

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-100969
(P2017-100969A)

(43) 公開日 平成29年6月8日(2017.6.8)

| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|-------------------------|---------------------|-------------|
| A 6 1 K 38/00 (2006.01) | A 6 1 K 37/02 Z N A | 4 C O 8 4 |
| A 6 1 P 33/06 (2006.01) | A 6 1 P 33/06 | 4 H O 4 5 |
| A 6 1 P 33/02 (2006.01) | A 6 1 P 33/02 | |
| C O 7 K 14/46 (2006.01) | C O 7 K 14/46 | |

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 11 頁)

| | | | |
|-----------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2015-233632 (P2015-233632) | (71) 出願人 | 504300088 国立大学法人帯広畜産大学 北海道帯広市稲田町西2線11番地 |
| (22) 出願日 | 平成27年11月30日 (2015.11.30) | (74) 代理人 | 230104019 弁護士 大野 聖二 |
| | | (74) 代理人 | 100105991 弁理士 田中 玲子 |
| | | (74) 代理人 | 100119183 弁理士 松任谷 優子 |
| | | (74) 代理人 | 100114465 弁理士 北野 健 |
| | | (74) 代理人 | 100149076 弁理士 梅田 慎介 |

最終頁に続く

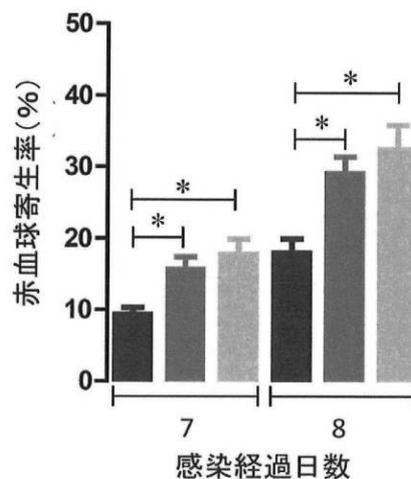
(54) 【発明の名称】 抗原虫薬

(57) 【要約】

【課題】 新規な抗原虫薬の提供。

【解決手段】 - ディフェンシン130 (- D e f e n s i n 1 3 0) 及び/又はその部分ペプチドを有効成分として含有する抗原虫薬を提供する。 - ディフェンシン130 (- D e f e n s i n 1 3 0) 及び/又はその部分ペプチドは、(1) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド、(2) 配列番号1記載のアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド、(3) 配列番号1記載のアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチドのいずれか1以上とできる。

【選択図】 図2



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- ディフェンシン 130 (- D e f e n s i n 1 3 0) 及び / 又はその部分ペプチドを有効成分として含有する抗原虫薬。

【請求項 2】

以下の (1) ~ (3) のポリペプチド及び / 又はその部分ペプチドのいずれか 1 以上を含有する請求項 1 記載の抗原虫薬。

(1) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

10

(3) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列に対して 8 0 % 以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

【請求項 3】

以下の (4) ~ (6) のポリペプチドのいずれか 1 以上を含有する請求項 2 記載の抗原虫薬。

(4) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(5) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

20

(6) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列に対して 8 0 % 以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

【請求項 4】

以下の (7) ~ (9) のポリペプチドのいずれか 1 以上を含有する請求項 2 記載の抗原虫薬。

(7) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(8) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

(9) 配列番号 4 記載のアミノ酸配列に対して 8 0 % 以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

30

【請求項 5】

抗マalaria薬である請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗原虫薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原虫薬に関する。より詳しくは、 - ディフェンシン 130 (- D e f e n s i n 1 3 0) 及び / 又はその部分ペプチドを有効成分として含有する抗原虫薬に関する。

【背景技術】

40

【0002】

マalariaは、マalaria原虫 (P l a s m o d i u m s p p .) に感染したハマダラカの吸血によって媒介される原虫感染症である。マalariaは、結核、後天性免疫不全症候群 (H I V) とともに、世界三大感染症の一つとなっている。全世界におけるマalaria感染者は年間約 2 億人、死亡者は約 6 0 ~ 7 0 万人とされている。

