

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5643189号
(P5643189)

(45) 発行日 平成26年12月17日 (2014.12.17)

(24) 登録日 平成26年11月7日 (2014.11.7)

(51) Int. Cl.	F 1
A 6 1 K 38/44 (2006.01)	A 6 1 K 37/50
A 6 1 K 31/198 (2006.01)	A 6 1 K 31/198
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1

請求項の数 24 (全 69 頁)

(21) 出願番号	特願2011-508671 (P2011-508671)	(73) 特許権者	398040011
(86) (22) 出願日	平成21年5月7日 (2009.5.7)		エクソゼミス, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2011-519954 (P2011-519954A)		アメリカ合衆国, 7 2 2 0 1 - 4 4 1 8
(43) 公表日	平成23年7月14日 (2011.7.14)		アーカンソー, リトル ロック, スイート
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/043172		1 6 1 6, センター ストリート 1 1
(87) 国際公開番号	W02009/137697		1
(87) 国際公開日	平成21年11月12日 (2009.11.12)	(74) 代理人	100078282
審査請求日	平成24年3月8日 (2012.3.8)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	12/118, 586	(74) 代理人	100062409
(32) 優先日	平成20年5月9日 (2008.5.9)		弁理士 安村 高明
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113413
			弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミエロペルオキシダーゼの抗菌活性を増強するための組成物、およびそれらの使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミエロペルオキシダーゼ、過酸化水素生成オキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように相乗作用的組合せで作用するグリシンと、D-イソロイシン、L-チロシン、β-アラニン、D-バリン、L-イソロイシン、L-バリン、L-アスパラギン酸、D-アラニンメチルエステル、L-ロイシン、L-アラニン、L-グルタミン、L-リシン、L-ヒスチジン、D-アラニン、L-グルタミン酸、L-セリンおよびL-プロリンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸とを含む、標的微生物の増殖を阻害するための組成物であって、該ミエロペルオキシダーゼは、該標的微生物を選択的に結合し、殺滅するか、または、該標的微生物の増殖を阻害する、組成物。

10

【請求項 2】

過酸化水素をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物であって、該過酸化水素が、過酸化水素生成オキシダーゼに対する基質の存在下において該過酸化水素生成オキシダーゼによって生成される、組成物。

【請求項 3】

過酸化水素生成オキシダーゼを含み、該オキシダーゼが、該オキシダーゼに対する基質の存在下にある場合、毎分 ml 当たり 100 p モル～50 μ モルの過酸化水素を生成するのに有効である、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

1～50, 000 μ g / ml のミエロペルオキシダーゼを含む、請求項 1 に記載の組成

20

物。

【請求項 5】

0. 1～500 mMのグリシンおよび前記少なくとも1つのアミノ酸の各々を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

10～5, 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のミエロペルオキシダーゼ、0. 3～50 mMのグリシン、0. 3～50 mMのL-アラニン、0. 3～50 mMのL-プロリン、および1～500 U/ ml のグルコースオキシダーゼを含む、標的微生物の増殖を阻害するための組成物であって、該ミエロペルオキシダーゼは、該標的微生物を選択的に結合し、殺滅するか、または、該標的微生物の増殖を阻害する、組成物。

10

【請求項 7】

治療を必要とするヒト対象または動物対象における微生物感染を治療するための組成物であって、該組成物は、ミエロペルオキシダーゼ、ならびに、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように相乗作用的組合せで作用するグリシンと、D-イソロイシン、L-チロシン、 β -アラニン、D-バリン、L-イソロイシン、L-バリン、L-アスパラギン酸、D-アラニンメチルエステル、L-ロイシン、L-アラニン、L-グルタミン、L-リシン、L-ヒスチジン、D-アラニン、L-グルタミン酸、L-セリンおよびL-プロリンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸とを含み、そして、該対象における感染部位に投与されることを特徴とし、該ミエロペルオキシダーゼは、該ヒトまたは動物に感染する標的微生物を選択的に結合し、殺滅するか、または、該標的微生物の増殖を阻害する、組成物。

20

【請求項 8】

前記組成物が、過酸化水素をさらに含み、該過酸化水素が、過酸化物生成オキシダーゼに対する基質の存在下において該過酸化物生成オキシダーゼによって生成される、請求項7に記載の組成物。

【請求項 9】

前記組成物が過酸化物生成オキシダーゼを含み、該オキシダーゼが、該オキシダーゼに対する基質の存在下にある場合、毎分 ml 当たり100 pモル～50 μ モルの過酸化物を生成するのに有効である、請求項8に記載の組成物。

【請求項 10】

30

前記組成物が、1～50, 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のミエロペルオキシダーゼを含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項 11】

前記組成物が、0. 1～500 mMのグリシンおよび前記少なくとも1つのアミノ酸の各々を含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項 12】

前記組成物が、10～5, 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のミエロペルオキシダーゼ、0. 3～50 mMのグリシン、0. 3～50 mMのL-アラニン、0. 3～50 mMのL-プロリン、および1～500 U/ ml のグルコースオキシダーゼを含む、請求項7に記載の組成物。

【請求項 13】

40

前記ヒト対象または動物対象が、歯茎、眼、耳、皮膚、軟組織、創傷、膣領域、鼠径部領域、褥瘡、または火傷領域の微生物感染に罹患している、請求項7に記載の組成物。

【請求項 14】

前記感染が多菌感染である、請求項13に記載の組成物。

【請求項 15】

標的微生物を殺滅するかまたはそれらの増殖を阻害するための組成物であって、ミエロペルオキシダーゼ、過酸化物生成オキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように相乗作用的組合せで作用するグリシンと、D-イソロイシン、L-チロシン、 β -アラニン、D-バリン、L-イソロイシン、L-バリン、L-アスパラギン酸、D-アラニンメチルエステル、L-ロイシン、L-アラニン、L-グルタミン、L

50

ーリシン、L-ヒスチジン、D-アラニン、L-グルタミン酸、L-セリンおよびL-プロリンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸を含み、該ミエロペルオキシダーゼは、該標的微生物を選択的に結合し、殺滅するか、または、該標的微生物の増殖を阻害する、組成物。

【請求項16】

ヒト対象または動物対象における微生物感染を治療するための薬剤の製造における、ミエロペルオキシダーゼ、過酸化水素生成オキシダーゼ、グリシン、および、D-イソロイシン、L-チロシン、β-アラニン、D-バリン、L-イソロイシン、L-バリン、L-アスパラギン酸、D-アラニンメチルエステル、L-ロイシン、L-アラニン、L-グルタミン、L-リシン、L-ヒスチジン、D-アラニン、L-グルタミン酸、L-セリンおよびL-プロリンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸を含む組成物の使用であって、該アミノ酸が、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように相乗作用的組合せで作用し、該ミエロペルオキシダーゼは、該ヒトまたは動物に感染する標的微生物を選択的に結合し、殺滅するか、または、該標的微生物の増殖を阻害する使用。

10

【請求項17】

前記組成物が、過酸化水素をさらに含み、該過酸化水素が、過酸化水素生成オキシダーゼに対する基質の存在下において該過酸化水素生成オキシダーゼによって生成される、請求項16に記載の使用。

【請求項18】

20

前記組成物が過酸化水素生成オキシダーゼを含み、該オキシダーゼが、該オキシダーゼに対する基質の存在下にある場合、毎分ml当たり100pモル～50μモルの過酸化水素を生成するのに有効である、請求項17に記載の使用。

【請求項19】

前記組成物が、1～50,000μg/mlのミエロペルオキシダーゼを含む、請求項16に記載の使用。

【請求項20】

前記組成物が、0.1～500mMのグリシンおよび前記少なくとも1つのアミノ酸の各々を含む、請求項16に記載の使用。

【請求項21】

30

前記組成物が、10～5,000μg/mlのミエロペルオキシダーゼ、0.3～50mMのグリシン、0.3～50mMのL-アラニン、0.3～50mMのL-プロリン、および1～500U/mlのグルコースオキシダーゼを含む、請求項16に記載の使用。

【請求項22】

前記ヒト対象または動物対象が、歯茎、眼、耳、皮膚、軟組織、創傷、腔領域、鼠径部領域、褥瘡、または火傷領域の微生物感染に罹患している、請求項16に記載の使用。

【請求項23】

前記微生物感染が多菌感染である、請求項22に記載の使用。

【請求項24】

標的微生物を殺滅するかまたはそれらの増殖を阻害するための薬剤の製造における、ミエロペルオキシダーゼ、過酸化水素生成オキシダーゼ、グリシン、および、D-イソロイシン、L-チロシン、β-アラニン、D-バリン、L-イソロイシン、L-バリン、L-アスパラギン酸、D-アラニンメチルエステル、L-ロイシン、L-アラニン、L-グルタミン、L-リシン、L-ヒスチジン、D-アラニン、L-グルタミン酸、L-セリンおよびL-プロリンからなる群より選択される少なくとも1つのアミノ酸を含む組成物の使用であって、該アミノ酸が、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように相乗作用的組合せで作用し、該ミエロペルオキシダーゼは、該標的微生物を選択的に結合し、殺滅するか、または、該標的微生物の増殖を阻害する使用。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、微生物感染の阻害または治療のための方法および組成物に関する。より具体的に述べると、本発明は、系の殺菌特性を増強する、アミノ酸およびミエロペルオキシダーゼの組合せを用いる方法および組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

特許文献1および特許文献2で開示される通り、ミエロペルオキシダーゼは、標的微生物に選択的に結合し、過酸化物およびハロゲン化物の存在下において、望ましい微生物を除去したり、標的の微生物環境内にある宿主細胞および正常な微生物叢など、生息環境の他の構成要素を著明に損なったりすることなく、標的微生物の増殖を阻害するのに用いることができる。ミエロペルオキシダーゼは、既に、基質としての適切なハロゲン化物補因子(X^-)および過酸化水素と共に存在すると、天然の系において微生物殺滅活性を示すことが公知である(非特許文献1)。しかし、ミエロペルオキシダーゼ結合の選択的な性質、ならびに治療的適用、研究的適用、および産業的適用に対するこれらの系の有用性が認識されるようになったのは、ごく近年のことである。新たに発見された、ミエロペルオキシダーゼの選択的結合特性によれば、病原性微生物などの標的微生物が、ミエロペルオキシダーゼに対して、正常な微生物叢のメンバーなど、望ましい微生物の場合よりも大きな結合能を有する場合、その標的微生物はミエロペルオキシダーゼに選択的に結合し、望ましい微生物によるミエロペルオキシダーゼに対する結合はほとんどまたは全く生じない。過酸化物およびハロゲン化物の存在下において、標的に結合したミエロペルオキシダーゼは、標的微生物の表面において、ハロゲン化物の酸化を触媒し、過酸化物が一重項酸素分子(1O_2)へと不均化することを促進し、その結果、望ましい微生物または生理学的生息環境に対する付随的な損傷を最小限としながら、標的微生物の選択的な殺滅をもたらす。したがって、特許文献1および特許文献2で開示される通り、ミエロペルオキシダーゼは、ヒト対象または動物対象の治療的処置または予防的処置において、宿主細胞および該宿主の正常な微生物叢に対する付随的な損傷を最小限としながら、病原性微生物に選択的に結合してこれらを殺滅する消毒剤として用いることができる。

【0003】

該システムはまた、*in vitro*において、特に、包帯、手術用具、縫合デバイス、カテーテル、歯科適用、コンタクトレンズなどの生物医学的デバイスを殺菌処理して、該生物医学的デバイスをその後*in vivo*において用いる際に、対象の宿主細胞を損傷することなく標的微生物の増殖を阻害する適用において、標的微生物の増殖を阻害するための消毒製剤または滅菌製剤としても用いることができる。

【0004】

特許文献3および特許文献4で開示される通り、特許文献1および特許文献2で開示されるミエロペルオキシダーゼ殺菌系が病原性微生物の処理において高度に有効であることは判明しているが、酵母および芽胞形成微生物の有効な殺滅には、抗微生物活性増強剤が必要とされる場合がある。微生物生活周期の芽胞期は、代謝休眠、およびその栄養期において該微生物を破壊する環境因子に対する耐性を特徴とする。芽胞の発芽最初期は、膨満、および休眠から活性な代謝への移行を特徴とする。栄養増殖、例えば、出芽、また最終的には生殖が後続する。

【0005】

細菌内生孢子および真菌孢子の発芽は、代謝の上昇、ならびに熱および化学反応物質に対する耐性の低下と関連する。発芽が生じるために、孢子は、環境が発育および生殖を支持するのに十分であることを感知しなければならない。アミノ酸であるL-アラニンが、細菌芽胞の発芽を刺激することが報告されている(非特許文献2および非特許文献3)。L-アラニンおよびL-プロリンはまた、真菌孢子の発芽を開始させることも報告されている(非特許文献4)。

【0006】

グリシンおよびL-アラニンなどの単純な α -アミノ酸は、代謝における中心的な位置

10

20

30

40

50

を占める。 α -アミノ酸のアミノ基転移または脱アミノ化により、代謝および増殖に必要とされる糖原性炭水化物またはケト原性炭水化物および窒素がもたらされる。例えば、L-アラニンのアミノ基転移または脱アミノ化により、解糖代謝（エンブデン-マイヤーホフ-パルナス経路）の最終生成物であるピルベートがもたらされる。ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体によるピルベートの酸化により、アセチル-CoA、NADH、 H^+ 、および CO_2 がもたらされる。アセチル-CoAは、トリカルボン酸回路（クレブス回路）の開始基質であり、このクレブス回路により、ミトコンドリア電子伝達鎖が始動する。アセチル-CoAはまた、脂肪酸合成のほか、ステロール合成のための最終的な炭素供給源でもある。単純な α -アミノ酸により、後続する発芽および代謝活性に必要とされる窒素、 CO_2 、糖原性等価物、および／またはケト原性等価物が供給されうる。

10

【0007】

したがって、特許文献3および特許文献4は、酵母の出芽、芽胞形成微生物の発芽、またおそらくは栄養期にある微生物の代謝の加速に対して刺激効果をもたらす特定の α -アミノ酸と組み合わせたミエロペルオキシダーゼにより微生物を処理することにより、酵母および微生物の芽胞形態に対するミエロペルオキシダーゼの殺菌作用が増強されうることを開示する。この目的で開示される代表的な α -アミノ酸には、グリシン、およびアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、リシン、フェニルアラニン、チロシンのL-光学異性体またはD-光学異性体、ならびにこれらのアルキルエステルが含まれる。特許文献3および特許文献4は、酵母および微生物の芽胞形態に対するミエロペルオキシダーゼの殺菌活性の α -アミノ酸による増強を開示するが、これらの特許は、ミエロペルオキシダーゼおよび本明細書で開示される少なくとも2つのアミノ酸の使用による、非芽胞細菌に対するミエロペルオキシダーゼ殺菌系の増強、または抗菌活性のさらなる増強については開示していない。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】米国特許第5, 888, 505号明細書

【特許文献2】米国特許第6, 294, 168号明細書

【特許文献3】米国特許第5, 389, 369号明細書

【特許文献4】米国特許第5, 451, 402号明細書

30

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Klebanoff, J., Bacteriol., 1968年、第95巻、2131~2138頁

【非特許文献2】Hills, J., Gen. Microbiol., 1950年、第4巻、38頁

【非特許文献3】HalvorsonおよびChurch, Bacteriol. Rev., 1957年、第21巻、112頁

【非特許文献4】Yanagita, Arch. Mikrobiol., 1957年、第26巻、329頁

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

この概要は、後出の「発明を実施するための形態」においてさらに説明される概念を精選し、これを簡潔な形で導入する目的で記載される。この概要は、主張される対象物質の重要な特徴を同定することを意図するものではなく、主張される対象物質の範囲を決定する際の補助として用いられることを意図するものでもない。

【0011】

本発明は、細菌感染など、微生物感染に対して、該感染部位を、ミエロペルオキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少な

50

くとも2つのアミノ酸を含む組成物と接触させることにより、これを殺滅または阻害するための組成物および方法を対象とする。本発明を実施する場合、感受性微生物を、ある量のミエロペルオキシダーゼ、ならびに過酸化物質および臭化物または塩化物の存在下において該微生物の増殖を阻害するかまたはこれらを殺滅するのに有効な少なくとも2つのアミノ酸と接触させることにより、該微生物を殺滅または阻害する。

【課題を解決するための手段】

【0012】

したがって、一実施形態において、本発明は、ミエロペルオキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を含む、感受性微生物の増殖を阻害するための組成物を提供する。一部の実施形態において、該少なくとも2つのアミノ酸は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベータ-ホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸；サルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニペコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される。他の実施形態において、該少なくとも2つのアミノ酸は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、およびD-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

ミエロペルオキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を含む、感受性微生物の増殖を阻害するための組成物。

(項目2)

前記少なくとも2つのアミノ酸が、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベータ-ホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸などのベータアミノ酸；3-アミノ酪酸エチル、サルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニペコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目1に記載の組成物。

(項目3)

前記少なくとも2つのアミノ酸が、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-

ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、およびD-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目2に記載の組成物。

(項目4)

少なくとも3つのアミノ酸を含み、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベーターホモロイシン、D-ベーターホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸；サルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニペコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目1に記載の組成物。

10

(項目5)

前記少なくとも3つのアミノ酸が、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、およびD-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目4に記載の組成物。

20

(項目6)

過酸化水素または過酸化水素の供給源をさらに含む、項目1に記載の組成物。

(項目7)

前記過酸化水素の供給源が、過氧化物生成オキシダーゼであり、該オキシダーゼに対する基質の存在下において過酸化水素を生成する、項目6に記載の組成物。

(項目8)

過氧化物生成オキシダーゼを含み、該オキシダーゼが、該オキシダーゼに対する基質の存在下にある場合、毎分m l 当たり100 p モル～50 μ モルの過氧化物を生成するのに有効である、項目7に記載の組成物。

30

(項目9)

1～50, 000 μ g / m l のミエロペルオキシダーゼを含む、項目1に記載の組成物。

(項目10)

0. 1～約500 mMの前記少なくとも2つのアミノ酸の各々を含む、項目1に記載の組成物。

(項目11)

10～5, 000 μ g / m l のミエロペルオキシダーゼ、0. 3～50 mMのグリシン、0. 3～50 mMのL-アラニン、0. 3～50 mMのL-プロリン、および1～500 U / m l のグルコースオキシダーゼを含む組成物。

40

(項目12)

治療を必要とするヒト対象または動物対象を治療する方法であって、該対象における感染部位に、ミエロペルオキシダーゼ、ならびに、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物を投与するステップを含む方法。

(項目13)

前記少なくとも2つのアミノ酸が、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチ

50

ジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベータ-ホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸；サルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニベコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記少なくとも2つのアミノ酸が、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、およびD-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記組成物が、少なくとも3つのアミノ酸を含み、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベータ-ホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸；サルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニベコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目12に記載の方法。

(項目16)

前記少なくとも3つのアミノ酸が、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、およびD-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目15に記載の方法。

(項目17)

前記組成物が、過酸化水素または過酸化水素の供給源をさらに含む、項目12に記載の方法。

(項目18)

前記過酸化水素の供給源が過氧化物生成オキシダーゼであり、該オキシダーゼが、該オキシダーゼに対する基質の存在下において過酸化水素を生成する、項目17に記載の方法。

(項目19)

前記組成物が過氧化物生成オキシダーゼを含み、該オキシダーゼが、該オキシダーゼに対する基質の存在下にある場合、毎分ml当たり100pモル～50μモルの過氧化物を生成するのに有効である、項目18に記載の方法。

(項目20)

前記組成物が、1～50, 000μg/mlのミエロペルオキシダーゼを含む、項目1

10

20

30

40

50

2に記載の方法。

(項目21)

前記組成物が、0.1～約500mMの前記少なくとも2つのアミノ酸の各々を含む、
項目12に記載の方法。

(項目22)

前記組成物が、10～5,000μg/mlのミエロペルオキシダーゼ、0.3～50mMのグリシン、0.3～50mMのL-アラニン、0.3～50mMのL-プロリン、
および1～500U/mlのグルコースオキシダーゼを含む、項目12に記載の方法。

(項目23)

前記ヒト対象または動物対象が、歯茎、眼、耳、皮膚、軟組織、創傷、膣領域、鼠径部
領域、褥瘡、または火傷領域の微生物感染に罹患している、項目12に記載の方法。

10

(項目24)

前記感染が多菌感染である、項目23に記載の方法。

(項目25)

感受性微生物を殺滅するかまたはそれらの増殖を阻害するための方法であって、該微生物を、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、ミエロペルオキシダーゼ、
および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物と接触させるステップを含む方法。

(項目26)

ヒト対象または動物対象における感染を治療するための薬剤の製造における、ミエロペル
オキシダーゼおよび少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物の使用であって、該アミノ酸が、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、該ミエロペルオキシダー
ゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する使用。

20

(項目27)

前記少なくとも2つのアミノ酸が、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、
L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベ
ータ-ホモロイシン3-アミノ酪酸、L-2,3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2,3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸；サルコシンメチルエステル塩酸塩、
およびニペコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目26に記載の使用。

30

(項目28)

前記少なくとも2つのアミノ酸が、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、
L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、およびD-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目26または27に記載の使用。

40

(項目29)

前記組成物が、少なくとも3つのアミノ酸を含み、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、
L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロ

50

イシシ、D-ベーターホモロイシシ、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸；サルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニベコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目26に記載の使用。

(項目30)

前記少なくとも3つのアミノ酸が、グリシシ、L-アラニシ、D-アラニシ、L-アラニシ無水物、L-グルタミシ、L-グルタミシ酸、グリシシ無水物、馬尿酸、L-ヒスチジシ、L-ロイシシ、D-ロイシシ、L-イソロイシシ、D-イソロイシシ、L-リシシ、L-オルニチシ、D-フェニルアラニシ、L-フェニルアラニシ、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリシ、タウリシ、L-トレオニシ、D-トレオニシ、L-チロシシ、L-バリン、およびD-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される、項目29に記載の使用。

10

(項目31)

前記組成物が、過酸化水素または過酸化水素の供給源をさらに含む、項目26に記載の使用。

(項目32)

前記過酸化水素の供給源が過氧化物生成オキシダーゼを含み、該オキシダーゼが、前記オキシダーゼに対する基質の存在下において過酸化水素を生成する、項目31に記載の使用。

20

(項目33)

前記組成物が過氧化物生成オキシダーゼを含み、該オキシダーゼが、該オキシダーゼに対する基質の存在下にある場合、毎分ml当たり100pモル~50μモルの過氧化物を生成するのに有効である、項目32に記載の使用。

(項目34)

前記組成物が、1~50, 000μg/mlのミエロペルオキシダーゼを含む、項目26に記載の方法。

(項目35)

前記組成物が、0.1~約500mMの該少なくとも2つのアミノ酸の各々を含む、項目26に記載の方法。

30

(項目36)

前記組成物が、10~5, 000μg/mlのミエロペルオキシダーゼ、0.3~50mMのグリシシ、0.3~50mMのL-アラニシ、0.3~50mMのL-プロリン、および1~500U/mlのグルコースオキシダーゼを含む、項目26に記載の使用。

(項目37)

前記ヒト対象または動物対象が、歯茎、眼、耳、皮膚、軟組織、創傷、膣領域、鼠径部領域、褥瘡、または火傷領域の微生物感染に罹患している、項目26に記載の使用。

(項目38)

前記感染が多菌感染である、項目37に記載の使用。

(項目39)

感受性微生物を殺滅するかまたはそれらの増殖を阻害するための薬剤の製造における、ミエロペルオキシダーゼおよび少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物の使用であって、該アミノ酸が、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する使用。

40

【0013】

他の実施形態において、本発明は、ミエロペルオキシダーゼ、およびグリシシ、L-アラニシ、D-アラニシ、L-アラニシ無水物、L-グルタミシ、L-グルタミシ酸、グリシシ無水物、馬尿酸、L-ヒスチジシ、L-ロイシシ、D-ロイシシ、L-イソロイシシ

50

、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベータホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸；サルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニペコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される少なくとも3つのアミノ酸を含む、感受性微生物の増殖を阻害するための組成物を提供する。他の実施形態において、該少なくとも3つのアミノ酸は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

10

【0014】

一部の実施形態において、本発明の組成物は、過酸化水素または過酸化水素の供給源もさらに含む。本発明のこの態様において、組成物は、それに対する基質の存在下において過酸化水素を生成する、過酸化物生成オキシダーゼを含みうる。一部の実施形態において、組成物は、それに対する基質の存在下にあると毎分ml当たり100pモル～50μモルの過酸化物を生成するのに有効な、過酸化物生成オキシダーゼを含む。

20

【0015】

一実施形態において、本発明の組成物は、1～50, 000μg/mlのミエロペルオキシダーゼを含む。他の実施形態において、本発明の組成物は、少なくとも2つのアミノ酸の各々を0.1～約500mMずつ含む。代表的な一実施形態において、本発明の組成物は、10～5, 000μg/mlのミエロペルオキシダーゼ、0.3～50mMのグリシン、0.3～50mMのL-アラニン、0.3～50mMのL-プロリン、および1～500U/mlのグルコースオキシダーゼを含む。

【0016】

他の態様において、本発明は、このような治療を必要とするヒト対象または動物対象を治療する方法であって、該対象における感染部位に、ミエロペルオキシダーゼ、ならびに、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物を投与するステップを含む方法を提供する。本発明のこの態様の一部の実施形態において、該少なくとも2つのアミノ酸は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベータホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸；サルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニペコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される。本発明のこの態様の他の実施形態において、該少なくとも2つのアミノ酸は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セ

