 個のアミノ酸が欠損した K 4 ペプチドの抗菌活性

K 4 のアミノ酸配列に対して 5 個のアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 2 1 に開示されている。

【0 1 8 3】

【表 2 1】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状 球菌	CRPA	MRSA	
d 58K 64G 69T 71M 72A	-KMMKK-GKFG-F--IGMGIR	2	2	3	3	0
d 62K 68G 71M 72A 75M	KKMM-KGGKF-TF--IG-GIR	20	20	20	25	0
d 58K 62K 68G 72A 75M	-KMM-KGGKF-TFM-IG-GIR	16	15	15	18	0
d 60M 62K 68G 72A 75M	KK-M-KGGKF-TFM-IG-GIR	4	4	4	5	0
d 62K 64G 68G 72A 75M	KKMM-K-GKF-TFM-IG-GIR	4	4	4	4	0
d 62K 68G 69T 72A 75M	KKMM-KGGKF--FM-IG-GIR	8	8	8	10	0
d 60M 61M 62K 71M 75M	KK---KGGKFGTF-AIG-GIR	80	80	80	80	0

30

【0 1 8 4】

40

実施例 1 7 . 6 個のアミノ酸が欠損した K 4 ペプチドの抗菌活性

K 4 のアミノ酸配列に対して 6 個のアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 2 2 に開示されている。

【0 1 8 5】

50

【表 2 2】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状 球菌	CRPA	MRSA	
d 58K 64G 69T 71M 72A 75M	-KMMKK-GKFG-F--IG-GIR	8	6	8	10	0
d 60M 61M 62K 64G 71M 75M	KK---K-GKFGTF-AIG-GIR	80	90	90	90	0
d 60M 61M 62K 69T 71M 75M	KK---KGGKFG-F-AIG-GIR	30	30	30	30	0
d 60M 61M 62K 71M 72A 75M	KK---KGGKFGTF--IG-GIR	100	100	110	120	

10

【0186】

実施例 18．7 個のアミノ酸が欠損した K 4 ペプチドの抗菌活性

K 4 のアミノ酸配列に対して 7 個のアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 2 3 に開示されている。

【0187】

【表 2 3】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状 球菌	CRPA	MRSA	
d 58K 62K 64G 69T 71M 72A 75M	-KMM-K-GKFG-F--IG-GIR	4	4	5	5	0
d 60M 61M 62K 64G 69T 71M 75M	KK---K-GKFG-F-AIG-GIR	15	16	16	16	0
d 60M 61M 62K 64G 71M 72A 75M	KK---K-GKFGTF--IG-GIR	100	100	100	100	
d 60M 61M 62K 69T 71M 72A 75M	KK---KGGKFG-F--IG-GIR	90	100	100	100	

30

40

【0188】

実施例 19．8 個のアミノ酸が欠損した K 4 ペプチドの抗菌活性

K 4 のアミノ酸配列に対して 8 個のアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 2 4 に開示されている。

【0189】

50

【表 2 4】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
d 58K 60M 62K 64G 69T 71M 72A 75M	-K-M-K-GKFG-F--IG-GIR	4	4	5	5	0
d 58K 60M 61M 62K 64G 71M 72A 75M	-K---K-GKFGTF--IG-GIR	8	12	10	12	0
d 58K 60M 61M 62K 64G 69T 71M 75M	-K---K-GKFG-F-AIG-GIR	4	8	6	8	0
d 58K 60M 61M 62K 69T 71M 72A 75M	-K---KGGKFG-F--IG-GIR	8	8	8	8	0
d 60M 61M 62K 64G 69T 71M 72A 75M	KK---K-GKFG-F--IG-GIR	2	3	4	4	0

10

20

【0190】

実施例 20. 9 個のアミノ酸が欠損した K 4 ペプチドの抗菌活性

K 4 のアミノ酸配列に対して 9 個のアミノ酸を欠損させ、抗菌活性を評価した。抗菌活性評価は下記表 2 5 に開示されている。

【0191】

【表 2 5】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				備考
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
d58K 60M 61M 62K 64G 69T 71M 72A 75M	-K---K-GKFG-F--IG-GIR	15	16	15	15	0