【0003】

マalariaにはワクチンが存在せず、マalaria罹患者の治療には抗マalaria薬が用いられる。クロロキン、スルファドキシム、ピリメタミン及びメフロキン等の様々な抗マalaria薬が開発されてきたが、これらの抗マalaria薬はいずれも耐性株の蔓延が問題となっている。多剤耐性マalariaの治療のために有効なキニーネに関しても、低感受性株の出現が東

50

南アジアやブラジルで報告されており、いまだマラリアの撲滅には至っていない。

【 0 0 0 4 】

マラリア原虫感染赤血球は、血中の単球から分化したマクロファージにより貪食され、排除される（非特許文献 1）。マクロファージに貪食された病原体は、ファゴソーム内で活性酸素やプロテアーゼ、陽イオン性ペプチド等によって破壊される（非特許文献 2）。

【 0 0 0 5 】

マクロファージが有するプロテアーゼ及び陽イオン性ペプチドは、様々な病原体を殺す働きがあり、これらに由来するペプチドを利用した創薬が試みられている。例えば、非特許文献 3 には、マクロファージが有するプロテアーゼであるエラスターゼ（MMP 12）が強力な殺菌作用を有し、これに由来するペプチドが、宿主に対する副作用なしに殺菌作用を示すことが報告されている。しかしながら、これまでに、マクロファージ内において抗原虫作用を担う生体防御因子は特定されておらず、当該生体防御因子に由来するペプチドを利用した抗原虫薬の開発もなされていない。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【 0 0 0 6 】

【非特許文献 1】 Blood, 2000, 96(9), 3231 - 3240

【非特許文献 2】 Nature Reviews Microbiology, 2009, 7, 355 - 366

【非特許文献 3】 Nature, 2009, 460, 637 - 641

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

上述の通り、従来の抗マラリア薬では耐性株の蔓延あるいは低感受性株の出現が問題となっている。このため、従来の抗マラリア薬とは異なる機序によって作用する抗原虫薬の開発が求められている。

【 0 0 0 8 】

そこで、本発明は、新規な抗原虫薬を提供することを主な目的とする。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

30

上記課題解決のため、本発明は、以下の [1] ~ [1 0] を提供する。

[1] - ディフェンシン 130 (- Defensin 130) 及び / 又はその部分ペプチドを有効成分として含有する抗原虫薬。

[2] 以下の (1) ~ (3) のポリペプチド及び / 又はその部分ペプチドのいずれか 1 以上を含有する [1] の抗原虫薬。

(1) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

(3) 配列番号 1 記載のアミノ酸配列に対して 80 % 以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

40

[3] 以下の (4) ~ (6) のポリペプチドのいずれか 1 以上を含有する [2] の抗原虫薬。

(4) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(5) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列において 1 ~ 数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

(6) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列に対して 80 % 以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

[4] 以下の (7) ~ (9) のポリペプチドのいずれか 1 以上を含有する [2] の抗原

50

虫薬。

(7) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(8) 配列番号4記載のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

(9) 配列番号4記載のアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

[5] 抗マラリア薬である[1]～[4]のいずれかの抗原虫薬。

【0010】

[6] -ディフェンシン130(-Defensin130)及び/又はその部分ペプチドを有効成分として含有する原虫増殖阻害剤。 10

[7] 以下の(1)～(3)のポリペプチド及び/又はその部分ペプチドのいずれか1以上を含有する[1]の原虫増殖阻害剤。

(1) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号1記載のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

(3) 配列番号1記載のアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

[8] 以下の(4)～(6)のポリペプチドのいずれか1以上を含有する[2]の原虫増殖阻害剤。 20

(4) 配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(5) 配列番号2記載のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