30

40

50

リン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、およびD-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

【0017】

他の実施形態において、本発明は、このような治療を必要とするヒト対象または動物対象を治療する方法であって、該対象における感染部位に、ミエロペルオキシダーゼ、ならびに、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも3つのアミノ酸を含む組成物を投与するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態において、該少なくとも3つのアミノ酸は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベータ-ホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸；サルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニペコチン酸、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される。他の実施形態において、該少なくとも3つのアミノ酸は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、およびD-バリン、またはこれらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

【0018】

他の実施形態において、ヒト対象または動物対象に投与される組成物は、過酸化水素または過酸化水素の供給源もさらに含む。一部の実施形態において、該過酸化水素の供給源は、過酸化物生成オキシダーゼを含み、該オキシダーゼが、該オキシダーゼに対する基質の存在下において過酸化水素を生成する。例えば、ヒト対象または動物対象に投与される組成物は、過酸化物生成オキシダーゼを含み、該オキシダーゼが、該オキシダーゼに対する基質の存在下にあると毎分ml当たり100pモル～50μモルの過酸化物を生成するのに有効である。

【0019】

一部の実施形態において、ヒト対象または動物対象に投与される組成物は、1～50, 000μg/mlのミエロペルオキシダーゼを含む。他の実施形態において、ヒト対象または動物対象に投与される組成物は、少なくとも2つのアミノ酸の各々を0.1～約500mMずつ含む。代表的な一実施形態において、ヒト対象または動物対象に投与される組成物は、10～5, 000μg/mlのミエロペルオキシダーゼ、0.3～50mMのグリシン、0.3～50mMのL-アラニン、0.3～50mMのL-プロリン、および1～500U/mlのグルコースオキシダーゼ、および1～500mMのグルコースを含む。

【0020】

本発明の一部の態様において、治療されるヒト対象または動物対象は、歯茎、眼、耳、皮膚、軟組織、創傷、膣領域、鼠径部領域、褥瘡、または火傷領域の微生物感染に罹患している。一部の実施形態において、感染は、多菌感染である。他の実施形態において、感染は、少なくとも部分的に、多剤耐性微生物により引き起こされる。

【0021】

他の態様において、本発明は、感受性微生物を殺滅するかまたはそれらの増殖を阻害す

るための方法であって、該微生物を、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、ミエロペルオキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物と接触させるステップを含む方法を提供する。

【0022】

本発明の前述の態様および多くの付随する利点は、以下の詳細な説明を参照することでより十分に理解されるので、これらが、添付の図面と併せて理解される場合に、より容易に理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、実施例11で説明される通り、9 (□)、6 (◇)、3 (△)、1 (○)、0.3 (*)、および0.1 (+) μg MPO/mlを含有する増強MPO溶液により治療された*S. aureus* ATCC 6538 (図1A) および *E. coli* ATCC 25922 (図1B) についての時間一殺滅解析を示す図である。懸濁液中中和法を用いて、迅速な殺菌活性 (初期接種材料からの $>3 \log$ の低減) が裏付けられた。増強MPO溶液のMPO濃度が上昇すると殺滅速度が増大し、曝露時間が長くなると殺滅規模が増大した。3 μg MPO/ml以上の濃度で検出可能な生存が観察されなくなるのは、曝露の5分以内であった。

【図2】図2は、実施例11で説明される通り、200 (□)、100 (◇)、および50 (△) μg MPO/mlを含有する増強MPO溶液により治療された*S. aureus* ATCC 6538 (図2A) および *P. aeruginosa* ATCC 27317 (図2B) についての時間一殺滅解析を示す図である。懸濁液中中和法により、3%のヒト全血液の存在下において単離株を調べた。増強MPO溶液の抗微生物活性に対する血液の干渉効果は、MPO濃度を上昇させることにより克服された。

【図3-1】図3は、実施例11で説明される通り、256 (□)、64 (◇)、16 (△)、4 (×)、1 (*), 0.025 (○)、および0.06 (+) μg MPO/mlを含有する増強MPO溶液により治療された*S. aureus* ATCC 29213 (図3A)、*E. coli* ATCC 25922 (図3B)、*E. faecalis* ATCC 29212 (図3C)、および *P. aeruginosa* ATCC 27853 (図3D) についての時間一殺滅解析を示す図である。CLSI培養液マイクロ希釈変法を用いて、殺菌活性 (初期接種材料からの $>3 \log$ の低減) が裏付けられた。すべての生物について同等な殺滅パターンが観察され、増強MPO溶液のMPO濃度が上昇すると殺滅速度が増大し、曝露時間が長くなると殺滅規模が増大した。すべての被験生物について、256および16 μg MPO/mlの濃度で検出可能な生存が観察されなくなるのは、それぞれ、30分および4時間以内であった。

【図3-2】図3は、実施例11で説明される通り、256 (□)、64 (◇)、16 (△)、4 (×)、1 (*), 0.025 (○)、および0.06 (+) μg MPO/mlを含有する増強MPO溶液により治療された*S. aureus* ATCC 29213 (図3A)、*E. coli* ATCC 25922 (図3B)、*E. faecalis* ATCC 29212 (図3C)、および *P. aeruginosa* ATCC 27853 (図3D) についての時間一殺滅解析を示す図である。CLSI培養液マイクロ希釈変法を用いて、殺菌活性 (初期接種材料からの $>3 \log$ の低減) が裏付けられた。すべての生物について同等な殺滅パターンが観察され、増強MPO溶液のMPO濃度が上昇すると殺滅速度が増大し、曝露時間が長くなると殺滅規模が増大した。すべての被験生物について、256および16 μg MPO/mlの濃度で検出可能な生存が観察されなくなるのは、それぞれ、30分および4時間以内であった。

【図4】図4は、実施例12で説明される通り、18.75 (◆)、75 GU/ml (■)、および150 (●) GU/mlを含有する増強MPO溶液により治療されたラットの全層創傷モデルにおける*S. aureus* ATCC 6538についての時間一殺滅解析を示す図である。60分後における非治療創傷からの生物の回収 (○)。このグラフは

10

20

30

40

50

、治療時間が5、15、30、および60分である各治療群から単離された、 $\log_{10}$ CFUによる平均生存菌数を示す。各治療群について、各データ点の95%信頼区間を示す。

【図5】図5は、実施例12で説明される通り、ラットの部分層創傷モデルにおける、メチシリン耐性*S. aureus* (MRSA) およびメチシリン感受性*S. aureus* (MSSA) に対する増強MPO溶液の殺菌活性の比較を示す図である。このグラフは、治療の15分後において単離された、 $\log_{10}$ CFUによる平均生存菌数を示す。

【図6】図6は、実施例12で説明される通り、18.75 (◆)、75 GU/ml (■)、および150 (●) GU/mlを含有する増強MPO溶液により治療されたラットの全層創傷モデルにおける*E. coli* ATCC 25922についての時間-殺滅解析を示す図である。60分後における非治療創傷からの生物の回収(○)。このグラフは、治療時間が5、15、30、および60分である各治療群から単離された、 $\log_{10}$ CFUによる平均生存菌数を示す。各治療群について、各データ点の95%信頼区間を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、ミエロペルオキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を用いて、細菌感染を殺滅または阻害するための組成物および方法を対象とする。本発明を実施する場合、感受性微生物を、ある量のミエロペルオキシダーゼ、ならびに過酸化水素および臭化物または塩化物の存在下において該微生物の増殖を阻害するかまたはこれらを殺滅するのに有効な少なくとも2つのアミノ酸と接触させることにより、該微生物を殺滅または阻害する。

【0025】

特に好ましい一実施形態において、本発明の組成物および方法は、細菌および真菌を含めた、広範囲の病原性微生物に対するミエロペルオキシダーゼの抗微生物活性を増強する消毒剤として用いられる。一態様において、本発明の組成物および方法は、本発明の組成物を、例えば、皮膚、眼、耳、口、鼻腔および副鼻腔、外傷性傷害部位、手術部位などの感染など、微生物感染と直接的に接触させることが可能な部位において、ヒト対象または非ヒト哺乳動物対象の感受性感染を局所治療するのに高度に適する。宿主組織と接触させて用いる場合、該消毒系は、病原性微生物に対する選択的な親和性を示す、二酸化ミエロペルオキシダーゼの使用に基づく。高効力の殺菌作用は、宿主組織を破壊すること、正常な微生物叢を破壊することなく、標的微生物を指向する、すなわち、該殺菌作用は選択的であり、標的微生物に限定される。

【0026】

したがって、一実施形態において、本発明は、ミエロペルオキシダーゼ、ならびに、過酸化水素および臭化物または臭化物の存在下において、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を含む、感受性微生物の増殖を阻害するための組成物を提供する。組成物は、その使用部位において、それ以外の形では十分な量で供給されない場合、過酸化水素または過酸化水素の供給源および臭化物または臭化物もさらに含む。関連する実施形態において、本発明は、このような治療を必要とするヒト対象または動物対象を治療する方法であって、該対象における感染部位に、ミエロペルオキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物を投与するステップを含む方法を提供する。また、組成物は、感染部位における天然量を補完する過酸化水素または過酸化水素の供給源および臭化物または臭化物もさらに含む。

【0027】

他の実施形態において、本発明は、*in vitro*において、特に、包帯、手術用具、縫合デバイス、カテーテル、歯科適用、コンタクトレンズなどの生物医学的デバイスが消毒または滅菌を必要とし、該デバイスがその後宿主組織と接触する場合に、感受性微生物の増殖を阻害するための組成物および方法を提供する。したがって、本発明の高効力の

ミエロペルオキシダーゼ製剤は、*in vitro*における消毒用調製物または滅菌用調製物として用いることができる。過酸化水素の供給時間を制限することにより、ミエロペルオキシダーゼ増強製剤が、材料またはデバイスの消毒、さらにまた滅菌を確保するのに十分なだけ強力となりうることを、宿主組織との接触前とすることができる。過酸化物が枯渇すれば、これらの高効力製剤の使用と関連する、正常な微生物叢および宿主組織に対する任意の潜在的な毒性は消失し、製剤により処理された材料またはデバイスをさらに洗浄または解毒することなく、宿主組織と接触させることができる。

【0028】

したがって、一実施形態において、本発明は、*in vitro*において感受性微生物を殺滅するかまたはそれらの増殖を阻害するための方法であって、該微生物を、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、ミエロペルオキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物と接触させるステップを含む方法を提供する。

10

【0029】

さらに他の態様において、本発明は、ヒト対象または動物対象における感染を治療するための薬剤の製造における、ミエロペルオキシダーゼおよび少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物の使用であって、該アミノ酸が、過酸化水素および塩化物または臭化物の存在下において、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する使用を提供する。一部の実施形態において、本発明は、感受性微生物を殺滅するかまたはそれらの増殖を阻害するための薬剤の製造における、ミエロペルオキシダーゼおよび少なくとも2つのアミノ酸を含む組成物の使用であって、該アミノ酸が、該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せて作用する使用を提供する。

20

【0030】

本発明の代表的な組成物は、(1) ミエロペルオキシダーゼ(MPO)と、(2) 少なくとも2つの活性増強用アミノ酸と、場合によって、(3) 過酸化水素(H_2O_2)または H_2O_2 の供給源と、(4) 塩化物または臭化物とを含む。

【0031】

本発明において有用なミエロペルオキシダーゼは、ハロゲン化物、すなわち、塩化物または臭化物が電子供与体または還元剤であり、過酸化物が電子受容体または酸化剤である、ハロゲン化物：過酸化水素に対する酸化還元酵素(例えば、国際生化学連合によるEC第1.11.1.7号およびEC第1.11.1.10号)である。ミエロペルオキシダーゼ溶液の酵素活性は、リン酸ナトリウム緩衝液中の過酸化水素存在下におけるグアイアコールとの反応により決定することができる。該反応は、470nmにおいて強い吸光度を示す生成物を生成する。該活性は、基準の標準物質と比較した、吸光度上昇の反応速度から決定される。ミエロペルオキシダーゼ活性は一般に、グアイアコール単位/mL(GU/mL)で表されるが、また、ミリリットル当たりのMPOマイクログラム($\mu g/mL$)としても表される。MPOの μg からGUへの変換は、MPO μg 当たりの0.375GUに基づく。比活性はその活性および総タンパク質濃度から計算され、GU/タンパク質mgで表される。本発明の組成物で用いられるミエロペルオキシダーゼの有用量は、該組成物が用いられる条件、使用環境、および所望の結果に応じて多様に変化する。大半の目的の場合、本発明の組成物は一般に、少なくとも約0.05 $\mu g/mL$ (0.01875GU/mL)のミエロペルオキシダーゼを含む。一部の実施形態において、本発明の組成物は、約1~約50,000 $\mu g/mL$ (すなわち約0.375~約18,750GU/mL)のミエロペルオキシダーゼ、より好ましくは、約5~約10,000 $\mu g/mL$ (すなわち約1.875~約3,750GU/mL)のミエロペルオキシダーゼ、またさらにより好ましくは約10~約5,000 $\mu g/mL$ (すなわち約3.75~約1,875GU/mL)のミエロペルオキシダーゼを含む。

30

40

【0032】

本明細書において詳細に説明される、少なくとも2つの活性増強用アミノ酸の組入れにより、感受性微生物に対するオキシダーゼーミエロペルオキシダーゼ系の殺菌能は大幅に

50

上昇する。本発明の実施において有用なアミノ酸は、組合せで、また、過酸化物および塩化物または臭化物の存在下において用いられると、感受性微生物に対するミエロペルオキシダーゼ殺菌系の抗微生物活性を増強するアミノ酸である。少なくとも2つのアミノ酸が、該系のミエロペルオキシダーゼ活性に対する有害効果、または該組成物および方法の使用環境において望ましくない効果をもたらさない濃度で用いられる。

【0033】

一部の実施形態において、本発明の組成物は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベータ-ホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸のほか、例えば、L-アラニンメチルエステル、D-アラニンメチルエステル、L-リシンメチルエステル二塩酸塩、グリシンメチルエステル塩酸塩、L-プロリンメチルエステル塩酸塩、L-バリンエチルエステル塩酸塩、およびエチル2-アミノプロパノエートなど、これらのアルキルエステルもしくは薬学的に許容される塩；ならびにサルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニペコチン酸など、N-置換アミノ酸からなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸を含む。

【0034】

他の実施形態において、本発明の組成物は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、およびD-バリンのほか、これらのアルキルエステルおよび薬学的に許容される塩からなる群から選択される少なくとも2つのアミノ酸を含む。

【0035】

一部の実施形態において、本発明の組成物は、ミエロペルオキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの殺菌活性を増強するように組合せで作用する少なくとも3つのアミノ酸を含む。したがって、一部の実施形態において、本発明の組成物は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリン；ベータアラニン、L-ベータ-ホモロイシン、D-ベータ-ホモロイシン、3-アミノ酪酸、L-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、D-2, 3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩、L-3-アミノイソ酪酸、D-3-アミノイソ酪酸、および3-アミノ酪酸エチルなどのベータアミノ酸のほか、例えば、L-アラニンメチルエステル、D-アラニンメチルエステル、L-リシンメチルエステル二塩酸塩、グリシンメチルエステル塩酸塩、L-プロリンメチルエステル塩酸塩、L-バリンエチルエステル塩酸塩、およびエチル2-アミノプロパノエートなど、これらのエステルおよび薬学的に許容される塩、ならびにサルコシンメチルエステル塩酸塩、およびニペコチン酸など、N-置換アミノ酸からなる群から選択される少なくとも3つのアミノ酸を含む。

【0036】

さらに他の実施形態において、本発明の組成物は、グリシン、L-アラニン、D-アラニン、L-アラニン無水物、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン無水物、馬尿

酸、L-ヒスチジン、L-ロイシン、D-ロイシン、L-イソロイシン、D-イソロイシン、L-リシン、L-オルニチン、D-フェニルアラニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、タウリン、L-トレオニン、D-トレオニン、L-チロシン、L-バリン、D-バリンのほか、これらのエステルおよび薬学的に許容される塩からなる群から選択される少なくとも3つのアミノ酸を含む。本明細書において好ましい、本発明のこの態様の代表例において、本発明の組成物は、ミエロペルオキシダーゼ、および該ミエロペルオキシダーゼの抗微生物活性を増強するのに有効な量におけるアミノ酸である、グリシン、L-アラニン、およびL-プロリンを含む。

【0037】

本発明の組成物で用いられるアミノ酸の有用量は、該組成物中におけるミエロペルオキシダーゼ量、および使用環境において存在する条件に応じて変化する。大半の目的の場合、本発明の組成物は一般に、本発明のアミノ酸の各々を、約0.1～約500mMずつ、より好ましくは約0.2～約100mMずつ、またさらにより好ましくは約0.3～約50mMずつ含む。例えば、代表的な一実施形態において、本発明の組成物は、10～5,000μg/mlのミエロペルオキシダーゼ、0.3～50mMのグリシン、0.3～50mMのL-アラニン、0.3～50mMのL-プロリン、および1～500U/mlのグルコースオキシダーゼを含む。

【0038】

本発明のミエロペルオキシダーゼ組成物の殺菌活性は、過酸化物および塩化物または臭化物から次亜ハロゲン酸塩を形成する反応、ならびに過酸化物および次亜ハロゲン酸塩から一重項酸素分子を形成する反応を伴い、本発明の組成物の活性は、抗微生物活性部位における、適切な過酸化物およびハロゲン化物の存在に依存する。一部の状況では、例えば、天然の微生物叢の活性により、過酸化物（例えば、過酸化水素）が、抗微生物活性部位において存在する場合があります、また、該転換反応において補因子として作用するのに十分な量の塩化物が、生理学的環境において存在する場合があります。これらの状況では、さらなる過酸化物またはハロゲン化物を投与することも、これらを本発明の組成物中に組み入れることも必要でない。他の状況では、微生物治療部位において過酸化水素および／またはハロゲン化物をさらに供給することが必要であるかまたは望ましい場合がある。したがって、本発明の組成物は、所望の場合、過酸化物または *in vivo* もしくは *in vitro* において過酸化物を生成することが可能な作用物質、および塩化物または臭化物もさらに含む。

【0039】

本発明の組成物および方法において有用な過酸化物には、過酸化水素、式：



〔式中、Rは、水素、または1～3個の炭素原子を有する短鎖のアルキル基、また、ポロペルオキシドまたは過酸化尿素などの無機過酸化物である〕の過酸化アルキルが含まれる。有機過酸化物の酸化活性は一般に、以下：



の通り、R鎖長が長くなると低下する。

【0040】

本発明の組成物において用いられる、本明細書において好ましい過酸化物は、過酸化水素である。また、*in vivo* もしくは *in vitro* において過酸化水素を生成することが可能な作用物質を組成物中に組み入れることによって、過酸化水素が殺菌活性部位において供給されるようにすることもできる。この目的で特に有用な作用物質には、例えば、グルコースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、およびガラクトースオキシダーゼなどのオキシダーゼが含まれる。

【0041】

in vivo において適用される本発明の組成物中に過酸化水素を直接に組み入れる場合、用いられる量は、最大の消毒活性を提供するように設計することが好ましい。宿主細胞および組織、ならびに正常な微生物叢に対する損傷は、高度のH₂O₂曝露時間にお

10

20

30

40

50

ける直接的な接触を回避することにより回避される。したがって、本発明の組成物は、組成物m l 当たり約1 n モル～約10 μモルの過酸化水素、より好ましくは、組成物m l 当たり約5 n モル～約5 μモルの過酸化水素、またより好ましくは、組成物m l 当たり約10 n モル～約1 μモルの過酸化水素を含みうる。i n v i v oにおいて過酸化水素物を生成することが可能な作用物質、例えば、過酸化物生成オキシダーゼは、抗微生物活性部位において存在する過酸化水素量の動的な制御に特に有用である。このような作用物質は、安定的で低レベルのH₂O₂濃度を供給および維持することにより、組成物の抗微生物活性を最大化する。したがって、このような作用物質が用いられる量は、該作用物質の性質および所望の効果に高度に依存するが、抗微生物活性部位において供給されるハロゲン化合物の種類および濃度に応じて、毎分液体m l 当たり約1 p モル～約1 μモルの安定状態レベルの過酸化水素を生成可能であることが好ましい。製剤を消毒-滅菌液として用いる場合は、オキシダーゼおよびその基質を、必要とされる滅菌時間にわたり存続する、比較的高い安定状態濃度のH₂O₂を供給するように調整することができる。消毒-滅菌活性は、オキシダーゼ基質の枯渇により、またはオキシダーゼ分解速度との関係で終結する。代表例として述べると、オキシダーゼがグルコースオキシダーゼであり、その基質がグルコース（またはデキストロース）である場合、本発明の組成物は、約0.05～約3,000 U/m l、より好ましくは、約0.1～約1,000 U/m l、またさらにより好ましくは、約1～約500 U/m lのグルコースオキシダーゼと、約0.1～約1,000 mM、より好ましくは、約0.5～約800 mM、またさらにより好ましくは、約1～約500 mMのグルコースとを含みうる。

【0042】

臭化物または塩化物を本発明の組成物中に組み入れる場合、具体的な適用において用いられる臭化物または塩化物の使用、選択、および量は、所望の治療効果、過酸化物の供給可能性、および他の因子など、各種の因子に依存する。塩化物は、大半の生理学的生息環境において、ハロゲン化合物補因子として無制限な程度に十分なレベルで存在するので、塩化物の外部供給源は一般に必要とされない。塩化物の外部供給源が望ましい場合、用いられる塩化物量は、生理学的条件を近似する、溶液m l 当たり約10 μモル塩化物～約150 μモル塩化物の範囲内に収まることが好ましい。組み入れる場合、本発明の組成物は、液体組成物m l 中約1 n モル臭化物～約20 μモル臭化物、より好ましくは、液体組成物m l 中約10 n モル臭化物～約10 μモル臭化物、また最も好ましくは、液体組成物m l 中約100 n モル臭化物～約1 μモル臭化物を含みうる。

【0043】

過酸化物に対するハロゲン化合物の比は、有効な殺菌環境の処方において重要な考慮点である。したがって、上記で説明した通り、微生物攻撃部位において有効レベルのハロゲン化合物および過酸化物を確保することに加え、最適の殺菌活性を提供するハロゲン化合物：過酸化物比において、本発明の方法を実施することが好ましい。例えば、ハロゲン化合物がCl⁻である場合、過酸化物に対するCl⁻の比は、殺菌活性環境において、好ましくは、約1～約40,000の範囲内、より好ましくは、約50～約40,000、また最も好ましくは、約200～約40,000の範囲内に維持される。ハロゲン化合物がBr⁻である場合、過酸化物に対するBr⁻の比は、殺菌活性環境において、好ましくは、約0.1～約4,000の範囲内、より好ましくは、約0.5～約2,000、また最も好ましくは、約1～約1,000の範囲内に維持される。

【0044】

本発明の組成物および方法は、好ましくは、正常な微生物叢に対する損傷を最小限としながら、広域スペクトルにわたる病理学的微生物の増殖を阻害するのに用いることができる。実施例において示される通り、本発明の組成物は、例えば、*Enterococcus faecalis*、*Enterococcus faecium*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Streptococcus agalactiae*、*Streptococcus* C群、*Streptococcus* F群、*Streptococcus* G群、*Str*

eptococcus pyogenes、Citrobacter freundii、Enterobacter cloacae、Escherichia coli、Klebsiella pneumoniae、Proteus mirabilis、Acinetobacter属種、Pseudomonas aeruginosa、Aeromonas hydrophilia、およびPasteurella multocidaなど、グラム陽性菌およびグラム陰性菌の両方に対する阻害において高度に効果的である。加えて、本発明の組成物は、例えば、Bacillus属種およびClostridium属種などの細菌、またAspergillus属種、Fusarium属種、Trichophyton属種などの真菌など、芽胞形成微生物の阻害においても有用である。それらの広域スペクトルにわたる活性のために、一部の実施形態において、本発明の組成物は、多菌感染の治療において用いると有利でありうる。多菌性疾患は複数の感染作用物質を伴い、複合体、複合、混合、二重、二次的、相乗作用的、合併、多菌性、または共感染であると称する。多菌性疾患には、例えば、膿瘍と関連する感染、AIDS関連の日和見感染、結膜炎、胃腸炎、肝炎、多発性硬化症、中耳炎、歯周病、呼吸器疾患、および性器感染が含まれる。加えて、本発明の組成物は、従来の抗生剤療法に関する作用機構とは全く異なる作用機構により作用するので、一部の実施形態において、本発明の組成物はまた、MRSA（メチシリン耐性Staphylococcus aureus）、VISA（バンコマイシン耐性S. aureus）、VRE（バンコマイシン耐性Enterococcus）、ペニシリン耐性Enterococcus、PRSP（ペニシリン耐性Streptococcus pneumoniae）、イソニアジド／リファンピン耐性Mycobacterium tuberculosis、ならびにE. coli、Salmonella、Campylobacter、およびStreptococciの他の抗生剤耐性菌株などの多剤耐性病原体により少なくとも部分的には引き起こされる感染の治療においても高度に有用である。本明細書では、このような細菌に、「抗生剤耐性」菌もしくは「薬剤耐性」菌もしくは「多剤耐性」菌として、または当技術分野において十分に理解されている他の類似の用語により言及する。

