

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5676451号
(P5676451)

(45) 発行日 平成27年2月25日 (2015. 2. 25)

(24) 登録日 平成27年1月9日 (2015. 1. 9)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 7/06 (2006. 01)
A 6 1 L 29/00 (2006. 01)
A 6 1 L 27/00 (2006. 01)
A 6 1 L 31/00 (2006. 01)
C O 2 F 1/50 (2006. 01)

C O 7 K 7/06 Z N A
A 6 1 L 29/00 Z
A 6 1 L 27/00 F
A 6 1 L 31/00 Z
A 6 1 L 31/00 B

請求項の数 1 (全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-527422 (P2011-527422)
 (86) (22) 出願日 平成21年9月23日 (2009. 9. 23)
 (65) 公表番号 特表2012-503597 (P2012-503597A)
 (43) 公表日 平成24年2月9日 (2012. 2. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2009/006926
 (87) 国際公開番号 W02010/035107
 (87) 国際公開日 平成22年4月1日 (2010. 4. 1)
 審査請求日 平成24年3月30日 (2012. 3. 30)
 (31) 優先権主張番号 61/136, 673
 (32) 優先日 平成20年9月24日 (2008. 9. 24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 511067950
 テル ハシヨメール メディカル リサー
 チ、インフラストラクチャ アンド サー
 ビシーズ リミテッド
 イスラエル国, 5 2 6 2 1 テル ハシヨ
 メール, ザ テクノロジー トランスファ
 ー カンパニー オブ ハイム シバ メ
 ディカル センター
 (74) 代理人 100077838
 弁理士 池田 憲保
 (74) 代理人 100129023
 弁理士 佐々木 敬
 (74) 代理人 100155424
 弁理士 亀谷 真太郎

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Y D Y N W Y (配列番号 1)、Y D Y N L Y (配列番号 2)、F D Y N F Y (配列番号 3)、F D Y N L Y (配列番号 4)、W D Y N L Y (配列番号 8)、F D Y N W Y (配列番号 5)、Y D W N L Y (配列番号 6)、及び Y D W H L Y (配列番号 7) からなる群から選択されるいずれか一種の配列からなることを特徴とするペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞接着の予防における単離天然ペプチド及びその使用に関する。

10

【背景技術】

【0002】

微生物は、(プランクトンとして)環境中で自由に泳動する個々の細胞として生存及び増殖することができるか、又は表面及び界面に密接に結び付いて、自己産生ポリマーマトリクス中に包含された、高度に組織化された多細胞コミュニティとして成長することができる。後者の微生物ライフスタイルはバイオフィーム (biofilm; もしくは菌膜) と呼ばれる。バイオフィーム形成は、厳しい環境で微生物を生存させ、また微生物が分散し、かつ新たなニッチにコロニーを形成するのを可能にする、古くからの (ancient) 保護された成長状態を示す [非特許文献 1]。

【0003】

20

バイオフィルムの組成は複雑であり、異なる微生物種間で、及びさらには同じ微生物種であっても異なる環境条件下で変化する。それにもかかわらず、バイオフィルム形成は、環境中での微生物の正常なライフスタイルを示し、また全ての微生物がバイオフィルムを作製する可能性がある。これまでの研究により、細菌性のバイオフィルム形成が、タンパク質プロファイルが異なる複数の発生段階で進行することが明らかになり〔非特許文献2〕、これは表面への付着から始まり、その後の移動（immigration）及び分裂により微小コロニーを形成し、最終的にはマトリクスポリマーの発現を伴う成熟へと続く。各バイオフィルム段階での細菌は、浮遊状態で（planktonically）成長する同じ群のものとは顕著に異なる表現型を提示し、また顕著に異なる性質を有している〔非特許文献3〕。

【0004】

10

バイオフィルムは、ヒトにおける全身感染（例えば院内感染）の主な原因である。体内で、バイオフィルムは組織（例えば内耳、歯、歯茎、肺、心臓弁及び尿生殖路）と結びつく可能性がある。実際、ヒトにおける細菌感染のおよそ65%はバイオフィルムによるものである。さらに、バイオフィルムが形成された後、微生物は、時に劇的にその特性を変える傾向があり、このため、生物が付着しているか又は集塊状のバイオフィルム形態である場合、通常懸濁培養液中の生物を死滅させる抗生物質の用量では同じ微生物に対してほとんど効果がない（特許文献1）。

【0005】

身体に導入される製品（例えばコンタクトレンズ、中心静脈カテーテル、機械心臓弁及びペースメーカー）、又は身体に経路を与える製品に関する主な懸念事項の1つは、微生物感染及び不可避なバイオフィルムの形成である。これらの感染は抗生物質による治療が困難であるので、度々装置の取り外しを余儀なくされ、このことが患者への外傷となり、医療費が増大する。したがって、当該技術分野において、かかる医療機器に関して、これらの医療機器及び装置を抗菌性にする手段及び方法が念願となっている。

20

【0006】

特許文献2は既に存在しているバイオフィルムの形成を阻害するため又は既に存在しているバイオフィルムを分解するための抗アミロイド剤、例えば芳香族化合物の使用を開示している。この出願はアルツハイマー病におけるアミロイド線維形成を予防する化合物がバイオフィルム中の線維形成に対して作用することができることを開示しており、芳香族アーム（aromatic arm）を有するアミノ酸がバイオフィルムに効果的であると結論付けている。しかしながらこの分析は全長配列に限定されていた。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】米国特許第7189351号

【特許文献2】PCT出願国際公開第06/006172号

【特許文献3】PCT出願国際公開第2007/147098号

【特許文献4】米国特許第4,678,512号明細書

【特許文献5】米国特許第4,286,988号明細書

【特許文献6】米国特許第4,675,051号明細書

40

【特許文献7】米国特許第4,865,909号明細書

【特許文献8】米国特許第5,143,545号明細書

【特許文献9】米国特許第4,666,828号明細書

【特許文献10】米国特許第4,683,202号明細書

【特許文献11】米国特許第4,801,531号明細書

【特許文献12】米国特許第5,192,659号明細書

【特許文献13】米国特許第5,272,057号明細書

【特許文献14】米国特許第3,791,932号明細書

【特許文献15】米国特許第3,839,153号明細書

【特許文献16】米国特許第3,850,752号明細書

50

- 【特許文献 1 7】米国特許第 3, 8 5 0, 5 7 8 号明細書
- 【特許文献 1 8】米国特許第 3, 8 5 3, 9 8 7 号明細書
- 【特許文献 1 9】米国特許第 3, 8 6 7, 5 1 7 号明細書
- 【特許文献 2 0】米国特許第 3, 8 7 9, 2 6 2 号明細書
- 【特許文献 2 1】米国特許第 3, 9 0 1, 6 5 4 号明細書
- 【特許文献 2 2】米国特許第 3, 9 3 5, 0 7 4 号明細書
- 【特許文献 2 3】米国特許第 3, 9 8 4, 5 3 3 号明細書
- 【特許文献 2 4】米国特許第 3, 9 9 6, 3 4 5 号明細書
- 【特許文献 2 5】米国特許第 4, 0 3 4, 0 7 4 号明細書
- 【特許文献 2 6】米国特許第 4, 0 9 8, 8 7 6 号明細書 10
- 【特許文献 2 7】米国特許第 4, 8 7 9, 2 1 9 号明細書
- 【特許文献 2 8】米国特許第 5, 0 1 1, 7 7 1 号明細書
- 【特許文献 2 9】米国特許第 5, 2 8 1, 5 2 1 号明細書
- 【非特許文献】
- 【0 0 0 8】
- 【非特許文献 1】Hall-Stoodley et al., Nat Rev Microbiol. (2004) 2(2):95-108
- 【非特許文献 2】Sauer et al., J Bacteriol. (2002) 184(4):1140-54
- 【非特許文献 3】Sauer et al., J Bacteriol. (2004) 186(21):7312-26
- 【非特許文献 4】Sher et al.: Toxicon 45、865-879, 2005.
- 【非特許文献 5】Kristan K, Podlessek Z, Hojnik V, Gutierrez-Aguirre I, Guncar G, Turk D, Gonzalez-Manas JM, Lakey JH, Macek P, Anderluh G (2004): J Biol Chem. 279(45):46509-46517. 20
- 【非特許文献 6】Zabrocki et al., J. Am. Chem. Soc. 110:5875 5880 (1988) .
- 【非特許文献 7】Jones et al., Tetrahedron Lett. 29: 3853 3856 (1988)
- 【非特許文献 8】Kemp et al., J. Org. Chem. 50:5834 5838 (1985)
- 【非特許文献 9】Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:5081 5082 (1988)
- 【非特許文献 1 0】Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:5057 5060 (1988)
- 【非特許文献 1 1】Kemp et al., Tetrahedron Lett. 29:4935 4938 (1988)
- 【非特許文献 1 2】Kemp et al., J. Org. Chem. 54: 109 115 (1987)
- 【非特許文献 1 3】Nagai and Sato, Tetrahedron Lett. 26:647 650 (1985) 30
- 【非特許文献 1 4】Di Maio et al., J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1687 (1985)、
- 【非特許文献 1 5】Kahn et al., Tetrahedron Lett. 30:2317 (1989)
- 【非特許文献 1 6】Olson et al., J. Am. Chem. Soc. 112:323 333 (1990)
- 【非特許文献 1 7】Garvey et al., J. Org. Chem. 56:436 (1990)
- 【非特許文献 1 8】Miyake et al., J. Takeda Res. Labs 43:53 76 (1989)
- 【非特許文献 1 9】Kazmierski et al., J. Am. Chem. Soc. 113:2275 2283 (1991))
- 【非特許文献 2 0】Zechel et al., Int. J. Pep. Protein Res. 43 (1991))、
- 【非特許文献 2 1】Kazmierski and Hruby, Tetrahedron Lett. (1991)
- 【非特許文献 2 2】Garg and Jeanloz, Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 43, Academic Press (1985) 40
- 【非特許文献 2 3】Kunz, Ang. Chem. Int. Ed. English 26:294-308 (1987)
- 【非特許文献 2 4】Toth et al., Peptides: Chemistry, Structure and Biology, Rivier and Marshal, eds., ESCOM Publ., Leiden, 1078-1079 (1990)
- 【非特許文献 2 5】"Remington's Pharmaceutical Sciences" (Mack Publishing Co., Easton, PA)
- 【非特許文献 2 6】Fingl, E. et al. (1975), "The Pharmacological Basis of Therapeutics," Ch. 1, p.1
- 【非特許文献 2 7】"Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989)
- 【非特許文献 2 8】"Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel 50

, R. M., ed. (1994)

【非特許文献 2 9】Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989)

【非特許文献 3 0】Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988)

【非特許文献 3 1】Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York

【非特許文献 3 2】Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998)

【非特許文献 3 3】"Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994) 10

【非特許文献 3 4】"Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994)

【非特許文献 3 5】Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994)

【非特許文献 3 6】Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980)

【非特許文献 3 7】"Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984)

【非特許文献 3 8】"Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985) 20

【非特許文献 3 9】"Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., Eds. (1984)

【非特許文献 4 0】"Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986)

【非特許文献 4 1】"Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986)

【非特許文献 4 2】"A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984)

【非特許文献 4 3】"Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press, "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990)

【非特許文献 4 4】Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996) 30

【非特許文献 4 5】Fritzmman et al., 2007: Fritzmman, C, Lowenberg, J., Wintgens, T., and Melin, T. (2007) 最先端の逆浸透脱塩 (State-of-the-art of reverse osmosis desalination.) Desalination 216: 1-76)

【非特許文献 4 6】I D E レポート (<http://www.ide-tech.tech.com/>)

【非特許文献 4 7】Heydorn et al., 2002: Ersboll, B., Kato, J., Hentzer, M., Pars ek, M.R., Tolker-Nielsen, T. et al. (2002) (Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression.)

【非特許文献 4 8】Applied and Environmental Microbiology 68: 2008-2017 40

【非特許文献 4 9】Grynkiewicz et al., 1985: Grynkiewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) 蛍光性が大きく改善した新世代の Ca^{2+} インディケータ (A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties) Journal of Biological Chemistry 260: 3440-3450;

【非特許文献 5 0】Neu et al., 2002、Neu, T.R., Kuhlicke, U., and Lawrence, J.R. (2002) : Assessment of Fluorochromes for Two-Photon Laser Scanning Microscopy of Biofilms., Applied and Environmental Microbiology 68: 901-909 .

【発明の概要】

【0009】

本発明は広範な微生物において初期段階でバイオフィルム形成を妨げる広範囲にわたる 50

天然因子を提供する。これらの天然因子から、高度保存配列を有するペプチドが単離され、その合成立体配座 (synthetic conformation) で微生物の接着の予防において高い活性を示した。保存配列が様々な既知の種のイソギンチャク、幾つかの魚類 (ダニオ・レリオ (Danio rerio)、すなわちゼブラフィッシュを含む) を含む幾つかの海洋生物、及びヒメツリガネゴケ (Physcomitrella patens subsp. Patens.) で見られている。

【 0 0 1 0 】

上述の因子は全て細菌の基体 (substrate) 接着及びそれに派生したバイオフィーム形成の予防にのみ関する活性を示す。上述の因子は抗生ペプチド及び二次代謝産物により明らかになる、一般的に観察される致死的な殺菌活性を欠いており、このことにより強力な微生物「繁殖能 (biotic potential)」による迅速な自然選択に関する強い選択圧がもたらされる。一方で、細菌定着の広範な阻害が細菌生存の基本的機構を損なわせる。したがってその生存率からかかる機構の適応変更の見込みは低い。

10

【 0 0 1 1 】

非特許文献 4 は、バイオインフォマティクスアプローチを用いて、そのアロモン系 (alomonal system) の構成要素となり得るヒドラにより発現された推定の生物学的に活性があるタンパク質及びポリペプチドを同定した。ヒドラはアクチノポリンファミリーに属する刺胞動物ホスホリパーゼ A 2 毒素及び細胞溶解素のオーソログを発現し、かつコブラ科動物様ホスホリパーゼ、高システイン分泌タンパク質 (C R I S P)、プロキネチシン (prokineticin) 様ポリペプチド及び毒性デオキシリボヌクレアーゼに類似したタンパク質を発現することが示されてきた。

20

【 0 0 1 2 】

天然源から単離されたペプチドにおける細胞毒性の活性に関与する特定の配列はこれまでに同定されていない。

本発明の一態様によれば、Y D Y N W Y (配列番号 1)、Y D Y N L Y (配列番号 2)、F D Y N F Y (配列番号 3)、F D Y N L Y (配列番号 4)、W D Y N L Y (配列番号 8)、F D Y N W Y (配列番号 5)、Y D W N L Y (配列番号 6)、及び Y D W H L Y (配列番号 7) からなる群から選択されるいずれか一種の配列からなることを特徴とするペプチドが得られる。

【 0 0 1 3 】

他に規定のない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の通常の技術を有する者 (当業者) により一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書で記載のものと同様又は同等の方法及び材料を本発明の実施又は試験に使用することができるが、好適な方法及び材料を以下で説明する。抵触の場合には、定義を含む本特許明細書により抵触の調整が行われる。さらに、材料、方法及び実施例は例示的なものにすぎず、限定を意図しない。

30

【 0 0 1 4 】

本明細書中で使用される、「含む ("comprising" and "including") 」という用語又はその文法的変化形は、決まった特徴、整数値、工程又は構成要素を明記するものとされるが、1つ又は複数のさらなる特徴、整数値、工程、構成要素又はそれらの群の付加を排除するものではない。この用語は、「からなる (consisting of) 」及び「から本質的になる」という用語を包含する。

40

【 0 0 1 5 】

本明細書中で使用される場合、「から本質的になる」という語句又はその文法的変化形は、決まった特徴、整数値、工程又は構成要素を明記するものとされるが、1つ又は複数のさらなる特徴、整数値、工程、構成要素又はそれらの群が、特許請求される組成物、装置又は方法の基礎となる新規の特性を大きく変えない場合に限れば、このさらなる特徴、整数値、工程、構成要素又はそれらの群の付加を排除するものではない。