(6) 配列番号2記載のアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

[9] 以下の(7)～(9)のポリペプチドのいずれか1以上を含有する[2]の原虫増殖阻害剤。

(7) 配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。 30

(8) 配列番号4記載のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

(9) 配列番号4記載のアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

[10] マラリア原虫の増殖を阻害する[6]～[9]のいずれかの原虫増殖阻害剤。

【0011】

本発明において、「原虫の増殖を阻害する活性(原虫増殖阻害活性)」とは、ある物質について、in vitro又はin vivoにおける赤血球への原虫の感染が、当該物質の存在下で、当該物質の非存在下に比して抑制されることを意味する。具体的には、in vitro又はin vivoにおいて一定期間原虫に曝露された赤血球における原虫の寄生率が、当該物質の存在下で、非存在下に比して5%以上、10%以上又は20%以上、好ましくは30%以上、40%以上、50%以上、より好ましくは60%以上、70%以上又は80%以上、さらに好ましくは90%以上、100%以上又はそれ以上減少することを意味する。 40

【発明の効果】

【0012】

本発明により、新規な抗原虫薬が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】マラリア原虫感染赤血球を貪食したマクロファージにおける -ディフェンシン 50

130発現量を測定した結果を示すグラフである（試験例1）。

【図2】in vivoにおいて - ディフェンシン130ペプチドの原虫増殖阻害活性を評価した結果を示すグラフである（試験例2）。図中、感染7日目及び8日目の結果は、左からDEFB130ペプチド投与群、スクランブルペプチド投与群及びPBS投与群を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

【0015】

10

[DEFB130]

本発明に係る抗原虫薬は、 - ディフェンシン130（DEFB130）タンパク及び/又はその部分ペプチド（DEFB130ペプチド）を有効成分として含有することを特徴とする。本発明者らは、DEFB130タンパクについて、その部分ペプチドがin vitro及びin vivoにおいて顕著な原虫増殖阻害活性を示すことを見出し、DEFB130タンパク及び/又はDEFB130ペプチドが原虫増殖阻害剤あるいは抗原虫薬として有用であることを明らかにした。

【0016】

本発明に係る抗原虫薬において、DEFB130タンパク及び/又はDEFB130ペプチドは、原虫増殖阻害活性を有する限りにおいて由来種は限定されず、ヒトの他、ラット、マウス、ハムスター、モルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ、ヒツジ等の有蹄目、イヌ、ネコ等のネコ目、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類であってよい。

20

【0017】

DEFB130タンパク及び/又はDEFB130ペプチドの由来種は、抗原虫薬を適用する種に応じて適宜選択することができ、好ましくは適用種と同じ種由来とされる。例えば、抗原虫薬をヒトに適用する場合は、ヒト由来のDEFB130タンパク等を用いるのが好ましい。

【0018】

DEFB130ペプチドは、原虫増殖阻害活性を有する限りにおいて、DEFB130タンパクの全長アミノ酸配列のうちの一部のアミノ酸配列を有する任意長のポリペプチドであってよい。

30

【0019】

本発明に係る抗原虫薬において、DEFB130タンパク及び/又はDEFB130ペプチドは、例えば、以下の(1)~(3)のいずれか1以上であってよい。配列番号1記載のアミノ酸配列は、ヒトDEFB130タンパクの全長アミノ酸配列である。

(1) 配列番号1記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

(2) 配列番号1記載のアミノ酸配列において1~数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

40

(3) 配列番号1記載のアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

【0020】

上記(2)に関し、「1~数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異ポリペプチド作製法により欠失、置換、挿入もしくは付加できる程度の数（好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、さらに好ましくは5個以下、最も好ましくは1又は2個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を意味する。

【0021】

タンパク質あるいはポリペプチドのアミノ酸配列中のいくつかのアミノ酸が、当該タン

50

パク質等の構造又は機能に有意に影響することなく容易に改変され得ることは、当該分野において周知である。さらに、天然に存在するタンパク質において、当該タンパク質の構造又は機能を有意に変化させない多型（ポリモルフィズム）が存在することもまた周知である。従って、「1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」には、公知の変異ポリペプチド作製法により人為的に変異を導入して得られる改変配列に加えて、天然に存在する多型配列も含まれる。