【0045】

本明細書で用いられる「正常な微生物叢」という用語は、健康な宿主の体表面の内部またはその上において、共生レベルで正常に生息する細菌を意味する。正常な微生物叢には、例えば、ヒト対象の口腔内、腸内、または腔内における細菌の乳酸ファミリー、例えば、口腔内におけるStreptococcus属（Streptococcus viridans）、および母乳哺育された乳児の腸内、外性器、前部尿道、および腔内におけるLactobacillus属種（例えば、ティエエ桿菌およびデーデルライン（Döderlein）桿菌）が含まれる。宿主の正常な微生物叢を構成する微生物は、周知である（例えば、「Principles and Practice of Infectious Diseases」、前出、ニューヨーク、34～36および161頁を参照されたい）。本発明のミエロペルオキシダーゼは、正常な微生物叢に優先して、多くの病原性細菌および病原性真菌に選択的に結合することが見出されている。in vivoの適用では、宿主から正常な微生物叢を除去するには無効な量のミエロペルオキシダーゼにより宿主を治療することが好ましい。消毒・滅菌のためのin vitroにおける適用では、すべての栄養形態および酵母形態の完全な殺滅を確保するのに十分に高濃度のミエロペルオキシダーゼを用いることができる。このような条件下では、宿主組織との接触前にH₂O₂またはH₂O₂生成系を消尽させることにより、宿主組織および正常な微生物叢に対する損傷が回避される。

【0046】

本発明の組成物は一般に、ある量のミエロペルオキシダーゼ、ならびに、過酸化物およびハロゲン化物の存在下において、感受性微生物を殺滅するかまたはそれらの増殖を阻害するのに有効な少なくとも2つのアミノ酸を含む。組成物は、薬学的に許容される担体もさらに含む。一部の実施形態において、組成物は、液体の担体中において供給されると好都合な場合がある。それがミエロペルオキシダーゼの選択的結合能または酵素活性に

著明に干渉するのでない限りにおいて、任意の液体担体を一般にこの目的に用いることができる。代替的に、組成物は、液体中における可溶化時に活性化する固体形態で提供することもできる。

【0047】

上記の通り、本発明の組成物は、過酸化化物、または、上記において詳述したオキシダーゼなど、過酸化化物を生成することが可能な作用物質もさらに含む。オキシダーゼ-ミエロペルオキシダーゼ系は、活性作用物質による組成物が、使用時において圧密である2つの個別部分において製剤化される、二元製剤としての構築に役立つ。例えば、二元製剤の1つの部分は、オキシダーゼ、ミエロペルオキシダーゼ、および少なくとも2つのアミノ酸、例えば、グリシン、L-アラニン、およびL-プロリンを含む溶液を含む。二元剤の第2の部分は、オキシダーゼの基質、例えば、グルコースオキシダーゼの場合におけるグルコースもしくはデキストロース、または酸素分子 O_2 を含む。該基質は、例えば、固体ウェハーの形態で提供することができる。医用品、例えば、手術用具またはコンタクトレンズを滅菌する場合、該基質ウェハーは、滅菌される品目と共に滅菌チャンバー内に入れることができる。ミエロペルオキシダーゼ、活性増強用アミノ酸、およびオキシダーゼを添加して滅菌を開始する。一部の実施形態において、オキシダーゼ基質の可溶化およびオキシダーゼによる利用を促進するため、ミエロペルオキシダーゼ組成物は、アルコールもさらに含む。この系は、反応を駆動するのに十分な基質が存在する限りにおいて、持続的な殺菌作用をもたらす。

【0048】

本発明の組成物は、単独で、または1つもしくは複数の他の治療剤と組み合わせて投与することができる。本発明の組成物と組み合わせて用いる、さらなる代表的な治療剤は、例えば、抗菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、および／もしくは抗寄生虫剤などの抗生剤または消毒剤を包含する。一部の実施形態において、さらなる治療剤は、1つまたは複数のペニシリン、セファロスポリン、カルバセフェム、セファマイシン、カルバペネム、モノバクタム、アミノグリコシド、グリコペプチド、キノロン、テトラサイクリン、マクロリド、および／またはフルオロキノロンでありうる。一部の実施形態において、さらなる治療剤は、ヨウ素、銀、銅、クロルヘキシジン、ポリヘキサニド、ビグアニド、キトサン、および／または酢酸でありうる。本発明の1つまたは複数のさらなる治療剤は、同じ組成物の一部として組み込むこともでき、個別に投与することもできる。

【0049】

*in vivo*における適用の場合、消毒用組成物は、ヒト対象および動物対象を含めた温血動物に対して、任意の有効な、薬学的に許容される形態、例えば、局所剤、口内剤、鼻腔用スプレー、吸入用エアゾール、または微生物感染部位へと活性ミエロペルオキシダーゼを送達するのに有効な他の任意の形など、局所用剤形、洗浄用剤形、経口用剤形、腔内用剤形、または坐剤用剤形において投与することができる。投与経路は、感染微生物との消毒用組成物の直接的な接触が得られるように設計することが好ましい。本発明の一態様において、本発明の組成物は、例えば、歯茎、眼、耳、皮膚、創傷、腔領域、鼠径領域、褥瘡、火傷；医用包帯材、おむつ、または水分を帯びる可能性が高い他の被覆下にある領域など、感染を受けやすい、ヒト対象または動物対象の領域へと局所的に送達または投与される。

【0050】

局所適用の場合、薬学的に許容される担体は、液体、クリーム、発泡体、ローション、軟膏、懸濁液、坐剤、またはゲルの形態をとることが可能であり、水溶性溶媒または有機溶媒、緩衝剤、乳化剤、ゲル化剤、保湿剤 (*moisturizers*)、安定化剤、界面活性剤、湿潤剤、防腐剤、遅延放出剤、および少量の保湿剤 (*humectants*)、封鎖剤、色素、芳香剤、ならびに局所投与用の医薬製剤において一般に用いられる他の成分もさらに含む。加えて、本発明の組成物は、対象に適用される包帯材または被覆内に含浸させることもできる。

【0051】

本発明の別の実施形態において、本発明の組成物は、特に、医療デバイスまたはコンタクトレンズが、患者または装着者と接触して用いられることが意図される場合、該デバイスまたはレンズの消毒または滅菌など、*in vitro*における適用のために特別に設計することができる。この種類の適用の場合、組成物は、液体、クリーム、発泡体、ローション、またはゲルの形態で提供すると好都合な場合があり、乳化剤、界面活性剤、緩衝剤、保湿剤、防腐剤、およびこの種類の組成物中において一般に見出される他の成分と共に提供することができる。本発明の組成物を微生物感染防止部位へと送達するために、縫合糸、包帯、およびガーゼなどの吸収性材料内に該組成物を含浸させることもでき、ステープル、ジッパー、およびカテーテルなど、固相材料の表面上において該組成物をコーティングすることもできる。この種類の他の送達系は、当業者には容易に明らかとなろう。

10

【0052】

上記において詳細に説明した通り、過酸化水素生成用のオキシダーゼ、該オキシダーゼの基質、およびハロゲン化物など、他の成分も、所望に応じて組み入れることができる。加えて、該成分は、単一の製剤中において製剤化することもでき、特定の適用に望ましい場合の通り、その後の使用時において混合される二元製剤へと個別化することもできる。単一製剤の場合、ハロゲン化物、オキシダーゼ、オキシダーゼ用の補欠分子族、オキシダーゼ用の還元基質、または酸素分子など、適用部位において用いられる必須の系成分の1つを製剤から除外し、尚早の反応および系成分の枯渇を回避することが好ましい。

【0053】

例示的な例として述べると、抗微生物（または抗感染）液として用いるのに適する組成物は、約1～50,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ （すなわち、約0.375～約18,750 GU/ ml ）のミエロペルオキシダーゼ、0.1～500 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ （すなわち、0.1～500 mM）のグリシン、0.1～500 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ （すなわち、0.1～500 mM）のL-プロリン、0～100 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ （すなわち、0～100 mM）のL-アラニン、 ml 当たり0.01～500単位のグルコースオキシダーゼ、および10～150 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ の塩化物を含みうる。上記の組成物を1～500 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ （すなわち1～500 mM）のグルコースまたはデキストロースと組み合わせ、消毒液または滅菌液として用いる。

20

【0054】

上記は、以下の代表的な実施例との関連でより十分に理解することができるが、これらは例示を目的として示されるものであり、限定を目的として示されるものではない。

30

【実施例】

【0055】

（実施例1）

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性に対するL-リシンの効果

Staphylococcus aureus に対するミエロペルオキシダーゼ系の活性に対するL-リシンの効果は、以下の通りに裏付けられた。

【0056】

材料

40

早期の定常相増殖に対する後期の対数増殖を達成するため、振とうフラスコ法により細菌懸濁液、この実施例では具体的に *Staphylococcus aureus* を調製した。細菌は、トリプチカーゼダイズ培養液（TSB）中35℃で24時間にわたり増殖させた。4,000 rpmで10分間にわたり培養物を遠心分離し、上清を除去した。ペレットを回収し、無菌の0.9%生理食塩液（NS）により2回にわたり洗浄した。洗浄された微生物を懸濁させ、生理食塩液により、3マクファーランド濁度の標準液、すなわち mL 当たりの細菌約 10^9 コロニー形成単位（CFU）へと希釈した。実際のコロニーカウントは、TSA上に播種され、35℃で一晩インキュベートされた希釈系列（ 10^{-1} ～ 10^{-5} または 10^{-6} ）により確認する。約 10^7 CFU/ mL の最終的な作業用標的接種材料を得るため、最終反応混合物 mL 当たり15マイクロリットルの微生物を用

50

いる。

【0057】

*Aspergillus Niger*に由来するグルコースオキシダーゼ (GO) は、英国、Biozyme社から購入した (型番GO3A; 270U/mg)。ブタミエロペルオキシダーゼ (p-MPO) (米国、アーカンソー州、リトルロック、Exoxemis社製; 375U/mg)。D-グルコースおよび塩化ナトリウムの無菌原液を調製し、各々、150mMの最終濃度で用いた。L-リシンヒドロクロリド (Spectrum Chemical社製; 型番L1142) は、100mMの原液として調製した。カタラーゼ (Sigma社製; 型番C-40) は、0.9%の生理食塩液中に1%の原液として調製した。静脈穿刺により血液を採取し、同日中に全血液として用いた。

10

【0058】

方法

滅菌法を用いて、0.02%のTween-80、150mEq/Lの塩化物、および0、1.25、5、または20μmol/mLのL-リシンを含有するpH6.5の20mMリン酸緩衝液により、表1において示される濃度で、p-MPOおよびグルコースオキシダーゼ溶液を調製した。*Staphylococcus aureus*を用いて、mL当たり $2 \sim 3 \times 10^7$ CFU ($7.4 \log 10$)の最終標的濃度をもたらし、静脈全血を用いて、3%の最終濃度をもたらし、反応混合物にグルコースを添加して、最終濃度を150mMとし、これにより殺菌反応を開始した。反応混合物の最終容量は1mLであった。反応は、乾燥槽内において、室温または37℃で、必要に応じて30分間～2時間

20

【0059】

表1

30

血液の存在下における*Staphylococcus aureus*に対するミエロペルオキシダーゼ系の殺菌活性に対するL-リシンの効果

【0060】

【表 1】

L-リシンの濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	平均生存率 CFU/ml 30分後	平均生存率 CFU/ml 60分後	対数による低減 30分後	対数による低減 60分後	
0	38	3.3	6300000		0.6		
0	38	3.3		700000		1.5	
5	38	3.3	6050		3.6		
5	38	3.3		770		4.5	
20	38	3.3	6450		3.6		10
20	38	3.3		620		4.6	
0	38	33.3	435000		1.8		
0	38	33.3		4650		3.7	
5	38	33.3	7		6.5		
5	38	33.3		3		6.8	
20	38	33.3	5		6.6		
20	38	33.3		5		6.6	
0	9	0.833	8550000		0.5		
0	9	0.833		6350000		0.6	
1.25	9	0.833	5050000		0.7		20
1.25	9	0.833		620000		1.6	
5	9	0.833	775000		1.5		
5	9	0.833		53000		2.7	
0	9	8.33	6150000		0.6		
0	9	8.33		5050000		0.7	
1.25	9	8.33	6200000		0.6		
1.25	9	8.33		4950		3.7	
5	9	8.33	675000		1.6		
5	9	8.33		47		5.7	30
0 ¹	0	0		25050000		0.0	

¹ 対照は、血液、アミノ酸、グルコース、MPO、およびグルコースオキシダーゼの不在下において実施された。

【0061】

表1に示される通り、MPOにグルコースオキシダーゼを加えると、アミノ酸(AA)であるL-リシンの存在下において強力な殺菌活性が示される。この組み合わせにより、3%血液の存在下において、 10^7 個の*Staphylococcus aureus*が死滅したのに対し、L-リシンを有さない同じ組み合わせでは、死滅が著明に低度であった。

【0062】

(実施例2)

血液の存在下における*Staphylococcus aureus*に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性の潜在的増強剤としてのアミノ酸の効果

各被験アミノ酸に単一濃度のp-MPO(714 pモル/mL;これは100 μg/mLまたは38 U/mLと等量である)および単一濃度のグルコースオキシダーゼ(33.3 U/mL)を用いたことを除き、実施例1の一般的な手順に従うことによって、血液の存在下におけるMPO殺菌活性の潜在的増強剤としての各種アミノ酸およびアミノ酸相同体の効果が裏付けられた。以下の表2~6に示される個々のアミノ酸を5 μモル/mLの単一濃度で調べ、アミノ酸を伴わないMPO系と比較した。それらの殺菌活性を除外する

ため、M P O の不在下における単独のアミノ酸を調べた。2 連の平均としての結果を、表 2 ～ 6 に示す。

【 0 0 6 3 】

表 2

アミノ酸の種類：血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の殺菌活性に対する効果

【 0 0 6 4 】

【表 2】

アミノ酸の名称	アミノ酸 の濃度	MPO	GO	平均生存率 CFU/ml	log10 (CFU+1) による生存 菌数	対数による 低減	
	mM	U/ml	U/ml	60分後	60分後	60分後	
L-アラニン	5	38	33.3	7	0.9	6.5	
L-アルギニン	5	38	33.3	5450000	6.7	0.6	
L-システイン	5	38	33.3	17400000	7.2	0.1	
L-グルタミン酸	5	38	33.3	236	2.4	5.0	
L-グルタミン	5	38	33.3	286	2.5	4.9	
グリシン	5	38	33.3	0	0.0	7.4	20
L-ヒスチジン	5	38	33.3	48000	4.7	2.7	
L-リシン	5	38	33.3	0	0.0	7.4	
L-メチオニン	5	38	33.3	6600000	6.8	0.6	
L-フェニルアラニン	5	38	33.3	0	0.0	7.4	
L-プロリン	5	38	33.3	4850	3.7	3.7	
L-セリン	5	38	33.3	0	0.0	7.4	
L-トレオニン	5	38	33.3	630000	5.8	1.6	
L-トリプトファン	5	38	33.3	21150000	7.3	0.1	
L-バリン	5	38	33.3	0	0.0	7.4	
なし	0	38	33.3	5200000	6.7	0.7	30
なし ¹	0	0	0	23950000	7.4	0.0	

¹ 対照は、血液、アミノ酸、グルコース、M P O、およびグルコースオキシダーゼの不在下において実施された。

【 0 0 6 5 】

表 3

アミノ酸の種類：血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の殺菌活性に対する効果

【 0 0 6 6 】

【表 3】

アミノ酸の名称	アミノ酸 の濃度	MPO	GO	平均生存率 CFU/ml	log10 (CFU+1) による生 存菌数	対数による 低減
	mM	U/ml	U/ml	60分後	60分後	60分後
L-ロイシン	5	38	33.3	0	0.0	7.3
L-イソロイシン	5	38	33.3	0	0.0	7.3
L-アスパラギン酸	5	38	33.3	620000	5.8	1.5
L-アスパラギン	5	38	33.3	5950000	6.8	0.6
L-ヒドロキシプロリン	5	38	33.3	0	0.0	7.3
L-オルニチン	5	38	33.3	0	0.0	7.3
L-チロシン	5	38	33.3	630000	5.8	1.5
D-アラニン	5	38	33.3	0	0.0	7.3
アラニン無水物	5	38	33.3	845000	5.9	1.4
グリシン無水物	5	38	33.3	830000	5.9	1.4
タウリン	5	38	33.3	830000	5.9	1.4
D-トレオニン	5	38	33.3	815000	5.9	1.4
ピルビン酸	5	38	33.3	4900000	6.7	0.6
馬尿酸	5	38	33.3	865000	5.9	1.4
ニコチン酸	5	38	33.3	4150000	6.6	0.7
なし	0	38	33.3	5550000	6.7	0.6
なし ¹	0	0	0	22000000	7.3	0.0

¹ 対照は、血液、アミノ酸、グルコース、MPO、およびグルコースオキシダーゼの不在下において実施された。

【0067】

表 4

アミノ酸の種類：血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の殺菌活性に対する効果

【0068】

【表 4】

アミノ酸の名称	アミノ酸の 濃度	MPO	GO	平均生存率 CFU/ml	対数による 低減
	mM	U/ml	U/ml	60分後	60分後
ベータアラニン	5	38	33.3	0	7.4
L-Alaメチルエステル	5	38	33.3	0	7.4
L-Ala-L-ala	5	38	33.3	238500	2.0
グリオキシル酸	5	38	33.3	610000	1.6
D-プロリン	5	38	33.3	830	4.5
D-ロイシン	5	38	33.3	66550	2.6
D-リシン	5	38	33.3	5050000	0.7
D-グルタミン酸	5	38	33.3	955000	1.4
D-トリプトファン	5	38	33.3	19700000	0.1
なし	0	38	33.3	665000	1.6
なし ¹	0	0	0	26150000	0.0

¹ 対照は、血液、アミノ酸、グルコース、MPO、およびグルコースオキシダーゼの不在

下において実施された。

【0069】

表 5

アミノ酸の種類：血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の殺菌活性に対する効果

【0070】

【表 5】

アミノ酸1の名称	アミノ酸1の濃度	MPO	GO	平均生存率 CFU/ml	対数による低減
	mM	U/ml	U/ml	60分後	60分後
D-グルタミン	5	38	33.3	18	6.1
D-イソロイシン	5	38	33.3	0	7.4
D-オルニチン	5	38	33.3	0	7.4
D-フェニルアラニン	5	38	33.3	0	7.4
D-セリン	5	38	33.3	0	7.4
D-バリン	5	38	33.3	0	7.4
D-アルギニン	5	38	33.3	0	7.4
D-アスパラギン酸	5	38	33.3	570000	1.6
D-メチオニン	5	38	33.3	9400000	0.4
D-ヒスチジン	5	38	33.3	10900	3.4
D-チロシン	5	38	33.3	9400	3.4
なし	0	38	33.3	400000	1.8
なし	0	0	0	24700000	0.0

10

20

アミノ酸単独の殺菌活性を決定するための対照として、グルコース、MPO、およびグルコースオキシダーゼの不在下にあることを除き、反復なしで実施例2の手順に従った。結果を表6に示す

表 6

アミノ酸の種類：血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するアミノ酸単独の殺菌活性

【0071】

30

【表 6 - 1】

アミノ酸の名称	アミノ酸の濃度	MPO	GO	平均生存率 CFU/ml	対数による低減
	mM	U/ml	U/ml	60分後	60分後
L-アラニン	5	0	0	24100000	0.0
L-アルギニン	5	0	0	23600000	0.0
L-システイン	5	0	0	22400000	0.0
L-グルタミン酸	5	0	0	23700000	0.0
L-グルタミン	5	0	0	24100000	0.0
グリシン	5	0	0	25300000	0.0
L-ヒスチジン	5	0	0	22700000	0.0
L-リシン	5	0	0	21400000	0.0
L-メチオニン	5	0	0	19800000	0.1
L-フェニルアラニン	5	0	0	22400000	0.0
L-プロリン	5	0	0	21600000	0.0
L-セリン	5	0	0	24100000	0.0
L-トレオニン	5	0	0	23300000	0.0
L-トリプトファン	5	0	0	21600000	0.0
L-バリン	5	0	0	23100000	0.0
L-ロイシン	5	0	0	18700000	0.1
L-イソロイシン	5	0	0	20500000	0.0
L-アスパラギン酸	5	0	0	18600000	0.1
L-アスパラギン	5	0	0	21800000	0.0
L-ヒドロキシプロリン	5	0	0	20400000	0.0
L-オルニチン	5	0	0	19200000	0.1
L-チロシン	5	0	0	21600000	0.0
D-アラニン	5	0	0	19600000	0.0
アラニン無水物	5	0	0	21900000	0.0
グリシン無水物	5	0	0	20100000	0.0
タウリン	5	0	0	21600000	0.0
D-トレオニン	5	0	0	20700000	0.0
ピルビン酸	5	0	0	22100000	0.0
馬尿酸	5	0	0	19700000	0.0
ニコチン酸	5	0	0	23200000	0.0
ベータアラニン	5	0	0	25500000	0.0
L-Alaメチルエステル	5	0	0	24300000	0.0
L-Ala-L-ala	5	0	0	26100000	0.0
グリオキシル酸	5	0	0	22200000	0.1
D-プロリン	5	0	0	21400000	0.1
D-ロイシン	5	0	0	24400000	0.0
D-リシン	5	0	0	25100000	0.0
D-グルタミン酸	5	0	0	26200000	0.0
D-トリプトファン	5	0	0	22600000	0.1
D-グルタミン	5	0	0	20500000	0.1
D-イソロイシン	5	0	0	21300000	0.1

【表 6 - 2】

アミノ酸の名称	アミノ酸の濃度	MPO	GO	平均生存率 CFU/ml	対数による低減
	mM	U/ml	U/ml	60分後	60分後
D-オルニチン	5	0	0	20600000	0.1
D-フェニルアラニン	5	0	0	24200000	0.0
D-セリン	5	0	0	23100000	0.0
D-バリン	5	0	0	20900000	0.1
D-アルギニン	5	0	0	21500000	0.1
D-アスパラギン酸	5	0	0	20900000	0.1
D-メチオニン	5	0	0	21100000	0.1
D-ヒスチジン	5	0	0	22300000	0.0
D-チロシン	5	0	0	23200000	0.0

10

表 2～5 は、アミノ酸の添加を伴う場合および伴わない場合における M P O 系の効能を示す。表 6 は、アミノ酸もそれらの相同体も、M P O の不在下におけるそれ自体では、殺菌性でないことを示す。

【 0 0 7 3 】

アミノ酸を介する改良の大きさは、用いられるアミノ酸に依存し、試験条件下において、ゼロ l o g ～少なくとも 6 l o g の改良の範囲にある。

20

【 0 0 7 4 】

表 2 において、代表的な L - アミノ酸による試験は、アミノ酸と共に用いると、M P O 系の活性が増大することを裏付ける。顕著な例外は、M P O 系により生成される酸化中間体と化学反応し、不活性化化合物を生成すると予測されるアミノ酸である、システイン、メチオニン、およびトリプトファンである。ヒスチジンによる活性増強の限定も、それが一重項酸素に対して高度に反応性であると予測され、M P O 系の生成物により消尽されるという事実によれば説明できるであろう。

【 0 0 7 5 】

表 3 および 4 では L - アミノ酸が追加され、これらにより、アミノ酸のエステルおよび他の密接な相同体もまた、裏付け可能な活性を有することが示される。

30

【 0 0 7 6 】

表 3、4、および 5 では、多数の D - アミノ酸について調べたところ、L - アミノ酸の場合と同様に、多くの D - アミノ酸により、製剤の殺菌活性に対して著明な向上をもたらすことができる。表 5 に示される D - アルギニンが、表 2 に示される、本質的に不活性の L - アルギニンとは対照的に、高度に活性であることに注目されたい。

【 0 0 7 7 】

一般に、脂肪族アミノ酸、とりわけ、分枝鎖を含有する脂肪族アミノ酸は、高度に活性である。

【 0 0 7 8 】

表 6 では、それらの殺菌活性を除外するため、すべてのアミノ酸を、M P O の不在下において単独で調べた。

40

【 0 0 7 9 】

(実施例 3)

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性の潜在的増強剤としてのアミノ酸類似体の効果

実施例 2 の一般的な手順に従うことによって、血液の存在下における p - M P O 殺菌活性の潜在的増強剤としての各種ベータアミノ酸、エステル誘導体、および N - 置換アミノ酸の効果が裏付けられた。それらの殺菌活性を除外するため、M P O の不在下における単独のアミノ酸類似体を調べた。

【 0 0 8 0 】

50

結果を以下の表 7 および表 8 に示す。

【0081】

表 7

アミノ酸類似体の種類：血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の殺菌活性に対する効果

【0082】

【表 7】

アミノ酸の名称	アミノ酸 の 濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	平均生存率 CFU/ml 60分後	対数によ る低減 60分後	
ベータアミノ酸						
DL-ベータホモロイシン	5	38	33.3	0	7.4	10
3-アミノ酪酸	5	38	33.3	9	6.4	
DL-2,3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩	5	38	33.3	0	7.4	
DL-3-アミノイソ酪酸	5	38	33.3	0	7.4	
ベータ-アラニンエチルエステル塩酸塩	5	38	33.3	1195000	1.3	
3-アミノ酪酸エチル	5	38	33.3	0	7.4	20
エステルアミノ酸						
L-リシンメチルエステル二塩酸塩	5	38	33.3	0	7.4	20
L-チロシンメチルエステル塩酸塩	5	38	33.3	87000	2.4	
グリシンメチルエステル塩酸塩	5	38	33.3	0	7.4	
L-バリンエチルエステル塩酸塩	5	38	33.3	0	7.4	
エチル2-アミノプロパノエート	5	38	33.3	0	7.4	
N-置換アミノ酸						
サルコシンメチルエステル塩酸塩	5	38	33.3	0	7.4	30
L-プロリンメチルエステル塩酸塩	5	38	33.3	0	7.4	
ニペコチン酸	5	38	33.3	0	7.4	
なし ¹	0	0	0	23150000	0.0	