【 0 0 1 6 】

「方法」という用語は、与えられた仕事を達成するための様式、手段、技法及び手法を表し、化学的、生物学的及び生物物理的分野の実践者にとって既知の、又は化学的、生物

50

学的及び生物物理的分野の実践者によって知られる様式、手段、技法及び手法から容易に開発される様式、手段、技法及び手法を含むが、これらに限定されない。

【0017】

本明細書中で使用される「約」という用語は $\pm 10\%$ を表す。

【0018】

本発明の他の特徴及び利点は以下の詳細な説明及び特許請求の範囲から明らかであろう。

【0019】

本発明は、添付の図面を参照して、ほんの一例として本明細書中で説明される。これより、特に図面を詳細に参照するが、示される詳細は、一例であり、本発明の好ましい実施形態の例示的な考察を目的とするものにすぎず、本発明の原理及び概念的側面の最も有用でかつ容易に理解される説明であると考えられるものを提供するために提示されることを強調する。このため、本発明の根本的理解に必要とされる以上に詳細には示していないが、本発明の構造細部、すなわち図面に伴う記述により本発明の幾つかの形態を実際に具現することができる方法が当業者に明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】水溶性状態の孔形成細胞溶解素スチコリシン (sticholysin) I i の1GWYのA鎖の結晶構造を示す図である。活性領域を黄色で示す。

【図2】水溶性状態の孔形成細胞溶解素スチコリシン I i の1GWYのB鎖の結晶構造を示す図である。活性領域を黄色で示す。

【図3】真核性の孔形成細胞溶解素イクイナトキシン (equinatoxin) I i の1KD6のA鎖の構造を示す図である。活性領域を黄色で示す。

【図4】イクイナトキシン突然変異体の三次元構築物を示す図である。活性領域を黄色で示す。

【図5】24時間にわたる緑膿菌 (Pseudomonas aeruginosa) ATCC 27853の成長に対する様々な濃度の合成タンパク質の効果を示す棒グラフである。殺菌効果又は静菌効果はない。

【図6】24時間にわたる緑膿菌 ATCC 27853 によるバイオフィルム形成に対する様々な濃度の合成タンパク質の効果を示す棒グラフである。

【図7】24時間にわたるアシネトバクター・バウマンニ (Acinetobacter Baumannii) の臨床分離株の成長に対する様々な濃度の合成タンパク質の効果を示す棒グラフである。殺菌効果又は静菌効果はない。

【図8】24時間にわたるアシネトバクター・バウマンニの臨床分離株によるバイオフィルム形成に対する様々な濃度の合成タンパク質の効果を示す棒グラフである。

【図9】アシネトバクター・バウマンニによるバイオフィルム形成に対するウメボシソギンチャク (Actinia equina) 由来の選択された触手画分の効果を示す棒グラフである。陽性対照としてPBSを用いる。

【図10】様々なグラム陽性細菌及びグラム陰性細菌によるバイオフィルム形成に対する画分13の効果を示す棒グラフである。

【図11】 $50\mu\text{g/ml}$ のタンパク質濃度で緑膿菌に対するアネモニア (Anemonia)、アイプタシア (Aiptasia) 及びフィスコミトレラ (Physcomitrella) (コケ) 由来の粗抽出物の効果を示す棒グラフである。

【図12】5つの合成ペプチドと、フィスコミトレラ・パテンス (Physcomitrella patens) のコケ由来の粗物質との効果を示す棒グラフである。

【図13】Sephadex G-10カラム上でのアイプタシア・プルチェラ (Aiptasia pulchella) の粗抽出物の分離により得られた画分を示す図である。

【図14】図13の高分子量画分の再クロマトグラフィで得られたピークを示す図である。

【図15】図14の低分子量画分のc-18カラムによる逆相高速液体クロマトグラフィ

10

20

30

40

50

(R P - H P L C) 分離で得られた画分を示す図である。

【図 1 6 A】本発明の原理に従ってペプチドの乳化アーム (emulsifier arm) を有する環状リード (lead) の一般構造を示す図である。

【図 1 6 B】本発明の原理に従ってペプチドの乳化アームを有する環状リードの一般構造を示す図である。

【図 1 7】乳化アーム (emulsifying arm) を有する環状ペプチドリードの展開を示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 1 】

本発明は細菌の基体接着及びそれに派生したバイオフィルム形成の予防、及びまた任意で細胞間接着の予防に関連する効果を 1 つ又は複数有する単離ペプチドを含む組成物に関する。任意で、付加的に又は代替的に他の効果がもたらされてもよい。非限定的な例として、ペプチドは任意で好ましくは、水生生物及びコケ等の生物から抽出された、Y D Y N W Y (配列番号 1)、Y D Y N L Y (配列番号 2)、F D Y N F Y (配列番号 3)、F D Y N L Y (配列番号 4)、F D Y N W Y (配列番号 5)、Y D W N L Y (配列番号 6)、Y D W H L Y (配列番号 7)、及び W D Y N L Y (配列番号 8) からなる群から選択される配列、並びにこのペプチドを使用する方法を含み得る。他の配列を以下に記載する。

【 0 0 2 2 】

医学における主な懸念事項の 1 つが微生物バイオフィルムの形成である。ヒトにおいて、バイオフィルムは全身感染 (例えば院内感染) の原因であり、製品 (例えばコンタクトレンズ、中心静脈カテーテル、機械心臓弁及びペースメーカー) を身体に導入する際の主な懸念事項である。

【 0 0 2 3 】

またバイオフィルムは、食品産業、医薬産業、塗装産業、水道産業、海運業及びエンジニアリング産業を含む多くの産業において、広範な負の効果の中でも、産業システムにおける腐食の促進、油の酸性化 (souring) 及び生物汚損 (biofouling) を引き起こすという問題がある。例えば、廃水システム及び脱塩システムで用いられるような、冷却設備又は脱塩設備、洗浄及び電源ステーション、並びにメンブレンにおける冷却塔、水管及びフィルターを含む海水環境又は淡水環境での生物の任意の表面への接着により、生物汚損が引き起こされる可能性がある。養魚場における養殖システム中でも生物汚損が生じる。

【 0 0 2 4 】

さらに世界の商船群は 1 年におよそ 3 億トンの燃料を消費する。汚損防止手段なしでは、この燃料消費は 1 年で 4 0 % も増大し、これはさらなる 1 億 2 0 0 0 万トンの燃料に相当する。この経済コストは 2 0 0 0 年には約 7 5 億ドルと推定されたが、より最近の推定では 3 0 0 億ドルである。

【 0 0 2 5 】

バイオフィルムは、その中で成長する微生物が高度に組織化され、高温及び抗菌剤 (例えば抗生物質) 等の厳しい環境に耐えることができるので、取り除くことが非常に困難である。

【 0 0 2 6 】

軟体の水生 (water) 無脊椎動物、魚類及びコケを含む海水及び淡水の植物及び生物は広範囲にわたる種の微生物に囲まれている。かかる植物及び生物は特定の免疫を欠いているので、身体表面上での微生物定着を予防することができる幾つかの因子を産生する。

【 0 0 2 7 】

最も「感受性の高い」生物はイソギンチャク、サンゴ、クラゲ、ヒドロ虫、メズサ及びウミウチワ (sea fans) を含む刺胞動物門 (phylum cnidaria) に属する無脊椎動物である。鱗又は貝等の物理的保護を欠くかかる軟体生物は、それらを取り巻く微生物環境から軟体生物自体を保護するためにタンパク質及び二次代謝産物を使用する。

【 0 0 2 8 】

海洋生物 (例えば海綿動物) が抗菌及び抗真菌の活性を示す二次代謝産物を産生するこ

10

20

30

40

50

とがこれまでに報告されている [Amade et al., 同上]。さらに、イソギンチャク (例えばウメボシイソギンチャク) は、他の抗菌小ペプチドと同様に、真核細胞を溶解及び死滅させる毒性のある孔形成ペプチド (すなわちイクイナトキシン) を産生することが分かっている [Anderluh et al., 同上]。

【0029】

様々なタンパク質の全長配列が細胞溶解機能に関連していることが当該技術分野において知られているが、細胞溶解効果に関与する特定のペプチドはこれまでに同定されていない。

【0030】

本発明者らは液体クロマトグラフィ分離を用いてイソギンチャクから得られた幾つかの活性画分が微生物の非生物表面への接着の高レベルの防止を示すことを明らかにしている。イソギンチャクは世界中の水源で見ることのできる46ファミリーを含む。ほとんどのイソギンチャクは固着性であり、軟質の基体に固定するか、又は岩礁及びサンゴに自身を接着させるのに用いられる特殊な足を有する。様々な属に属する数種のイソギンチャク: ウメボシイソギンチャク (*Actina equine*)、アイプタシア及びアネモニアを用いて接着防止活性を明らかにした。イソギンチャク (*anemone*) 細胞毒素のN末端領域が細胞毒性効果に関わっていることが分かっている [非特許文献5の「真核性の孔形成毒素であるイクイナトキシンによる孔形成にはフレキシブルなN末端領域と安定した サンドイッチが必要である」を参照されたい]。イソギンチャク細胞毒素のC末端領域 (この領域は細胞毒性に関わっていない) と幾らかの類似性を有するタンパク質は本発明者らにより魚類でも同定されている。このタンパク質は高Trpドメインでもある機能が未知の高度に保存された領域を有し、タンパク質の脂質膜への結合に重要であり得る。また本発明者らはコケ、フィスコミトレラ・パテンスでこの領域を発見している。

【0031】

したがって本発明者らは、この領域が細胞毒性の活性を欠きながらもバイオフィルム形成の予防に非常に効果的なペプチドを提供すると仮定している。本発明者らは、非常に効果的なバイオフィルム形成防止特性を有する、Y D Y N W Y (配列番号1)、Y D Y N L Y (配列番号2)、F D Y N F Y (配列番号3)、F D Y N L Y (配列番号4)、W D Y N L Y (配列番号8)、F D Y N W Y (配列番号5)、Y D W N L Y (配列番号6)、及びY D W H L Y (配列番号7) からなる群から選択される配列を含む天然ペプチドを特徴付けて、単離している。

【0032】

幾つかの実施形態によれば、ペプチドは最大約30個、最大約40個、又は最大約50個のアミノ酸を含む配列部分を含む。

【0033】

幾つかの実施形態によれば、ペプチドはL F S V P Y D Y N W Y S N W W (配列番号9)、F S V P Y D Y N L Y S N W W (配列番号10)、M F S V P F D Y N F Y S N W W (配列番号11)、M F S V P F D Y N L Y S N W W (配列番号12)、M F S V P F D Y N L Y T N W W (配列番号13)、M W S V P F D Y N L Y S N W W (配列番号14)、M F S V P W D Y N L Y K N W F (配列番号15)、M F S V P F D Y N L Y K N W L (配列番号16)、M F S V P F F D Y N W Y S N W W (配列番号17)、L F S V P F D Y N L Y S N W W (配列番号18)、L F S V P Y D Y N W Y S N W W (配列番号9)、M A S I P Y D W N L Y Q S W A (配列番号19)、M A S I P Y D W N L Y S A W A (配列番号20) 及び M A S I P Y D W H L Y N A W A (配列番号21) からなる群から選択される。本明細書中の以下で及び続く実施例の項に示されるように、本発明者らはタンデム質量スペクトル (MS/MS) 分析を用いて、アイプタシア・プルチェラ、イソギンチャクから抽出した活性画分を同定している。

【0034】

本発明者らは、幾つかのイソギンチャク細胞毒素タンパク質の生物学的に重要な複数の配列アラインメントを同定し、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で使用するイソギンチャ

10

20

30

40

50

ク細胞毒素ユニバーサルプライマーを同定するのに *clustalW* プログラムを使用した。2種の異なるイソギンチャク、アイプタシア及びアネモニア・ピリダンスから細胞毒素タンパク質の250bp領域、それぞれ配列 *Eq t - F : G T R T C G A C A A C G A G T C R G G* (配列番号22) 及び *Eq t - R 2 5 2 : T G A C A T Y C C A C C A G T T G C T G* (配列番号23) の増幅を達成した。これらの領域のペプチドへの翻訳及び *gene bank* との *BLAST X* 比較により、これらの領域がイソギンチャク細胞毒素の保存ドメインの部分であることが示された。以下の実施例の項により詳細に述べられ、図5～図8に示されるように、本発明者らは、イソギンチャク及びコケ由来の多くの合成ペプチドの活性を比較し、これらのペプチドがバイオフィルムの形成を予防するが[図6及び図8～図12]、細菌を死滅させない、又は細菌の成長を阻害しないことを見出した[図5及び図7]。

10

【0035】

接着防止効果が幾つかの細菌種で明らかになり(図10)、このことにより本発明者らは活性物質が種特異的ではなく、広範な微生物種に対して活性であると結論付けた。

【0036】

保存ペプチド領域を例えば以下の天然タンパク質で同定している：

L F S V P Y D Y N W Y S N W W (配列番号24) *Eq T - I V*
F S V P Y D Y N L Y S N W W (配列番号25) アクチノポリン *O r - A*
M F S V P F D Y N F Y S N W W (配列番号26) センジュイソギンチャク (*Heteractis magnifica*) 由来の *H M g I I I*
M F S V P F D Y N L Y S N W W (配列番号27) *A v t - I R T X - A*
M F S V P F D Y N L Y T N W W (配列番号28) *P s t x 2 0*
M W S V P F D Y N L Y S N W W (配列番号29) フィスコミトレラ・パテンス
M F S V P W D Y N L Y K N W F (配列番号30) ダニオ・レリオ
M F S V P F D Y N L Y K N W L (配列番号31) ミドリフグ (*Tetraodon nigroviridis*)

20

【0037】

任意で好ましくは、本発明のペプチドは配列 *C M F S V P F D Y N W Y S N W W C* を含む。任意で好ましくは、本発明のペプチドは約100個～約300個のアミノ酸を有するタンパク質の中に含まれる。

30

【0038】

単一の仮説に限定されることを望まないが、図1～図4に示されるように2つのイソギンチャク細胞毒素(イクイナトキシン及びスチコリシン)の三次元構造に基づく、活性領域は外に向いている。

【0039】

図1及び図2はそれぞれ、細胞溶解素スチコリシン *I i* の1GWYのA鎖及びB鎖の結晶構造を示す。図3は真核性の孔形成細胞溶解素イクイナトキシン *I i* の1KD6のA鎖の構造を示す。

【0040】

図4は3つのシステインが8位、18位及び69位に導入されたイクイナトキシン突然変異体の三次元構築物(1TZQのA鎖)を示す。この突然変異体はこれまでに溶血活性がないことが示されている(非特許文献5には、イクイナトキシンに関し、真核性の孔形成毒素による孔形成にはフレキシブルなN末端領域と安定した サンドイッチが必要であることが示されている。このためタンパク質はその細胞毒性を喪失しているが、細菌接着に対しては活性のままであった。

40

【0041】

本発明の原理及び操作は図面及びそれに付随する説明を参照してより良好に理解することができる。

【0042】

より詳細に本発明の少なくとも1つの実施形態を説明する前に、本発明がその適用にお

50

いて、以下の記載で説明された又は実施例で例示された詳細に限定されないことを理解されたい。本発明は他の実施形態であってもよく、又は様々な方法で実践若しくは実施することができる。また、本明細書で用いられる語句 (phraseology) 及び用語 (terminology) は説明目的のものであり、限定するものとはみなされないことを理解されたい。

【 0 0 4 3 】

本発明の一態様によれば、単離された天然ペプチドを含む組成物であって、該ペプチドが Y D Y N W Y (配列番号 1)、Y D Y N L Y (配列番号 2)、F D Y N F Y (配列番号 3)、F D Y N L Y (配列番号 4)、W D Y N L Y (配列番号 8)、F D Y N W Y (配列番号 5)、Y D W N L Y (配列番号 6)、及び Y D W H L Y (配列番号 7) からなる群から選択される配列を含む、組成物が提供される。

10

【 0 0 4 4 】

本発明のさらなる態様によれば、単細胞生物の表面への接着を予防する方法であって、Y D Y N W Y (配列番号 1)、Y D Y N L Y (配列番号 2)、F D Y N F Y (配列番号 3)、F D Y N L Y (配列番号 4)、W D Y N L Y (配列番号 8)、F D Y N W Y (配列番号 5)、Y D W N L Y (配列番号 6)、及び Y D W H L Y (配列番号 7) からなる群から選択される配列を含む単離された天然ペプチドを含む組成物に細胞を接触させることを含み、それにより表面への細胞の接着を予防する、方法が提供される。