【0022】

アミノ酸配列の1個または数個のアミノ酸が置換する場合は、類似するアミノ酸残基間の保存的置換が好ましい。例えばアミノ酸は、その側鎖の性質に基づいて、疎水性アミノ酸（A, I, L, M, F, P, W, Y, V）、親水性アミノ酸（R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G, A, V, L, I, P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S, T, Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C, M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D, N, E, Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R, K, H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H, F, Y, W）に分類される。各群に分類されたアミノ酸は、相互に置換したときに、当該ポリペプチドの活性が維持される可能性が高いことが知られており、そのようなアミノ酸相互の置換が好ましい。例えば、グリシンとプロリン、グリシンとアラニンまたはバリン、ロイシンとイソロイシン、グルタミン酸とグルタミン、アスパラギン酸とアスパラギン、システインとスレオニン、スレオニンとセリン又はアラニン、リジンとアルギニン間での置換を挙げることができる。

【0023】

上記（3）に関し、配列同一性は、当該ポリペプチドが原虫増殖阻害活性を維持し得る限り特に限定されないが、50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上であってもよく、特に好ましくは90%以上、さらに特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上であってもよい。

【0024】

本発明に係る抗原虫薬において、DEFB130ペプチドは、好ましくは、以下の（4）～（6）のポリペプチドのいずれか1以上とされる。配列番号2記載のアミノ酸配列は、DEFB130タンパクの全長アミノ酸配列の23～79番目のアミノ酸配列に相当する。

（4）配列番号2記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

（5）配列番号2記載のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

（6）配列番号2記載のアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を示し、原虫の増殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

【0025】

上記（5）及び（6）に関して、「1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」及び配列同一性の用語の定義は、上記（2）及び（3）に関して上述した通りである。

【0026】

本発明に係る抗原虫薬において、DEFB130ペプチドは、より好ましくは、以下の（7）～（9）のポリペプチドのいずれか1以上とされる。配列番号4記載のアミノ酸配列は、DEFB130タンパクの全長アミノ酸配列の29～61番目のアミノ酸配列に相当する。

（7）配列番号4記載のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

（8）配列番号4記載のアミノ酸配列において1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、原虫の増殖を阻害する活性を有するポリペプチド。

（9）配列番号4記載のアミノ酸配列に対して80%以上の配列同一性を示し、原虫の増

10

20

30

40

50

殖を阻害する活性を有する活性を有するポリペプチド。

【0027】

上記(8)及び(9)に関して、「1～数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入もしくは付加されたアミノ酸配列」及び配列同一性の用語の定義は、上記(2)及び(3)に関して上述した通りである。

【0028】

[原虫]

本発明に係る抗原虫薬が対象とする原虫は、特に限定されないが、例えばマラリア、トリパノソーマ、イソスポーラ、ネオスポーラ、トキソプラズマ、クリプトスポリジウム、リーシュマニア、赤痢アメーバ、コクシジウム、サルコシスチス、ロイコチトゾーン、ピロプラズマ等の原虫が挙げられる。本発明に係る抗原虫薬は、これらのうち特にマラリア原虫(Plasmodium spp.)に好適に適用される。

10

【0029】

[医薬組成物]

本発明に係る抗原虫薬は、DEFB130タンパク及び/又はDEFB130ペプチドを有効成分として含有する。この医薬は、赤血球への原虫の感染を抑制することが可能であるので、原虫感染症の予防及び/又は治療のために好適に用いられ得る。

【0030】

本発明に係る抗原虫薬は、DEFB130タンパク及び/又はDEFB130ペプチドを単独で、又は溶解剤、増量剤、賦形剤あるいは担体と混合して、注射剤、錠剤、顆粒剤、細粒剤、散剤、カプセル剤、溶液剤、徐放剤等の製剤として用いることができる。溶解剤、増量剤、賦形剤あるいは担体などの添加剤は、薬剤学的に許容されるものが選ばれ、その種類および組成は投与経路や投与方法によって適宜決定され得る。例えば注射剤の場合、一般に食塩、グルコース、マンニトール等の糖類が望ましい。経口剤の場合、でんぷん、乳糖、結晶セルロース、ステアリン酸マグネシウム等が望ましい。