¹ 対照は、血液、アミノ酸、グルコース、MPO、およびグルコースオキシダーゼの不在下において実施された。

【0083】

アミノ酸単独の殺菌活性を決定するための対照として、グルコース、MPO、およびグルコースオキシダーゼの不在下にあることを除き、反復なしで上述の手順に従った。結果を表 8 に示す。

【0084】

表 8

アミノ酸類似体の種類：血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するアミノ酸類似体単独の殺菌活性

【0085】

10

20

30

40

【表 8】

アミノ酸の名称	アミノ酸 の 濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	平均生存率 CFU/ml 60分後	対数に よる低 減 60分後	
ベータアミノ酸						
DL-ベータホモロイシン	5	0	0	20500000	0.0	10
3-アミノ酪酸	5	0	0	21300000	0.0	
DL-2,3-ジアミノプロピオン酸一塩酸塩	5	0	0	20600000	0.0	
DL-3-アミノイソ酪酸	5	0	0	24200000	0.0	
ベータ-アラニンエチルエステル塩酸塩	5	0	0	23100000	0.0	
3-アミノ酪酸エチル	5	0	0	20900000	0.0	
エステルアミノ酸						
L-リシンメチルエステル二塩酸塩	5	0	0	21500000	0.0	20
L-チロシンメチルエステル塩酸塩	5	0	0	20900000	0.0	
グリシンメチルエステル塩酸塩	5	0	0	21100000	0.0	
L-バリンエチルエステル塩酸塩	5	0	0	22300000	0.0	
エチル2-アミノプロパノエート	5	0	0	23200000	0.0	
N-置換アミノ酸						
サルコシンメチルエステル塩酸塩	5	0	0	23200000	0.0	30
L-プロリンメチルエステル塩酸塩	5	0	0	23200000	0.0	
ニペコチン酸	5	0	0	23200000	0.0	

表 7 および表 8 に示される通り、大半の被験アミノ酸相同体の存在下において、MPO 系は、強力な殺菌活性を示す。表 2 ～表 5 に示される通り、ベータアミノ酸、エステルアミノ酸、および N-置換されたアミノ酸相同体を代表するものとして選択された化合物の大半が、3% 血液の存在下において、 10^7 CFU の *Staphylococcus aureus* 殺滅を達成したのに対し、アミノ酸を伴わない同一の試験条件でもたらされる低減は、 $1.5 \log$ 未満であった。表 8 に示される通り、アミノ酸単独では、殺菌活性が示されなかった。

【0086】

(実施例 4)

カタラーゼによる反応停止前の 30 分間または 60 分間にわたって、25 または 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度における MPO、および 1.25、5、または 20 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ (mM) の濃度におけるアミノ酸を用い、各種のアミノ酸について、実施例 2 の一般的手順に従った。アミノ酸および条件の各々に対する生存生物数の $\log_{10}$ (CFU + 1) を、試験条件ごとの平均結果を有効性の降順にランク付けした以下の表 9 に示す。

【0087】

表 9

濃度条件および時間条件を変化させる場合における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の殺菌活性に対するアミノ酸の効果

【0088】

10

20

30

40

【表 9】

試験条件:	A	B	C	D	E	F	G	H	
MPO ($\mu\text{g/mL}$)	100	100	100	100	25	25	25	25	
AA (mM)	20	20	5	5	5	5	1.25	1.25	
時間 (分)	30	60	30	60	30	60	30	60	
アミノ酸:	log10(CFU+1)による生存菌数								平均のランク
	A	B	C	D	E	F	G	H	
ベータアラニン	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.000
D-アラニンメチルエステル	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.000
L-イソロイシン	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.1	0.0	1.250
L-ロイシン	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	3.9	0.0	2.000
L-バリン	0.0	0.0	0.0	0.0	4.7	0.0	4.8	0.0	2.375
D-バリン	0.0	0.0	0.0	0.0	4.1	0.0	6.7	0.0	2.625
D-イソロイシン	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.0	1.1	2.625
D-フェニルアラニン	0.0	0.0	0.0	0.0	5.1	0.0	7.2	4.9	6.500
L-フェニルアラニン	0.0	0.0	0.0	0.0	7.1	0.0	7.0	4.9	7.500
L-セリン	5.8	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	6.8	1.8	8.000
L-アラニンメチルエステル	0.0	0.0	0.0	0.0	7.3	0.0	7.3	0.0	8.625
L-オルニチン	6.9	0.0	6.7	0.0	7.2	0.0	7.3	0.0	12.375
L-アラニン	6.1	0.0	5.1	0.0	6.9	4.1	7.0	4.7	12.875
D-ロイシン	1.8	1.9	2.7	2.0	3.8	2.2	6.7	2.1	13.625
L-プロリン	5.8	0.0	4.9	0.0	7.1	3.9	7.0	6.8	14.000
L-リシン 261	0.8	0.8	0.9	0.5	5.8	1.6	6.8	3.7	14.125
D-オルニチン	6.8	0.0	5.1	0.0	7.3	3.9	7.3	5.7	15.500
D-セリン	6.0	3.9	6.0	0.0	6.8	6.5	6.7	6.0	15.625
D-プロリン	4.8	0.0	5.7	2.7	6.9	2.4	7.3	3.7	16.125
D-チロシン	5.8	0.0	6.7	5.0	6.8	5.9	6.7	7.0	18.125
グリシン	7.0	0.0	6.0	0.0	7.2	6.8	7.3	6.9	19.625
D-アルギニン	7.0	6.8	6.9	0.0	6.9	6.7	7.0	5.9	20.000
D-ヒスチジン	6.8	3.9	5.1	4.1	7.0	6.0	6.9	5.8	20.125
D-グルタミン	6.8	4.0	5.0	0.0	7.3	7.0	7.2	7.0	21.375
D-アラニン	7.3	0.0	6.8	0.6	7.3	3.7	7.3	6.7	22.500
馬尿酸	6.8	5.0	7.3	5.9	7.3	5.9	6.7	5.8	24.875
L-グルタミン	7.0	5.2	7.2	0.0	7.3	7.1	6.8	7.0	25.000
L-アスパラギン酸	7.0	6.8	7.0	5.8	7.1	7.0	7.0	6.9	26.375
L-グルタミン酸	7.3	6.0	6.9	2.8	7.1	7.0	7.3	6.7	26.875
L-トレオニン	7.3	7.3	7.1	5.5	7.3	7.1	7.3	6.7	29.625
D-トレオニン	7.4	5.0	7.1	5.1	7.3	6.8	7.3	6.7	29.750
L-アラニン無水物	7.1	6.0	7.2	5.8	7.2	7.3	7.2	7.2	30.250
L-ヒドロキシプロリン	7.2	7.3	7.2	0.9	7.3	7.3	7.4	6.1	30.625
L-ヒスチジン	7.3	7.3	6.8	4.7	7.3	7.3	7.3	7.3	32.125
タウリン	7.3	5.1	7.3	5.0	7.3	7.0	7.3	7.1	32.625
グリシン無水物	7.0	6.9	7.3	5.9	7.4	7.2	7.3	7.0	33.000
L-チロシン	7.3	7.2	7.3	5.8	7.3	7.1	7.3	7.0	33.250

(実施例 5)

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性に対するアミノ酸の二元的組合せの効果

以下の表 9～13 に示される通り、各試験が、単一低濃度の MPO ($12.5 \mu\text{g/mL}$ または 4.7 U/mL) およびグルコースオキシダーゼ (4.2 U/mL) および 2 つのアミノ酸による活性化剤を含有し、各々が、 $1.25 \mu\text{mol/mL}$ の最終濃度で混合物

10

20

30

40

50

に添加されることを除き、実施例 2 の一般的な手順に従うことによって、血液の存在下における p-MPO 殺菌活性の潜在的増強剤としてのアミノ酸の二元的組合せの効果が裏付けられた。比較のためにアミノ酸による増強剤を個別に調べる場合、それらは、 $2.5 \mu\text{mol/mL}$ の最終濃度で混合物に添加される。

【0089】

結果を以下に示す。

【0090】

表 10

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の殺菌活性に対するアミノ酸の二元的組合せの効果

10

【0091】

【表 10-1】

アミノ酸1の 名称	アミノ 酸1の 濃度 mM	アミノ酸2の 名称	アミノ酸2 の濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	平均生存率 CFU/ml 50分後	対数に よる 低減 50分後
D-チロシン	1.25	L-ロイシン	1.25	4.7	4.2	5050000	0.7
D-チロシン	1.25	D-グルタミン	1.25	4.7	4.2	11050000	0.3
D-チロシン	1.25	L-セリン	1.25	4.7	4.2	11250000	0.3
D-バリン	1.25	L-プロリン	1.25	4.7	4.2	10100000	0.4
D-バリン	1.25	L-ヒスチジン	1.25	4.7	4.2	12600000	0.3
グリシン	1.25	D-フェニル アラニン	1.25	4.7	4.2	4250000	0.8
L-Alaメチル エステル	1.25	D-フェニル アラニン	1.25	4.7	4.2	11900000	0.3
L-アスパラギ ン酸	1.25	L-アラニン	1.25	4.7	4.2	11350000	0.3
L-アスパラギ ン酸	1.25	L-グルタミン酸	1.25	4.7	4.2	13150000	0.3
L-グルタミン 酸	1.25	D-アルギニン	1.25	4.7	4.2	12500000	0.3
L-グルタミン	1.25	L-バリン	1.25	4.7	4.2	11800000	0.3
L-グルタミン	1.25	L-Alaメチルエ ステル	1.25	4.7	4.2	12500000	0.3
L-グルタミン	1.25	D-バリン	1.25	4.7	4.2	14850000	0.2
グリシン	1.25	L-バリン	1.25	4.7	4.2	910	4.4
L-ヒスチジン	1.25	L-オルニチン	1.25	4.7	4.2	12250000	0.3
L-ヒドロキシ プロリン	1.25	D-グルタミン	1.25	4.7	4.2	13750000	0.3
L-イソロイシ ン	1.25	D-フェニルアラ ニン	1.25	4.7	4.2	4850000	0.7
L-ロイシン	1.25	L-グルタミン酸	1.25	4.7	4.2	8200000	0.5
L-リシン	1.25	L-グルタミン酸	1.25	4.7	4.2	12050000	0.3
L-オルニチン	1.25	L-フェニルアラ ニン	1.25	4.7	4.2	5950000	0.6
なし	0	D-チロシン	2.5	4.7	4.2	1320000	1.3
なし	0	L-ロイシン	2.5	4.7	4.2	214500	2.1
なし	0	D-グルタミン	2.5	4.7	4.2	14750000	0.2
なし	0	L-セリン	2.5	4.7	4.2	1175000	1.3
なし	0	D-バリン	2.5	4.7	4.2	630000	1.6
なし	0	L-プロリン	2.5	4.7	4.2	1235000	1.3
なし	0	L-ヒスチジン	2.5	4.7	4.2	7000000	0.5
なし	0	グリシン	2.5	4.7	4.2	9100	3.4
なし	0	D-フェニル アラニン	2.5	4.7	4.2	7950000	0.5
なし	0	L-Alaメチルエ ステル	2.5	4.7	4.2	7250000	0.5
なし	0	L-アスパラギ ン酸	2.5	4.7	4.2	6900000	0.6
なし	0	L-アラニン	2.5	4.7	4.2	9750000	0.4
なし	0	L-グルタミン酸	2.5	4.7	4.2	10850000	0.4

10

20

30

40

【表 10-2】

アミノ酸1の 名称	アミノ 酸1の 濃度 mM	アミノ酸2の 名称	アミノ酸2 の濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	平均生存率 CFU/ml 50分後	対数に よる 低減 50分後
なし	0	D-アルギニン	2.5	4.7	4.2	14200000	0.2
なし	0	L-グルタミン	2.5	4.7	4.2	14350000	0.2
なし	0	L-バリン	2.5	4.7	4.2	104500	2.4
なし	0	L-オルニチン	2.5	4.7	4.2	18250000	0.1
なし	0	L-ヒドロキシプ ロリン	2.5	4.7	4.2	13100000	0.3
なし	0	L-イソロイシン	2.5	4.7	4.2	159500	2.2
なし	0	L-リシン	2.5	4.7	4.2	16200000	0.2
なし	0	L-フェニルアラ ニン	2.5	4.7	4.2	10550000	0.4
なし ¹	0	なし	0	0	0	25050000	0.0

10

¹ 対照は、血液、アミノ酸、グルコース、MPO、およびグルコースオキシダーゼの不在下において実施された。

【0093】

20

表 11

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性に対するアミノ酸の二元的組合せの効果

【0094】

【表 1 1】

アミノ酸1の 名称	アミノ酸1 の濃度	アミノ酸2の 名称	アミノ酸2 の濃度	MPO	GO	平均生存率 CFU/ml	対数に よる 低減
	mM		mM	U/ml	U/ml	50分後	50分後
D-アルギニン	1.25	L-フェニルアラニ ン	1.25	4.7	4.2	6650000	0.6
D-アルギニン	1.25	D-グルタミン	1.25	4.7	4.2	10850000	0.4
D-アルギニン	1.25	D-ヒスチジン	1.25	4.7	4.2	6050000	0.6
D-グルタミン	1.25	D-イソロイシン	1.25	4.7	4.2	8950000	0.5
D-ヒスチジン	1.25	D-プロリン	1.25	4.7	4.2	5100000	0.7
D-ヒスチジン	1.25	L-ヒスチジン	1.25	4.7	4.2	11250000	0.4
D-イソロイシン	1.25	L-ロイシン	1.25	4.7	4.2	7750000	0.5
D-イソロイシン	1.25	D-フェニルアラニ ン	1.25	4.7	4.2	4100000	0.8
D-ロイシン	1.25	L-ヒスチジン	1.25	4.7	4.2	10200000	0.4
D-ロイシン	1.25	D-Alaメチルエス テル	1.25	4.7	4.2	7100000	0.6
D-オルニチン	1.25	L-イソロイシン	1.25	4.7	4.2	11850000	0.4
D-オルニチン	1.25	L-オルニチン	1.25	4.7	4.2	12850000	0.3
D-フェニルアラ ニン	1.25	L-リシン	1.25	4.7	4.2	8300000	0.5
D-プロリン	1.25	L-リシン	1.25	4.7	4.2	12350000	0.3
D-プロリン	1.25	D-イソロイシン	1.25	4.7	4.2	10500000	0.4
D-プロリン	1.25	D-ロイシン	1.25	4.7	4.2	11600000	0.4
D-セリン	1.25	D-トレオニン	1.25	4.7	4.2	12300000	0.3
D-セリン	1.25	D-グルタミン	1.25	4.7	4.2	12000000	0.4
D-トレオニン	1.25	L-リシン	1.25	4.7	4.2	11900000	0.4
なし	0	D-アルギニン	2.5	4.7	4.2	14650000	0.3
なし	0	L-フェニルアラニ ン	2.5	4.7	4.2	11100000	0.4
なし	0	D-グルタミン	2.5	4.7	4.2	15500000	0.2
なし	0	D-ヒスチジン	2.5	4.7	4.2	8000000	0.5
なし	0	D-イソロイシン	2.5	4.7	4.2	196000	2.1
なし	0	D-プロリン	2.5	4.7	4.2	1890000	1.2
なし	0	L-ヒスチジン	2.5	4.7	4.2	7000000	0.6
なし	0	L-ロイシン	2.5	4.7	4.2	200500	2.1
なし	0	D-フェニルアラニ ン	2.5	4.7	4.2	9300000	0.5
なし	0	D-ロイシン	2.5	4.7	4.2	313000	1.9
なし	0	D-Alaメチルエス テル	2.5	4.7	4.2	9500000	0.5
なし	0	D-オルニチン	2.5	4.7	4.2	17950000	0.2
なし	0	L-イソロイシン	2.5	4.7	4.2	155500	2.2
なし	0	L-オルニチン	2.5	4.7	4.2	17400000	0.2
なし	0	L-リシン	2.5	4.7	4.2	18900000	0.2
なし	0	D-セリン	2.5	4.7	4.2	945000	1.5
なし	0	D-トレオニン	2.5	4.7	4.2	2020000	1.1
なし	0	なし	0	0	0	26850000	0.0

(実施例 6)

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性に対する、グリシンを含有するアミノ酸の二元的組合せの効果

2つのアミノ酸のうちの1つをグリシンとして、実施例5の一般的手順を用いたところ

10

20

30

40

50

、表12および13に示される結果がもたらされた。

【0095】

表12

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペル
オキシダーゼ系の殺菌活性に対する、グリシンを伴うアミノ酸の二元的組合せの効果

【0096】

【表12】

アミノ酸1の 名称	アミノ 酸1の 濃度 mM	アミノ酸2の名称	アミノ 酸2の 濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	平均生存 率CFU/ ml 50分後	対数に よる低減 50分後
グリシン	1.25	ベータ-アラニン	1.25	4.7	4.2	6800	3.5
グリシン	1.25	L-バリン	1.25	4.7	4.2	910	4.4
グリシン	1.25	L-ロイシン	1.25	4.7	4.2	6900	3.5
グリシン	1.25	L-イソロイシン	1.25	4.7	4.2	975	4.4
グリシン	1.25	D-バリン	1.25	4.7	4.2	3330	3.8
グリシン	1.25	D-イソロイシン	1.25	4.7	4.2	0	7.4
グリシン	1.25	D-Ala-メチルエステル	1.25	4.7	4.2	125500	2.3
グリシン	2.5	なし	0	4.7	4.2	7050	3.5
なし	0	ベータ-アラニン	2.5	4.7	4.2	505000	1.7
なし	0	L-バリン	2.5	4.7	4.2	104500	2.4
なし	0	L-ロイシン	2.5	4.7	4.2	200500	2.1
なし	0	L-イソロイシン	2.5	4.7	4.2	73000	2.5
なし	0	D-バリン	2.5	4.7	4.2	630000	1.6
なし	0	D-イソロイシン	2.5	4.7	4.2	196000	2.1
なし	0	D-Ala-メチルエステル	2.5	4.7	4.2	5450000	0.6
なし	0	なし	0	0	0		0.0

表13

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペル
オキシダーゼ系の殺菌活性に対する、グリシンを伴うアミノ酸の二元的組合せの効果

【0097】

10

20

30

【表 1 3】

アミノ酸1の 名称	アミノ 酸1の 濃度 mM	アミノ酸2の濃度	アミノ酸2 の濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	平均 生存率 CFU/ml 50分後	対数に よる低減 50分後
グリシン	1.25	L-アラニン	1.25	4.7	4.2	209500	2.1
グリシン	1.25	D-アラニン	1.25	4.7	4.2	162500	2.2
グリシン	1.25	L-アスパラギン酸	1.25	4.7	4.2	51000	2.7
グリシン	1.25	L-グルタミン酸	1.25	4.7	4.2	1100000	1.3
グリシン	1.25	L-グルタミン	1.25	4.7	4.2	765000	1.5
グリシン	1.25	L-ヒスチジン	1.25	4.7	4.2	495000	1.7
グリシン	1.25	L-ヒドロキシプロリン	1.25	4.7	4.2	4900000	0.7
グリシン	1.25	D-ロイシン	1.25	4.7	4.2	90000	2.4
グリシン	1.25	L-リシン	1.25	4.7	4.2	680000	1.6
グリシン	1.25	L-オルニチン	1.25	4.7	4.2	4600000	0.7
グリシン	1.25	L-プロリン	1.25	4.7	4.2	162500	2.2
グリシン	1.25	L-セリン	1.25	4.7	4.2	99500	2.4
グリシン	1.25	L-トレオニン	1.25	4.7	4.2	515000	1.7
グリシン	1.25	L-チロシン	1.25	4.7	4.2	565	4.6
グリシン	1.25	D-フェニルアラニン	1.25	4.7	4.2	4250000	0.8
グリシン	2.5	なし	0	4.7	4.2	10050	3.4
なし	0	L-アラニン	2.5	4.7	4.2	2230000	1.0
なし	0	D-アラニン	2.5	4.7	4.2	1900000	1.1
なし	0	L-アスパラギン酸	2.5	4.7	4.2	4700000	0.7
なし	0	L-グルタミン酸	2.5	4.7	4.2	11800000	0.3
なし	0	L-グルタミン	2.5	4.7	4.2	12550000	0.3
なし	0	L-ヒスチジン	2.5	4.7	4.2	4750000	0.7
なし	0	L-ヒドロキシプロリン	2.5	4.7	4.2	11450000	0.3
なし	0	D-ロイシン	2.5	4.7	4.2	119000	2.3
なし	0	L-リシン	2.5	4.7	4.2	11400000	0.3
なし	0	L-オルニチン	2.5	4.7	4.2	12650000	0.3
なし	0	L-プロリン	2.5	4.7	4.2	1500000	1.2
なし	0	L-セリン	2.5	4.7	4.2	835000	1.5
なし	0	L-トレオニン	2.5	4.7	4.2	1415000	1.2
なし	0	L-チロシン	2.5	4.7	4.2	890000	1.4
なし	0	D-フェニルアラニン	2.5	4.7	4.2	8850000	0.4
なし	0	なし	0	0	0	25000000	0.0

(実施例 7)

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性に対する、L-イソロイシンを含有するアミノ酸の二元的組合せの効果

実施例 2 において、アミノ酸である L-イソロイシンは、*Staphylococcus aureus* に対する MPO 系の強力な活性増強剤として同定された。したがって、実施例 5 の手順に従うことにより、血液の存在下における MPO 殺菌活性の潜在的増強剤としての L-イソロイシンとの個々のアミノ酸の二元的組合せ効果が検討された。結果を、以下の下記表 1 4 に示す。

【0 0 9 8】

表 1 4

血液の存在下における *Staphylococcus aureus* に対するミエロペルオキシダーゼ系の殺菌活性に対する、L-イソロイシンを伴うアミノ酸の二元的組合せの効果

【 0 0 9 9 】

【表 1 4】

アミノ酸1 の名称	アミノ 酸1の 濃度 mM	アミノ酸2の濃度	アミノ 酸2の 濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	平均生存率 CFU/ml 50分後	対数に よる低減 50分後	
L-イソロイシン	1.25	ベータ-アラニン	1.25	4.7	4.2	13850000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	D-Alaメチルエス テル	1.25	4.7	4.2	14700000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	L-フェニルアラニ ン	1.25	4.7	4.2	7900000	0.5	10
L-イソロイシン	1.25	L-グルタミン酸	1.25	4.7	4.2	13950000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	D-グルタミン	1.25	4.7	4.2	13700000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	L-アラニン	1.25	4.7	4.2	16400000	0.2	
L-イソロイシン	1.25	L-ヒドロキシプロ リン	1.25	4.7	4.2	12850000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	D-ロイシン	1.25	4.7	4.2	12600000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	L-リシン	1.25	4.7	4.2	13350000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	D-オルニチン	1.25	4.7	4.2	11850000	0.4	
L-イソロイシン	1.25	L-オルニチン	1.25	4.7	4.2	14700000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	D-フェニルアラニ ン	1.25	4.7	4.2	4850000	0.7	20
L-イソロイシン	1.25	L-プロリン	1.25	4.7	4.2	15950000	0.2	
L-イソロイシン	1.25	L-セリン	1.25	4.7	4.2	13250000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	D-アルギニン	1.25	4.7	4.2	12400000	0.3	
L-イソロイシン	1.25	L-チロシン	1.25	4.7	4.2	8450000	0.5	
L-イソロイシン	2.5	なし	0	4.7	4.2	117000	2.4	
なし	0	ベータ-アラニン	2.5	4.7	4.2	6000000	0.7	
なし	0	D-Alaメチルエス テル	2.5	4.7	4.2	8850000	0.5	
なし	0	L-フェニルアラニ ン	2.5	4.7	4.2	12050000	0.3	30
なし	0	L-グルタミン酸	2.5	4.7	4.2	13700000	0.3	
なし	0	D-グルタミン	2.5	4.7	4.2	15050000	0.3	
なし	0	L-アラニン	2.5	4.7	4.2	2215000	1.1	
なし	0	L-ヒドロキシプロ リン	2.5	4.7	4.2	11550000	0.4	
なし	0	D-ロイシン	2.5	4.7	4.2	163500	2.2	
なし	0	L-リシン	2.5	4.7	4.2	16950000	0.2	
なし	0	L-オルニチン	2.5	4.7	4.2	19200000	0.1	
なし	0	L-プロリン	2.5	4.7	4.2	1835000	1.2	
なし	0	L-セリン	2.5	4.7	4.2	940000	1.5	40
なし	0	D-アルギニン	2.5	4.7	4.2	15000000	0.3	
なし	0	L-チロシン	2.5	4.7	4.2	1450000	1.3	
なし	0	D-フェニルアラニ ン	2.5	4.7	4.2	7950000	0.5	
なし	0	D-オルニチン	2.5	4.7	4.2	17950000	0.2	
なし	0	なし	0	0	0	27400000	0.0	

効能に対する、2つの組み合わせられたアミノ酸によるすべての製剤の効果を、各単一のアミノ酸の効果と比較する、表10～表14に含有されるデータの解析を実施し、可能な相乗作用またはアンタゴニズムを同定した。