【 0 0 4 5 】

本発明の幾つかの実施形態によれば、上記ペプチドを少なくとも 1 つ含み、表面への細胞の接着に対して効果的なドメインが提供されるのが好ましい。より好ましくは、該ドメインはタンパク質の部分として含まれる。任意で最も好ましくは、該ドメインは例えばバイオフィルムの形成の予防及び/又はバイオフィルムの処理に関して接着防止挙動を示すが、細胞毒性挙動は示さない。

20

【 0 0 4 6 】

例示的なドメインの非限定的な選択を以下の表で与える。

【 0 0 4 7 】

【表 1】

配列番号	ドメイン配列	種
24	LFSVPYDYNWYSNWW	EqT-IV
25	FSVPYDYNLYSNWW	アクチノポリン Or-A
26	MFSVPFDYNFYSNWW	センジュイソギンチャク由来のHMg III
27	MFSVPFDYNLYSNWW	Avt-I RTX-A
28	MFSVPFDYNLYTNWW	Pstx20
29	MWSVPFDYNLYSNWW	フィスコミトレラ・パテンス
30	MFSVPWDYNLYKNWF	ダニオ・レリオ
31	MFSVPFDYNLYKNWL	ミドリフグ

30

【 0 0 4 8 】

以下の配列に関するようなさらなる例示的な配列を本明細書に記載する：

MSRLIIIVFIVVTMICSATALPSKKIIDEDEEDEDEKRSADVA
GAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKKRIAVGV DNE S GKTW
TALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGPVATG
AVGVLAYLMSDGNTLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIYK GK
RRADQRMYYEELYYNLS PFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMN
SSGHAILEIHVSKA (配列番号 33)

【 0 0 4 9 】

この配列は GenBank アクセッション識別子：

> gi | 48428895 | sp | P61914.1 | ACTP2__ACTEQ イクイ

50

ナトキシン - 2 前駆体 (イクイナトキシン I I) (E q T I I) (E q T I I) ウメボシイソギンチャクを有し、2 1 4 アミノ酸長である。この配列は任意で、本発明による例示的な配列でもある。この配列の 3 8 位 ~ 2 1 3 位は注釈ドメイン p f a m 0 6 3 6 9、A n e m o n e _ c y t o t o x、イソギンチャク細胞毒性タンパク質をヒットし、そのため上記配列のこの部分は任意で本発明による例示的な配列でもある。

【 0 0 5 0 】

幾つかの実施形態において、本発明は上記のその配列に対する任意の関連配列も含む。かかる関連配列は任意の種類の配列比較ソフトウェア (B L A S T P を含むがこれに限定されない) を実行することにより任意に見出すことができる。以下に、選択された分類群で代表的なヒット及び E q t I I (上記配列) に対するそれらのアラインメントを与える。

10

【 0 0 5 1 】

1 . イソギンチャク

1 a . カリブイソギンチャク (Stichodactyla helianthus)

> g i | 2 8 1 5 4 9 6 | s p | P 0 7 8 4 5 . 2 | A C T P 2 _ S T O H E スチコリシン - 2 (スチコリシン I I) (S t n I I) (細胞溶解素 S t I I) (細胞溶解素 I I I) (細胞毒素)

A L A G T I I A G A S L T F Q V L D K V L E E L G K V S R K I A V G I D N E S G
G T W T A L N A Y F R S G T T D V I L P E F V P N T K A L L Y S G R K D T G P V
A T G A V A A F A Y Y M S S G N T L G V M F S V P F D Y N W Y S N W W D V K I Y
S G K R R A D Q G M Y E D L Y Y G N P Y

20

R G D N G W H E K N L G Y G L R M K G I M T S A G E A K M Q I K I S R (配列番号 3 4)

アラインメント:

> s p | P 0 7 8 4 5 . 2 | A C T P 2 _ S T O H E スチコリシン - 2 (スチコリシン I I) (S t n I I) (細胞溶解素 S t I I) (細胞溶解素 I I I) (細胞毒素)

長さ = 1 7 5

スコア = 2 5 3 ビット (6 4 6)、期待値 = 8 e - 6 6、方法: 組成物ベースの統計。

同一性 = 1 1 8 / 1 7 6 (6 7 %)、陽性 = 1 4 4 / 1 7 6 (8 1 %)、ギャップ = 1 / 1 7 6 (0 %)

30

【 0 0 5 2 】

【表 2】

Query	38	DVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKKRIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDIVLP	97
		+AG +I GASL+F +L VLE LG V RKIAVG+DNESG TWTALN YFRSGT+D++LP	
Sbjct	1	ALAGTTIAGASLTFQVLDKVLLEELGKVSRIKIAVGIDNESGGTWTALNAYFRSGTTDVILP	60

Query	98	HKVPHGKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSDGNLAVLFSVPYDYNWYSNWWNVRIY	157
		VP+ KALLY+G+KD GPVATGAV AY MS GNLT V+FSVP+DYNWYSNWW+V+IY	
Sbjct	61	EFVPNTKALLYSGRKDTGPVATGAVAAFAIYMSGNTLGVMFSPFPDYNWYSNWWDVKIY	120

40

Query	158	KGKRRADQRMYEELYNLSPFRGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK	213 (配列番号 3 5)
		GKRRADQ MYE+LYY +P+RGDNGWH +NLGYGL+ +G M S+G A ++I +S+	
Sbjct	121	SGKRRADQGMIEDLYYG-NPYRGDNGWHEKNLGYGLRMKGIMTSAGEAKMQIKISR	175 (配列番号 3 4)

【 0 0 5 3 】

2 . 硬骨魚

2 a . ダニオ・レリオ

> g i | 1 2 5 8 2 1 2 1 2 | r e f | X P _ 0 0 1 3 4 2 6 5 0 . 1 | 予測: 仮想タンパク質 [ダニオ・レリオ]

M T E S A E A V A A N V S S R R H A T V E I T N L T N N Y C F L N P K V Y L E N

50

GETSNPPQPTVRPLKTEVCTFSKSAAHATGSVGVLT YDLF
 ERRRNDYTETLAIMFSVPWDYNLYKNWF AVGIYPKGKECD
 QALYKEMY YQKNQHGFVREEANGSGINFEGKNLDIRATMC
 PMGRAIVKVEVWDKLLSPMAQMDC (配列番号36)

アラインメント:

> ref | XP_001342650.1 | UniGene infoGene info
 予測: 仮想タンパク質 [ダニオ・レリオ]

長さ = 184

遺伝子番号: 100002992 apn1 | アクチノポリン様タンパク質 [ダニオ・レリオ]

スコア = 199ビット (505)、期待値 = $1e-49$ 、方法: 組成物ベースの統計。

同一性 = 49 / 167 (29%)、陽性 = 73 / 167 (43%)、ギャップ = 12 / 167 (7%)

【0054】

【表3】

Query 58 LEALGNVKKRIAGVDNESG-KTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP 116
 + A + +R V + N + + Y +G + V K + K

Sbjct 8 VAANVSSRRHATVEITNLTNNYCFLNPKVYLENGETSNPPQPTVRPLKTEVCTFSKSAAH 67

Query 117 VATGAVGVLAYLMSD-----GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWNVRIYKGRRADQRM YEE 170
 ATG+VGVL Y + + TLA++FSVP+DYN Y NW+ V IY + DQ +Y+E

Sbjct 68 -ATGSVGVLT YDLFERRRNDYTETLAIMFSVPWDYNLYKNWF AVGIYPKGKECDQALYKE 126

Query 171 LYYNLSPF----RGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSCHAILEIHVSK 213 (配列番号37)
 +YY + NG G L R M G AI+++ V

Sbjct 127 MYYQKNQHGFVREEANGSGINFEGKNLDIRATMCPMGRAIVKVEVWD 173 (配列番号38)

【0055】

2b. ミドリフグ

> gi | 47218822 | emb | CAG02807.1 | 無名タンパク質産物 [ミドリフグ]

MESAEAVAADVSRSRSVTIEISNLTKNYCLINPRVYLESG
 ETYNPPQPTVRPLMTEVCTFSKSSGIPTGSVGVLT YELLE
 RRSTMLPETLAIMFSVPYDYSFYNNWF AVGIYETGT KCNE
 GLYKQMYNEKKQAEHGFVREKANGSGINYVGGNLDIRATM
 NPLGKAIMKVEVWDAFFPFSE (配列番号39)

アラインメント:

> emb | CAG02807.1 | 無名タンパク質産物 [ミドリフグ]

長さ = 181

スコア = 192ビット (489)、期待値 = $1e-47$ 、方法: 組成物ベースの統計。

同一性 = 46 / 170 (27%)、陽性 = 76 / 170 (44%)、ギャップ = 14 / 170 (8%)

【0056】

10

20

30

40

【表 4】

```

Query 58 LEALGNVKKIAVGVDNES-GKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP 116
          + A + R + + + N +          Y SG +          V          + K G
Sbjct 7  VAADVSRSRSVTIEISNLTKNYCLINPRVYLESGETYNPPQPTVRPLMTEVCTFSKSSG- 65

Query 117 VATGAVGVLAYLMSD-----GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWNVRIYKGRRADQRMYYE 170
          + TG+VGVL Y + +          TLA++FSVPYDY++Y+NW+ V IY+  + ++ +Y++
Sbjct 66 IPTGSGVGLTYELLERRSTMLPETLAIMFSVPYDYSFYNNWFAVGYYETGTCNEGLYKQ 125

Query 171 LYYNLSPF-----RGDNGWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA 214 (配列番号40)
          +Y          NG          +G L R MN G AI+++ V A
Sbjct 126 MYNEKKQAEHGFVREKANGSGINYGGNLDIRATMNPLGKAIMKVEVWDA 175 (配列番号41)

```

10

【0057】

3. コケ

3a. フィスコミトレラ・パテンス

> g i | 1 6 8 0 6 0 2 3 7 | r e f | X P _ 0 0 1 7 8 2 1 0 4 . 1 | 予測タンパク質
[ヒメツリガネゴケ]

```

M V V H L I A M G L R Y S E T I M K T A R M A E A I I P A A E L S I K T L Q N I
V E G I T G V D R K I A I G F K N L T D Y T L E N L G V Y F N S G S S D R S I A
Y K I N A Q E A L L F S A R K S D H T A R G T V G T F S Y Y I Q D E D K T V H V
M W S V P F D Y N L Y S N W W N I A V V D G R Q P P D S N V H D N L Y N G S G G
M P Y P N K P D Q Y I N N E Q K G F H L F G S M T N N G Q A T I E V E L K K A (
配列番号42)

```

20

> r e f | X P _ 0 0 1 7 8 2 1 0 4 . 1 | G e n e i n f o 予測タンパク質 [ヒメ
ツリガネゴケ]

g b | E D Q 5 3 0 9 8 . 1 | G e n e i n f o 予測タンパク質 [ヒメツリガネゴケ]
]

長さ = 199

遺伝子番号 : 5 9 4 5 2 9 2 P H Y P A D R A F T _ 6 1 0 9 4 | 仮想タンパク質 [ヒ
メツリガネゴケ]

30

スコア = 230ビット(586)、期待値 = 7e-59、方法 : 組成物ベースの統計。

同一性 = 63 / 183 (34%)、陽性 = 101 / 183 (55%)、ギャップ = 4 / 183 (2%)

【0058】

【表 5】

Query 35 RSADVAGAVIDGASLSFDILKTVLEALGNVKKRIAVGVDNESGKTWTALNTYFRSGTSDI 94
 ++A +A A+I A LS L+ ++E + V RKIA+G N + T L YF SG+SD
 Sbjct 18 KTARMAEAIIPAAELSIKTLQNIIVEGITGVDRKIAIGFKNLTDYTLLENLGVYFNSGSSDR 77

Query 95 VLPHKVPHGKALLYNGQKDRGPVATGAVGVLAYLMSD-GNTLAVLFSVPYDYNWYSNWN 153
 + +K+ +ALL++ +K A G VG +Y + D T+ V++SVP+DYN YSNWN
 Sbjct 78 SIAYKINAQEALLFSARKSDH-TARGETVGTFSYIYQDEDKTVHVMWSVFPDYNLYSNWN 136

Query 154 VRIYKGRRADQRMYEELYYNL--SPFRGDNQWHTRNLYGLKSRGFMNSSGHAILEIHV 211
 + + G++ D +++ LY P+ + N G G M ++G A +E+ +
 Sbjct 137 IAVVDGRQPPDSNVHDNLYNGSGGMPYPNKPQYINNEQKGFHLFGSMTNNGQATIEVEL 196

Query 212 SKA 214 (配列番号 4 3)
 KA
 Sbjct 197 KKA 199 (配列番号 4 4)

10

【 0 0 5 9 】

4 . 鳥類

4 a . ニワトリ (Gallus gallus)

> g i | 1 1 8 1 2 9 7 2 6 | r e f | X P _ 0 0 1 2 3 1 8 3 9 . 1 | 予測 : 仮想タン
 パク質アイソフォーム 1 [ニワトリ]

20

M P P K E K K E N D K P C N D N C Q P K P Q G K G V E S L M K N I D V C R S V G
 L E I I N R T R T V T L T D F R S Y C F S G K I V T T L P F E I G P D S K G I C
 I F A K T P Y S L R G S V G T V V C K A D T F F L A I T F S N P Y D Y I L Y K I
 E F A L E I F T E P N H L G N L G D V F S K M M K S K P Y C G S S L F Q R A V L
 E S E H E T L E V S K G S I R V Q A K M S N N R K A I L K V Q V E D M D P P P Y
 S K G M (配列番号 4 5)

> r e f | X P _ 0 0 1 2 3 1 8 3 9 . 1 | U n i G e n e i n f o G e n e i n f
 o 予測 : 仮想タンパク質アイソフォーム 1 [ニワトリ]

長さ = 2 0 4

30

遺伝子番号 : 7 6 9 7 2 9 L O C 7 6 9 7 2 9 | 仮想タンパク質 L O C 7 6 9 7 2 9 [
 ニワトリ]

スコア = 1 5 0 ビット (3 7 8) 、期待値 = 9 e - 3 5 、方法 : 組成物ベースの統計。

同一性 = 3 3 / 1 7 2 (1 9 %) 、陽性 = 6 3 / 1 7 2 (3 6 %) 、ギャップ = 2 2 / 1
 7 2 (1 2 %)

【 0 0 6 0 】

【表 6】

Query 58 LEALGNVKKRIAVGVDNES-GKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVPHGKALLYNGQKDRGP 116
 L +V R + + + N + T T +Y SG LP ++ + K
 Sbjct 29 LMKNIDVCRSVGLEIINRTRTVILTDFRSYCFSGKIVTTLPFEIGPDSKIGICIFAKTP-Y 87

Query 117 VATGAVGVLAYLMSDGNLAVLFSVPYDYNWYSNWNVRIYKGRRADQ-----RMYEEL 171
 G+VG + +D LA+ FS PYDY Y + + I+ + ++ ++
 Sbjct 88 SLRGSVGTVVCK-ADTFFLAITFSNPYDYIILYKIEFALEIF---TEPNHLGNLGDVFSKM 143

Query 172 YYNLSPFRG-----DNGWHTRNLYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSK 213 (配列番号 3 7)
 P+ G ++ + M+++ AIL++ V
 Sbjct 144 MK-SKPYCGSSSLFQRAVLESEHETLEVSKGSIRVQAKMSNNRKAILKVQVED 194 (配列番号 4 6)

40

【 0 0 6 1 】

5 . プラティパス (Platypus)

50

5 a . カモノハシ (Ornithorhynchus anatinus)
 > g i | 1 4 9 4 9 1 2 4 1 | r e f | X P _ 0 0 1 5 1 6 9 0 6 . 1 | 予測：仮想タン
 パク質 [カモノハシ]

MAQTIEHLVHEVEAGRCVGIETNTNTNMTFRSPRTFCFSG
 HTLTPTPTPIIHPNNAGFCIFVKRKFSLRGSVGLLVYEIED
 QTLAIMFSNPF DYNFFKVEFAVALSGYKEETQDLKAFFEL
 LYHEKQKGWLKMAKEKLCCEQCQCPVSLNNGIRVTATMSNN
 AKAI IKLSSSPDAKPPEGDVADVQPTTVRRPNPPFPSPRP
 RIGSDLTG DQLATLDFESGK (配列番号 47)

> r e f | X P _ 0 0 1 5 1 6 9 0 6 . 1 | G e n e i n f o 予測：仮想タンパク質
 [カモノハシ]