20

【0031】

本発明に係る抗原虫薬の投与経路は、経口的又は注射剤により非経口的に全身性に投与される。また、カテーテル等により遠隔的に投与してもよく、ステントやグラフトあるいは一体化させたステントグラフトに薬剤を結合させてもよい。さらに、体内に留置することにより徐放性に投与してもよい。特に経口投与が好ましい。

30

【0032】

本発明に係る抗原虫薬の投与量は、剤型の種類、投与方法、投与対象(動物を含む)の年齢や体重、症状等を考慮して決定されるものであるが、患者の症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量とされる。また、投与期間は患者の年齢、症状により適宜選択することができる。

【0033】

本発明に係る抗原虫薬は、抗原虫薬として既に臨床応用されている薬剤や研究段階にある薬剤を有効成分として含有していてもよい。臨床応用されている抗原虫薬としては、クロロキン、スルファドキシム、ピリメタミン、メフロキン及びキニーネ等が挙げられる。

【0034】

本発明に係る抗原虫薬は、他の態様として、上述した既に臨床応用されている薬剤や研究段階にある薬剤と組み合わせられて用いられるもの、あるいは組み合わせるものであってもよい。ここで、「組み合わせられて用いられる」とは、2以上の医薬のそれぞれを異なる時間に投与する場合、それぞれの医薬を同時に投与する場合を意味し、「組み合わせる」とは、2以上の医薬を含んで成る1種類の医薬組成物を投与する場合を意味する。前者の場合、2以上の医薬のそれぞれを同一の投与経路で投与してもよく、又は別の投与経路で投与してもよい。各医薬は、患者に対して症状を治癒するか、あるいは少なくとも部分的に阻止するために十分な量で投与される。また、投与期間は患者の年齢、症状により適宜選択することができる。

40

【実施例】

50

【 0 0 3 5 】

[試験例 1 : 抗原虫作用を有する生体防御因子のスクリーニング]

マクロファージ内において抗原虫作用を担う生体防御因子の同定を行った。

【 0 0 3 6 】

Ficoll Paque PLUS (GE Healthcare) を用いて末梢血から単球を単離し、IFN 及びGM-CSFを含むRPMI 1640培地 (Sigma) を用いて37 °C、8日間培養することにより、ヒト末梢血由来マクロファージを得た。マクロファージ (5×10^6 cells) を培養フラスコ内に用意し、マラリア原虫感染赤血球又は非感染赤血球 (1×10^8 cells) を混合し、37 °C、2時間共培養した。マクロファージからmRNAを抽出し、マイクロアレイチップ (Agilent Technologies) を用いて遺伝子発現解析を行った。

10

【 0 0 3 7 】

マラリア原虫感染赤血球を貪食したマクロファージにおいて、非感染赤血球を貪食したマクロファージに比して発現が上昇又は低下した遺伝子 (P value < 0.05, Fold change > 2.0) を168遺伝子 (上昇) 及び216遺伝子 (低下) 同定した。このうち、マラリア原虫感染赤血球を貪食したマクロファージにおいて特に高い発現を示す遺伝子としてDefensin 130 (DEFB130) を同定した。マイクロアレイチップ及びRT-PCRによるDEFB130の発現定量の結果を図1に示す。

【 0 0 3 8 】

[試験例 2 : DEFB130ペプチドの原虫増殖阻害活性の評価]

ヒトDEFB130の部分ペプチドを人工合成 (Eurofins scientific, Tokyo, Japan) し、in vitro及びin vivoにおいて原虫増殖阻害活性を評価した。DEFB130ペプチドのアミノ酸配列を配列番号2に示す。比較のため、ペプチドのアミノ酸組成を変化させず、アミノ酸の配列順序を入れ替えたスクランブルペプチド (配列番号3) を合成した。

20

【 0 0 3 9 】

熱帯熱マラリア原虫 (Plasmodium falciparum 3D7株、Dd2株又はHB3株) 感染赤血球を96ウェルプレートにヘマトクリット2%、寄生率1%となるように播種した。DEFB130ペプチド又はスクランブルペプチド (終濃度10 μ M ~ 1 mM) を添加し、3日後に寄生率を測定した。結果を表1に示す。スクランブルペプチドの50%原虫増殖阻害濃度 (IC₅₀) は > 200 μ Mであったが、DEFB130ペプチドのIC₅₀は43 ~ 49 μ Mであった。

