(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号

特表2009-521932

(P2009-521932A)

(43)公表日　平成21年6月11日(2009.6.11)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47		4B064
C12N 1/15	(2006.01)	C12N	1/15		4B065
C12N 1/19	(2006.01)	C12N	1/19		4C084
C12N 1/21	(2006.01)	C12N	1/21		4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 59 頁）　最終頁に続く

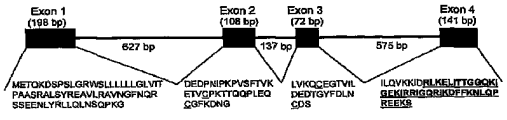
(21)出願番号　特願2008-548779 (P2008-548779)
(86)(22)出願日　平成18年12月29日 (2006.12.29)
(85)翻訳文提出日　平成20年8月7日 (2008.8.7)
(86)国際出願番号　PCT/US2006/049637
(87)国際公開番号　WO2007/076162
(87)国際公開日　平成19年7月5日 (2007.7.5)
(31)優先権主張番号　60/754,878
(32)優先日　平成17年12月29日 (2005.12.29)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　508194065
カンザス　ステート　ユニバーシティー　リサーチ　ファウンデーション
アメリカ合衆国　カンザス　６６５０２－５０２０，　マンハッタン，　リサーチ　パーク　サークル　２００５，　リサーチ　パーク　ビルディング，　スイート　１０５
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】抗菌性カテリシジンペプチド

(57)【要約】
本発明は、配列番号４を有する３８アミノ酸ペプチドに関連する抗菌性カテリシジンポリペプチドに関するものである。本発明は、広範囲の抗菌活性を有するポリペプチド、このようなポリペプチドをコードする核酸および発現ベクター、ならびに、微生物の生存を低減させる宿主細胞および方法も提供する。加えて、本発明はまた、広範囲の抗菌性ポリペプチドを含む、組成物および製造品も提供する。本発明により、配列番号４、配列番号４に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有する配列番号４の変異体、または少なくとも１５個連続したアミノ酸を有するその断片を含む精製されたポリペプチドであって、該ポリペプチド、その変異体またはその断片は抗菌活性を有する、ポリペプチド、その変異体またはその断片が提供される。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号４、配列番号４に対して少なくとも８０％のアミノ酸配列同一性を有する配列番号４の変異体、または少なくとも１５個連続したアミノ酸を有するその断片を含む精製されたポリペプチドであって、該ポリペプチド、その変異体またはその断片は抗菌活性を有する、ポリペプチド、その変異体またはその断片。
【請求項２】
配列番号４、配列番号４に対して少なくとも８０％の配列同一性を有する配列番号４の変異体、または少なくとも１５個連続したアミノ酸を有するその断片からなる、請求項１に記載の精製されたポリペプチド。
【請求項３】
前記変異体が配列番号４に対して少なくとも９０％のアミノ酸配列同一性を有する、請求項１または２に記載の精製されたポリペプチド。
【請求項４】
前記変異体が１～４個の保存的アミノ酸置換を有する、請求項１または２に記載の精製されたポリペプチド。
【請求項５】
前記断片が配列番号４の少なくとも２５個連続したアミノ酸を含む、請求項１または２に記載の精製されたポリペプチド。
【請求項６】
請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチド、変異体または断片をコードする核酸セグメントを含む、単離された核酸分子。
【請求項７】
前記核酸セグメントが配列番号４を含むポリペプチドをコードする、請求項６に記載の単離された核酸分子。
【請求項８】
前記核酸セグメントが配列番号２を含むポリペプチドをコードする、請求項７に記載の単離された核酸分子。
【請求項９】
前記核酸セグメントがプロモータに作動可能に連結された、請求項６～８のいずれか一項に記載の単離された核酸分子。
【請求項１０】
長さが少なくとも１００ヌクレオチドであり、中程度のストリンジェント条件または高いストリンジェント条件下で配列番号３またはその相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。
【請求項１１】
高いストリンジェント条件下で配列番号３またはその相補体にハイブリダイズする、請求項１０に記載の単離された核酸分子。
【請求項１２】
検出できるように標識された、請求項１０に記載の単離された核酸分子。
【請求項１３】
請求項６～９のいずれか一項に記載の核酸分子を含む、単離された細胞。
【請求項１４】
前記ポリペプチド、前記変異体または前記断片の発現を生じさせるために、請求項１３に記載の単離された細胞を培養することを含む、ポリペプチドを生成する方法。
【請求項１５】
前記細胞または前記細胞の培地から前記ポリペプチド、前記変異体または前記断片を精製することをさらに含む、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチド、変異体または断片を含む、組成物。