長さ = 220

遺伝子番号：100086848 LOC100086848 | 仮想タンパク質 LOC
 100086848 [カモノハシ]

スコア = 168ビット (426)、期待値 = $2e-40$ 、方法：組成物ベースの統計。
 同一性 = 36 / 167 (21%)、陽性 = 69 / 167 (41%)、ギャップ = 12 / 1
 67 (7%)

【0062】

【表7】

Query	58	LEALGNVKKIAVGV DNE SGKTWTALNTYFRSGTSDIVLPHKVP H GKALLYNGQKDRGPV	117
		L R + + + N + T + + T + SG + + A K R	
Sbjct	8	LVHEVEAGRCVGIETNTNTNMTFRSPRTFCFSGHTLTPTPTPIIHPNNAGFCIFVK-RKFS	66
Query	118	ATGAVGV LAYLMSDGN TLAVLFSVPYDYNWYSNWNVRI--YKGKRRADQRM YEELYNL	175
		G+VG+L Y + D TLA++FS P+DYN++ + V + YK + + + +E LY+	
Sbjct	67	LRGSGVGLLVYEIED-QTLAIMFSNPF DYNFFKVEFAVALSGYKEETQDLKAFFELLYHEK	125
Query	176	-----SPFRGDN GWHTRNLGYGLKSRGFMNSSGHAILEIHVSKA	214 (配列番号 48)
		+ G++ M+++ AI+++ A	
Sbjct	126	QKGWLKMAKEKLCCEQCQCPVSLNNGIRVTATMSNNAKAI IKLSSPDA	172 (配列番号 49)

【0063】

本明細書中で使用される「単離 (isolated)」組成物という用語はその *in vivo* 位置 (例えば水生生物又はコケ) から取り出された組成物を表す。好ましくは、本発明の単離組成物はその *in vivo* 位置に存在する他の物質 (例えば接着防止効果を有しない他のタンパク質) をほとんど含まない (すなわち精製又は準精製されている)。

【0064】

本明細書中で使用される「水生生物」という語句は例えば魚類又は固着水生生物のような水環境 (海水又は淡水) に生息する生物を表す。

【0065】

本明細書中で使用される「固着水生生物」という語句はその生活環の少なくとも或る部分で自由に移動することのない水生生物を表す。水生固着生物は通常、基体との物理的固定、又は任意の他の理由 (例えばオニダルマオコゼ (stone fish)) により、或る種の固体基体、例えば岩礁又は船体に恒久的に付着している。

【0066】

例示的な固着生物としては、サンゴ、イソギンチャク (例えばウメボシイソギンチャク及びアイブタシア・プルチェラ)、ウミエラ (sea pens)、水生固着幼生 (例えばクラゲ幼生)、ハナギンチャク (tube dwelling anemones) 及びヒドロ虫 (例えばクロロヒドラ・ビリジシマ (Chlorohydra viridissima) 及びヒドラ・ブルガリス (Hydra vulgaris)) のような固着刺胞動物が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0067】

本発明の実施形態に従って使用することのできる例示的な魚類は浅水域に住むもの又は海の底層、場合によっては穴若しくは洞窟に潜むものが好ましい。かかる魚類にはウナギ及びナマズが含まれる。

【0068】

本明細書中で使用される「コケ」という語句はタタキポシダ (takakiposida)、スフィアゴノプシダ (sphyagnopsida)、アンドレアエオブシダ (andreaeopsida)、アンデラエオブリョプシダ (anderaeobryopsida)、ポリチルコプシダ (polytirchopsida) 又はブリョプシサ (bryopsisa) の綱のいずれかを含むコケ植物門の非維管束植物を表す。

【0069】

コケは例えばフィスコミトレラ・パテンス、ヒョウタンゴケ (真核生物界; 緑色植物亜界; ストレプト植物門; 有胚植物類; コケ植物類; コケ上綱 (Moss Superclass) V; 蘚類綱; ヒョウタンゴケ亜綱; ヒョウタンゴケ目; ヒョウタンゴケ科; 又はニセツリガネゴケ属) を含み得る。

【0070】

本発明の組成物を遺伝子組換え技法を用いて (例えばトランスジェニック水生固着生物を用いて) *in vivo* で発現してもよい。

【0071】

本発明の幾つかの実施形態によれば、本発明の組成物は細胞毒性又は細胞増殖抑制性の活性を欠いている。例えば本発明の組成物は殺菌性又は静菌性ではない。

【0072】

本発明の幾つかの実施形態によれば、本発明の組成物は凍結乾燥に耐性がある。すなわち例えば本発明の組成物の活性は凍結乾燥後でも保存される。

【0073】

本明細書中で使用される「単細胞生物」という語句は、微生物 (microorganism or a microbe) とも呼ばれる単細胞の生物を表す。本発明の単細胞生物は、真核性の単細胞生物 (例えば原生動物又は真菌、例えば酵母) 又は原核性の単細胞生物 (例えば細菌又は古細菌) であり得る。本発明の単細胞生物は、単離細胞又は細胞懸濁液として、例えばバイオフィーム内のような任意の細胞環境にあり得る。

【0074】

本明細書中で使用される「バイオフィーム」という用語は、その中で微生物が分散し、及び/又はコロニーを形成する細胞外マトリクスを表す。バイオフィームは典型的には、多糖及び他の巨大分子で構成されている。

【0075】

接着が本発明の方法に従って予防され得る細菌細胞の例としては、グラム陽性細菌及びグラム陰性細菌が挙げられる。

【0076】

本明細書中で使用される「グラム陽性細菌」という用語は、それらの細胞壁構造の部分としてペプチドグリカンと、多糖及び/又はテイコ酸とを有することを特徴とし、かつグラム染色法におけるそれらの青紫色の反応物を特徴とする細菌を表す。代表的なグラム陽性細菌としては、アクチノミセス属、バシラス・アントラシス (Bacillus anthracis: 炭疽菌)、ピフィドバクテリウム属、クロストリジウム・ボツリナム (Clostridium botulinum: ボツリヌス菌)、クロストリジウム・ペルフリンゲンス (Clostridium perfringens: ウェルシュ菌)、クロストリジウム属、クロストリジウム・テタニ (Clostridium tetani: 破傷風菌)、コリネバクテリウム・ジフテリアエ (Corynebacterium diphtheriae: ジフテリア菌)、コリネバクテリウム・ジャイカム (Corynebacterium jeikeium)、エンテロコッカス・フェカリス (Enterococcus faecalis: 大便連鎖球菌)、エンテロコッカス・フェシウム (Enterococcus faecium)、エリシペロトリックス・ルシオパチエ (Erysipelothrix rhusiopathiae: ブタ丹毒菌)、ユーバクテリウム属、ガードネレラ・バギナリス (Gardnerella vaginalis: ガードネレラ菌)、ゲメラ・モルビロルム (Gemella mor

10

20

30

40

50

billorum)、ロイコノストック属、マイコバクテリウム・アブセサス (*Mycobacterium abscessus*)、複合マイコバクテリウム・アビウム (*Mycobacterium avium*)、マイコバクテリウム・ケロネー (*Mycobacterium chelonae*)、マイコバクテリウム・フォーチュイタム (*Mycobacterium fortuitum*)、マイコバクテリウム・ヘモフィルム (*Mycobacterium haemophilum*)、マイコバクテリウム・カンサシイ (*Mycobacterium kansasii*)、マイコバクテリウム・レプレ (*Mycobacterium leprae*:らい菌)、マイコバクテリウム・マリナム (*Mycobacterium marinum*)、マイコバクテリウム・スクロフラセウム (*Mycobacterium scrofulaceum*)、マイコバクテリウム・スメグマチス (*Mycobacterium smegmatis*:スメグマ菌)、マイコバクテリウム・テラエ (*Mycobacterium terrae*)、マイコバクテリウム・ツベルクロシス (*Mycobacterium tuberculosis*:結核菌)、マイコバクテリウム・ウルセラ 10
 ンス (*Mycobacterium ulcerans*)、ノカルディア属、ペプトコッカス・ニガー (*Peptococcus niger*)、ペプトストレプトコッカス属、プロブリオニバクテリウム属、サルシナ・ルテア (*Sarcina lutea*)、黄色ブドウ球菌、スタフィロコッカス・アウリクラリス (*Staphylococcus auricularis*)、スタフィロコッカス・キャピティス (*Staphylococcus capitis*)、スタフィロコッカス・コーニイ (*Staphylococcus cohnii*)、スタフィロコッカス・エピデルミデス (*Staphylococcus epidermidis*:表皮ブドウ球菌)、スタフィロコッカス・ヘモリチカス (*Staphylococcus haemolyticus*)、スタフィロコッカス・ホミニス (*Staphylococcus hominis*)、スタフィロコッカス・ルグダネンシス (*Staphylococcus lugdanicus*)、スタフィロコッカス・サッカロリチクス (*Staphylococcus saccharolyticus*)、スタフィロコッカス・サブロフィチクス (*Staphylococcus saprophyticus*)、スタフ 20
 ィロコッカス・シュライフェリ (*Staphylococcus schleiferi*)、スタフィロコッカス・シミランス (*Staphylococcus similans*)、スタフィロコッカス・ワルネリ (*Staphylococcus warneri*)、スタフィロコッカス・キシロサス (*Staphylococcus xylosus*)、ストレプトコッカス・アガラクチア (*Streptococcus agalactiae*) (B群連鎖球菌)、ストレプトコッカス・アンギノサス (*Streptococcus anginosus*)、ストレプトコッカス・ボビス (*Streptococcus bovis*:ウシ連鎖球菌)、ストレプトコッカス・カニス (*Streptococcus canis*)、ストレプトコッカス・エクイ (*Streptococcus equi*:腺疫菌)、ストレプトコッカス・ミレリ (*Streptococcus milleri*)、ストレプトコッカス・ミチオール (*Streptococcus mitior*)、ストレプトコッカス・ミュータンス (*Streptococcus mutans*:ミュー 30
 タンス菌)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*:肺炎連鎖球菌)、ストレプトコッカス・ピオゲネス (*Streptococcus pyogenes*:化膿レンサ球菌) (A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス・サリバリウス (*Streptococcus salivarius*)、ストレプトコッカス・サンギス (*Streptococcus sanguis*:サンギス菌) が挙げられる。

【 0 0 7 7 】

本明細書中で使用される「グラム陰性細菌」という用語は、それぞれの細菌細胞を囲む二重膜の存在を特徴とする細菌を表す。代表的なグラム陰性細菌としては、アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*)、アシネトバクター・バウマンニ、アクチノバチルス・アクチノミセタムコミタンス (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、エロモナス・ヒドロフィラ (*Aeromonas hydrophila*)、アルカリジェネス・キシロソキシダンス (*Alcaligenes xylosoxidans*)、バクテロイデス属、バクテロイデ 40
 ス・フラギリス (*Bacteroides fragilis*)、バルトネラ・バシリホルミス (*Bartonella bacilliformis*)、ボルデテラ属、ボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*)、ブランハメラ・カタラリス (*Branhamella catarrhalis*:カタル球菌)、ブルセラ属、カンピロバクター属、カルミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、クラミジア・シッタシ (*Chlamydia psittaci*)、クラミジア・トラコマチス (*Chlamydia trachomatis*)、クロモバクテリウム・ピオラセウム (*Chromobacterium violaceum*)、シトロバクテ 50
 ー属、エイケネラ・コローデンス (*Eikenella corrodens*)、エンテロバクター・エロゲネス (*Enterobacter aerogenes*)、大腸菌、フラボバクテリウム・メニンゴセプトリカム (*Flavobacterium meningosepticum*)、フソバクテリウム属、ヘモフィルス・インフルエンゼ (*Haemophilus influenzae*)、ヘモフィリス属、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobact*

er pylori : ピロリ菌)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae* : 肺炎桿菌)、クレブシエラ属、レジオネラ属、レプトスピラ属、モラクセラ・カタラーリス (*Moraxella catarrhalis* : カタル球菌)、モルガネラ・モルガニイ (*Morganella morganii*)、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、ナイセリア・ゴノレエ (*Neisseria gonorrhoeae*)、ナイセリア・メニンギティディス (*Neisseria meningitidis* : 髄膜炎菌)、パストツレラ・マルトシダ (*Pasteurella multocida*)、プレシオモナス・シゲロイデス (*Plesiomonas shigelloides*)、プレボテラ属、プロテウス属、プロビデンシア・レットゲリ (*Providencia rettgeri*)、緑膿菌、シュードモナス属、リケッチア・プロワゼキイ (*Rickettsia prowazekii*)、リケッチア・リケッチイ (*Rickettsia rickettsii*)、ロシャメリア属、サルモネラ属、サルモネラ・チフィ (*Salmonella typhi* : チフス菌)、セラチア・マルセセンス (*Serratia marcescens*)、シゲラ属、シゲラ・ソネイ (*Shigella sonnei* : ソンネ菌)、トレポネーマ・カラテウム (*Treponema carateum*)、トレポネーマ・パリダム (*Treponema pallidum*)、トレポネーマ・パリダム亜種エンデミカム (*Treponema pallidum endemicum*)、トレポネーマ・ペルテヌエ (*Treponema pertenuae*)、ベイヨネラ属、ビブリオ・コレレ (*Vibrio cholerae* : コレラ菌)、ビブリオ・バルニフィカス (*Vibrio vulnificus*)、エルシニア・エンテロコリチカ (*Yersinia enterocolitica*)、エルシニア・ペスチス (*Yersinia pestis* : ペスト菌) が挙げられる。

【0078】

本明細書中で使用される「真菌」という用語は、キチン質細胞壁の存在と、大部分の種における多細胞菌糸としての糸状成長とを特徴とする従属栄養生物を表す。接着が本発明の方法に従って予防され得る代表的な真菌としては、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、カンジダ・グラブラタ (*Candida glabrata*)、カンジダ・パラプローシス (*Candida parapsilosis*) 及びカンジダ・ドゥブリニエンシス (*Candida dubliniensis*) が挙げられる。

【0079】

本明細書中で使用される「接着の予防」という語句は、(例えば表面上での成長速度を低減することによる) 表面との細胞付着の低減又は排除を表す。好ましくは、本発明の組成物は、細胞接着アッセイによって測定される場合、細胞接着を10%、より好ましくは20%、より好ましくは30%、より好ましくは40%、より好ましくは50%、より好ましくは60%、より好ましくは70%、より好ましくは80%、より好ましくは90% 及び最も好ましくは100% 予防する。細胞接着アッセイの例が本明細書中の以下に、及び続く実施例の項に記載されている。本発明の組成物は、細胞凝集を予防することもできる(すなわち表面に細胞凝集しない)と理解される。

【0080】

本発明は、布、繊維、発泡体、フィルム、コンクリート、レンガ、ガラス、金属、プラスチック、ポリマー等を含む、多種多様の表面との細胞接着の予防を意図する。

【0081】

一実施形態によれば、表面は、バイオフィーム形成しやすい装置に含まれる。その表面が本発明で意図されている装置の例としては、船体、自動車表面、飛行機表面、膜、フィルター及び工業設備が挙げられるが、これらに限定されない。

【0082】

また表面は、医療装置、医療機器及びインプラントに含まれ得る。かかる医療装置、医療機器及びインプラントの例としては、ヒト等の哺乳動物に一時的に又は永久的に埋め込むことができる任意の物体が挙げられる。本発明に従って使用され得る、代表的な医療装置、医療機器及びインプラントとしては例えば、中心静脈カテーテル、導尿カテーテル、気管内チューブ、機械心臓弁、ペースメーカー、血管グラフト、ステント及び人工関節が挙げられる。医療装置との細胞付着を予防する方法及びそれらのさらなる例は本明細書中の以下に記載されている。

【0083】

別の実施形態によれば、表面は例えば哺乳動物組織、例えば皮膚等の生物組織に含まれ

10

20

30

40

50

る。

【0084】

言及されるように、本発明の方法は、細胞と表面との接着を予防することができる生物由来の組成物に細胞を接触させることによって達成される。

【0085】

本明細書中で使用される「接触」という用語は、本発明の組成物の中に含まれる活性因子が細胞と表面との接着を予防することができるような方法で、本発明の組成物を接着細胞と直接又は間接的に接触させるように配置させることを表す。したがって本発明は、本発明の組成物を所望の表面に適用すること及び/又は接着細胞に直接適用することの両方を意図する。