【 0 1 0 0 】

37のアミノ酸またはそれらの誘導体を単独で検討した。上記で説明した標準的な条件下において、74対のアミノ酸を調べた。

【0101】

相乗作用の判定法

相乗作用またはアンタゴニズムの計算は、以下の通りに行った。

【0102】

被験アミノ酸対の各々について、標準的な条件下において単独で作用する個別のアミノ酸の2つの結果について見出されるCFUによる生存菌数の平均として、予測CFUを計算した。例えば、表11に示される、D-イソロイシンおよびグリシンによる第1の相乗作用的組合せについて考えてみよう。上記の表11に由来する、個別に作用する各アミノ酸についてのCFUは、それぞれ、196000および9300である。これら2つの数の平均は102650であり、下記の表16の第1行において、CFUによる予測生存菌数として示される。次いで、該対について観察される実際のCFUを、予測CFUにより除し、これに100を乗じて、予測値に対する%を計算する。次いで、この値を、次節において論じる閾値と比較して、該対が相乗的であるか、アンタゴニスト的であるか、または相加的であるかを判定する。

10

【0103】

閾値の計算

相乗作用およびアンタゴニズムの判定に適切な閾値の計算は、CFUによる生存菌数を反復して測定した場合のばらつきに基づいた。大半の測定は、2連で行った。すべての2連データについての平方数の和を統合し、 $\log_{10}(CFU+1)$ 変換の後、自由度の数で除すると、対数変換されたデータの誤差分散が得られる。これにより、変動係数(CV)を計算し、これを表15に示す。

20

【0104】

表15

CFU変動係数の統合推定値の計算

【0105】

【表15】

自由度	統合された平方数の和	分散	標準偏差	変動係数
709	5.6859	0.0080	0.0896	23%

30

このCVは、CFU応答の全範囲にわたり計算される。したがって、この応答の場合、正常変動は、標準偏差の2倍以内、または約50%~200%にある。ここで、さらに2倍の控えめな倍数を用い、実際の相乗作用およびアンタゴニズムが同定されることを確認した。したがって、カットオフは、相乗作用の場合が25%、また、アンタゴニズムの場合が400%に設定された。上記の例にこの閾値を適用すると、D-イソロイシンおよびグリシンによる対についての実際のCFUは0CFUまたは予測値の0%であるので、この対には相乗作用が存在するという明らかな結論が得られる。

【0106】

結果の表

40

被験対象である各組合せの結果を3つの表に分類する：表16は、応答が予測値の25%未満である相乗作用的組合せを示し、表17は、応答が予測値の400%を超えるアンタゴニスト的組合せを示し、表18は、応答が予測値の25%~400%である相加的組合せを示す。

【0107】

表16

相乗作用的な組合せ

【0108】

【表 1 6】

アミノ酸1	アミノ酸2	実際のCFU	アミノ酸の予測平均	予測値対実際値
D-イソロイシン	グリシン	0	102650	0.0%
L-チロシン	グリシン	565	589650	0.1%
ベータ-アラニン	グリシン	6800	1630900	0.4%
D-バリン	グリシン	3330	319650	1.0%
L-イソロイシン	グリシン	975	69317	1.4%
L-バリン	グリシン	910	56900	1.6%
L-アスパラギン酸	グリシン	51000	3121317	1.6%
D-Alaメチルエステル	グリシン	125500	3834650	3.3%
L-ロイシン	グリシン	6900	106650	6.5%
L-アラニン	グリシン	209500	2370483	8.8%
L-グルタミン	グリシン	765000	6704650	11.4%
L-リシン	グリシン	680000	5704650	11.9%
L-ヒスチジン	グリシン	495000	2942150	16.8%
D-アラニン	グリシン	162500	954650	17.0%
L-グルタミン酸	グリシン	1100000	6124650	18.0%
L-セリン	グリシン	99500	492650	20.2%
L-プロリン	グリシン	162500	739650	22.0%

10

表 1 7

20

アンタゴニスト的な組合せ

【0 1 0 9】

【表 1 7】

アミノ酸1	アミノ酸2	実際のCFU	アミノ酸の予測平均	予測値対実際値
L-ロイシン	D-チロシン	5050000	762000	662.7%
L-イソロイシン	L-アラニン	16400000	2430500	674.8%
L-イソロイシン	D-アラニン	13850000	1690917	819.1%
D-トレオニン	D-セリン	12300000	1482500	829.7%
L-プロリン	D-バリン	10100000	1050000	961.9%
L-セリン	D-チロシン	11250000	1148000	980.0%
D-プロリン	D-イソロイシン	10500000	1043000	1006.7%
D-プロリン	D-ロイシン	11600000	1052500	1102.1%
L-チロシン	L-イソロイシン	8450000	649667	1300.7%
L-プロリン	L-イソロイシン	15950000	799667	1994.6%
L-セリン	L-イソロイシン	13250000	552667	2397.5%
L-ロイシン	D-イソロイシン	7750000	200000	3875.0%
L-イソロイシン	D-ロイシン	12600000	172167	7318.5%

30

表 1 8

相加的な組合せ

40

【0 1 1 0】

【表 18】

アミノ酸1	アミノ酸2	実際のCFU	アミノ酸の 予測平均	予測値 対実際値	
L-フェニルアラニン	L-オルニチン	5950000	13800000	43.1%	
L-フェニルアラニン	D-アルギニン	6650000	12900000	51.6%	
D-ヒスチジン	D-アルギニン	6050000	11300000	53.5%	
L-オルニチン	グリシン	4600000	8204650	56.1%	
L-リシン	D-フェニルアラニン	8300000	13087500	63.4%	
L-トレオニン	グリシン	515000	712150	72.3%	
D-グルタミン	D-アルギニン	10850000	14700000	73.8%	10
L-オルニチン	D-オルニチン	12850000	17175000	74.8%	
グリシン	D-ロイシン	90000	112150	80.2%	
L-リシン	L-グルタミン酸	12050000	14857500	81.1%	
L-ヒドロキシプロリン	グリシン	4900000	5934650	82.6%	
D-フェニルアラニン	D-イソロイシン	4100000	4448000	92.2%	
L-グルタミン酸	D-アルギニン	12500000	13420000	93.1%	
グリシン	D-フェニルアラニン	4250000	4354650	97.6%	
L-ヒドロキシプロリン	D-グルタミン	13750000	13330000	103.2%	
L-イソロイシン	D-フェニルアラニン	4850000	4414667	109.9%	
L-オルニチン	L-ヒスチジン	12250000	11137500	110.0%	
D-イソロイシン	D-グルタミン	8950000	7498000	119.4%	20
L-グルタミン	L-Alaメチルエステル	12500000	10325000	121.1%	
L-リシン	D-トレオニン	11900000	9747500	122.1%	
L-リシン	D-プロリン	12350000	9682500	127.5%	
L-イソロイシン	D-オルニチン	11850000	9039667	131.1%	
L-ロイシン	L-グルタミン酸	8200000	6222000	131.8%	
D-チロシン	D-グルタミン	11050000	8060000	137.1%	
L-フェニルアラニン	L-イソロイシン	7900000	5664667	139.5%	
L-グルタミン酸	L-アスパラギン酸	13150000	9236667	142.4%	
L-Alaメチルエステル	D-フェニルアラニン	11900000	7975000	149.2%	
L-リシン	L-イソロイシン	13350000	8802167	151.7%	30
D-セリン	D-グルタミン	12000000	7872500	152.4%	
L-ヒスチジン	D-ヒスチジン	11250000	6937500	162.2%	
L-イソロイシン	D-アルギニン	12400000	7364667	168.4%	
L-バリン	L-グルタミン	11800000	6752250	174.8%	
L-オルニチン	L-イソロイシン	14700000	8264667	177.9%	
D-ロイシン	D-Alaメチルエステル	7100000	3937500	180.3%	
L-イソロイシン	D-グルタミン	13700000	7464667	183.5%	
L-アスパラギン酸	L-アラニン	11350000	5482500	207.0%	
L-グルタミン	D-バリン	14850000	7015000	211.7%	
L-イソロイシン	L-ヒドロキシプロリン	12850000	5994667	214.4%	
L-イソロイシン	L-グルタミン酸	13950000	6184667	225.6%	40
r-イソロイシン	グリシン	94500	36650	257.8%	
L-ヒスチジン	D-ロイシン	10200000	3045000	335.0%	
L-イソロイシン	D-Alaメチルエステル	14700000	3894667	377.4%	
L-ヒスチジン	D-バリン	12600000	3252500	387.4%	

ラセミアミノ酸の組合せ

ラセミアミノ酸とは、D-異性体およびL-異性体の1:1の混合物として考えることができる。そこで、個々のD-光学異性体およびL-光学異性体の効能に基づいて、いくつかのラセミ混合物を組合せとして調べ、アンタゴニスト的混合物であるか、相加的混合物であるか、または相乗作用的混合物であるかを同定した。4つのアミノ酸のD-形態、L-形態、およびラセミ形態についての結果を、表19に示す。

【0111】

表19
ラセミ混合物

【0112】

【表19】

アミノ酸1の名称	アミノ酸1の濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	平均生存率	対数による低減
				CFU/ml 50分後	50分後
D,L-イソロイシン	2.5	4.7	4.2	64000	2.7
D,L-ロイシン	2.5	4.7	4.2	650000	1.6
D,L-フェニルアラニン	2.5	4.7	4.2	900000	1.4
D,L-バリン	2.5	4.7	4.2	685000	1.5
L-イソロイシン	3.5	4.7	4.2	129333	2.3
L-ロイシン	3.5	4.7	4.2	204000	2.1
L-フェニルアラニン	3.5	4.7	4.2	11200000	0.4
L-バリン	2.5	4.7	4.2	104500	2.4
D-イソロイシン	2.5	4.7	4.2	196000	2.1
D-ロイシン	2.5	4.7	4.2	215000	2.1
D-フェニルアラニン	2.5	4.7	4.2	8700000	0.5
D-バリン	2.5	4.7	4.2	630000	1.6

10

20

以下の表中における予測値に基づく、相乗作用的であると考えられる L-フェニルアラニンの場合を除き、ラセミ混合物は相加的であると考えられる。

【0113】

表20
ラセミ混合物の結果

【0114】

【表20】

アミノ酸	実際の CFU	アミノ酸の 予測平均	予測値対実際値
d,l-イソロイシン	64000	162667	39%
d,l-ロイシン	650000	209500	310%
d,l-フェニルアラニン	900000	9950000	9%
d,l-バリン	685000	367250	187%

30

(実施例8)

血液の存在下における *Bacillus subtilis* 芽胞に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性に対するベータアラニンおよび L-アラニンの組合せの効果

実施例2の手順に従い、血液の存在下における *Bacillus subtilis* 芽胞に対するMPO殺菌活性の潜在的増強剤としてのベータアラニンおよび L-アラニンの二元的組合せの効果が判定された。しかし、この場合、各試験は、単一低濃度のMPO (25 μg/mL または 9.4 U/mL) およびグルコースオキシダーゼ (8.3 U/mL) を含有した。顕微鏡により確認される、100%の芽胞を含有する *Bacillus subtilis* の懸濁液は、50%のエタノールで洗浄して *Bacillus subtilis* の栄養形態を除去することにより得た。比較のため、*Bacillus subtilis* 芽胞に対するミエロペルオキシダーゼの抗微生物活性に対する L-アラニン単独およびベータアラニン単独の両方の効果を調べた。結果を、以下の下記表21に示す。

40

【0115】

表21

50

血液の存在下における *Bacillus subtilis* 芽胞に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性に対するベータアラニンおよびL-アラニンの組合せの効果

【0116】

【表21】

アミノ酸1 の名称	アミノ酸 1の 濃度 mM	アミノ酸2の 名称	アミノ酸 2の 濃度	MPO U/ml	GO U/ml	平均生 存率 CFU/ml 1時間後	平均生 存率 CFU/ml 2時間後	対数に よる 低減 1時間後	対数に よる 低減 2時間後
ベータ アラニン	5	L-アラニン	0.2	9.4	8.3	80000		2.3	
ベータ アラニン	5	L-アラニン	0.2	9.4	8.3		70000		2.4
ベータ アラニン	5	L-アラニン	0	9.4	8.3		3100000		0.7
なし	0	L-アラニン	0.2	9.4	8.3	1200000		1.1	
なし	0	L-アラニン	0.2	9.4	8.3		520000		1.5
なし	0	なし	0	9.4	8.3		3700000		0.6

表21に示される通り、アミノ酸であるベータアラニンおよびL-アラニンの二元的相互作用により、L-アラニンを単独で伴うか、またはアミノ酸の不在下におけるMPO系の効能と比較して、ミエロペルオキシダーゼによる *Bacillus subtilis* 芽胞の殺滅が著明に増強された。2時間後において、ベータアラニン/L-アラニンを含有する製剤が2.4logの低減を示したのに対し、L-アラニンだけの製剤は1.5logの低減をもたらした。

【0117】

上記で説明した相乗作用決定法に従い、ベータアラニンおよびL-アラニンの間における関係の性質を検討した。2時間後において、単独でのベータアラニンは3100000CFUの生存菌数を示すが、単独で作用するL-アラニンは520000CFUを示す。これらの数の平均は1810000CFUであり、これは、2つのアミノ酸の組合せについての予測値である。ベータアラニン/L-アラニン対について観察される実際のCFUは70000CFUであり、これは、予測値の3.9%を占めるにすぎず、これにより、相乗作用的組合せが示される。

【0118】

(実施例9)

血液の存在下におけるグラム陰性菌、グラム陽性菌、および酵母菌に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性に対する二元的組合せおよび個々のアミノ酸の効果

実施例2の手順に従い、血液の存在下における *Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus*、および *Candida albicans* に対するMPO殺菌活性の潜在的増強剤としてのアミノ酸であるグリシンおよびバリンの二元的組合せ効果、ならびにベータアラニンの個別効果が判定された。単一低濃度のMPO (25 μg/mLまたは9.4 U/mL) およびグルコースオキシダーゼ (8.3 U/mL) に対して各生物を調べた。2つのアミノ酸による活性化剤は、各々2.5 μmol/mLの最終濃度で添加し、個別のアミノ酸であるベータアラニンは、5 μmol/mLの単一濃度で調べた。比較のために、これらの生物に対するミエロペルオキシダーゼの抗微生物活性に対する、アミノ酸を含有しない製剤の効果を調べた。結果を、以下の表22に示す。

【0119】

表22

血液の存在下におけるグラム陰性菌、グラム陽性菌、および酵母菌に対するミエロペルオキシダーゼ系の抗微生物活性に対する二元的組合せおよび個々のアミノ酸の効果

【0120】

【表 2 2】

生物の名称	アミノ酸1の名称	アミノ酸1の濃度 mM	アミノ酸2の名称	アミノ酸2の濃度	アミノ酸3の名称	アミノ酸3の濃度 mM	MPO U/ml	GO U/ml	log10による 出発接種 材料	平均生存率 CFU/ml	平均生存率 CFU/ml	対数に よる低減 30分後	対数に よる低減 60分後
<i>P. aeruginosa</i>	グリシン	2.5	L-バリン	2.5	ベータアラニン	0	9.4	8.3	7.5	885000	60分後	1.5	
<i>P. aeruginosa</i>	グリシン	2.5	L-バリン	2.5	ベータアラニン	0	9.4	8.3	7.5	2070		4.1	
<i>P. aeruginosa</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	5	9.4	8.3	7.5	52		5.7	
<i>P. aeruginosa</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	5	9.4	8.3	7.5	6		6.6	
<i>P. aeruginosa</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	0	9.4	8.3	7.5	210000		2.1	
<i>P. aeruginosa</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	0	9.4	8.3	7.5	301500		1.3	2.0
<i>C. albicans</i>	グリシン	2.5	L-バリン	2.5	ベータアラニン	0	9.4	8.3	6.2	68500		1.3	
<i>C. albicans</i>	グリシン	2.5	L-バリン	2.5	ベータアラニン	0	9.4	8.3	6.2	5000		2.2	2.5
<i>C. albicans</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	5	9.4	8.3	6.2	8500		9.65	3.2
<i>C. albicans</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	5	9.4	8.3	6.2	151000		1.0	
<i>C. albicans</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	0	9.4	8.3	6.2	73500		7.4	1.3
<i>S. aureus</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	5	9.4	8.3	7.4	0		7.4	
<i>S. aureus</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	5	9.4	8.3	7.4	0		0.6	7.4
<i>S. aureus</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	0	9.4	8.3	7.4	6150000		0.5	0.7
<i>S. aureus</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	2.5	4.7	4.2	7.4	8100000		0	
<i>S. aureus</i>	グリシン	0	L-バリン	0	ベータアラニン	2.5	4.7	4.2	7.4	0		7.4	
<i>S. aureus</i>	グリシン	1.25	L-バリン	1.25	ベータアラニン	0	4.7	4.2	7.4	0		7.4	
<i>P. aeruginosa</i>	なし	0	なし	0	なし	0	0	0	7.5	28650000	28650000	0	0
<i>C. albicans</i>	なし	0	なし	0	なし	0	0	0	6.2	1400000	1455000	0	0
<i>S. aureus</i>	なし	0	なし	0	なし	0	0	0	7.4	23800000	23800000	0	0

表 2 2 に示される通り、L-バリンおよびグリシンの二元的組合せならびに個別のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸であるベータアラニンのいずれによっても、アミノ酸の不在下におけるMPO系の効能と比較して、すべての被験生物に対するMPO系の殺菌活性が、血液存在下において著明に増強された。P. aeruginosaの場合、L-バリン／グリシンの組合せによる増強効果は、60分以内において2.1logであり、MPO系に対する5mMベータアラニン単独の添加では、60分間後において、4.6logだけ抗微生物活性が増大した。C. albicansに対しては、L-バリン／グリシンによりもたらされる殺菌活性の向上が1.2logであり、ベータアラニンの場合が1.9logであった。最も顕著な向上は、S. aureusに対して、MPO系に対するベータアラニンの効果により見ることができ、30分以内に6.8logの効能の増大であった。加えて、表21で見ることができる通り、アミノ酸およびMPOのいずれもが低濃度の場合において、単一の

10

アミノ酸であるベータアラニンならびにL-バリンおよびグリシンの2つのアミノ酸の組合せは、60分以内にS. aureusの完全な殺滅をもたらした。

【0121】

(実施例10)

アミノ酸および添加剤の各種の組合せを含有するMPO製剤についてのin vivoにおける試験データ

以下の通り、in vivoモデルを用いて、MPO抗微生物系の有効性の増強における、アミノ酸の各種の組合せの有効性を調べた。

【0122】

すべての試験において、成体雄Sprague-Dawleyラットを用いた。ラットに麻酔をかけ、電動式バリカンにより各動物の背部における体毛を除去し、皮膚を準備した。各ラットの背部において、2カ所ずつの創傷部位を準備した。電動式バリカンにより各動物の背部における体毛を除去し、動物に麻酔をかけ、皮膚を準備した。弛緩性皮膚をつまみ上げ、滅菌法を用いてハサミにより楕円形領域を切除し、筋膜を露出させることにより全層皮膚創傷を作製した。

20

【0123】

QuickTite（登録商標）（Loctite社製）セメントにより、開放端のポリスチレン製円筒（直径2.5cm）を各治療部位へと接着した。各円筒は液密性の試験チャンバーを形成し、その底部は創傷であった。次いで、露出した筋膜に、約 10^7 CFUのS. aureusを含有する200 μ lを接種した。15分後において、接種された

30

筋膜を治療した。生物学的接種の増量が所望される場合は、この時点において、30 μ lの新鮮なラットの全血液を添加した。次に、800 μ lの試験製剤を該部位に添加した結果、試験部位当たり1.0mLの総容量がもたらされた。試験製剤は、以下の表に記載の量で、ミエロペルオキシダーゼ、各種のアミノ酸、グルコースオキシダーゼ、およびグルコースを含有した。対照部位にはp-MPOを投与せず、800 μ lの0.9%生理食塩液または同緩衝液により治療した。単一のラットにおけるいずれの部位も、同じ治療を受けた。

【0124】

p-MPO製剤による所定の治療時間後において、各治療部位に過大量のカタラーゼを添加し、さらなる殺菌活性を停止させた。これにより、製剤による、残存する、かつ／またはその後生成する過酸化水素が破壊された。

40

【0125】

円筒内に残存する流体を個別に回収し、基底部にある筋膜を無菌的に切除し、秤量し、ホモジナイズした。定量的培養により、液体試料および切除された組織の生存細菌カウントを評価した。結果は、初期接種量からの対数による低減として報告される。

【0126】

前述の手順を用いて、アミノ酸であるL-アラニン、L-プロリン、およびグリシンを含む本発明の増強ミエロペルオキシダーゼ試験製剤に対する5分間にわたる曝露による、S. aureus（ 2×10^7 CFUのS. aureusを含有する接種材料）に対する、in vivoにおける阻害の有効性を、3%の血液存在下において、また血液を伴わ

50

ない場合において、8連の平均として決定した。結果を以下の下記表23に示す。

【0127】

表23

【0128】

【表23】

血液 (%)	Ala mM	Pro mM	Gly mM	Glu mM	MPO μ g/ml	GO U/ml	MPO/ GO比	平均生存 率CFU/ml	log10 (CFU+1)による 生存菌数	対数による 低減
0	1.4	1.5	1.5	150	200	13.3	15	11620	3.9	3.4
3	1.4	1.5	1.5	150	200	13.3	15	10290	4.0	3.3

10

表23において示される通り、アミノ酸により、曝露5分後における添加血液の存在を伴う場合および伴わない場合において、同様の形で試験製剤の効能が増強された。

【0129】

6連の平均として以下の表24に示される通り、前述の手順を用いて、多様な濃度のL-アラニン、L-プロリン、およびグリシンを含有する試験製剤に対する、*in vivo*におけるグルコース濃度の効果を、 2×10^7 CFUの*S. aureus*を含有する接種材料により決定した。

【0130】

表24

【0131】

【表24】

血液 (%)	Ala mM	Pro mM	Gly mM	Glu mM	MPO μ g/ml	GO U/ml	MPO/ GO比	平均生存率 CFU/ml	log10 (CFU+1)による 生存菌数	対数による 低減
0%	4	5	5	150	200	13.3	15	1261	2.9	3.4
0%	4	5	5	60	200	13.3	15	3952	3.2	3.0
0%	0.4	0.5	0.5	150	200	13.3	15	4872	3.6	2.7
0%	0.4	0.5	0.5	60	200	13.3	15	1313	3.0	3.2

示される通り、効能の平均間において観察される差は、被験対象である条件についての統計学的な差ではない。

30

【0132】

前述の手順に従い、6%の血液の存在下において、または血液を伴わない場合において、200または400 μ g/mlでミエロペルオキシダーゼを含有する試験製剤の殺菌活性に対して、*in vivo*においてL-アラニン、L-プロリン、およびグリシンの濃度を変化させる場合の効果を決定した。結果を表25に示す。

【0133】

表25

【0134】

【表 2 5】

生物	血液	Pro	Gly	Glu	MPO	GO	MPO 対GO	対数による 出発接種 材料	生物曝 露時間	N	平均生存率 CFU/ml	log10 (CFU+1)に よる生存 菌数	対数による 低減
		mM	mM	mM	ug/ml	U/ml	比		分		5分後	5分後	5分後
S. aureus	0%	5	5	150	200	13.3	15	6.3	15	4	3373	2.7	3.7
S. aureus	0%	10	10	150	200	13.3	15	6.3	15	8	3053	3.1	3.4
S. aureus	0%	5	5	150	400	26.7	15	6.3	15	4	3390	3.4	2.9
S. aureus	0%	20	20	150	400	26.7	15	6.3	15	8	416	2.4	3.9
S. aureus	6%	5	5	150	200	13.3	15	6.3	15	8	41309	4.0	2.7
S. aureus	6%	10	10	150	200	13.3	15	6.3	15	8	131082	4.5	1.9
S. aureus	6%	5	5	150	400	26.7	15	6.3	15	8	89595	5.0	1.3
S. aureus	6%	20	20	150	400	26.7	15	6.3	15	8	49079	4.6	1.9

前述の手順に従い、200または400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でミエロペルオキシダーゼを含有する試験製剤の殺菌活性に対して、*in vivo*においてL-アラニン、L-プロリン、およびグリシンの濃度を変化させる場合の効果を、これらを変化させない場合と対比して決定した。この関連において、変化とは、MPO濃度に合わせて該アミノ酸の濃度を比例的に変化させることを指す。結果を表26に示す。

【0135】

表 2 6

【0136】

【表 2 6】

生物	血液	Ala	Pro	Gly	Glu	MPO	MPO 対GO	対数による 出発接種 材料	生物曝 露時間	N	平均生存率 CFU/ml	log10 (CFU+1)に よる生存 菌数	対数による 低減
		mM	mM	mM	mM	ug/ml	比		分		5分後	5分後	5分後
S. aureus	0	8.0	10.0	10.0	150	200	15	6.3	15	6	120167	5.1	1.2
S. aureus	0	4.0	5.0	5.0	150	200	15	6.3	15	6	11700	4.1	2.3
S. aureus	0	16.0	20.0	20.0	150	400	15	6.3	15	6	49162	4.7	1.7
S. aureus	0	4.0	5.0	5.0	150	400	15	6.3	15	6	4810	3.7	2.6

表26に示される通り、最低の総アミノ酸濃度（4 mMのL-アラニン、4 mMのL-プロリン、および5 mMのグリシン）を含有する製剤が、200および400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のいずれのミエロペルオキシダーゼ濃度においても、最高の効能を示した。