【 0 0 4 0 】

【表1】

30

| | IC _{50s} (μ M) | | |
|-------------------|-------------------------------|------------|------------|
| | 3D7 株 | Dd2 株 | HB3 株 |
| DEFB130 ペプチド | 47.12±2.22 | 43.53±3.81 | 49.22±3.16 |
| スクランブルペプチド | >200 | >200 | >200 |
| DEFB130 ペプチド N 末端 | 93.02±0.88 | 91.31±2.09 | 90.55±1.63 |
| DEFB130 ペプチド C 末端 | >200 | >200 | >200 |

【 0 0 4 1 】

SPF 7週齢メスC57BL/6系統マウス (Clea, Tokyo, Japan) に、マウスマラリア原虫 (PI

50

asmodium yoelii 17 XNL株) 感染赤血球 1.0×10^7 個を腹腔内投与し、感染4, 5, 6日経過後にDEFB130ペプチド又はスクランブルペプチドを静脈注射 (5 mg/kg body weight) により投与した。比較のため、リン酸バッファー (PBS) のみも投与した。感染7, 8日経過後に血中の原虫寄生率を測定した。結果を図2に示す。図中、7日目の結果及び8日目の結果は、左からDEFB130ペプチド群、スクランブルペプチド群及びPBS群を示す。DEFB130ペプチドを投与したマウスでは、スクランブルペプチドを投与したマウスと比較して、感染経過7, 8日目における末梢血中の赤血球原虫寄生率が有意に減少した。

【0042】

さらに、DEFB130ペプチドについて、そのN末端側のペプチド (DEFB130ペプチドN末端、配列番号3) とC末端側のペプチド (DEFB130ペプチドC末端、配列番号4) を合成し、上述の方法によりIC₅₀を測定した。結果を前掲の表1に示す。DEFB130ペプチドC末端のIC₅₀は > 200 μ Mであったが、DEFB130ペプチドN末端のIC₅₀は90~93 μ Mであった。

10

【0043】

以上の結果から、DEFB130の部分ペプチドが、顕著な原虫増殖阻害活性を示すことが明らかとなった。

【配列表フリーテキスト】

【0044】

配列番号1 : DEFB130の全長アミノ酸配列

配列番号2 : DEFB130ペプチドのアミノ酸配列

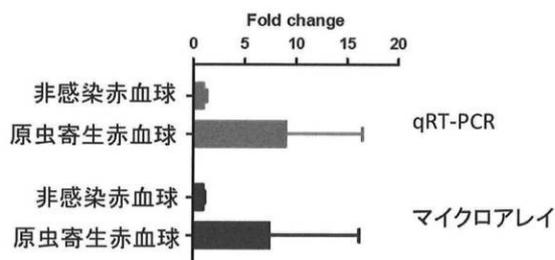
配列番号3 : スクランブルペプチドのアミノ酸配列

配列番号4 : DEFB130ペプチドN末端

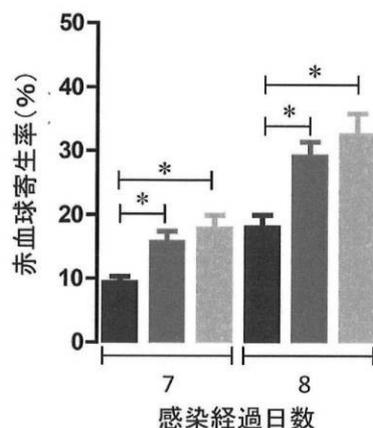
配列番号5 : DEFB130ペプチドC末端

20

【図1】



【図2】



【配列表】

2017100969000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 加藤 健太郎

北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内

(72)発明者 アラー テルカウイ

北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内

(72)発明者 高野 量

北海道帯広市稲田町西2線11番地 国立大学法人帯広畜産大学内

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA20 BA26 CA59 DA43 MA17 MA35
MA37 MA41 MA43 MA52 MA66 NA14 ZB381
4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 DA50 EA20 FA71 GA01