10

【0086】

接触は、*in vivo* (すなわち哺乳動物身体内)、*ex vivo* (すなわち身体から取り出された細胞内) 及び/又は *in vitro* (すなわち哺乳動物身体外) で達成され得る。

【0087】

組成物の表面への接触は、噴霧、散布、湿潤 (*wetting*)、浸潤、浸漬 (*dipping*)、塗工、超音波溶接、溶接、接合 (*bonding*) 又は接着 (*adhering*) を含む、当該技術分野で既知の方法のいずれかを使用して達成することができる。本発明の組成物を単層又は多層で付着させてもよい。

【0088】

20

一実施形態によれば、本発明の組成物は、生きている水生生物全体に含まれ得る。例えば本発明は、生きている水生生物が、表面 (例えば水中パイプ、船体) 及び/又は表面に接着する細胞と接触することができるように、生きている水生生物を水中環境に加えることを意図し、これにより表面への微生物接着を予防する。活性因子は水生生物から分泌され得ると理解される。この場合、水生生物を表面又は微生物細胞と直接接触させる必要はないが、活性因子がその作用部位に広がることができるように十分接近している必要がある。このため、本発明の組成物を水中に分散させてもよく (*secreted*)、また例えば海水又は汽水の脱塩等の水精製処理に使用してもよい。

【0089】

本発明のさらなる態様によれば、薬学的に許容可能な担体又は希釈剤と、活性成分として単離された天然ペプチドから単離したペプチドとを含む医薬組成物であって、該ペプチドが Y D Y N W Y (配列番号 1)、Y D Y N L Y (配列番号 2)、F D Y N F Y (配列番号 3)、F D Y N L Y (配列番号 4)、W D Y N L Y (配列番号 8)、F D Y N W Y (配列番号 5)、Y D W N L Y (配列番号 6)、及び Y D W H L Y (配列番号 7) からなる群から選択される配列、又は本明細書に記載の任意の他の配列を含む、医薬組成物が提供される。

30

【0090】

本発明の他の実施形態によれば、任意で非ペプチド類似体を形成するように上記ペプチドを変更してもよく、これには 1 つ又は複数の結合をより不安定さが低い結合に置き換えること、環化 (以下でより詳細に説明する) 等が含まれるが、これらに限定されない。付加的に又は代替的に、任意でペプチドを例えば P C T 出願国際公開第 2 0 0 7 / 1 4 7 0 9 8 号 (本明細書中で完全に説明されるかのように参照により本明細書中に援用される) に記載のように、コンピュータモデリングにより小分子に変換してもよい。

40

【0091】

任意で保存的置換として及び非保存的置換として本発明によるペプチドにおいてアミノ酸残基を「ペプチド模倣物の有機部分」に置換することができる。これらの部分は「非天然アミノ酸」とも称され、任意でアミノ酸残基、アミノ酸を置き換えるか、又は欠失アミノ酸の代わりにペプチド内でスペーサ基として働くことができる。ペプチド模倣物の有機部分は任意で好ましくは、置き換えられたアミノ酸と同様の立体的特性、電気的特性又は立体配置特性を有し、かかるペプチド模倣物は必須位置でアミノ酸を置き換えるのに使用され、保存的な置換であると考えられる。しかしながら、かかる類似性は必ずしも必要と

50

いう訳ではない。ペプチド模倣物の使用に関する制限は組成物が少なくとも本発明による天然ペプチドと比較してその生理活性を保持していることだけである。

【0092】

ペプチド模倣物は任意で酵素プロセス又は他の分解プロセスによるペプチドの分解を阻害するのに使用してもよい。任意で好ましくはペプチド模倣物を有機合成技法により産生することができる。好適なペプチド模倣物の非限定的な例としては、対応するLアミノ酸のDアミノ酸、テトラゾール（非特許文献6）、アミド結合の等量式（非特許文献7）、LL-3-アミノ-2-プロペニドン-6-カルボン酸（LL-Acp）（非特許文献8）が挙げられる。同様の類似体が非特許文献9、並びに非特許文献10、非特許文献11及び非特許文献12に示されている。他の好適であるが例示的なペプチド模倣物が非特許文献13、非特許文献14、非特許文献15、非特許文献16、及び非特許文献17に示されている。さらなる好適である例示的なペプチド模倣物には、ヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボキシレート（非特許文献18）、1,2,3,4-テトラヒドロ-イソキノリン-3-カルボキシレート（非特許文献19）、ヒスチジンイソキノロンカルボン酸（HIC）（非特許文献20）、（2S,3S）-メチルフェニルアラニン、（2S,3R）-メチルフェニルアラニン、（2R,3S）-メチルフェニルアラニン及び（2R,3R）-メチルフェニルアラニン（非特許文献21）が含まれる。

10

【0093】

例えば例示的であるが、非限定的な非天然アミノ酸には、 α -アミノ酸（ β 及び γ ）、ホモ-アミノ酸、環状アミノ酸、芳香族アミノ酸、Pro及びPyr誘導体、3-置換アラニン誘導体、グリシン誘導体、環置換Phe及びTyr誘導体、直鎖状コアアミノ酸又はジアミノ酸が含まれる。それらは例えば、Sigma-Aldrich（USA）等の様々な供給業者から利用可能である。

20

【0094】

本発明では、任意でペプチドの任意の部分を化学修飾してもよい、すなわち官能基の付加により変化させてもよい。化学合成プロセスの後に、例えば化学修飾されたアミノ酸を付加する場合、任意で分子の合成中に修飾を行うことができる。しかしながら、アミノ酸が分子に既に存在する場合のアミノ酸の化学修飾（「in situ」修飾）も可能である。

30

【0095】

任意で以下の例示的な種類の修飾のうちのいずれか1つに従って、（概念的に「化学修飾された」とみなされたペプチドにおいて）分子の配列領域のうちのいずれかのアミノ酸を修飾することができる。非限定的で例示的な種類の修飾には、カルボキシメチル化、アシル化、リン酸化、グリコシル化又は脂肪酸アシル化が含まれる。任意でセリン又はスレオニンのヒドロキシル基と糖のヒドロキシル基とを連結させるのにエーテル結合を使用することができる。任意でグルタミン酸塩又はアスパラギン酸塩のカルボキシル基と糖のアミノ基とを連結させるのにアミド結合を使用することができる（非特許文献22、非特許文献23）。任意でアセタール結合及びケタール結合をアミノ酸と炭水化物との間に形成することもできる。任意で例えば遊離アミノ基のアシル化により（例えばリシン）、脂肪酸アシル誘導体を生成することができる（非特許文献24）。

40

【0096】

本明細書中で使用される、本発明によるペプチドに言及する際の「化学修飾」という用語は、プロセッシング若しくは他の翻訳後修飾等の自然プロセスにより、又は他の翻訳後修飾により、又は当該技術分野で既知の化学修飾技法によりそのアミノ酸残基のうちの少なくとも1つが修飾されたペプチドを表す。多くの既知の修飾の例としては典型的にアセチル化、アシル化、アミド化、ADP-リボシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、脂質若しくは脂質誘導体の共有結合、メチル化、ミリスチル化、ペグ化、プレニル化、リン酸化、ユビキチン化又は任意の同様のプロセスが挙げられるが、これらに限定されない。

50

【 0 0 9 7 】

本発明のこの態様の幾つかの実施形態によれば、それを必要とする被験体において病原体感染を予防又は治療する方法であって、該被験体に治療的に効果的な量の医薬組成物を投与することを含み、それにより該病原体感染を治療又は予防する、方法が提供される。

【 0 0 9 8 】

本発明のこの態様の代替的な実施形態によれば、外因性細菌の胃腸管への付着を予防する方法が提供される。

【 0 0 9 9 】

哺乳動物の胃腸管は、腸内病原体による定着に対する耐性をもたらす多種多様の固有微生物叢を含有している。病原体に対する高まった防御を宿主にもたらす代わりとして、固有微生物叢は栄養素が豊富な安定した環境に近づき、それにより宿主の腸管と共生関係になる。

10

【 0 1 0 0 】

共生細菌は親和性の高い受容体媒介性の付着によりヒトの胃腸管上皮に付着する。これに対して、外因性細菌は親和性の低い機構により上皮に付着する。単一の仮説に限定されることを望まないが、本発明の組成物はこの親和性の低い付着を選択的に予防するか又は低減し、それによりバイオフィーム形成の初期段階を阻止することが期待される。

【 0 1 0 1 】

したがって本発明の組成物は、例えばクローン病又は例えばコラーゲン蓄積大腸炎、リンパ球性大腸炎、虚血性大腸炎、空置性大腸炎 (diversion colitis)、感染性大腸炎及びベーチェット症候群を含む潰瘍性大腸炎のような胃腸管の疾患の治療又は予防に有用である。

20

【 0 1 0 2 】

本明細書中で使用される「医薬組成物」という用語は、本明細書中に記載される活性成分のうちの1つ又は複数と、生理学的に好適な担体及び賦形剤等の他の化学的構成要素との調製物を表す。医薬組成物の目的は、生物への化合物の投与を容易にすることである。

【 0 1 0 3 】

本明細書中で使用される「活性成分」という用語は、意図された生物学的効果に關与する生物組成物（及びそれから精製される作用因子）を表す。

【 0 1 0 4 】

以下、交換して使用することができる「生理学的に許容可能な担体」及び「薬学的に許容可能な担体」という語句は、生物に対する有意な刺激を引き起こさず、また投与化合物の生物学的活性及び性質を失わせない担体又は希釈剤を表す。アジュバントはこれらの語句に含まれる。

30

【 0 1 0 5 】

本明細書中で、「賦形剤」という用語は、活性成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を表す。賦形剤の例としては、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖及び様々な種類のデンプン、セルロース誘導體、ゼラチン、植物油及びポリエチレングリコールが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 0 6 】

薬剤を配合及び投与する技法は、非特許文献 2 5（参照により本明細書中に完全に援用される）の最新版に見ることができ、本明細書中の以下でさらに記載される。

40

【 0 1 0 7 】

言及されるように、本発明の医薬組成物は、病原体感染を予防又は治療するために、それを必要とする被験体に投与することができる。

【 0 1 0 8 】

本明細書中で使用される「それを必要とする被験体」という用語は、哺乳動物、好ましくはヒト被験体を表す。

【 0 1 0 9 】

本明細書中で使用される「治療」という用語は、病原体感染の有害効果の治癒、反転、

50

軽減、緩和、最小化、抑制又は停止を表す。

【0110】

本明細書中で使用される「病原体感染」という語句は、病原生物によって引き起こされる任意の医学的状態を表す。病原体感染の例としては、慢性感染性疾患、亜急性感染性疾患、急性感染性疾患、ウイルス疾患、細菌疾患、原生動物疾患、寄生性疾患、真菌疾患、マイコプラズマ疾患、古細菌疾患及びプリオン病が挙げられるが、これらに限定されない。

【0111】

一実施形態によれば、病原体感染はバイオフィーム内で又はバイオフィーム上で成長することができる生物によって引き起こされる。

10

【0112】

微生物バイオフィームによって引き起こされる病原体感染の例としては、自然弁心内膜炎(NVE)、中耳炎(OM)、慢性細菌性前立腺炎、嚢胞性線維症(CF)及び歯周炎が挙げられる。バイオフィームに特異的に起因しないさらなる病原体感染としては、尿路感染、女性生殖管感染及び肺炎が挙げられるが、これらに限定されない。医療装置の埋め込みによる感染としては、血管カテーテル感染、人工動脈感染、人工心臓弁の感染、人工関節感染、中枢神経系シャントの感染、整形外科的インプラント感染、ペースメーカー及び除細動器感染、血液透析及び腹膜透析感染、眼感染、尿路感染、女性生殖管の感染、気管内挿管及び気管切開に関連する感染、並びに歯感染が挙げられる。

【0113】

20

本明細書中で使用される「病原生物」という語句は、疾患を引き起こす可能性がある任意の単細胞生物、特に細菌又は真菌等の生きている微生物を表す。好ましくは、病原生物はバイオフィーム内で又はバイオフィーム上で成長することができる。多くの一般的な病原生物がバイオフィームとして哺乳動物(例えばヒト)に存在し、疾患を引き起こす。これらとしては、マンヘミア・ヘモリチカ(*Mannheimia haemolytica*:ヘモリチカ菌)及びパスツレラ・マルトシダ(*Pasteurella multocida*)(肺炎の原因となる)、フソバクテリウム・ネクロフォールム(*Fusobacterium necrophorum*)(肝膿瘍の原因となる)、黄色ブドウ球菌及び緑膿菌(創傷感染の原因となる)、大腸菌及びサルモネラ属(腸炎の原因となる)、黄色ブドウ球菌及びスタフィロコッカス・エピデルミチス(OMの原因となる)、並びにストレプトコッカス属、スタフィロコッカス属、カンジダ属及びアスペルギルス属(NVEの原因となる)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0114】

本発明による感染性疾患の治療を当該技術分野で既知の他の治療法と組み合わせてもよいこと(すなわち併用療法)が理解される。これらとしては、ペニシリン、セファロsporin、カルバペネム、アミノグリコシド、マクロリド、リンコマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール及びグリセオフルビン等の抗菌剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【0115】

好適な投与経路には例えば、経口、直腸、経粘膜、特に経鼻、腸、又は非経口送達(筋肉内、皮下及び髄内注射、並びに髄腔内、直接脳腔内、静脈内、腹腔内(intraperitoneal)、鼻内又は眼内注射を含む)が含まれ得る。

40

【0116】

代替的に、例えば患者の組織域への医薬組成物の直接注射によって全身ではなく局所的に医薬組成物を投与してもよい。

【0117】

本発明の医薬組成物は、当該技術分野で既知のプロセス、例えば従来の混合、溶解、粒状化、糖衣錠作製、粉末化、乳化、カプセル封入、封入又は凍結乾燥プロセスによって製造され得る。

【0118】

このため、本発明に従って使用される医薬組成物を、賦形剤及び助剤を含む、1つ又は

50

複数の生理学的に許容可能な担体を使用して従来通り配合してもよく、これにより活性成分を薬学的に使用することができる製剤に加工するのが容易になる。適切な剤形は、選択される投与経路によって変わる。

【0119】

注射のために、医薬組成物の活性成分を、水溶液、好ましくはハंकス液、リンガー液又は生理食塩緩衝液等の生理学的に相溶性の緩衝液中で配合してもよい。経粘膜投与のために、浸透しようとする障壁に適した浸透剤を製剤に使用する。かかる浸透剤は当該技術分野で一般的に知られている。

【0120】

局所投与のために、本発明の組成物を、ゲル、クリーム、洗浄液、リンス又は噴霧剤として配合してもよい。

【0121】

経口投与のために、活性化合物を当該技術分野で既知の薬学的に許容可能な担体と組み合わせることによって、医薬組成物を容易に配合することができる。かかる担体は、患者による経口摂取のために、医薬組成物を、錠剤、ピル、糖衣錠、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液等として配合することを可能にする。固形賦形剤を使用して、任意で得られる混合物を粉碎し、所望に応じて好適な助剤を添加した後、顆粒混合物を処理して、錠剤又は糖衣錠コアを得ることで、経口使用のための医薬製剤を作製することができる。好適な賦形剤は、特にラクトース、スクロース、マンニトール又はソルビトールを含む糖等の充填剤；例えばトウモロコシデンプン、小麦デンプン、米デンプン、ジャガイモデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びカルボメチルセルロースナトリウム等のセルロース製剤；及び/又はポリビニルピロリドン(PVP)等の生理学的に許容可能なポリマーである。所望に応じて、崩壊剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、又はアルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウム等のアルギン酸塩を添加してもよい。

【0122】

糖衣錠コアに好適なコーティングを与える。この目的のために、任意でアラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコール、二酸化チタン、ラッカー溶液及び好適な有機溶媒、又は溶媒混合物を含有し得る濃縮糖溶液を使用してもよい。染料又は顔料を、識別するため又は異なる組合せの活性のある化合物の用量を特徴付けるために、錠剤又は糖衣錠コーティングに添加してもよい。

【0123】

経口で 사용할 ことができる医薬組成物としては、ゼラチンでできている押し込み型カプセル、並びにゼラチン及び可塑剤、例えばグリセロール又はソルビトールでできている軟封入カプセルが挙げられる。押し込み型カプセルは、ラクトース等の充填剤、デンプン等の結合剤、タルク又はステアリン酸マグネシウム等の滑剤、及び任意で安定剤と混合して、活性成分を含有し得る。軟カプセルでは、活性成分が好適な液体、例えば脂肪油、液体パラフィン又は液体ポリエチレングリコール中に溶解又は懸濁し得る。さらに、安定剤を添加してもよい。経口投与のための剤形は全て、選択された投与経路に適した投与量である必要がある。