【0137】

表27において示される通り、前述の手順に従い、L-プロリン、L-リシン、およびグリシン、またはL-プロリンおよびグリシンを含有する試験製剤の*in vivo*における効果が決定され、S. aureusの阻害において高度に有効であることが判明した。

【0138】

表 2 7

【0139】

【表 2 7】

生物	血液	Lys	Pro	Gly	Glu	MPO	MPO 対GO	対数による 出発接種 材料	生物曝 露時間	N	平均生存率 CFU/ml	log10 (CFU+1)に よる生存 菌数	対数による 低減
		mM	mM	mM	mM	ug/ml	比		分		30分後	30分後	30分後
S. aureus	0	8.2	11.4	24.0	150	200	15	6.2	15	6	8	0.6	5.6
S. aureus	0	0.0	9.6	10.0	150	200	15	6.2	15	6	0	0	6.2

表27に示される通り、L-プロリン、L-リシン、およびグリシンを含有する試験製

剤、またはL-プロリンおよびグリシンを含有する試験製剤は、ミエロペルオキシダーゼ抗微生物系の効能を増強する。MPOが200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、MPO：GO比が15：1であるこれら2つの製剤は、30分以内に完全な殺滅をもたらした。これらは、その場合において最良の効能を示す添加剤である2% Triton X-200の存在下において、2倍のMPOおよび20倍のGOを有する製剤の効能を上回った。以下の表28を参照されたい。

【0140】

前述の手順に従い、MPO：GO比が1.5：1で、単一のアミノ酸であるL-アラニンおよび2% Triton X-200を含有する試験製剤のin vivoにおける効果を決定した。結果を表28に示す。

【0141】

表28

【0142】

【表28】

生物	血液	添加剤	Glu	Ala	MPO	MPO 対GO	対数による 出発接種材 料	生物曝 露時間	N	平均生存率 CFU/ml	log10 (CFU+1)に よる生存 菌数	対数による 低減
		Triton	mM	mM	$\mu\text{g}/\text{ml}$	比				30分後	30分後	30分後
S. aureus	0	2%	90	0.2	400	1.5	5.9	15	6	313	2.2	3.7
S. aureus	3%	2%	90	0.2	400	1.5	5.9	15	6	356	2.5	3.4

上記に示される通り、2%のTriton X-200を含有するこの製剤は、3%の血液を添加する場合および添加しない場合において同等の効能を示すが、単一のアミノ酸であるL-アラニンを伴うこの試験製剤は、2つ以上のアミノ酸を含有する製剤よりも、S. aureusに対する阻害の有効性が著明に低下した。この結果は、以下の表28および29において確認される。

【0143】

前述の手順に従い、単一のアミノ酸であるL-アラニン、1% Triton X-200、3：1のMPO：GO比、および90 mMのグルコース濃度を含有する試験製剤のin vivoにおける効果を決定した。6連の平均として示される結果を、表29に示す。

【0144】

表29

【0145】

【表29】

添加剤	Ala	MPO	対数による 出発接種材 料	平均生存 率CFU/ml	log10(CFU+1)に よる生存菌数	対数による 低減
Triton	mM	$\mu\text{g}/\text{ml}$	log 10	30分後	30分後	30分後
1%	0.2	400	5.9	513	2.15	3.65

前述の手順に従い、MPO：GO比が3：1で、単一のアミノ酸であるL-アラニンを含有する試験製剤のin vivoにおける効果を、MPOの3つの濃度について決定した。4連の平均として示される結果を、表30に示す。

【0146】

表30

【0147】

【表 3 0】

アラニンの濃度	Glu	MPO	GO	MPO 対GO	対数による 出発接種 材料	平均生存 率CFU/ml	log10 (CFU+1) による生 存菌数	対数によ る低減
mM	mM	$\mu\text{g}/\text{ml}$	U/ml	比	log 10	30分後	30分後	30分後
0.2	90	400	133	3	5.8	90	2.0	3.8
0.2	90	200	67	3	5.8	1112	3.0	2.8
0.2	90	100	33	3	5.8	13440	4.1	1.7
0	0	0	0	0	5.8	670000	5.8	0

この製剤は、 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ で30分後において、最大値である $3.8\log$ の低減をもたらした。添加剤を伴わない場合、単一のアミノ酸であるL-アラニンを含むこの試験製剤の効能は、生物学的干渉の存在下において、明らかに限定されている。

【0148】

MPO：GO比が15：1で、L-プロリン、グリシン、およびL-アラニンを含む試験製剤の*in vivo*における経時的な効果を、MPOの3つの濃度について決定した。この時間-殺滅試験の結果を、図4に示す。データは、表示される時点におけるCFU/ml単位の $\log_{10}$ による低減として提示される。増強MPO溶液は、すべての被験濃度において、*S. aureus*に対する殺菌活性を示した。この試験では、接種材料を、 10^7 CFUまで増加させた。6連の平均として示される結果を、表31に示す。

【0149】

表 3 1

【0150】

【表 3 1】

Pro	Gly	Ala	MPO	GO	MPO 対GO	平均生存率CFU/ml			log10(CFU+1)による生存菌数			対数による低減		
mM	mM	mM	$\mu\text{g}/\text{ml}$	U/ml	比	5分後	15分後	30分後	5分後	15分後	30分後	5分後	15分後	30分後
3.6	3.6	2.8	400	27	15	548	68	12	2.7	1.8	1.1	4.6	5.5	6.2
1.8	1.8	1.4	200	13	15	647	179	91	2.8	2.3	2.0	4.6	5.1	5.4
0.5	0.5	0.4	50	3	15	18286	3713	1284	4.3	3.6	3.1	3.1	3.7	4.2
			0	0	0			22100000			7.3			
			0	0	0			23350000			7.4			
			0	0	0			20000000			7.3			

表31において示される通り、アミノ酸による増強製剤は、表30に示される、 $400\mu\text{g}/\text{ml}$ でL-アラニンを含む単一のアミノ酸による製剤の8分の1のMPO（ $50\mu\text{g}/\text{ml}$ ）を用いて、5分以内に $3.1\log$ の低減を結果としてもたらした。アミノ酸による増強製剤は、*in vivo*において、より迅速でより大きな殺菌活性をもたらす。

【0151】

(実施例11)

各種のアミノ酸の組合せおよび添加剤を含むMPO製剤の*in vitro*における試験データ

細菌株

MIC試験およびMBC試験のための、活性が増強された、本発明の組成物の例示的な実施形態（「増強MPO溶液」）の活性のスペクトルを決定するのに選択された生物（530菌株）には、140菌株の*staphylococci*（そのうち、70菌株がオキサシリン耐性、5菌株がバンコマイシン低感受性/耐性、4菌株がパントンバレンチンロ

イコシジン [PVL] 陽性)、95 菌株の β 型溶血連鎖球菌株、55 菌株の腸球菌 (33 菌株がバンコマイシン感受性、22 菌株がバンコマイシン耐性)、148 菌株の *Enterobacteriaceae* 菌株 (そのうち、51 菌株がセフトジジム耐性)、および 92 菌株の非 *Enterobacteriaceae* 種 (そのうち、54 菌株がセフトジジム耐性) が含まれた。すべての臨床的単離株は、Eurofins Medinet 社 Anti-Infective Services (米国、バージニア州、ハーンドン) の培養物コレクションから入手されたものであり、多様な地理的領域を代表する。これらは元来、臨床標本に由来し、標準的な微生物学的方法 (詳細については、以下の表 33 を参照されたい) を用いて同定された。*Escherichia coli* ATCC 25922、*Staphylococcus aureus* ATCC 25923、*S. aureus* ATCC 29213、*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853、および *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 は、増強 MPO 溶液の品質管理菌株、および臨床検査標準協会 (CLSI; 旧 NCCLS) による培養液マイクロ希釈変法を検証するための対照作用物質として用いられた。

【0152】

抗微生物剤

増強 MPO 溶液は、濃縮液および希釈液と称する、異なるバイアル内にパッケージングされた 2 つの個別の水溶液として提供される。濃縮液は、注射用水によるリン酸ナトリウム緩衝液中の、塩化ナトリウム、ポリソルベート 80 (Tween-80) からなる水性製剤媒体中において、p-MPO、グルコースオキシダーゼ (GO)、およびアミノ酸を含有する。希釈液は、濃縮液と同じ水性製剤媒体中において、デキストロース (グルコース) を含有する。濃縮液および希釈液を共に混合し、薬剤産物である増強 MPO 溶液を生成する。

【0153】

増強 MPO 溶液の定量的組成物を、3 つの MPO 濃度で表 32 に示す。この表において見ることができる通り、グルコースオキシダーゼ活性およびアミノ酸濃度は、MPO 濃度に直接に比例する。デキストロース濃度は、280 ~ 336 mM に維持される。残りの成分は、一定濃度に保たれる。

【0154】

表 32

3 つの濃度における増強 MPO 溶液の定量的組成物

【0155】

【表 32】

MPO (GU/mL)	GO (U/mL)	L-アラニン (mM)	L-プロリン (mM)	グリシン (mM)	デキストロース (mM)	塩化ナトリウム (mM)	ポリソルベート 80 (% w/v)	リン酸ナトリウム緩衝液 (mM)	pH
150	26.67	2.8	3.6	3.6	300	150	0.02	20	6.5
75	13.33	1.4	1.8	1.8	280	150	0.02	20	6.5
37.5	6.67	0.7	0.9	0.9	308	150	0.02	20	6.5

注： MPO の濃度は、mL 当たりのグアイアコール単位 (GU) として表される。

【0156】

増強 MPO 溶液は、使用前に混合される、濃縮液および希釈液と称する 2 つの水溶液を含む。濃縮液は、水性の製剤媒体中において、MPO、GO、塩化ナトリウム、および特定の抗微生物活性増強剤を含有する。希釈液は、濃縮液と同じ水性製剤媒体中において、グルコース (デキストロース) を含有する。濃縮液および希釈液を、使用の直前に多様な比率で共に混合し、薬剤産物である増強 MPO 溶液を所望の濃度で生成する。増強 MPO 溶液の濃度は、ミリリットル当たりの MPO マイクログラム ($\mu\text{g}/\text{ml}$) として表され

るが、また、ミリリットル当たりにおけるMPO活性のグアイアコール単位 (GU/ml) としても表される。MPOの μg からGUへの変換は、 $0.375 \text{ GU}/\mu\text{g}$ MPOに基づく。品質管理の作用物質には、Sigma Chemical社 (米国、ミズーリ州、セントルイス) 製のセファゾリンおよびゲンタマイシンが含まれ、選択されて用いられる対照薬は、ゲンタマイシン (Sigma Chemical社製) およびGlaxoSmithKline社 (米国、ペンシルベニア州、フィラデルフィア) 製のムピロシンリチウムであった。すべての原液は、試験直前に調製された。濃度は、増強MPO溶液が $0.004 \sim 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、セファゾリンが $0.06 \sim 64 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、ゲンタマイシンが $0.25 \sim 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、ムピロシンが $0.12 \sim 16 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。薬剤相互作用試験に用いられる抗微生物剤は、以下：セファゾリン、セフト

10

【0157】

抗微生物剤の感受性試験

培養液のマイクロ希釈および殺菌活性の決定法は、CLSIにより推奨される手順 (Clinical and Laboratory Standards Institute, 「Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline」、CLSI文書第M26-A号、米国、ペンシルベニア州、ウェイン、CLSI、1999年9月; Clinical and Laboratory Standards Institute, 「Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard」、第7版、CLSI文書第M7-A7号、米国、ペンシルベニア州、ウェイン、CLSI、2006年1月) を用いて実施された。以下において説明される増強MPO溶液の急速な*in vitro*活性に適合させるため、標準的な培養液マイクロ希釈法に対して改変を行った。各抗微生物剤および濃縮液は、2倍濃度の陽イオン調整型ミュラー-ヒントン培養液 (CAMHB) 中において希釈し、マイクロ希釈トレイ内において分注した。5%に溶解したウマ血液を補充した、2倍濃度のCAMHB中において、すべての β 型溶血連鎖球菌を調べた。5%のヒツジ血液を伴うトリプチカーゼダイズ寒天 (TSA) 上における一晚にわたる培養物に由来する複数のコロニー (4~6個) を無菌の生理食塩液中へと懸濁させることにより単離株を調製し、密度を 0.5 マクファーランド濁度の標準液 (約 $10^8 \text{ CFU}/\text{ml}$) へと調整した。約 $5 \times 10^5 \text{ CFU}/\text{ml}$ が薬剤の希釈系列と混合されるように、標準化された細菌懸濁液を、2倍濃度の希釈液中においてさらに希釈した。濃縮液への希釈液の添加により酵素系が活性化し、これにより、その急速な作用方式が作用する。マイクロ希釈トレイは、周囲大気内 35°C で $18 \sim 24$ 時間にわたりインキュベートした。生物の増殖を完全に阻害する抗微生物剤の最低濃度を観察することにより、MICを決定した。

20

30

【0158】

増強MPO溶液のMICについて、上記で説明した培養液マイクロ希釈変法をまず実施することにより、最小殺菌濃度 (MBC) を決定した。マイクロ希釈トレイからは、可視的な増殖を伴う、薬剤を含有する最後のウェル、およびそれ以降の透明な各ウェルをサンプリングした。ウェル当たり $10 \mu\text{l}$ の試料を、5%のヒツジ血液と共にTSA上へと播種し、周囲大気中において24時間にわたりインキュベートし、増殖およびコロニーカウントについて検討した。出発接種サイズと比べ、コロニー形成単位で $\geq 99.9\%$ の低減を示した最低抗微生物濃度として、MBCを決定した。

40

【0159】

品質管理パラメータ

1ロットの増強MPO溶液を、S. aureus ATCC 29213およびE. c

50

o l i A T C C 2 5 9 2 2 に対して 2 0 連にわたって調べることにより、増強 M P O 溶液の M I C 範囲を確立した。次いで、増強 M P O 溶液の最終製剤を調製するのに用いた濃縮液の 3 つのロットを調べることにより、増強 M P O 溶液についての品質管理パラメータを決定した。試験は、S . a u r e u s A T C C 2 9 2 1 3 および E . c o l i A T C C 2 5 9 2 2 に対して 2 連で実施した。公知の品質管理限界により C L S I 培養液マイクロ希釈法を検証するための抗生剤により、標準的な培養液マイクロ希釈試験の改変効果もまた評価した。

【0160】

結果を以下の表 3 3 に示すが、ここでは、増強 M P O 溶液製剤を、「E - M P O」と称する。

10

【0161】

表 3 3

E n t e r o c o c c i 、 S t a p h y l o c o c c i 、 S t r e p t o c o c c i 、 E n t e r o b a c t e r i a c e a e 、 および非 E n t e r o b a c t e r i a c e a e 種の 5 3 0 菌種からなる臨床単離株パネルに対する、i n v i t r o における増強 M P O 溶液および他の抗微生物剤対照薬の活性

【0162】

【表 3 3】

生物(被験単離株の数)	化合物	MIC $\mu\text{g/ml}$		
		50%	90%	範囲 ^a
<i>Enterococcus faecalis</i> (33)	E-MPO	0.5	0.5	0.12-0.5
	ムピロシン	32	>32	8->32
<i>Enterococcus faecium</i> (22)	E-MPO	0.12	0.12	0.06-0.12
	ムピロシン	0.25	0.25	0.06-0.5
<i>Staphylococcus aureus</i> (109)	E-MPO	0.015	0.03	0.008-0.06
	ムピロシン	0.06	0.12	<0.03->32
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (31)	E-MPO	0.03	0.03	0.015-0.06
	ムピロシン	0.12	>32	<0.03->32
<i>Streptococcus agalactiae</i> (34)	E-MPO	0.5	0.5	0.12-1
	ムピロシン	0.5	0.5	0.12-2
Streptococcus GroupC(8)	E-MPO	n/a ^b	n/a	0.5-1
	ムピロシン	n/a	n/a	0.06-0.5
Streptococcus GroupF(2)	E-MPO	n/a	n/a	1-1
	ムピロシン	n/a	n/a	0.25-0.25
Streptococcus GroupG(18)	E-MPO	0.5	0.5	0.25-1
	ムピロシン	0.12	0.12	0.06-0.5
<i>Streptococcus pyogenes</i> (33)	E-MPO	0.5	0.5	0.12-0.5
	ムピロシン	0.12	0.25	0.06-0.5
<i>Citrobacter freundii</i> (20)	E-MPO	0.6	0.12	0.03-0.12
	ゲンタマイシン	2	4	2->32
<i>Enterobacter cloacae</i> (21)	E-MPO	0.12	0.12	0.06-0.12
	ゲンタマイシン	2	8	1->32
<i>Escherichia coli</i> (52)	E-MPO	0.25	0.25	0.12-0.5
	ゲンタマイシン	4	>32	2->32
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (31)	E-MPO	0.25	0.25	0.06-0.25
	ゲンタマイシン	4	>32	2->32
<i>Proteus mirabilis</i> (24)	E-MPO	0.06	0.06	0.03-0.06
	ゲンタマイシン	8	8	2->32
<i>Acinetobacter</i> spp.(29)	E-MPO	0.12	0.12	0.06-0.12
	ゲンタマイシン	8	>32	0.5->32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (53)	E-MPO	0.06	0.06	0.03-0.12
	ゲンタマイシン	4	16	1->32
<i>Aeromonas hydrophilia</i> (5)	E-MPO	n/a	n/a	0.015-0.03
	ゲンタマイシン	n/a	n/a	1-4
<i>Pasteurella multocida</i> (5)	E-MPO	n/a	n/a	<0.004
	ゲンタマイシン	n/a	n/a	2-16

^a すべての被験菌株に対するMIC値の範囲

^b n/a：該当なし（単離株の総数が10未満である）

増強MPO溶液を調べるためにCLSI培養液マイクロ希釈法を改変することにより、産物の特徴づけ、活性スペクトルを決定するための効果的な手順がもたらされる。表33に示される530種の細菌の臨床単離株に対する増強MPO溶液および選択された局所用対照薬を調べた結果、増強MPO溶液が、被験対象のグラム陽性菌種およびグラム陰性菌種のいずれに対しても、強力で広域スペクトルの活性を示すことが裏付けられる。腸球菌中、単離株の50%および90%が阻害されたときの増強MPO溶液のMIC（MIC₅₀値およびMIC₉₀値）は、E. faecalisが0.5 $\mu\text{g/ml}$ であり、E. faeciumが0.12 $\mu\text{g/ml}$ であった。バンコマイシン感受性腸球菌またはバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）に対する増強MPO溶液の活性には、差が認められなかつ

た。MIC₉₀に基づく、増強MPO溶液は、*E. faecalis*に対して、ムピロシンよりも64倍活性であった。グラム陽性球菌中、増強MPO溶液が最も活性であったのは、ブドウ球菌に対してであった。MRSAおよびMRSEを含めた*S. aureus*および*S. epidermidis*に対するすべてのMICが $\leq 0.06 \mu\text{g/ml}$ であり、MIC₉₀は $0.0 \mu\text{g/ml}$ であった。増強MPO溶液の効力は、オキサシリン耐性菌株およびオキサシリン感受性菌株のいずれに対しても同等であった。増強MPO溶液がPVL陽性菌株およびVISA/VRSA菌株に対して高度に活性であったことは、野生型と比較して同等の活性を裏付ける。PVL陽性単離株に対するMIC値は、すべての被験*S. aureus*菌株の範囲内にあった。*streptococci*の場合、増強MPO溶液は、5%に溶解したウマ血液を補充したCAMHBの存在下においても高度に活性であった。*S. agalactiae*および*S. pyogenes*に対するMIC₉₀は、いずれも $0.5 \mu\text{g/ml}$ であった。*streptococci*のC、F、およびG群の場合、MICは $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ であり、MICの範囲は $0.25 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ であった。*S. agalactiae*および*S. pyogenes*を例外として、増強MPO溶液は、*in vitro*において、MIC₉₀でムピロシンよりも大きな効力を示した。*E. faecalis*、*S. aureus*、および*S. epidermidis*に対するムピロシンのMICの範囲は、 $> 32 \mu\text{g/ml}$ にまで拡大された。

【0163】

総じて、増強MPO溶液は、*Enterobacteriaceae*属種に対して高度に活性であり（表33）、MIC₉₀は $0.25 \mu\text{g/ml}$ であり、MICの範囲は $0.03 \sim 0.25 \mu\text{g/ml}$ であった。非発酵性のグラム陰性菌中において、MICは $\leq 0.12 \mu\text{g/ml}$ であり、狭い活性範囲（ $\leq 0.004 \sim 0.12 \mu\text{g/ml}$ ）を示した。増強MPO溶液は、治療が困難なことが多い生物である、*P. aeruginosa*（MIC₉₀： $0.06 \mu\text{g/ml}$ ）および*Acinetobacter*属種（MIC₉₀： $0.12 \mu\text{g/ml}$ ）に対して優れた活性を示した。セフトジジム感受性菌株およびセフトジジム耐性菌株に対する増強MPO溶液の活性には差が認められなかった。MIC₉₀に基づく、増強MPO溶液は、すべての被験グラム陰性菌に対して、ゲンタマイシンよりも32～256倍活性であった。

【0164】

皮膚感染および皮膚構造感染と一般的に関連する病原体の臨床単離株に対するMIC試験およびMBC試験の結果を、表34にまとめる。

【0165】

表34

皮膚感染および皮膚構造感染と関連する臨床単離株に対する増強MPO溶液の最小阻害濃度および最小殺菌濃度

【0166】

【表34】

単離株(被験株の数)	MIC $\mu\text{g/ml}$ ^a			MBC $\mu\text{g/ml}$		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	範囲 ^a	MBC ₅₀	MBC ₉₀	範囲
<i>E. faecalis</i> (7)	n/a ^b	n/a	0.12-0.5	n/a	n/a	0.5-2
<i>S. aureus</i> (16)	0.015	0.03	0.015-0.03	0.015	0.03	0.015-0.03
<i>S. agalactiae</i> (13)	0.5	0.5	0.12-0.5	0.5	0.5	0.12-1
<i>S. pyogenes</i> (20)	0.5		0.5 0.12-0.5	0.5	1	0.12-1
<i>E. coli</i> (5)	n/a	n/a	0.12-0.25	n/a	n/a	0.12-1
<i>P. aeruginosa</i> (5)	n/a	n/a	0.03-0.06	n/a	n/a	0.06-0.5

^a すべての被験菌株に対するMIC値の範囲

^b n/a：該当なし（単離株の総数が10未満である）

増強MPO溶液の強力な殺菌活性は、MBCの範囲（ $0.015 \sim 2 \mu\text{g/ml}$ ）によ

り確認された。増強MPO溶液は、*S. aureus*のすべての単離株に対して極めて活性であり、MIC値およびMBC値が同一であった（MIC50およびMBC50=0.015 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ；MIC90およびMBC90=0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。

【0167】

寒天ベースの方法は、該培地の潜在的な干渉特性のために、比較には用いられなかった。しかし、セファゾリン、ゲンタマイシン、およびムピロシンのMICに対する、標準化された培養液感受性試験の条件を変更することの効果については、該結果をCLSI培養液マイクロ希釈基準法の結果と比較することにより評価および検証した。MIC変法およびMIC基準法共に、*in vitro*における試験パラメータは、培地（CAMHB）、pH（7.2）、最終接種材料（ 5×10^5 CFU/ml）、およびインキュベーション環境（35℃、周囲大気）に関して同様であった。希釈液中における接種材料調製物へと変化させたところ、対照薬である抗生剤について予測されるMIC結果に対する著明な効果を示さなかった（Clinical Laboratory Standards Institute、「Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seven teenth informational supplement」、CLSI文書第M100-S17号、米国、ペンシルベニア州、ウェイン、2007年1月）。*S. aureus* ATCC 29213に対するセファゾリンおよびムピロシンのMIC、ならびに*E. coli* ATCC 25922に対するセファゾリンおよびゲンタマイシンのMICは、既に公表された品質管理の範囲（CLSI文書第M100-S17、前出）内にあった。*S. aureus* ATCC 29212および*E. coli* ATCC 25922の場合に増強MPO溶液について決定された品質管理の範囲は、それぞれ、0.010~0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ および0.15~0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。これらの生物については20連を超えて実施され、結果はすべて確立された品質管理の範囲内にあった。濃縮液の3つのロットを2連で調べた結果は、すべてのMIC値が、確立された品質管理の範囲内にあることを裏付けた。

【0168】

上記で示された通り、*in vitro*における増強MPO溶液についての比較活性は、グラム陽性菌に対して、ムピロシンの活性と同等であるかこれよりも大きく、グラム陰性菌の場合、ゲンタマイシンの活性よりも数倍大きかった。被験対象の耐性菌株および感受性菌株中において、増強MPO溶液に対する感受性の差は観察されなかった。MBC試験により、増強MPO溶液が、重篤な皮膚感染症と関連する最も一般的な2つの病原体である*S. aureus*および*S. pyogenes*に対する殺菌活性を呈することが示されたことは重要である。

【0169】

時間一殺滅試験

2つの方法：懸濁液中中和法（Tortorano, A. M.らおよびEBGA Network 2005、「In vitro testing of fungicidal activity of biocides against *Aspergillus fumigatus*」、J. Med. Microbiol.、第54巻、955~957頁）およびCLSIマイクロ希釈時間一殺滅アッセイ（Clinical and Laboratory Standards Institute、「Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline」、CLSI文書第M26-A号、米国、ペンシルベニア州、ウェイン、CLSI、1999年9月）を適用することにより、増強MPO溶液の殺菌効果を評価した。懸濁液中中和法は、増強MPO溶液の急速な殺菌活性速度、および干渉物質の例としての血液によるその生物学的活性に対する効果を評価するのに用いられた。標準化された試験を適用することにより、増強MPO溶液の殺菌活性を評価するため、CLSI法もまた用いられた。