30

【0192】

実施例 21. ペギル化 (pegylation) された K 4 の抗菌活性の確認

4 個のアミノ酸が欠失した K 4 および 8 個のアミノ酸が欠失した K 4 をペギル化させ、抗菌活性を測定した。

40

【0193】

下記表 2 6 によれば、抗菌活性はペギル化前よりはやや減少したものの、5878 よりははるかに優れた抗菌活性を示すことを確認した。

【0194】

50

【表 2 6】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
PEG-K4-d62K68G72A75M	KKMM-KGGKF-TFM-IG-GIR	2	3	3	2	0
PEG-K4-d58K60M61M62K69T71M72A75M	K---KGGKFG-F--IG-GIR	30	32	32	32	0

10

【0195】

実施例 22. ステープルペプチドの抗菌活性

K4のアミノ酸配列に対して2番目アミノ酸をTに置換し（以下、K4-K59Tと称することができる）、抗菌活性を評価した。

【0196】

K4-K59Tは配列番号23のK3と比較すれば、2番目アミノ酸および9番目アミノ酸配列において差異がある他の配列である。下記表27にて、ステープル化（stapled）は、一対のアミノ酸がペンテニルアラニンまたはオクテニルアラニンに置換され、これらが互いに架橋結合した場合を意味する。stapled peptide-1は10および14番目アミノ酸対がペンテニルアラニン（S5と表示）に置換されて相互架橋結合したものであり、stapled peptide-2は14および18番目アミノ酸対がペンテニルアラニンに置換されて相互架橋結合したものである。

20

【0197】

K4-K59Tおよびステープル化されたK4-K59Tに対する抗菌活性評価は下記表27に開示されている。

【0198】

【表 2 7】

30

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC				活性 増加
		緑膿菌	黄色ブドウ状球菌	CRPA	MRSA	
5878-K3 (62, 63, 66)	KTMMKGGKFGTFMAIGMGIR	4	4	4	5	0
Stapled peptide-1	KTMMKGGKFGTF (S5) AIG (S5) GIR	2	3	3	3	0
Stapled peptide-2	KTMMKGGK (S5) GTF (S5) AIGMGIR	16	16	18	20	0

40

【0199】

実施例 23. C末端に配列が付加されたK4変異体の抗菌活性の確認

K4の2欠失変異体のC末端またはK4の4欠失変異体のC末端にRまたはKアミノ酸

50

を付加し、抗菌活性を測定した。下記表 28 によれば、R または K の単独または繰り返し配列が付加されたペプチドは抗菌活性が増加した。

【0200】

【表 28】

ペプチド名	アミノ酸配列	MBC			
		緑膿菌	黄色ブドウ状 球菌	CRPA	MRSA
K4-d71M75M	KKMMKKGGKFGTF-AIG-GIR	4	3	4	5
K4-d71M75M-R	KKMMKKGGKFGTF-AIG-GIRR	3	2	3	3
K4-d71M75M-K	KKMMKKGGKFGTF-AIG-GIRK	2	1	1	2
K4-d60M61M71M75M	KK--KKGGKFGTF-AIG-GIR	2	1	2	2
K4-d60M61M71M75M-RRR	KK--KKGGKFGTF-AIG-GIRRRR	2	1	1	2
K4-d60M61M71M75M-KKK	KK--KKGGKFGTF-AIG-GIRKKK	1	1	1	1
K4-d62K68G72A75M	KKMM-KGGKF-TFM-IG-GIR	1	1	2	3
K4-d62K68G72A75M-RRR	KKMM-KGGKF-TFM-IG-GIRRRR	1	1	2	2

10

20

30

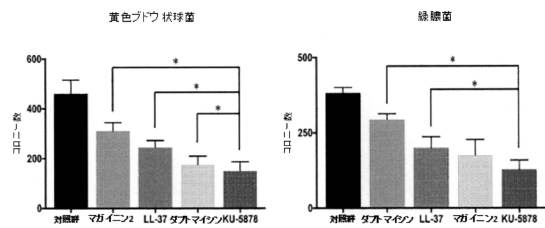
【0201】

以上、本発明の内容の特定部分を詳細に記述したが、当業界における通常の知識を有する者にとって、このような具体的な記述は単に好ましい実施態様に過ぎず、これによって本発明の範囲が限定されるものではないことは自明であろう。したがって、本発明の実質的な範囲は添付した請求項とそれらの等価物によって定義される。