【0124】

口腔投与のため、組成物は、従来通り配合された錠剤又はロゼンジの形態をとってもよい。

【0125】

鼻吸入による投与のため、本発明による使用のための活性成分は、好適な推進剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン又は二酸化炭素の使用によって加圧バック又はネブライザからエアロゾル噴霧放出(presentation)形態で従来通り送達される。加圧エアロゾルの場合、一定量を送達するために弁を提供することによって投与量を決定し得る。例えばディスペンサにおける使用のためのゼラチンのカプセル及びカートリッジは、化合物の混合粉末及び好適な粉末基剤、例

10

20

30

40

50

えばラクトース又はデンプンを含出して配合し得る。

【0126】

本明細書中に記載の医薬組成物は、例えばボーラス注射又は持続注入による非経口投与のために配合してもよい。注射のための剤形は、単位投与形態、例えば任意で保存料を添加したアンプル又は複用量の容器内に与えられ得る。組成物は、油性ビヒクル又は水性ビヒクル中の懸濁液、溶液又はエマルションであってもよく、懸濁剤、安定剤及び／又は分散剤等の処方剤 (formulatory agents) を含出しててもよい。

【0127】

非経口投与のための医薬組成物は、水溶性形態での活性製剤の水溶液を含む。さらに、活性成分の懸濁液は、適切な油性又は水性の注射懸濁液として調製され得る。好適な脂溶性溶媒又はビヒクルとしては、ゴマ油等の脂肪油、又はオレイン酸エチル、トリグリセリド若しくはリポソーム等の合成脂肪酸エステルが挙げられる。水性注射懸濁液は、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール又はデキストラン等の懸濁液の粘度を増大させる物質を含出して得る。また任意で、懸濁液は、高濃度溶液の調製を可能にするために、好適な安定剤又は活性成分の可溶性を増大させる作用因子を含出して得る。

10

【0128】

代替的に、活性成分は、使用前に好適なビヒクル、例えば滅菌性の発熱物質無含有の水溶液との構成のために粉末形態であり得る。

【0129】

また本発明の医薬組成物は、例えばココアバター又は他のグリセリド等の従来の坐剤基剤を使用して、坐剤又は停留浣腸剤等の直腸組成物に配合され得る。

20

【0130】

本発明に関連して使用するのに適した医薬組成物としては、活性成分を本来の目的を達成するのに効果的な量含出している組成物が挙げられる。より具体的には、「治療的に効果的な量」は病原体感染の症状 (例えば発熱) を予防、軽減又は改善するのに、又は治療する被験体の生存期間を延長するのに効果的な活性成分 (例えば水生生物組成物又はコケ組成物) の量を意味する。

【0131】

特に本明細書中に与えられる詳細な開示を考慮すると、治療的に効果的な量の決定は、十分に当業者の能力内である。

30

【0132】

本発明の方法に使用される任意の製剤のために、初めに投与量又は治療的に効果的な量を *in vitro* アッセイ及び細胞培養アッセイから推定することができる。例えば、所望の濃度又は力価を達成するために、用量を動物モデルで配合することができる。かかる情報をヒトに有用な用量をより正確に決定するのに使用することができる。

【0133】

本明細書中に記載の活性成分の毒性及び治療の有効性を、*in vitro* で標準的な薬学的処置により、細胞培養液又は実験動物で決定することができる。これらの *in vitro* アッセイ及び細胞培養液アッセイ、並びに動物試験から得られたデータを、ヒトで使用するために様々な投与量を配合する際に使用することができる。投与量は、用いられる投薬形態及び用いられる投与経路に応じて変わり得る。正確な剤形、投与経路及び投与量を、患者の状態を鑑みて医師個人が選択することができる (例えば、非特許文献 26 を参照されたい)。

40

【0134】

生物学的効果を誘導又は抑制するのに十分な血漿又は脳レベルの活性成分 (すなわち最小有効濃度、MEC) が提供されるように、投与量及び投与間隔を個々で調整してもよい。MEC は各製剤で変わるが、*in vitro* データから推測することができる。MEC を達成するのに必要な投与量は個々の特性及び投与経路に応じて変わる。検出アッセイを、血漿濃度を求めるのに使用することができる。

【0135】

50

治療される状態の重症度及び反応性に応じて、投薬は単回又は複数回の投与で行い、治療過程は、数日から数週間、すなわち治癒が達成されるまで、又は疾患状態が縮小されるまで継続する。

【 0 1 3 6 】

当然のことながら、組成物の投与量は治療される被験体、病気の重症度、投与様式、処方医師の判断等によって変わる。

【 0 1 3 7 】

所望であれば、本発明の組成物は、活性成分を含有する、1つ又は複数の単位投薬形態を含有し得るパック又はディスペンサ装置、例えばFDA認可キット内で与えられてもよい。パックは例えば、金属又はプラスチックホイル、例えばブリスターパックを含み得る。パック又はディスペンサ装置は投与のための指示書を伴い得る。またパック又はディスペンサ装置は、調合薬の製造、使用又は販売を規制する行政機関によって規定された形での表示(notice)を伴う場合があり、この表示は、ヒト又は動物投与のための組成物形態の機関による認可を反映する。かかる表示には例えば、処方薬に関して米国食品医薬品局で認可された、又は認可された商品の説明(insert)のラベルが含まれ得る。また薬学的に許容可能な担体中で配合される本発明の製剤を含む組成物を調製し、適切な容器に入れ、さらに上記で詳述されたように、指定の状態の治療のためにラベルを付ける場合がある。

10

【 0 1 3 8 】

言及されるように、医療装置及びインプラントは一般的に、埋め込み装置の取り外しが必要になる場合もある、日和見感染細菌及び他の感染性微生物(例えば真菌)に感染する。かかる感染が、病気、長い入院生活又はさらには致死をもたらす可能性もある。それゆえに、バイオフィルム形成、及び医療装置の感染の予防が強く望まれている。

20

【 0 1 3 9 】

このため本発明は、上記の組成物を付着させた医療装置も意図する。

【 0 1 4 0 】

本明細書中で使用される「医療装置」という用語は、任意のインプラント、機器、器具、道具、機械、装置、又は任意の他の類似若しくは関連の物体(任意の構成要素又はアクセサリを含む)を表し、これは疾患又は他の状態の診断、治療、治癒又は予防における使用を目的とする。かかる医療装置は、ヒト又は他の動物での使用を目的とし、身体の構造又は任意の機能に影響を与えることが期待される。かかる医療装置は、化学的作用を通じては、その主となる本来の目的を達成せず、またその主となる本来の目的の達成のために代謝が必要という訳ではない(dependent upon)。

30

【 0 1 4 1 】

本明細書中に使用される「インプラント」という用語は、生きている組織ではない、ヒトの身体での配置を目的とする任意の物体を表す。インプラントは一時的又は永久的なものであり得る。インプラントは、人工構成要素を含む物品、例えばカテーテル又はペースメーカーであり得る。インプラントは、それらの生きている組織が失活されるように処理されている天然由来の物体も含み得る。例えば、生きている細胞を取り除く(脱細胞化する(acellularized))が、宿主由来の骨の内部成長のために鋳型として役立つようにそれらの形状を保持するように処理されている骨移植片が挙げられる。別の例としては、天然のサンゴを処理して、或る特定の整形外科療法及び歯科療法のために身体に適用することができるヒドロキシアパタイト製剤を得ることができる。

40

【 0 1 4 2 】

したがって本発明は、移植の後に起こることが知られる、起こり得る任意の細胞凝集及びバイオフィルム形成を低減/排除するように、医療装置との細胞接着を予防するために、医療装置を本発明の組成物でコーティングすることを想定している。装置関連の感染は通常、装置の挿入若しくは埋め込み処置の間の微生物、主に細菌の導入、又は血液伝播性の生物と新たに挿入される装置との付着、及びその後の表面上での生物の増殖により起こる。それにより本発明の組成物による医療装置のコーティングが、1つ又は複数の微生物

50

種のバイオフィルム形成を阻害し、医療装置関連の感染を予防し、結果として抗生物質による治療又は被験体から医療装置を取り外す必要性が減る。

【0143】

本発明の教示に従ってコーティングされ得る医療装置としては、人工血管、カテーテル及び流体の除去又は患者への流体の送達のための他の装置、人工心臓、人工腎臓、整形外科用のピン、人工関節、プレート及びインプラント；カテーテル及び他のチューブ（泌尿器チューブ及び胆管チューブ、気管内チューブ、末梢部に（peripherably）挿入可能な中枢神経カテーテル、透析カテーテル、長期間トンネル型（tunneled）中枢神経カテーテル、末梢静脈内カテーテル、短期間中心静脈カテーテル、動脈カテーテル、肺動脈カテーテル、スワン-ガンツカテーテル、導尿カテーテル、腹膜カテーテルを含む）、尿道装置（長期間尿道装置、組織結合尿道装置、人工尿道括約筋、尿道拡張器を含む）、シャント（心室シャント又は動静脈シャントを含む）；プロテアーゼ（胸部インプラント、陰茎プロテアーゼ、血管移植プロテアーゼ、動脈瘤修復装置、機械心臓弁、人工関節、人工喉頭、耳鼻科インプラントを含む）、吻合装置、血管カテーテルポート、血管ステント、クランプ、塞栓装置、創傷ドレインチューブ、接眼レンズ、歯科インプラント、水頭症シャント、ペースメーカー及び埋め込み型除細動器、無針コネクタ、声帯（voice）プロテアーゼ等が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0144】

本発明の組成物の別の可能性のある用途は、医学的及び歯科的環境で見られる表面のコーティングである。かかる表面には、使い捨てか、又は反復使用目的であるかにかかわらず、様々な機器及び装置の内面及び外面が含まれる。かかる表面は、医学的使用に適した物品の全範囲を含み、この物品としては外科用メス、針、ハサミ、及び侵襲性の外科的、治療的又は診断的処置に使用される他の装置；血液フィルタが挙げられるが、これらに限定されない。他の例がこれらの技術分野における実践者には容易に明らかである。

20

【0145】

医学的環境に見られる表面には、医療の場で職員が着用する又は職員によって運ばれる医療ギアである医療設備の部品の内面及び外面も含まれる。かかる表面には、医療の場において感染性生物に対する生物学的障壁として意図される表面、例えばグローブ、エプロン及びマスクが含まれ得る。生物学的障壁に一般的に使用される材料は、ポリエチレン、ダクロン、ナイロン、ポリエステル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ラテックス、シリコン及びビニル等の熱可塑性材料又は高分子材料である。他の表面には、医療的処置、又は呼吸器治療（酸素、ネブライザにおける可溶化薬剤及び麻酔薬の投与を含む）に使用される医療機器、医療チューブ及び医療キャニスタを準備するのに使用される領域におけるカウンタトップ及び固定具が含まれ得る。他のかかる表面には、無菌であることを意図しない医療設備又は歯科用設備用のハンドル及びケーブルが含まれ得る。さらにかかる表面には、血液若しくは体液又は他の有害な生体材料が共通して接する（encountered）領域で見出されるチューブ及び他の機器の非無菌の外面が含まれ得る。

30

【0146】

本発明の組成物は、微生物コロニー形成に対する長期間保護を与えるのに、及び装置関連の感染の発生率を低減するのに、これらの医療装置の表面上又はこれらの医療装置内で使用することができる。これらの組成物を、抗菌剤（例えば抗生物質剤）と組合せて医療装置のためのコーティングに組み込むこともできる。かかる組合せは、この物質が装置-微生物界面に阻止濃度で与えられていれば、初期のコロニー形成細菌を死滅又は阻害させ、かつ装置関連の感染を予防するのに十分である。

40

【0147】

本発明の組成物を、ポリマー合成段階又は装置製造段階で、医療装置のポリマーマトリクスに直接組み込むことができる。組成物を医療装置ポリマーに共有結合させることもできる。医療装置をコーティングするこれらの及び多くの他の方法は当業者には明らかである。

【0148】

50

本発明の教示に従って処理することができるさらなる表面には、水精製、水貯蔵及び水送達に關与する物品、並びに食品加工に關与する物品の内面及び外面が含まれる。このため本発明は、その内容物の保存期間を延長するために、食品容器又は飲料容器の固体表面をコーティングすることを想定している。

【0149】

また健康に關連する表面には、栄養摂取、公衆衛生又は疾患予防の提供に關与する家庭用品の内面及び外面が含まれ得る。このため、本発明の組成物は、外面からの疾患を引き起こす微生物の除去に使用することができる。これらとして例えば、家庭用食品加工設備、育児用材料、タンポン、石鹸、洗剤、健康製品及びスキンケア製品、家庭用クリーナー並びに便器が挙げられる。

10

【0150】

表面は、研究用品であってもよく、顕微鏡スライドガラス、培養フード、ペトリ皿、又は当該技術分野で既知の任意の他の好適な種類の組織培養器又は容器が挙げられるが、これらに限定されない。

【0151】

本願の発明者らは、防汚剤としての本発明の組成物の使用も想定している。

【0152】

本明細書中で使用される「防汚剤」という用語は、単細胞生物の付着から水中の表面を保護するのに使用される化合物を表す。これらの単細胞生物としては、細菌及び真菌等の微生物が挙げられる。

20

【0153】

これらの水中の表面は任意の浸水表面を含み、これには船ノボートの船体（すなわち船又はボートのボディ又はフレーム）、潜水艇、航行援助施設（navigational aids）、スクリーン、網、構造物（constructions）、浮遊する又は据え付けられた海上プラットフォーム（例えばドック）、ブイ、信号設備、及び海水又は塩水に接する物品が含まれる。他の水中の表面は海水に曝された構造物（structures）を含み、これには杭、海洋マーカー、ケーブル及びパイプのような海中伝導装置（conveyances）、漁網、バルクヘッド、冷却塔並びに水中で動作する任意の装置又は構造物が含まれる。

【0154】

本発明の組成物を、不要な海洋汚損を制限するのに海洋コーティングに組み込むことができる。このため、本発明の防汚剤を、毒性材料（例えば重金属）を含有せず、かつそれらの有効性を保持するように配合することができる。本発明の防汚塗布剤はさらに、結合剤（複数可）、顔料（複数可）、溶媒（複数可）及び添加剤（複数可）を含有してもよい。

30

【0155】

使用され得る溶媒の例としては、キシレン及びトルエン等の芳香族炭化水素；ヘキサン及びヘプタン等の脂肪族炭化水素、酢酸エチル及び酢酸ブチル等のエステル；N-メチルピロリドン及びN,N-ジメチルホルムアミド等のアミド；イソプロピルアルコール及びブチルアルコール等のアルコール；ジオキサン、THF及びジエチルエーテル等のエーテル；並びにメチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン及びメチルイソアミルケトン等のケトンが挙げられる。溶媒を単独又はそれらを組み合わせて使用してもよい。

40

【0156】

使用され得る結合剤の例としては、アルキド樹脂、アクリル又はビニルエマルション、ポリウレタン樹脂、エポキシ樹脂、シリコン系樹脂、アクリル樹脂、無機ケイ酸系樹脂、ビニル樹脂、特に塩化ビニルノ酢酸ビニルコポリマー及びロジンが挙げられる。

【0157】

使用され得る顔料の例としては、二酸化チタン、酸化第一銅、酸化鉄、タルク、アルミニウムフレーク、マイカフレーク、酸化第二鉄、チオシアン酸第一銅、酸化亜鉛、酢酸メタヒ酸第二銅、クロム酸亜鉛、ジメチルジチオカルバミン酸亜鉛、エチレンビス（ジチオカルバミン酸）亜鉛及びジエチルジチオカルバミン酸亜鉛が挙げられる。

50

【 0 1 5 8 】

コーティング組成物に組み込まれ得る添加剤の例としては、除湿剤、湿潤／分散剤、沈降防止剤、皮張り防止剤、乾燥／硬化剤、損傷防止剤 (anti-marring agents)、並びに安定剤及び消泡剤としてコーティング組成物に通常用いられる添加剤が挙げられる。さらに、海水に比較的不溶性である任意の抗生物質を防汚海洋塗布剤と共に使用することができる。