【請求項１７】
製薬的に許容される担体または食品添加物をさらに含む、請求項１６に記載の組成物。
【請求項１８】
微生物増殖を抑制する方法であって、該微生物に請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチド、変異体または断片、あるいは請求項１６または１７に記載の組成物の有効量を接触させることを含む、方法。
【請求項１９】
脊椎動物における、または微生物増殖または生存を補助できる培地における微生物の増殖を抑制する方法であって、該脊椎動物または該培地に請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチド、変異体または断片、請求項９に記載の核酸分子、あるいは請求項１６または１７に記載の組成物の有効量を接触させることを含む、方法。
【請求項２０】
グラム陽性細菌、グラム陰性細菌、酵母または原生動物の増殖が抑制される、請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記微生物が食品伝染疾患または性感染症の原因因子である、請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２２】
前記疾患が梅毒、クラミジア、淋病、トリコモナス症、または鵞口瘡である、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記微生物がリステリア・モノサイトゲネス、スタフィロコッカス・アウレウス、エシェリキア・コリ、クレブシエラ・ニューモニエ、サルモネラ・ティフィムリウム、シュードモナス・アエルギノザ、プロテウス・ミラビリス、サルモネラ・エンテリティディス、ナイセリア・ゴノレア、ウレアプラズマ・カニゲニタリウム、ウレアプラズマ・ウレアリチカム、カンジダ・アルビカンス、またはトリコモナス・バギナリスである、請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２４】
請求項１～５のいずれかに記載のポリペプチド、変異体または断片、あるいは請求項１６または１７に記載の組成物を含む、製造品。
【請求項２５】
配列番号４に特異的に結合する、精製された抗体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の引用）
本願は、その開示が参考として援用される、２００５年１２月２９日出願の米国仮出願第６０／７５４，８７８号の利益を主張する。
【０００２】
（連邦政府による資金提供を受けた研究の記載）
本出願に関する研究は、米国政府より助成金が補助された（Ｎ．Ｉ．Ｈ．ｇｒａｎｔ ｎｕｍｂｅｒ Ｐ２０ ＲＲ０１６４７５およびＰ２０ ＲＲ０１７６８６）。それゆえ政府は、本発明に一定の権利を有しうる。
【背景技術】
【０００３】
（背景）
抗菌薬は、ヒトの感染症の治療に不可欠な医薬品である。抗菌薬は家畜、魚類および植物生産にも幅広く使用される。動物では、抗菌薬は感染症の治療に、そして疾患予防のために予防的に使用される。加えて、抗菌薬は治療量以下の量で成長促進剤として使用される。抗菌薬のこのような広範囲にわたる使用の結果は、耐性病原菌の蔓延の増加であり、

このことはヒトおよび動物の治療不全を引き起こす。
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【０００４】
それゆえ新しく効果的な抗菌剤を開発する必要性が存在する。
【課題を解決するための手段】
【０００５】
（発明の要旨）
本発明は、グラム陽性およびグラム陰性細菌はもちろんのこと、酵母および原生動物（以下「微生物（ｍｉｃｒｏｂｅ）」または「微生物（ｍｉｃｒｏｏｒｇａｎｉｓｍ）」）に対する幅広い抗菌活性を有する、精製カテリシジンポリペプチド、その断片、その変異体または変異体の断片を提供する。それゆえ精製されたポリペプチド、その変異体、またはその断片、あるいはそのいずれかをコードする単離核酸分子を使用して微生物の増殖を抑制または予防できる。一実施形態において、精製されたポリペプチド、その変異体、またはその断片、あるいはそのいずれかをコードする単離核酸分子を使用して、たとえばトリコモナスおよび／またはナイセリア属のメンバによる食品伝染疾患または性感染症などの疾患を治療または予防できる。下に記載するように、本発明のポリペプチド、その変異体または断片の抗菌活性は塩依存性でありうる。その上、一実施形態において、本発明のポリペプチド、変異体または断片は、最小溶血活性も有する。一実施形態において、本発明は、配列番号４を含むポリペプチド、配列番号４に対して少なくとも１５％、たとえば少なくとも２０％、３０％、４０％、５０％、７０％以上、たとえば８０％、または９０％のアミノ酸配列同一性を有する配列番号４の変異体、あるいは少なくとも１５の連続アミノ酸を有するその断片を提供し、ポリペプチド、その変異体またはその断片は抗菌活性を有する。
【０００６】
したがって本発明は、単離された核酸分子はもちろんのこと、抗菌性ポリペプチドをコードする発現ベクター、その変異体または断片；このような核酸分子および／または発現ベクターを含有する単離された細胞；本発明の核酸分子またはポリペプチド、変異体または断片を含有する組成物；ならびに本発明の核酸分子またはポリペプチド、変異体または断片を含有する製造品も提供する。本発明は、抗菌性ポリペプチド、その変異体または断片を製造する方法はもちろんのこと、本発明の抗菌性ポリペプチド、その変異体または断片をコードする単離された核酸分子、あるいは抗菌性ポリペプチド、その変異体または断片を使用した微生物の増殖を低減または抑制する方法も提供する。
【０００７】
一実施形態において、本発明は、配列番号１、配列番号３、またはその縮重変異体に対して少なくとも７０％、たとえば８０％、９０％、９５％または１００％の核酸配列同一性を有する核酸配列を含む単離された核酸分子を提供する。
【０００８】
別の実施形態において、本発明は、高いストリンジェント条件または中程度のストリンジェント条件下で、長さが少なくとも１５ヌクレオチド、たとえば少なくとも１００ヌクレオチドである配列番号３またはその断片のコード領域の相補体であるヌクレオチド配列を有するハイブリダイゼーションプローブにハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する、単離された核酸分子を提供する。
【０００９】
別の実施形態において、本発明は、長さが少なくとも１５アミノ酸であり、抗菌活性を有する、配列番号２または配列番号４を有するポリペプチド、あるいは配列番号２または配列番号４の断片をコードするヌクレオチド配列を有する単離された核酸分子を提供する。ある実施形態において、配列番号２の断片は、長さが少なくとも２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０または５０超のアミノ酸である。ある実施形態において、配列番号４の断片は、長さが少なくとも２０、２５、３０、３０超のアミノ酸である。ある実施形