【0170】

懸濁液中中和による時間一殺滅試験に用いられる被験生物は、*S. aureus* ATCC 6538 および *E. coli* ATCC 25922 であった。振とうフラスコ法により細菌懸濁液を調製し、早期の定常相増殖に対する後期の対数増殖を達成した。無菌の生理食塩液中において 1.0 ml 容量の培養物をペレット化して再懸濁させ、約 10^9 CFU/ml とした。 20 ml のガラス製シンチレーションバイアル内において、*in vitro* アッセイを実施した。適量である 1.0 ml の希釈液に加えて 15 ml の接種材料を含有するように時間一殺滅反応バイアルを調製した後で、濃縮液を添加した。最終懸濁液は約 10^7 CFU/ml を含有し、希釈系列により実際のコロニーカウントを確認した。低濃度の増強MPO溶液に生物懸濁液を加え、 0.1 、 0.3 、 1 、 3 、 6 、および $9\text{ }\mu\text{g/ml}$ の最終濃度で調べた（図1Aおよび1Bを参照されたい）。処理バイアルは室温でインキュベートした。次いで、 1 、 2 、 5 、 15 、 30 、 60 、および 120 分後において、無菌の 1% カタラーゼ溶液 $100\text{ }\mu\text{l}$ を添加することにより、細菌の定量直前に酵素反応を停止させた。濃縮液を添加しない対照培養物を室温で 30 分間にわたりインキュベートし、定量的培養を実施した。指定された各時点において各反応バイアルから $100\text{ }\mu\text{l}$ の試料を採取し、無菌の生理食塩液中において希釈系列を調製した。 $100\text{ }\mu\text{l}$ の各希釈液を適用して、 5% ヒツジ血液を伴う TSA プレートを複製し、無菌の接種ループにより表面上に拡散させた。 35°C で一晚にわたるインキュベーション後、コロニーをカウントし、生存カウントを計算した。増強MPO溶液の殺菌効果は、増殖対照と比べた、 99.9% または $3\log_{10}\text{ CFU/ml}$ を超える生存カウントの低減として定義された。

10

20

【0171】

増強MPO溶液の活性に対する、干渉物質の潜在力を評価するため、既に説明した懸濁液中中和法を用いて、実験日において、ヘパリン処理した試験管内に新鮮な状態で回収されたヒト全血液およびラット全血液の存在下において、時間一殺滅試験を実施した。 3% のヒト血液の存在下において、*S. aureus* ATCC 6538 および *P. aeruginosa* ATCC 27317 の約 10^7 CFU/ml の接種材料に対して、 50 、 100 、および $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ で増強MPO溶液を調べ、 5 、 15 、 30 、および 60 分後において殺菌活性を停止させた（図2Aおよび2Bを参照されたい）。上記で説明した通り、 6 、 12 、および 24% のラット血液の存在下において、*S. aureus* ATCC 6538 の約 10^7 CFU/ml の接種材料に対して、 400 、 800 、および $1,600\text{ }\mu\text{g/ml}$ の増強MPO溶液もまた調べ、 2 、 5 、および 15 分後において殺菌活性を停止させた。各試験条件について、 2 連または 3 連が得られた。

30

【0172】

CLSI 変法による時間一殺滅試験に用いられる被験生物には、*S. aureus* ATCC 29213、*E. faecalis* ATCC 29212、*E. coli* ATCC 25922、および *P. aeruginosa* ATCC 27853 が含まれた。 5% ヒツジ血液を伴う TSA 上で増殖した複数のコロニー（ $4\sim 6$ 個）を、 3 ml の脱イオン化水中に懸濁させ、懸濁液を、 0.5 マクファーランド濁度の標準液（約 $1\times 10^8\text{ CFU/ml}$ ）へと調整した。次いで、この懸濁液を、あらかじめ加熱した CAMHB 中において $1:10$ に希釈し、 37°C の振とう式インキュベーター内で $1\sim 4$ 時間にわたりインキュベートした。培養物がその対数増殖相に達し、濁度が 0.5 マクファーランド濁度の標準液の濁度に近づいたら、 $100\text{ }\mu\text{l}$ を採取して 10 ml の希釈液へと添加し、結果として約 $5\times 10^6\text{ CFU/ml}$ の濃度を得た。この懸濁液が、時間一殺滅試験用の接種材料を構成した。時間一殺滅反応ウェルは、CAMHB および接種材料中において調製された $100\text{ }\mu\text{l}$ の濃縮液（ $50\text{ }\mu\text{l}$ の濃縮液および希釈液中で調製された $50\text{ }\mu\text{l}$ の接種材料）を含有するように調製した。濃縮液中におけるMPOの最終濃度は、最高濃度の 4 倍希釈： 0 、 0.06 、 0.25 、 1 、 4 、 16 、 64 、および $256\text{ }\mu\text{g/ml}$ であった。培養液および接種材料は含有するが濃縮液は含有しない、同一の反応ウェルが培養物の増殖対照を構成した。細菌細胞の最終濃度は、約 $5\times 10^5\text{ CFU/ml}$ であっ

40

50

た。マイクロ希釈トレーは、周囲大気中35℃でインキュベートし、0、2、5、15、30、および60分後、ならびに4および24時間後において各時間一殺滅ウェルに10μlの1%カタラーゼ溶液を添加して、増強MPO溶液の抗微生物作用を停止させた。定量化のために系列試料を得た。各時点において各ウェルから100μlずつの試料を採取し、無菌の生理食塩液中において希釈系列を調製した。容量100μlの各希釈液を適用して、5%ヒツジ血液を伴うTSAプレートを複製し、無菌の接種ループにより表面上に拡散させた。時点ゼロにおけるプレートは、純度プレートとして機能した。35℃で一晩にわたるインキュベーション後、手作業でコロニーをカウントし、生存カウントを計算した。殺菌活性は、初期接種材料からの、99.9%または $3 \log_{10} \text{CFU/ml}$ のコロニーカウントの低減として定義された。

10

【0173】

懸濁液中中和法による時間一殺滅試験の結果を、図1に示す。データは、被験増強MPO溶液の濃度を上昇させた場合の所定の時点における、初期接種材料と比した CFU 単位の $\log_{10}$ による低減として提示される。増強MPO溶液は、*S. aureus*および*E. coli*のいずれに対しても極めて迅速な殺菌活性を示した。増強MPO溶液の濃度が上昇すると殺滅速度が増大し、曝露時間が長くなると殺滅規模が増大した。*S. aureus*の場合、増強MPO溶液は、6~9μg/mlに対する2分間の曝露後において、初期接種材料の $3 \log_{10}$ を超える($7.2 \log_{10} \text{CFU/ml}$)の低減をもたらした。殺菌性であった。3、6、および9μg/mlに対する曝露で検出可能な増殖が観察されなくなるのは5分以内であり、1μg/mlでも、 $3 \log_{10}$ を超える低減が5分以内に達成され、15分間の曝露では検出可能な増殖が生じなかった。0.3および0.1μg/mlの増強MPO溶液に対する、それぞれ30分間および120分間の曝露後においても検出可能な増殖は観察されなかった。増強MPO溶液は、*E. coli*に対しても同様の時間一殺滅パターンを示した。3μg/ml以上の増強MPO溶液濃度に対する曝露で検出可能な増殖が観察されなくなるのは2分以内であった。1μg/mlの増強MPO溶液に対する2分間の曝露後においては、初期接種材料の $3 \log_{10}$ を超える($6.8 \log_{10} \text{CFU/ml}$)の低減が達成された。1.0μg/mlの処理で検出可能な増殖が観察されなくなるのは5分以内であった。増強MPO溶液が0.3および0.1μg/mlの低濃度の場合も、それぞれ15分間および60分間の曝露後において、検出可能な増殖が観察されなかった。

20

30

【0174】

増強MPO溶液の殺菌活性の時間依存性および濃度依存性は、3%のヒト全血液または同ラット全血液の存在下においても依然として存在した。いずれの血液供給源間においても、著明な差は認められなかった。3%のヒト血液存在下において調べた最高のMPO濃度である200μg/mlでの増強MPO溶液が、初期接種材料が $7.15 \log_{10} \text{CFU/ml}$ である*S. aureus*および*P. aeruginosa*の検出可能な生存菌数をもたらさなくなるのは5分未満であった。濃度100μg/mlの増強MPO溶液は、*P. aeruginosa*および*S. aureus*に対して、それぞれ、 $4 \log_{10}$ を超える低減および $5 \log_{10}$ を超える低減を5分以内に達成した。最低の被験MPO溶液濃度である50μg/mlでも、いずれの生物の場合共に、すべての時点において殺菌活性が観察された(図2)。

40

【0175】

増強MPO溶液の抗微生物活性に対する血液の干渉作用は、MPO濃度を上昇させることにより克服された。増強MPO溶液の濃度が400および800μg/mlの場合、6および12%のラット血液の存在下において、*S. aureus*に対する $7.10 \log_{10} \text{CFU/ml}$ の低減が、検出可能な増殖なしに2分以内に達成された。24%ラット血液の存在下においても、増強MPO溶液は、400および800μg/mlで $4 \log_{10}$ の低減を2分以内にもたらした。1,600μg/mlで検出可能な生存菌数をもたらさなくなるのが2分以内であった。

【0176】

50

C L S I 培養液マイクロ希釈変法による時間一殺滅試験の結果を、図 3 A ~ 3 D に示す。データは、指定される時点における、 $\log_{10}$ による C F U / m l の低減として提示される。増強 M P O 溶液は、すべての被験濃度において、*S. aureus* に対する殺菌活性を示した。*E. coli* に対して、増強 M P O 溶液は、その M I C の 4 分の 1 である $0.06 \mu\text{g} / \text{ml}$ を除き、すべての被験濃度で殺菌性であった。*E. faecalis* および *P. aeruginosa* の場合も同様に、増強 M P O 溶液は、M I C を上回る濃度で調べると殺菌性であった。*E. faecalis* および *P. aeruginosa* に対する M I C は、それぞれ、 0.5 および $0.06 \mu\text{g} / \text{ml}$ であった。4 つの生物すべてについて同等の殺菌活性パターンが観察され、増強 M P O 溶液の濃度が上昇すると殺滅速度が増大し、曝露時間が長くなると殺滅規模が増大した。増強 M P O 溶液の濃度が 256 および $16 \mu\text{g} / \text{ml}$ の場合、すべての生物について検出可能な増殖が観察されなくなるのは、それぞれ、 30 分および 4 時間以内であった。増強 M P O 溶液に対する 4 時間の曝露後において、*E. faecalis* の場合は $16 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、*S. aureus* の場合は $4.0 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、*E. coli* および *P. aeruginosa* の場合は $1.0 \mu\text{g} / \text{ml}$ で $3 \log_{10}$ を超える低減が達成された。懸濁液中和法を用いてより迅速な殺菌活性が観察されたことは、C L S I 培養液マイクロ希釈法で用いられた培地の効果による可能性がある。

【0177】

懸濁液中和法により実施された時間一殺滅試験は、増強 M P O 溶液の殺菌活性の速度および規模を示した。濃度に依存して、殺滅活性は迅速であり、*S. aureus* または *E. coli* に対する $6 \sim 7 \log_{10}$ C F U / m l の低減が 1 分以内に結果としてもたらされた。一重項酸素の生成を示す化学発光試験（データは示さない）と併せた迅速な殺菌活性により、一重項酸素が主要な殺滅作用物質である、提起される作用方式が支持される。一重項酸素の高度に求電子的な性質により、標的の生物学的分子における高電子密度領域を酸化し、この結果、膜の完全性の破壊、および／または代謝機能に必要とされる酵素に対する酸化的阻害をもたらすことが可能となる。従来の抗体とは異なり、増強 M P O 溶液は、微生物の細胞内代謝に依存して細胞増殖の阻害または細胞死をもたらすとは考えられない。

【0178】

増強 M P O 溶液の時間一殺滅試験のための標準化された方法が存在しなかったので、懸濁液中和法および C L S I 培養液マイクロ希釈法の両方を用いて、被験生物に関わらず、増強 M P O 溶液の殺菌活性が時間および濃度に依存的であることを確認した。また、原型的な製剤による、*Candida* 属、*Aspergillus* 属、*Bacillus* 属、および *Mycobacterium* 属またはこれらのメンバーに対する、懸濁液中和法による時間一殺滅試験は、時間が経過すると検出可能な生存が観察されなくなる、時間および濃度に依存する殺菌活性も裏付けた。

【0179】

抗微生物的な相互作用

96 ウェルマイクロ希釈トレイを用いるチェッカーボード滴定法により、 3 つの多剤耐性臨床菌株を用いて、増強 M P O 溶液および抗生剤の組合せを調べた (Moody, J.、*「Synergism Testing: Broth Microdilution Checkerboard and Broth Macrodilution Methods」*、 $5.12.1 \sim 5.12.23$ 頁、H. D. Isenberg (編)、*「Clinical Microbiology Procedures Handbook」*、第 2 版、 2004 年、米国、ワシントン D C.、A S M P r e s s 社)。被験生物には、バンコマイシン低感受性 *S. aureus* Mu 50 菌株 (N R S 1 における N A R S A による単離株) (Hiramatsu, K. H. ら、*「Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Clinical Strain With Reduced Vancomycin Susceptibility」*、J. Antimicrob. Chemother.、第 4

10

20

30

40

50

0 巻、135～136 頁、1997 年)、*E. coli* (Eurofins 1075701)、および *P. aeruginosa* (Eurofins 1445536) が含まれた。濃縮液および選択された抗生剤を、CAMHB を伴う培養液マイクロ希釈法により調べ、単独および組合せで系列希釈 (2 倍) した。チェッカーボード内の各ウェルは、2 つの薬剤の濃度による固有の組合せを含有し、2 つの行は 1 つの薬剤だけを含有した。増強 MPO 溶液の薬剤濃度範囲は、*S. aureus* に対して $0.0005 \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、*E. coli* に対して $0.008 \sim 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、また *P. aeruginosa* に対して $0.001 \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。抗生剤の濃度範囲は、被験単離株に対するそれらの各 MIC の 4 分の 1 以下～2 倍であった。上記で説明した通り、接種材料は希釈液中で調製し、マイクロ希釈トレイの各ウェルに添加し、周囲大気中 35°C でインキュベートした。単独または組合せでの各抗微生物剤の MIC は、18～24 時間後において目視により検出可能な増殖が生じない (1 つまたは複数の) 最低濃度であるように決定された。FIC 指標 (fractionary inhibitory concentration indexes; FICI) は、以下の通り： ≤ 0.5 ：相乗作用； $> 0.5 \sim 4.0$ ：相互作用なし； > 4.0 ：アンタゴニズム (Odds, F. C.、「Synergy, Antagonism, and What the Checkerboard Puts Between Them」、*J. Antimicrob. Chemother.*、第 52 巻、1 頁、2003 年) に解釈された。

【0180】

培養液マイクロ希釈法による耐性発生試験において、*S. aureus*、*E. faecalis*、および *P. aeruginosa* に対する MIC 結果は、阻害濃度未満の増強 MPO 溶液中における継代後においても、21 日間にわたり変化なしの状態を保った。*E. coli* の 3 つの臨床菌株に対する MIC は、第 1 日～第 2 日における 1 回だけの継代後において倍化希釈液の ≥ 4 倍の上昇を示し、該 MIC は 21 日間にわたって高値を保った。試験期間にわたる MIC の変化は、各菌株それぞれに対して $0.12 \sim 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.25 \sim 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.5 \sim 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。薬剤を含まない寒天プレート上においてこれらの菌株各々を 3 回にわたって継代したところ、再試験時の MIC は安定的でなく、倍化希釈液の ≤ 2 倍の初期ベースライン MIC へと低下した。

【0181】

耐性の発生

2 つの *in vitro* 法により、多段階の突然変異速度を決定した。阻害濃度未満の原型製剤中で毎日継代された菌株を、懸濁液中中和法により調べ (Millichap, J. ら、「Selection of Enterococcus faecium Strains With Stable and Unstable Resistance to the Streptogramin RP 59500 Using Stepwise In Vitro Exposure」、*Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*、第 25 巻、15～20 頁、1996 年；Tortorano, A. M. ら、「In vitro Testing of Fungicidal Activity of Biocides Against *Aspergillus fumigatus*」、*J. Med. Microbiol.*、第 54 巻、955～957 頁、2005 年)、培養液マイクロ希釈パネル内において増強 MPO 溶液を調べた (Silverman, J. A. ら、「Resistance Studies With Daptomycin」、*Antimicrob. Agents Chemother.*、第 45 巻、1799～1802 頁、2001 年)。懸濁液中中和法により用いられる 3 つの被験菌株には、*S. aureus* ATCC 6538、*P. aeruginosa* ATCC 15442、およびバンコマイシン耐性である *E. faecium* の臨床菌株が含まれた。既に説明した通りに生物懸濁液を調製し、 $10^7 \text{ CFU}/\text{ml}$ の最終標的濃度とした。初期処理として、 0.1 または $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$ で容量 1.0 ml の増強 MPO 溶液に生物懸濁液を加えて、各処理バイアルへと添加した。乾燥槽内 37°C でバイアルをインキュベートした。次いで、60 分後、 $100 \mu\text{l}$ のカタラー

ゼを各バイアルに添加して反応を停止させ、各バイアルの全内容物を単離培地上において培養した。安定的な耐性を誘導しようとする試みでは、48時間のインキュベーション後において、最高度の増強MPO溶液で処理した単離プレートからの生存菌を用いて、次の継代のための接種材料を調製した。各連続実験は、増殖を許容する、前実験における増強MPO溶液の最高濃度、およびその濃度の約2倍の濃度で実施された。継代は、3つの菌株すべてを用いて、連続する25～30日間にわたり継続した。

【0182】

阻害濃度未満の増強MPO溶液に対する生物の反復曝露の結果、耐性が急速に発生するかどうかを判定するため、マイクロ希釈トレイにおいて連続継代法を用いた (Silverman, J. A. ら、「Resistance Studies With Daptomycin」、Antimicrob. Agents Chemother.、第45巻、1799～1802頁、2001年)。10の菌株には、S. aureus (ATCC 29213、Eurofins 1288199)、E. faecalis (ATCC 29212、ATCC 51299)、E. coli (ATCC 25922、Eurofins 1075701、Eurofins 1337451、Eurofins 1337019)、およびP. aeruginosa (ATCC 27853、Eurofins 1077561) が含まれた。上記で説明した通りに、増強MPO溶液に対するベースラインのMICを決定した。増殖を許容した最高濃度の増強MPO溶液を含有するウェルから、後続のMIC試験のための接種材料を調製した。CAMHB内において系列希釈された濃縮液を含有する新鮮なパネルに、希釈液中において調製された新規の懸濁液を再接種した。21日間にわたり継代を継続し、各連続継代後において、増強MPO溶液のMICを決定した。その後、MICが上昇を示した場合は、薬剤を含まない寒天 (TSA) プレート上における3回の連続継代により安定性試験を実施し、この間におけるMICを再決定した。

【0183】

培養液マイクロ希釈法による耐性発生試験において、S. aureus、E. faecalis、およびP. aeruginosaに対するMIC結果は、増強MPO溶液の阻害濃度未満における継代後においても、21日間にわたり変化なしの状態を保った。E. coliの3つの臨床菌株に対するMICは、第1日～第2日における1回だけの継代後において倍化希釈液の ≥ 4 倍の上昇を示し、該MICは21日間にわたって高値を保った。試験期間にわたるMICの変化は、各菌株それぞれに対して $0.12 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ 、 $0.25 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ 、および $0.5 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ であった。薬剤を含まない寒天プレート上においてこれらの菌株各々を3回にわたって継代したところ、再試験時のMICは安定的でなく、倍化希釈液の ≤ 2 倍の初期ベースラインMICへと低下した。

【0184】

耐性発生試験は、増強MPO溶液および類似の原型製剤が、S. aureus、Enterococcus属種、P. aeruginosa、およびE. coliにおける耐性に選ばれないことを示した。E. coliの3つの臨床菌株は、増強MPO溶液に対する曝露時においてMICの上昇を示したが、MICの上昇は安定的でなく、抗生剤を含まない培地上における後続の継代時に失われた。増強MPO溶液による迅速な殺滅速度および作用方式と共に、これらの知見は、該薬剤産物に対する曝露が耐性の発生に対して有する可能性が極めて低いことを示唆する。

【0185】

薬剤相互作用試験は、被験対象である従来の抗生剤の活性に対するアンタゴニズムを示さなかった。これは、従来の抗生剤療法と併せて増強MPO溶液を用いる適用にとって重要である。増強MPO溶液はまた、手術による創傷および外傷による創傷の治療における不可欠の属性である、全血液の存在下においても、その強力な殺菌活性を及ぼす。

【0186】

上記で示された通り、本発明の増強ミエロペルオキシダーゼ組成物は、薬剤感受性菌株、薬剤耐性菌株、および多剤耐性菌株を含めた、臨床生物および基準生物に対して強力で

10

20

30

40

50

、広域スペクトルで、迅速な殺菌活性を提供する。それらが耐性に選ばれる傾向が小さく、薬剤間相互作用を欠くことから、本発明の増強組成物は、*in vivo*における多種多様な適用における、感染を治療および予防するための局所／外用の抗感染使用に理想的である。

【0187】

(実施例12)

増強MPO製剤についての*in vivo*試験

*in vivo*状況における実施例11の増強MPO溶液を評価するため、3つの異なる創傷モデルを用いた。これらのモデルには、全層切除創傷、部分層創傷、および大腿深部切開創傷が含まれた。

10

【0188】

抗微生物剤

増強MPO溶液は、使用前に混合される、濃縮液および希釈液と称する2つの水溶液を含む。濃縮液は、水性の製剤媒体中において、MPO、GO、塩化ナトリウム、および特定の抗微生物活性増強剤を含有する。希釈液は、濃縮液と同じ水性製剤媒体中において、グルコース（デキストロス）を含有する。濃縮液および希釈液を、使用の直前に多様な比率で共に混合し、薬剤産物である増強MPO溶液を所望の濃度で生成する。増強MPO溶液の濃度は、ミリリットル当たりのMPOグアイアコール単位（GU/ml）として表されるが、また、ミリリットル当たりのMPOマイクログラムとしても表される。MPOのGUから μg への変換は、 $0.375 \text{ GU} / \mu\text{g}$ MPOに基づく。

20

【0189】

細菌株

MRSAの臨床菌株である*Staphylococcus aureus*（登録商標）136、*S. aureus* ATCC 6538、*Escherichia coli* ATCC 25922、および*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27317は、Ricerca LLC社（米国、オハイオ州、コンコード）、またはATCC（American Type Culture Collection）から購入した。

【0190】

実験動物創傷モデル

米国、ミシガン州、ボーテッジ、Charles River Laboratories社から購入した成体雄Sprague-Dawleyラット（約250グラム）を、各創傷モデルにおいて用いた。動物は各ケージ内で飼育し、試験全体にわたり不断に餌および水を与えた。すべての創傷モデルについて、各ラットにおいて2カ所ずつの創傷部位を作製した。創傷形成前に、電気バリカンで対象部位の体毛を剃毛した。イソフルランを用いて動物に麻酔をかけた（顔面マスクを介して O_2 中1～5%）。試験時間（5時間を超える）にわたり動物が麻酔下に保たれない場合は、12時間ごとに術後疼痛用にブプレノフィンを投与した（腹腔内で $0.05 \sim 0.25 \text{ mg/kg}$ ）。すべての実験動物手順は、Ricerca LLC社内の実験動物管理使用委員会によるガイドラインに従い実施した。

30

40

【0191】

(i) 全層切除創傷モデル

Saymen, G. D. ら、「Infected Surface Wound: An Experimental Model and a Method for the Quantitation of Bacteria in Infected Tissues」、Applied Microbiology、第23巻、第3号、509～514頁、1972年により報告される方法の改変により実験創傷を誘導した。メチシリン耐性*S. aureus*（登録商標）136、*S. aureus* ATCC 6538、または*E. coli* ATCC 25922を接種生物として用いた。生物は、トリプチカーゼダイズ培養液中で増殖した後期対数増殖懸濁液として調製した。振とうフラ