【 0 1 5 9 】

海洋防汚塗布剤を調製する方法は、特許文献 4、特許文献 5、特許文献 6、特許文献 7、及び特許文献 8 で詳細に説明される。

【 0 1 6 0 】

本発明の組成物は、化粧品に抗菌特性を与え、製品を傷めるのを予防するのに使用することもできる。

【 0 1 6 1 】

組成物はさらに、例えば歯磨き粉、口内洗浄液又はチューイングガムに組み込むことにより抗菌効果を口、歯及び歯肉に与えるのに使用することができる。まとめると、本発明の教示は、水生生物及びコケ等の生物から単離した広範な新規の接着防止剤を示している。微生物バイオフィルム形成の初期の弱い段階をもたらす能力と共に、これらの作用因子の広範囲にわたる接着防止 (例えばグラム陽性細菌及びグラム陰性細菌の接着を阻害する) 効果により、これらの作用因子がバイオフィルム形成防止剤の有力候補となる。さらに、本明細書に記載の接着防止剤はクローン可能であり (clonable)、変更及び大量生産することができる。さらにその安定性 (すなわち環境条件に対する耐性) により、これらの作用因子が幅広い用途に好適となる。

【 0 1 6 2 】

本発明のさらなる目的、利点及び新規の特徴は、限定を意図しない以下の実施例を検討することで当業者に明らかになる。さらに、上記に詳述され、かつ特許請求の範囲の項で特許請求される本発明の様々な実施形態及び態様のそれぞれは、以下の実施例における実験的裏づけを見出している。

【 0 1 6 3 】

一般的に、本明細書中で使用される命名法及び本発明で用いられる検査法としては、分子学的技法、生化学的技法、微生物学的技法及び組み換え DNA 技法が挙げられる。かかる技法は文献で完全に説明される。例えば、非特許文献 27、非特許文献 28、非特許文献 29、非特許文献 30、非特許文献 31、非特許文献 32、特許文献 9、特許文献 10、特許文献 11、特許文献 12、及び特許文献 13 に記載される方法、非特許文献 33、非特許文献 34、非特許文献 35、非特許文献 36 を参照されたい。利用可能なイムノアッセイが特許文献及び科学文献で広範に記載されており、例えば特許文献 14、特許文献 15、特許文献 16、特許文献 17、特許文献 18、特許文献 19、特許文献 20、特許文献 21、特許文献 22、特許文献 23、特許文献 24、特許文献 25、特許文献 26、特許文献 27、特許文献 28、及び特許文献 29、非特許文献 37、非特許文献 38、非特許文献 39、非特許文献 40、非特許文献 41、非特許文献 42 及び非特許文献 43、非特許文献 44 (それらは全て、本明細書中で完全に説明されるかのように参照により援用される) を参照されたい。他の一般的な参考文献が本明細書を通して与えられる。それらの文献中の処置は、当該技術分野で既知であると考えられ、読者の便宜のために与えられる。それらの文献に含まれる全ての情報は参照により本明細書中に援用される。

【 実施例 】

【 0 1 6 4 】

これより、以下の実施例を参照して、上述の記載と共に、非限定的に本発明を説明する。

【 0 1 6 5 】

実施例 1 : アイプタシア・アネモネから抽出した活性画分の MS / MS 分析

アイプタシア・プルチェラの粗抽出物 (全生物) を Sephadex G - 10 カラム

10

20

30

40

50

で分離し、接着防止／バイオフィーム形成防止活性を共に示す２画分が得られた（図１３）。

【０１６６】

Sephadex G-10 で得られた高分子画分の Sephadex G-75 による再クロマトグラフィにより、高分子画分及び低分子画分を表す２つのメインピークが得られた（図１４）。

【０１６７】

2 ml / 分の流速での 0.1% TFA 中のアセトニトリルの直線勾配における（５分～７５分で 3%～80%）G-75 カラムで得られた低分子画分の c-18 カラムによる逆相高速液体クロマトグラフィ（RP-HPLC）分離により、緑膿菌 ATCC 27853 に対する接着防止化合物として幾つかの活性画分が得られた。画分を２分毎に回収した（図１５）。

【０１６８】

活性画分を全てトリプシンにより消化し、Q to f Premier (Waters) 及び LTQ-Orbitrap (Thermo) での LC-MS/MS により分析し、nr データベースの真核生物部分に対して Pep-Miner 及び Sequest ソフトウェアにより同定した。72.3% アセトニトリルで溶出した活性画分（赤色の矢印で示された）がウメボシイソギンチャク由来のイクイナトキシン５に類似していることが分かった。

【０１６９】

実施例 2：イソギンチャク細胞毒素の保存領域の同定

動物組織由来のゲノム DNA の単離に関する製造業者のプロトコルに従ってウィザードゲノム DNA 精製キット (Promega、USA) を使用して、25 mg のアイプタシア・プルチェラ及びアネモニア・ビリダンス (Anemonia viridans) から精製鋳型 DNA を調製した。Reddy Mix PCR マスターミックス (ABgene, UK) を使用して以下のプロトコルによってアイプタシア・プルチェラ及びアネモニア・ビリダンス由来の 500 ng の精製鋳型 DNA で PCR を行った：95 - 5 分（95 30 秒、52 30 秒及び 72 1 分）× 35、72 10 分。

【０１７０】

プライマー Eqt-F (GTR TCG ACA ACG AGT CRG G (配列番号 22)) 及び Eqt-R252 (TGA CAT YCC ACC AGT TGC TG (配列番号 23)) をそれぞれ最終濃度が 0.5 μM になるまで反応混合物に添加した。

【０１７１】

約 250 bp サイズの DNA 単位複製配列がもたらされた陽性 PCR 反応のものを DNA シークエンシングにかけた。

【０１７２】

アイプタシア・プルチェラ由来の PCR 単位複製配列が以下の 265 bp 配列を与えた：G T G T C G C C A A C G A G T C G G G A T G C A C T T G G G A A A A G C C A A A T A C A T A C T T C T T C T C T G G T A C T G A G G T A T A A A G T G C C T C C C T C T A A A G C T T G A G A A T A A A A A A G C A C T T T T G T A C G G C C C A C G T A A G A C A A C A G G G C C T G T T G C C A C G G G A G C T G T T G G A G T G C T C A C T T A C A A A A T G T T G T G C A C C A A T G A G A C G A A C A C T C T G G C T G T T C T T T T C A G T G T A C C C T T C G A C T A C A A C T T G T A C A G C A A C T G G T G G A A A T G T C A A (配列番号 50)

【０１７３】

上記のポリヌクレオチド配列によりコードされる予測アミノ酸配列と Gene Bank における既知のタンパク質配列との BLASTx 比較が以下の結果を与えた：溶血性毒素 [フサウンバチイソギンチャク (Actinaria villosa)]、P s T X - 20 A [ウンバチイソギンチャク (Phyllodiscus semoni)]、細胞溶解素 I 前駆体 [サガルティア・ロゼア (Sagartia rosea)] 及びイクイナトキシン I V 受容体 [ウメボシイソギンチャク] (

アクセッション番号：B A D 7 4 0 1 9 . 1、B A C 4 5 0 0 7 . 1、A A P 0 4 3 4 7 . 1 及び A F 0 5 7 0 2 8 _ 1) 等の他のイソギンチャク細胞毒素に対する同一性 = 5 4 / 8 8 (6 1 %)、陽性 = 6 2 / 8 8 (7 0 %)。

【 0 1 7 4 】

関連のペプチド配列 [F S V P F D Y N L Y S N W W] (配列番号 5 1) がアイプタシア配列に現れる。

【 0 1 7 5 】

アネモニア・ビリダンス由来の P C R 単位複製配列が以下の 2 5 4 b p 配列を与えた：
T G T G T C G A C A A C G A G T C g G G C a a g a c g t G g a C C G C A n t g a
a C A C A T A C T T C C G T T C T G G c A C C T C T G A T n T C r T C C T T C C
C C A T A C A G T T C C A C A T G G T A A G G C A C T G C T C T A C A A C G G T
C A G A A A G A T C G T G G T C C A G T T G C G A C T G G C G t g G T T G G A G
T A C T T G C T T A T G c C A T G A G C g A T G G A A A C A C C C t G G C C G T
T T T g T T C A G C r T T C C C T a T G A C T A T A A C C t G T A C A G C A A C
T G G T G G A A T G T C A A (配列番号 5 2)

【 0 1 7 6 】

Gene Bank における既知のヌクレオチド配列との B L A S T n 比較により、対応においてイクイナトキシシン 5 [アクセッション番号：A E U 5 1 9 0 0] に対して 9 7 %、イクイナトキシシン 4 [アクセッション番号：A F 0 5 7 0 2 8] に対して 9 6 % 及びイクイナトキシシン 2 [アクセッション番号：A E U 4 1 6 6 1] に対して 9 5 % の類似性もたらされた。

【 0 1 7 7 】

第 2 の陽性 O R F の翻訳に基づく予測アミノ酸配列が以下のアミノ酸配列を与えた：
C R Q R V G M H L G K A K Y I L L L W Y * G I K C L P L K L E N K K A L L Y G P
R K T T G P V A T G A V G V L T Y K M L C T N E T N T L A V L F S V P F D Y N L
Y S N W W K C Q (配列番号 5 3 及び 6 2)

【 0 1 7 8 】

実施例 3：合成ペプチドの活性比較

固相方法を用いて以下で挙げられたペプチドを合成し、Pepttron Inc. (Taejeon, Korea) により 9 0 % 尺度まで精製を行った。

【 0 1 7 9 】

2 0 μ l のジメチルスルホキシド (D M S O) を用いてペプチドを溶解し、再蒸留水で 5 m g / m l 濃度まで希釈した。さらなる希釈をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で行った。

【 0 1 8 0 】

5 0 0 μ g / m l ~ 0 . 5 μ g / m l の範囲のペプチド濃度でアシネトバクター・バウマンニ及び緑膿菌 A T C C 2 7 8 5 3 の臨床分離株において以下の合成ペプチドの活性を研究した。適切な濃度まで希釈したペプチドを細菌と共に 2 4 時間 ~ 4 8 時間インキュベートした。

【 0 1 8 1 】

細菌接着バイオアッセイにおいて、バイオフィルムを 9 6 ウェルの丸底ポリスチレンプレートで成長させた。要するに、1 8 0 μ l の一晚培養物を P B S で希釈した適切なペプチドが 2 0 μ l 入っているウェルに加えた。3 7 ° C で 2 4 時間のインキュベーションの後、それぞれのウェルを水で洗浄し、2 5 0 μ l のクリスタルバイオレット溶液を用いて染色した。それから水で徹底的に洗い流すことにより染料を取り除いた。付着細胞の定量化のために、クリスタルバイオレットを 2 5 0 μ l の 1 % ドデシル硫酸ナトリウム (S D S) 中で可溶化し、吸光度を 5 9 5 n m で測定した。

C M F S V P F D Y N W Y S N W W C (配列番号 3 2) A b a c Z - 1 7 C

A c - M F S V P F D Y N W Y S N W W - N H 2 (配列番号 5 4) A b a c Z - 1 5

C F S V P F D Y N W Y S N W W C (配列番号 5 5) A b a c Z - 1 6 C

F D Y N W Y (配列番号 5)

A b a c Z - 6

C F D Y N W Y C (配列番号 5 6)

A b a c Z - 8 C

【 0 1 8 2 】

結果を図 1 ~ 図 1 2 に示す。図 1、図 3、図 5 及び図 7 から分かるように、上記ペプチドは細菌を死滅させなかった、又は細菌の成長を阻害しなかった。図 2、図 4、図 6、図 8 及び図 1 0 ~ 図 1 2 は該ペプチドがバイオフィルムの形成を防いだことを実証している。

【 0 1 8 3 】

実施例 4：好ましいペプチドの同定

本発明による最も活性のある環状ペプチドを同定するために、ペプチド精製器を備えた手動の P a r a l l e l P e p t i d e 合成装置を用いて、互いに長さ及び環化戦略が異なるペプチドを生成する。マイクロプレート及びフローセルアッセイにおいて接着防止活性に関してそれぞれのペプチドをスクリーニングし、高活性ペプチドの選択を行う。幾つかのバージョンのペプチドのコンピュータモデリングを用いて、活性化化合物の選択を最適化する。

【 0 1 8 4 】

より感度のよいスクリーニングのために、Promega (USA) の B a c T i t e r - G l o 微生物細胞生存アッセイを用いてバイオアッセイをスケールアップする。この方法は発光をベースにより感度のよい分光技法を利用する。

【 0 1 8 5 】

様々な環化戦略を用いて、生体活性が満足のいくものである直鎖類似体由来の最適化環状ペプチドを得る。図 1 6 A は乳化アームを有する環状リードの一般化構造を示している。直鎖類似体はファーマコフォアと規定される疎水性コア (6 アミノ酸) を有する 1 4 m e r ペプチドである。環状リードを調製し、このファーマコフォアを保存して、それからポリエチレン、ポリプロピレン、テフロン (登録商標) 等の乳化アーム (疎水性部分) を加えることにより、疎水性ポリマー表面への吸収能がもたらされる (図 1 6 B)。

【 0 1 8 6 】

エピトープマッピング、e s c a n n i n g 及び C y c l o s c a n 法を、所望の生体活性を保有するより短く、よりコスト効率がよいペプチドを明らかにするのに用いる。

【 0 1 8 7 】

9 H - フルオレン - 9 - イルメトキシカルボニル固相ペプチド合成 (F m o c S P P S) を用いて環状リードを調製する。

【 0 1 8 8 】

図 1 7 で示されるような代表的な手法に従って、ジクロロメタン (D C M) 中の N , N - ジイソプロピルエチルアミン (D I E A) を用いたクロロトリチル (chlorotrityl) (C l - T r t) 樹脂で、又はカップリング試薬として O - ベンゾトリアゾール - N , N , N ' , N ' - テトラメチル - ウロニウム - ヘキサフルオロ - ホスフェート (H B T U) を用いた R i n k A m i d e で第 1 の保護アミノ酸を縮合する。

【 0 1 8 9 】

N - メチル - 2 - ピロリジノン (N M P) 中の 2 - (1 H - 7 - アザベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 1 , 1 , 3 , 3 - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートメタンアミニウム (H A T U) 又はベンゾトリアゾール - 1 - イル - オキシトリピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート (P y B o P) 又は D I E A による標準的な F m o c プロトコルを用いて、次のカップリングを行う。酢酸 / N - メチルマレイミド / 塩化ジエテン (diethene chloride) (A c O H / N M M / D C E) カクテルを用いた P d - トリフェニルホスフィン (テトラキス) によりアリルオキシカルボニル (a l l o c) 基を脱保護する。

【 0 1 9 0 】

標準的なカップリング反応として (アミド結合が形成される場合) 又は酸素で泡立たせることにより (ジスルフィド架橋が形成される場合) 環化工程を行う。当該技術分野で既

10

20

30

40

50

知の他の種類の環化を行ってもよい。

【0191】

C1 - Trt樹脂の場合、30分間1, 2 - エタンジチオールが存在下で、並びにRink Amideの場合、95% TFA、TIS及びH₂Oの存在下で1:98:1のトリフルオロ酢酸:ジクロロメタン:トリ - イソ - プロピルシラン (TFA:DCM:TIS) による処理によって樹脂からペプチドを切り出す。

【0192】

粗生成物溶液 (AcOH/H₂O 1:1) を分取HPLC又はMPLCにより精製し純粋な環状ペプチドを得る。純度を分析HPLCにより決定する。構造をLC-MS及びアミノ酸分析により確認する。

10

【0193】

次の段階は吸収特性を環状ペプチドリードに導入するための疎水性アームの連結を伴う。標準的なSPPSプロトコルを用いてこのアームを連結する。

【0194】

図17は乳化アームを有する環状ペプチドリードの展開プロセスを概説するフローチャートを示している。

【0195】

実施例4: 水又は液体培地の処理

任意で好ましくは、水及び/又は液体培地、又はこれらを含む、例えば逆浸透フィルター及び/又は濾過装置若しくは濾過システムが挙げられるがこれらに限定されないシステム若しくは装置を処理するのに上記のペプチド及び/又は組成物及び/又は生物を使用してもよい。