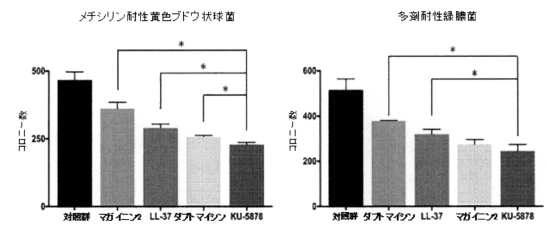
40

50

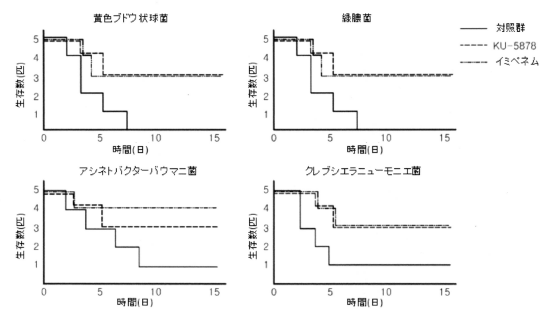
【図面】
【図 1】



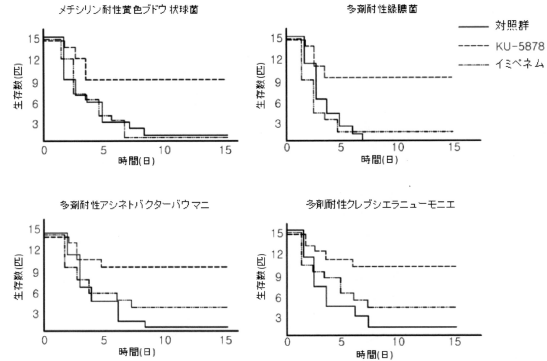
【図 2】



【図 3】

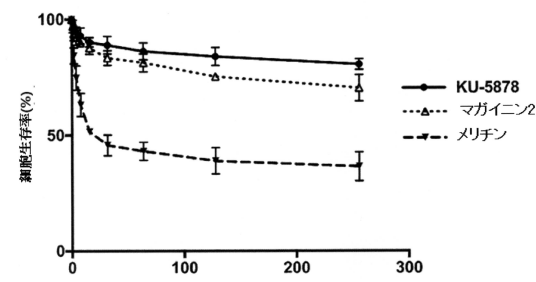


【図 4】

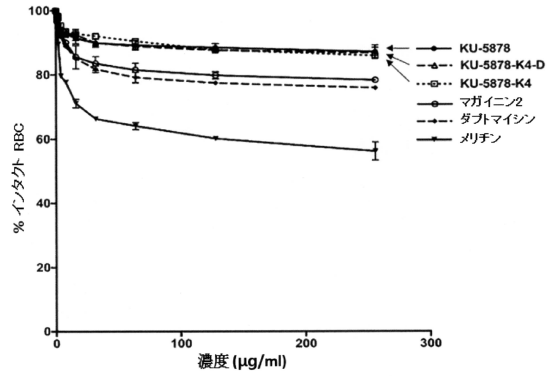


菌株	生存率 (%)		
	対照群	イミペネム (4回投与)	KU-5878 (1回投与)
メチシリン耐性黄色バクテリウム	7	7	60
多剤耐性バクテリウム	0	7	60
多剤耐性アシネトバクターバウマニ	7	27	67
多剤耐性クレブシエラニューモニエ	7	27	67

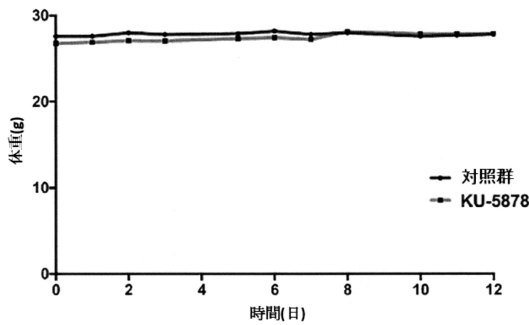
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0007315724000001.app

フロントページの続き

弁理士 阿部 達彦

(72)発明者 ユン・ド・ヨ

大韓民国・ソウル・06284・カンナムーグ・サムソンーロ・212・6-1401

(72)発明者 ヘ・ラ・イ

大韓民国・キョンギード・18379・ファソーンシ・ヨントンーロ・60・シンヨントン・ヒュンダイ・アパートメント・109-1103

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 韓国公開特許第10-2018-0123866 (KR, A)

国際公開第2017/109494 (WO, A1)

J. Cell. Biol., 2018年06月04日, Vol.217, No.6, pp.2059-2071

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

Caplus/REGISTRY (STN)