50

スコから細胞を回収し、遠心分離し、緩衝生理食塩液中において再懸濁させ、 $9 \log 10 \text{ CFU/ml}$ の懸濁液をもたらした。次いで、この原液を緩衝液中において希釈して約 $7.5 \log 10 \text{ CFU/ml}$ の作業懸濁液をもたらし、接種材料として用いた。弛緩性皮膚をつまみ上げ、滅菌法を用いてハサミにより楕円形の皮膚領域を切除し、約 $1 \sim 2 \text{ cm}^2$ の筋膜を露出させることにより、各ラットにおいて2カ所ずつの創傷部位を作製した。すべての治療群では、各々2カ所ずつの創傷を有する3匹ずつのラットを用いた。Breuingら(Breuing, K., 「Wound Fluid Bacterial Levels Exceed Tissue Bacterial Counts in Controlled Porcine Partial-Thickness Burn Infections」、Plast. Reconstr. Surg., 第111巻、781～788頁、2003年)により報告される手順と同様、Quick Tite (登録商標) (Loctite社製)セメントにより、直径 2.5 cm で開放端のポリスチレン製円筒を各切除部位周囲の皮膚へと接着した。各円筒は液密性の試験チャンバーを形成し、その底部は露出した筋膜であった。 10^7 CFU の細菌懸濁物を含有する $200 \mu\text{L}$ を筋膜上において直接に貯留させることにより、露出した創傷に接種した。露出した筋膜を完全に覆うには、この容量の接種材料で十分であった。適用後、治療前の15分間にわたり、接種材料を筋膜上において静置した。容量 $800 \mu\text{L}$ の増強MPO溶液を該部位に添加した結果、試験部位当たり 1 ml の総容量がもたらされた。無菌の 0.9% 生理食塩液 $800 \mu\text{L}$ または同緩衝液が添加された対照部位には、増強MPO溶液を投与しなかった。単一のラットにおけるいずれの創傷部位も、同じ治療を受けた。増強MPO溶液による5、15、30、または60分間の治療時間後において、各部位に過大量のカタラーゼ溶液を添加し、残存する酵素および／またはその後生成する過酸化水素を破壊し、これにより、さらなる殺菌活性を阻害した。円筒内の液体を回収し、基底部分にある筋膜を無菌的に切除し、秤量し、ホモジナイズした。トリプチカーゼダイズ寒天(TSA)上に播種され、 37°C で一晩にわたりインキュベートされた、10倍の希釈系列を用いる定量的培養により、各部位について回収された液体試料および組織ホモジネート中における生存細菌カウントを個別に評価した。治療の効能は、各創傷について回収された液体および組織ホモジネートに由来するカウントの合計として計算され、各治療群内のすべての試料の平均として報告される。

【0192】

全層創傷モデルについて、生データから $\log 10 (\text{CFU} + 1)$ による平均生存菌数を計算した。該平均の標準誤差および適切な自由度数を反映するt値から、該平均についての95%信頼区間を計算した。増強MPO溶液の活性は、全層切除モデルの3つの異なるp-MPO濃度である 18.75 、 75 、および 150 GU MPO/ml において、時間依存性および濃度依存性を示した。図4に示される通り、 75 GU MPO/ml および 150 GU MPO/ml を含有する増強MPO溶液により、 $7 \log_{10}$ を超える*S. aureus* ATCC 6538の接種材料のほぼ完全な殺滅が15分以内にもたらされた。いずれの濃度の増強MPO溶液による治療も、 $4 \log_{10} \text{ CFU}$ を超える低減を5分以内に結果としてもたらした。該濃度を 18.75 GU MPO/ml へと低下させても、約 $3 \log_{10} \text{ CFU}$ の低減がやはり5分以内に達成された。増強MPO溶液で治療した創傷から回収された、創傷当たりの対数によるCFU数は、すべての被験濃度および被験時点について、接種材料($7.3 \log_{10}$)および非治療の感染対照($7.25 \log_{10}$)のいずれとも統計学的に異なっていた($p < 0.05$)。

【0193】

E. coli ATCC 25922を接種した創傷に対する増強MPO溶液の効果を図6に示す。*S. aureus*について観察される通り、細菌カウントは、増強MPO溶液による治療後5分以内に迅速に減少した。 150 GU MPO/ml を含有する増強MPO溶液により治療した創傷では、適用された接種材料($7.2 \log_{10}$)のほぼ完全な殺滅が5分以内に観察された。

【0194】

これらの結果により、組織および創傷滲出物を含む環境における、*S. aureus* および *E. coli* に対する増強MPO溶液の迅速で時間依存的かつ濃度依存的な活性が確認された。

【0195】

治療の15分後において、創傷内のMRSAに対する増強MPO溶液の殺菌活性と、同MSSAに対する同殺菌活性との間には、著明な差が見られなかった（図5）。いずれの場合においても、治療群からの生存生物の回収により、接種材料対照からの、CFU単位で約 $5 \log_{10}$ の低減が示された。かつての結果では、創傷部位に対する細菌接種後最長1時間にわたり、細菌生存率にはさほどの増減が示されなかったもので、治療に対する曝露の15分後における殺滅の程度を該接種材料と比較した（図5および図6）。これらの知見は、メチシリン耐性生物およびメチシリン感受性生物に対する、実施例11に記載される、*in vitro*における増強MPO溶液の活性を裏付ける（MIC₉₀：0.03 μg MPO/ml）。

【0196】

(ii) 部分層創傷モデル

Staphylococcus aureus ATCC 6538を接種生物として用いた。全層切除創傷について上記で説明した通りに、接種材料を調製した。実験創傷は、各ラットの背部正中線上における2つの10mm×7mm部位からなり、1つの部位は前方肩付近であり、もう1つの部位は尾側であった。創傷は、皮膚の制御された剥離により達成された。手指を用いて皮膚をつまんで襞を形成し、力を入れておろし金を10回通過させることによりこれをこすり取った。これにより、若干落ちくぼみ（すなわち、該皮膚の約 $1/3 \sim 1/2$ の厚さ）、若干出血した（ぬぐい取って乾燥させた）創傷がもたらされた。試験は、実験当たり4～5つずつの治療群へと編成し、3匹ずつのラットに各治療を投与した。各ラットは2カ所ずつの創傷を有し、これにより、実験群当たり6カ所ずつの創傷部位が得られた。露出した創傷の中央部に 10^6 CFU/mlの接種材料25マイクロリットルを分注し、無菌のポリプロピレン製スパチュラを用いて全創傷領域上において10秒間にわたってすり込んだ。接種材料の適用20分後、創傷部位上において、30秒間にわたり、綿棒により1mlの増強MPO溶液またはプラセボをスワッピングした。次いで、3mlの増強MPO溶液またはプラセボを含有する含浸ガーゼを各創傷へと適用し、該創傷をTegadermにより被覆した。接種の3または24時間後においてすべての治療部位を回収し、生存生物について培養した。Tegadermおよびガーゼを除去し、創傷全体を筋膜まで切除し、風袋計量済みの無菌試験管内に入れ、秤量し、各試験管に0.9%の無菌低温生理食塩液1mlを添加した。次いで、組織をホモジナイズし、TSA上に播種され、37℃で一晩にわたりインキュベートされた、10倍の希釈系列を用いる定量的培養により、各部位について回収された組織ホモジネート中における生存細菌カウントを評価した。治療の効能は、各治療群について回収された組織試料に由来するカウントの平均として報告される。

【0197】

生データから $\log_{10} (CFU + 1)$ による平均生存菌数を計算した。該平均の標準誤差および適切な自由度数を反映するt値から、該平均についての95%信頼区間を計算した。以下の表35に示される通り、部分層創傷モデルにおける治療の3および24時間後、75、150、または300 GU MPO/mlにおける増強MPO溶液（E-MPO）の活性度を評価した。この表は、各治療の3および24時間後に単離された、 $\log_{10} CFU$ による平均生存菌数を示す。各治療群について、各々の95%信頼区間が示される。組織試料から回収された生存*S. aureus*のCFU数に関して、プラセボ対照治療群と増強MPO溶液治療群との間では、有意差が観察された。

【0198】

表35

部分層切除モデル—*S. aureus* ATCC 6538に対する、*in vivo*における増強MPO溶液の殺菌活性

【0199】

【表35】

治療群	log10(CFU+1)による生存菌数± 95%信頼区間
単回治療の3時間後	
感染対照-非治療	4.2 ± 0.068
E-MPO溶液-150GU/ml	0.8 ± 0.614*
単回治療の24時間後	
プラセボ治療	5.9 ± 0.143
E-MPO溶液-150GU/ml	4.8 ± 0.807*
単回治療の24時間後	
プラセボ治療	6.2 ± 0.697
E-MPO溶液-75GU/ml	5.3 ± 0.997
E-MPO溶液-300GU/ml	4.4 ± 0.637

*は、プラセボ対照または感染対照に対して統計学的な差を示す治療群を表す。

【0200】

150GU/mlにおける増強MPO溶液の単回の適用後において、創傷から単離された生物の平均数は、3時間後において約0.81log₁₀CFU（約6CFU）であった。これは、感染対照と比較して、3log₁₀を超える低減を表した。

【0201】

24時間後において、MPOを75、150、および300GU/mlで含有する増強MPO溶液の単回適用を検討して用量反応を決定し、プラセボ対照と比較した。75GU/mlの増強MPO溶液を用いる治療により、回収される生物数が5.31log₁₀CFUまで低減された。しかし、この低減は、6.21log₁₀CFUの回収を伴うプラセボ治療群と比較して統計学的に有意ではなかった（p=0.15）。増強MPO溶液を150GU/mlで単回適用した後において、創傷から回収される生物数は、プラセボ対照よりも約1.11log₁₀CFU少なかった（p<0.01）。300GU/mlの増強MPO溶液で治療した創傷は、プラセボ治療対照群から回収された6.21log₁₀CFUと比較して、約4.41log₁₀CFUを含有した（p=0.01）。これらの知見は、*S. aureus*に対する増強MPO溶液については24時間後において用量反応が存在し、単回治療後における創傷の汚染レベルの低下に持続的な効果が存在することを示す。

【0202】

(iii) 大腿深部切開創傷モデル

メチシリン耐性*S. aureus*（登録商標）136または*Pseudomonas aeruginosa*を接種生物として用い、上記で説明した通りに接種材料を調製した。創傷は、MRSAを用いる場合、各ラットの両方の大腿部における1カ所ずつの切開部からなり、*P. aeruginosa*の場合、1つの大腿部だけにおける1つの切開部からなった。各脚部について、脊柱、大転子、および膝に印をつけ、膝から大転子を経て脊柱へと至る線を描いた。大転子を中心として該描線に沿って約3cmにわたりハサミを用いて皮膚を切開し、約1cm幅で皮膚を剥離させた。下方は大腿骨のレベルまで、上方は殿筋内へと深部切開を作製した。ピンセットを用いて大腿骨骨幹軸に触れることにより、創傷の深さを確認した。*S. aureus*による試験は、実験当たり3つずつの治療群へと編成した（増強MPO溶液群、生理食塩液治療群、および非治療対照群）。一方の足には増強MPO溶液を施し、他の足は生理食塩液で治療する10匹のラットを用いて、増強MPO溶液を生理食塩液と比較した。加えて、5匹の動物には左足において増強MPO溶液を施し、5匹の動物には右足において同溶液を施した。2匹のラットは、接種は受けるが治療は受けず、その結果、非治療対照には4カ所の創傷がもたらされた。

【0203】

*P. aeruginosa*による試験もまた、実験当たり3つずつの治療群へと編成し

、増強MPO溶液群、生理食塩液治療群、および非治療対照群に、それぞれ4匹ずつのラットを用いた。ラットの各々は1カ所ずつの創傷を施され、これにより、実験群当たり4カ所ずつの創傷がもたらされた。無菌のピペットを用いて、 10^9 CFU/mlの生物懸濁液による接種材料100 μ Lを創傷の深部に分注した。S. aureusを接種した60分後において、75 GU/mlの増強MPO溶液2.5 mlにより1回、または300 GU/mlの増強MPO溶液10 mlずつにより、15分おいて2回にわたり創傷を治療した（表36を参照されたい）。P. aeruginosaを接種した60分後において、300 GU/mlの増強MPO溶液5 mlずつにより、15分おいて2回にわたり創傷を治療した（表37を参照されたい）。すべての増強MPO溶液治療および生理食塩液治療は、経管栄養投与用注射針を伴うシリンジを用いて適用した。治療された創傷が、2回

10

【0204】

平均感染性スコアは、創傷がラット内に埋め込まれ、ラットが実験内に組み込まれたモデルを用いて、PROC MIXED（米国、ノースカロライナ州、ケアリー、SAS社、SAS研究所）により、複数の実験からプールされたデータをもとに決定された。このモデルにおいては、ラットおよび実験のいずれもが、無作為変数として考えられる。t検定を用いて、平均値に対する対応のある比較を行った。S. aureusまたはPseudomonas aeruginosaのメチシリン耐性菌株による感染の進行に対する増強MPO溶液の効果は、大腿深部切開創傷モデルにおいて、接種の4日後に決定された。以下の表36において示される通り、増強MPO溶液（E-MPO）により治療された群のいずれもが、互いに対して統計学的な差を示さなかった。*はプラセボに対して統計学的な差を示す治療群を表し、#は感染対照に対して統計学的な差を示す治療群を表す。

20

【0205】

以下の表36および37に示される通り、治療の4日後における増強MPO溶液による治療群に対する感染性スコアを、同生理食塩液群および非治療群の感染性比率と比較した。

30

【0206】

表36

大腿深部切開創傷モデル—S. aureusに対する、in vivoにおける増強MPO溶液の殺菌活性

【0207】

【表36】

治療 ^a	N	感染性の評価
非治療	44	303*
生理食塩液-2×10ml	28	195#
生理食塩液-1×2.5ml	30	216#
E-MPO溶液(300GU/ml-2×10ml)	31	110*#
E-MPO溶液(75GU/ml-1×2.5ml)	10	84*#

40

Nは、治療群当たりの足の本数である。

*は、プラセボに対して統計学的な差を示す治療群を表す。

#は、感染対照に対して統計学的な差を示す治療群を表す。

【0208】

表37

50

大腿深部切開創傷モデル：P. aeruginosa に対する、in vivo における増強MPO溶液の殺菌活性

【0209】

【表37】

治療 ^a	N	感染性の評価
非治療	4	1032*
生理食塩液-2×5ml	4	705#
増強MPO溶液(300GU/ml-2×5ml)	4	86*#

Nは、治療群当たりの足の本数である。

*は、プラゼボに対して統計学的な差を示す治療群を表す。

#は、感染対照に対して統計学的な差を示す治療群を表す。

【0210】

MRSAを接種された動物は、300GU/mlの増強MPO溶液10mlずつにより2回にわたり、または75GU/mlの増強MPO溶液2.5mlにより1回治療された。治療の4日後における創傷の検査により、生理食塩液で治療された創傷（25%）および増強MPO溶液による治療群（300GU/mlおよび75GU/mlのいずれにおいても10%）と比較して、すべての非治療創傷（59%）についてより高度の発生率により化膿の存在が示された。

【0211】

300GU/mlの増強MPO溶液10mlずつにより2回にわたり治療された動物についての平均感染性スコア110は、それぞれ216、195、および303の感染性スコアを有する2回にわたる生理食塩液治療および非治療群の場合に対して統計学的な差を示した（p値<0.05）（表36）。増強MPO溶液の高濃度/高容量および低濃度/低容量の間では、統計学的な差が示されなかった（p>0.05）。

【0212】

表36に示される通り、300GU/mlで2回にわたり適用される10mlから、75GU/mlで1回適用される2.5mlへと、増強MPO溶液の濃度および容量を同時に低減した結果、1回適用される2.5mlの生理食塩液により治療される動物、2回にわたり適用される10mlの生理食塩液により治療される動物、および非治療動物について得られた、それぞれ216、195、および303の感染性スコアに対して統計学的な差を示す（p値<0.05）、84の感染性スコアがもたらされた。増強MPO溶液の高濃度/高容量および低濃度/低容量の間では、統計学的な差が示されなかった（p>0.05）。

【0213】

S. aureusからP. aeruginosaへと生物を変化させると、両足に接種した場合に、モデルの重症度が増大し、致死率も上昇した（データは示さない）ので、動物にP. aeruginosaを接種する場合は、動物1匹につき片足だけを用いた。加えて、P. aeruginosaは局所投与後において全身性となりうるため、2本の足を異なる治療に用いることは推奨されず、不明確な転帰をもたらす可能性が高かった。図37に示される通り、300GU/mlの増強MPO溶液5mlずつにより2回にわたり治療された動物についての86の平均感染性スコアは、生理食塩液治療群（IS=705）および非治療群（1032）のいずれに対しても統計学的な差を示した（p値<0.05）。第4日における観察により、生理食塩液により治療された創傷（25%）および増強MPO溶液治療群（0%）と比較して、すべての非治療創傷（50%）について、より高い化膿発生率もたらされた。

【0214】

具体的に述べると、これらの結果は、全層創傷感染モデルにおいて、S. aureusおよびE. coliに対する増強MPO溶液の用量依存的で時間依存的な殺滅活性を裏付ける。増強MPO溶液は、単回適用後、創傷滲出物の存在下において細菌負荷を低減する

のに有効であり、また従来用いられた抗生剤を添加せずに有効であったことが重要である。この殺滅効果は迅速であり、増強MPO溶液による治療の24時間後であっても、プラセボ対照または非治療対照と比較した細菌回収量を低減する。

【0215】

まとめると、これらの殺菌結果は、*in vitro*試験において見られる広域スペクトルの迅速な殺菌活性、耐性に選ばれる傾向の低さ、および薬剤間相互作用の欠如と結び付き、*in vivo*において感染を治療、予防、および軽減するための、本発明の組成物の使用を強力に支持する。

【0216】

例示的な実施形態について例示および説明してきたが、本発明の精神および範囲から逸脱しない限り、本発明において各種の変化を行うことが理解されるであろう。

10

【0217】

その中で、独占的な所有権または特権が主張される本発明の実施形態は、添付の特許請求の範囲に規定される。

【図1】

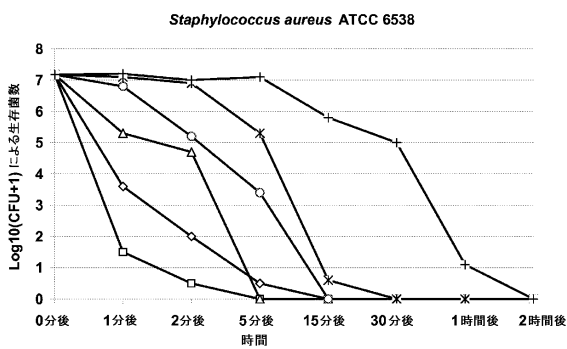


Fig. 1A

【図2】

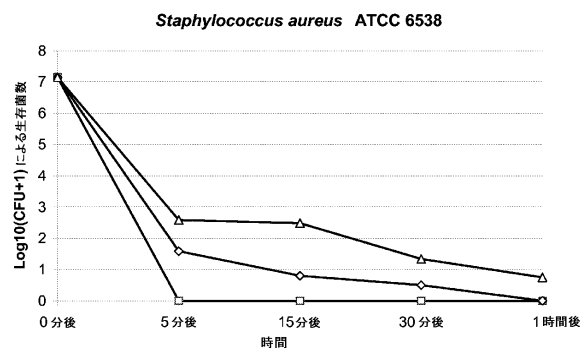


Fig. 2A

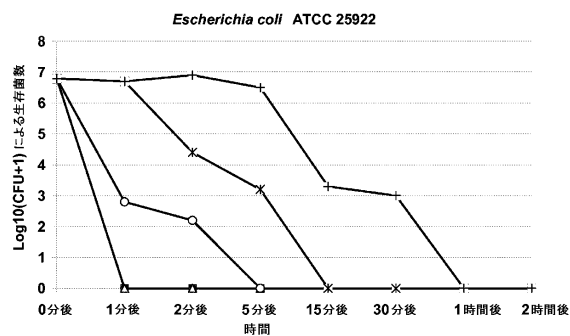


Fig. 1B

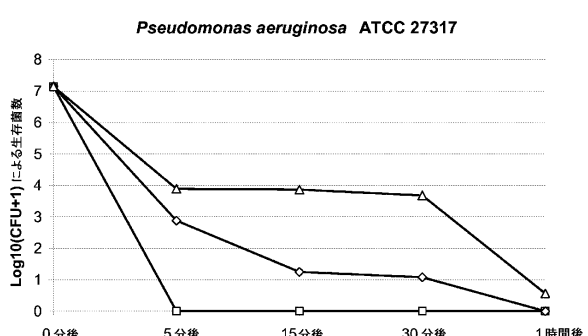


Fig. 2B

【図 3 - 1】

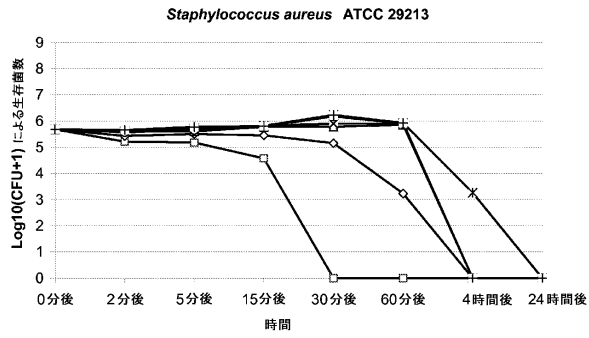


Fig. 3A

【図 3 - 2】

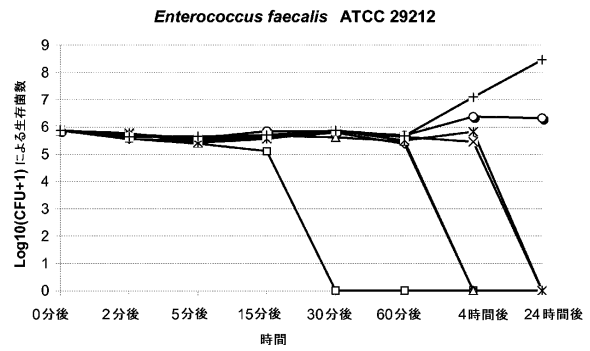


Fig. 3C

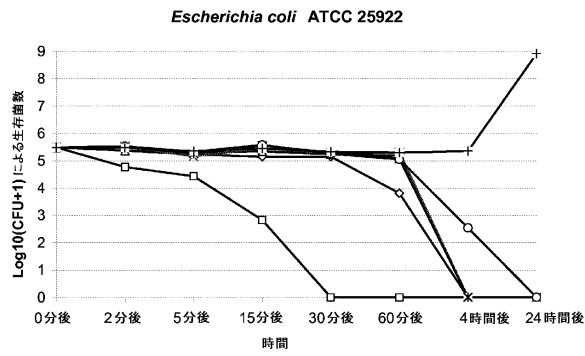


Fig. 3B

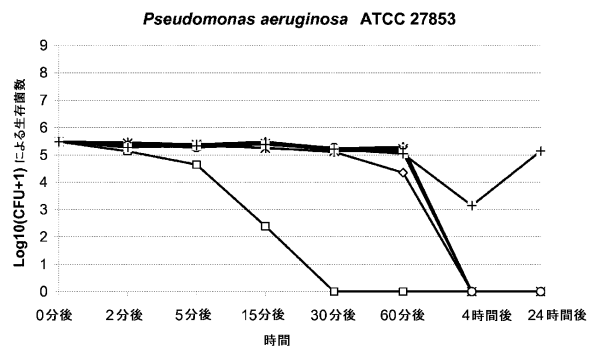


Fig. 3D

【図 4】

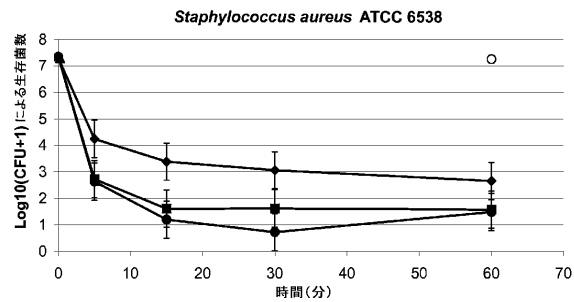


Fig. 4

【図 6】

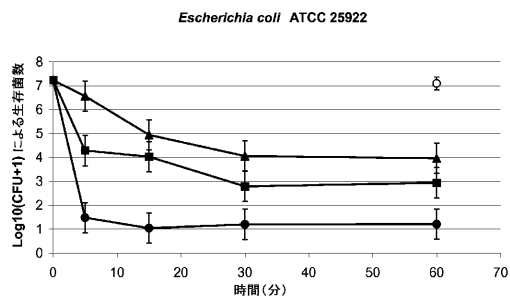


Fig. 6

【図 5】

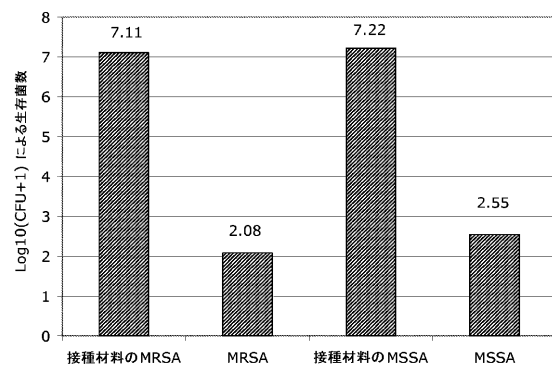


Fig. 5

フロントページの続き

- (72)発明者 ベクレル, ソフィー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95472, セバストポル, スキッドモアー ロード 7
505
- (72)発明者 ハーグ, ウィリアム
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94708-2049, バークレイ, シャスタ ロード
2877
- (72)発明者 アプリルーホーペル, オブシディアナ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94005-1304, ブリスベン, ハンボルト ロード
271
- (72)発明者 バルバニ, シュリ
アメリカ合衆国 ミシガン 49009-4590, カラマズー, ブルー スプリース レー
ン 5695

審査官 安藤 公祐

- (56)参考文献 特表平11-506444 (JP, A)
特表平09-503752 (JP, A)
特表2004-519462 (JP, A)
特表平06-505482 (JP, A)
ANDERSON, THE MYELOPEROXIDASE SYSTEM OF HUMAN PHAGOCYTES GENERATES N-(CARBOXYMETHYL)LY
SINE 以下備考, J. CLIN. INVEST., 1999年 7月 1日, V104 N1, P103-113, ON PROTEIN
S: A MECHANISM FOR PRODUCING ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS AT SITES OF INFLAMMATION

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A61K 31/198
A61K 38/44
A61P 31/04
A61P 43/00
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (STN)
P u b M e d