20

【0196】

濾過することなくフローセルでポリアミドクーポンを使用するバイオフィルム形成に対するイソギンチャク目抽出物の効果を以下の通りに試験する。RO (逆浸透) 活性層と同様のポリアミド表面上で共焦点顕微鏡用の (dedicated for) フローセルでバイオフィルム成長の効果を分析する。モデル株と逆浸透 (RO) 膜クーポンから採取した様々な濃度 (ナノグラム/ml ~ マイクログラム/ml) の抽出物を添加した、地中海の選択場所に位置した実際の微生物接種材料との両方を用いて、二チャンネルフローセル (FC270、Biosurface Technologies, Montana, USA) を操作する。フローセルにおけるフローレ
ジームは層状であり、典型的なRO操作フロー条件に類似している。モデル株では、海水合成培地を決定し (非特許文献45「最先端の逆浸透脱塩」及び非特許文献46「IDEレポート」を参照されたい)、細胞付着バイオフィルム成長実験に使用する。Palmachimにおいて脱塩植物から単離された微生物共同体では、実際の海水を微生物付着実験及びバイオフィルム成長実験の培地として用いる。用いられるモデル株はビブリオ・フィッシャーリ (Vibrio fischeri) 及びカウロバクター・クレセンタスである。二チャンネルフローセルでは、1つのチャンネルは抽出物が添加されており、もう1つは (例えば抽出物がエタノール中に溶解する場合) 溶媒のみが培地に添加された対照としての役割を果たす。

30

【0197】

生細胞、死細胞及び細胞外ポリマー物質 (EPS) を蛍光プローブで染色し (EPSにおいて様々な多糖成分 (polysaccharide constituents) をプロービングするのに様々な蛍光標識レクチンを使用する)、レーザスキャニング共焦点顕微鏡 (LSCM) で可視化することで、様々な時点 (実験の最大14日目) でフローセルバイオフィルムを顕微鏡分析する。Imaris bitplane及びCOMSTAT (非特許文献47「緑膿菌のバイオフィルム展開の統計分析: 収縮運動、細胞間シグナル伝達及び静止期 因子発現に
関与する遺伝子の突然変異の影響」、非特許文献48等の画像処理分析ソフトウェアを用いて、顕微鏡分析を行う。

40

【0198】

バイオフィルムの接着性及び稠密度に対して大きな効果があるカルシウムもモニタリングし、Fura-2等のカルシウム特異的な蛍光色素を用いてLSCMで可視化する (非

50

特許文献49「蛍光性が大きく改善した新世代のCa²⁺インディケータ」及び非特許文献50「バイオフィルムの二光子レーザスキャニング顕微鏡検査に関する蛍光色素の評価」参照）。

【0199】

異なるペプチドに共有結合したQCM-D表面修飾結晶を用いて様々な種類のEPC/細菌の接着を分析することにより防汚特性も調べる。

【0200】

QCM-Dは、明確な配置及び流体力学的特徴でフローセルの中に収納された超感度質量センサ（シリカコーティングした水晶振動子（silica-coated quartz crystal））、標識を必要としない質量吸着のリアルタイムモニタリングを可能にする設計を利用している。水晶振動子に取り付けられた電極に電圧を印加し、圧電型水晶振動子を1nm～2nmの振幅で横方向に振動させる。沈着（吸着）が結晶表面で起こると、結晶の振動周波数が変動する。吸着された質量を決定するために周波数変動をモニタリングすることに加えて、吸着層の厚さ及び構造（structural conformation）を、1回の振幅サイクル当たりのシステム内での総エネルギー損失の合計である散逸エネルギーを同時にモニタリングすることにより抽出できる。興味深いことに、様々な環境条件（すなわち二価カチオン濃度の変化）下で様々な種類のEPSの吸着及び接着（すなわち多糖/タンパク質含有量の変化）を測定することに加えて、QCM-Dは沈降ナノ層の粘弾特性、構造変化及び厚さを明らかにすることもできる。

【0201】

実施例5：脱塩条件下での逆浸透生物汚損に対する活性ペプチドの効果

脱塩条件下での逆浸透生物汚損に対するイソギンチャク目抽出物の効果を決定する。

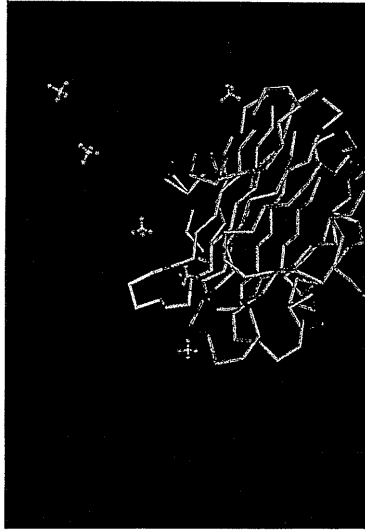
【0202】

2つのRO（逆浸透）ベンチスケールユニットを海水の脱塩のために操作し、候補モデル株及びGES脱塩植物（上述のような）から単離した微生物共同体の両方を用いた生物汚損実験を合成海水培地及び実際の海水の両方で行う。Dow-Filmtecの市販のフラットシート膜SW-30をこれらの生物汚損実験に使用する。プロセス条件の特定の評価基準を得る：透過流束、全有機炭素（TOC）、浸透溶液及びブライン溶液中の酸素濃度、酸素取り込み速度、並びに膜による様々なイオン及びカチオンの排除。様々なバイオフィルム成分を分析する。生物汚損層の化学分析にはタンパク質、炭水化物、脂質及びDNAの特徴付けが含まれる。顕微鏡観察及び分析を上述のように行う。

【0203】

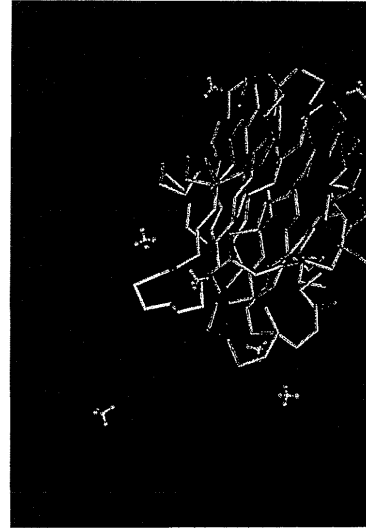
本発明は限られた数の実施形態に関して説明しているが、本発明の多くの変更、修正及び他の適用を為すことができることを理解されたい。

【図 1】



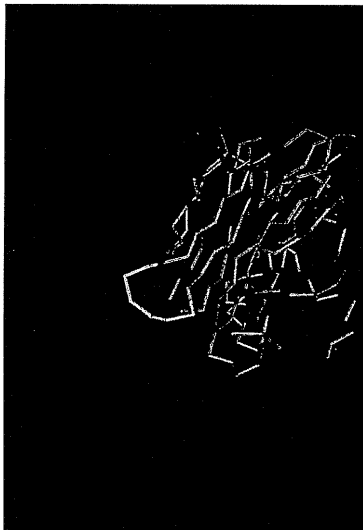
水溶性状態の孔形成細胞溶解素スチコリ
シン I i の 1GWY の A 鎖の結晶構造

【図 2】



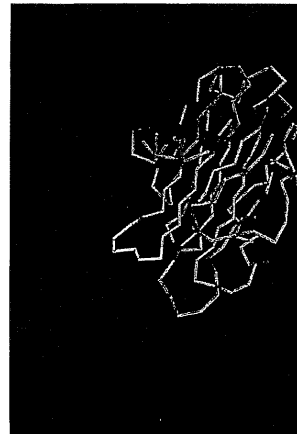
水溶性状態の孔形成細胞溶解素スチコリ
シン I i の 1GWY の B 鎖の結晶構造

【図 3】



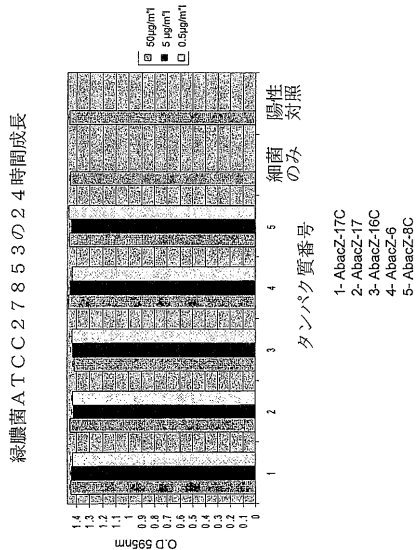
真核性の孔形成細胞溶解素イクイナトキ
シン I i の 1KDG の A 鎖の溶液構造

【図 4】

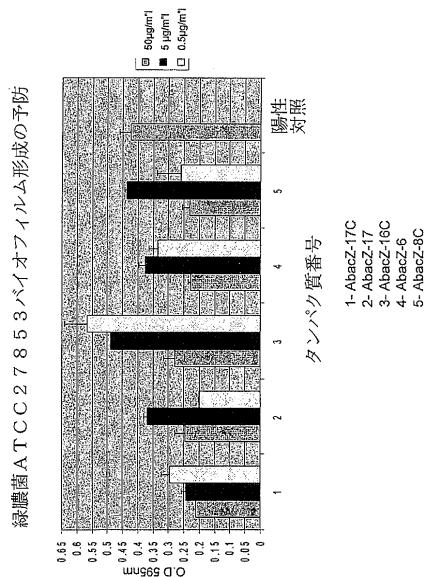


イクイナトキシン I i の 8-69 二重
シス테인突然変異体の 1TZZ の A
鎖の結晶構造

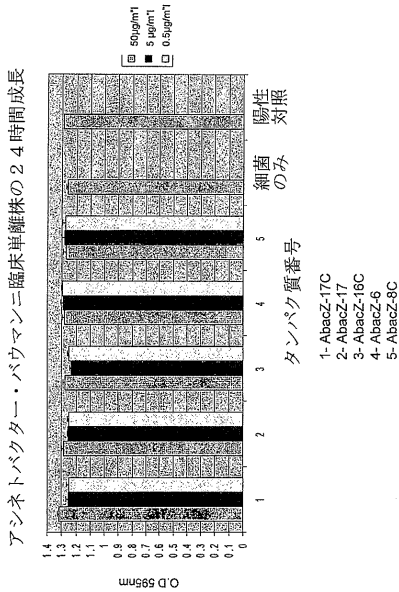
【図 5】



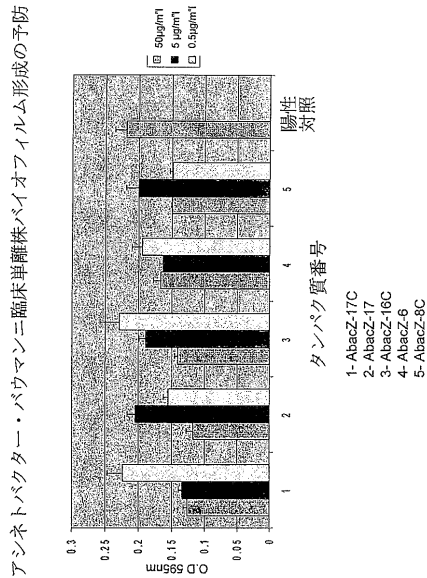
【図 6】



【図 7】

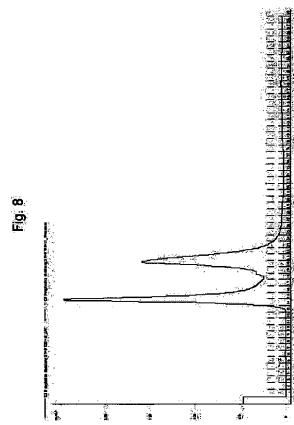


【図 8】



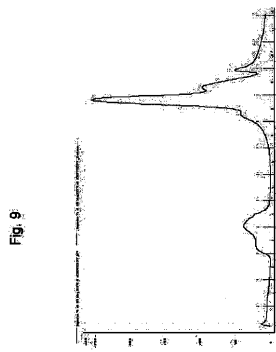
【図 13】

Figure 13

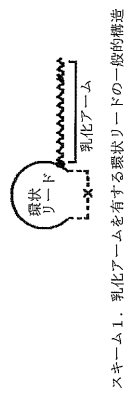


【図 14】

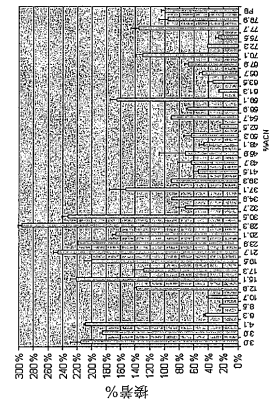
Figure 14



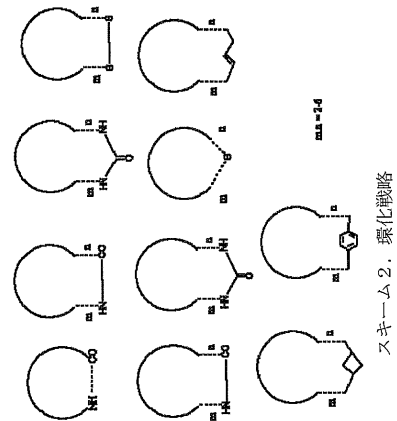
【図 16 A】



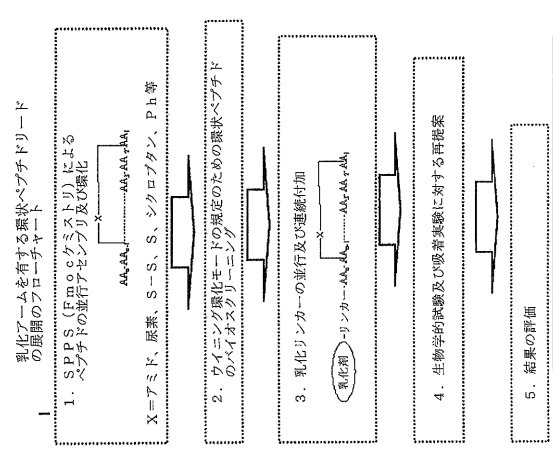
【図 15】



【図 16 B】



【図 17】



【配列表】

0005676451000001.xml

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
C 0 2 F	1/44	(2006.01)	A 6 1 L	29/00	B
B 0 1 D	61/02	(2006.01)	C 0 2 F	1/50	5 1 0 A
B 0 1 D	61/04	(2006.01)	C 0 2 F	1/50	5 3 2 C
B 0 1 D	65/08	(2006.01)	C 0 2 F	1/50	5 3 2 D
C 0 7 K	14/435	(2006.01)	C 0 2 F	1/50	5 6 0 E
C 0 7 K	14/46	(2006.01)	C 0 2 F	1/44	D
C 0 7 K	14/415	(2006.01)	B 0 1 D	61/02	5 0 0
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	B 0 1 D	61/04	
			C 0 2 F	1/50	5 1 0 E
			B 0 1 D	65/08	
			C 0 7 K	14/435	
			C 0 7 K	14/46	
			C 0 7 K	14/415	
			C 1 2 N	15/00	A

- (72)発明者 ズロトキン, アミル
 イスラエル国, 5 2 6 2 1 テル ハシヨメール, シバ メディカル センター, ザ テクノロジ
 ー トランスファー カンパニー オブ ハイム, テル ハシヨメール メディカル リサーチ,
 インフラストラクチャ アンド サービスーズ リミテッド内
- (72)発明者 ケステンボイム, ヘン
 イスラエル国, 5 2 6 2 1 テル ハシヨメール, シバ メディカル センター, ザ テクノロジ
 ー トランスファー カンパニー オブ ハイム, テル ハシヨメール メディカル リサーチ,
 インフラストラクチャ アンド サービスーズ リミテッド内

審査官 櫛引 明佳

- (56)参考文献 国際公開第 0 3 / 0 5 7 7 0 8 (W O , A 1)
 米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 7 2 6 8 4 (U S , A 1)
 特表 2 0 1 0 - 5 4 0 4 3 1 (J P , A)
 特表 2 0 0 5 - 5 2 0 8 0 7 (J P , A)
 Database UniProt[Online] Accession no:Q9ADRO
 Database UniProt[Online] Accession no:A4ANN9
 Database UniProt[Online] Accession no:A9TTZ8
 Database UniProt[Online] Accession no:P81662
 Database UniProt[Online] Accession no:A6POV6
 Database UniProt[Online] Accession no:A9V9E9
 Database UniProt[Online] Accession no:A6LV00

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
 C 1 2 N 1 5 / 0 0
 C 0 7 K 7 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
 U n i P r o t / G e n e S e q
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 P u b M e d