態において、断片は抗菌活性を有する、および／または免疫原性、免疫調節性、または免疫原性および免疫調節性の両方である。

【００１０】

別の実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチド、その変異体または断片をコードする核酸分子を含有する発現ベクターを提供する。別の実施形態において、本発明は、本発明の核酸分子、たとえば発現制御配列に作動可能に連結されたものを含有する単離された細胞を提供する。ある実施形態において、単離された細胞は、本発明のポリペプチド、その変異体または断片を発現する。一実施形態において、ポリペプチド、その変異体または断片は細胞または細胞の培地から精製される。

【００１１】

別の実施形態において、生物活性であり、配列番号２の少なくとも１５、たとえば２０の連続残基のアミノ酸配列を有し、配列番号４に対して少なくとも１５％同一であるか、または配列番号４に特異的に結合する抗体を結合する、精製されたポリペプチドを提供する。ある実施形態において、ポリペプチドは配列番号２または４を有する。ある実施形態において、ポリペプチドは配列番号２または４より成る。ある実施形態において、ポリペプチドは、配列番号４に対して１、２、３、４、５、または１０あるいはそれ以上、たとえば２０の保存アミノ酸置換を有する。

【００１２】

別の実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチド、変異体または断片を含む組成物を提供する。ある実施形態において、組成物は製薬的に許容される担体または食品添加物をさらに含む。

【００１３】

別の実施形態において、本発明は、微生物の増殖または生存を低減または抑制する方法を提供する。該方法は、微生物に本発明の、ポリペプチド、変異体、または断片、あるいはポリペプチド、変異体、または断片を含む組成物あるいはポリペプチド、変異体、または断片をコードする核酸分子を接触させることを含む。

【００１４】

別の実施形態において、本発明は、哺乳類、魚類または鳥類などの脊椎動物における、あるいは微生物の増殖または生存を維持できる培地、たとえば水性培地またはパッケージングにおいて、微生物の増殖または生存を低減または抑制する方法を提供する。該方法は、脊椎動物または培地に本発明の、ポリペプチド、変異体、または断片、あるいはポリペプチド、変異体、または断片をコードする核酸分子の有効量を接触させることを含む。

【００１５】

別の実施形態において、本発明は、食品媒介病または性感染症、たとえば梅毒、クラミジア、淋病、トリコモナス症、または鵞口瘡を治療する方法を提供する。該方法は、本発明の、ポリペプチド、変異体、または断片、あるいはポリペプチド、変異体、または断片をコードする核酸分子の有効量を脊椎動物に投与することを含む。

【００１６】

一実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチド、変異体、または断片の有効量を使用して、食品の微生物汚染を低減する、または腐敗しやすい食品の貯蔵寿命を延長する方法を提供する。

【００１７】

別の実施形態において、本発明は、容器および本発明の、ポリペプチド、変異体、または断片、あるいはポリペプチド、変異体、または断片をコードする核酸分子を含む製造品を提供する。一実施形態において、製造品は包装材料を含み、包装材料内には本発明の、ポリペプチド、変異体、または断片、あるいはポリペプチド、変異体、または断片をコードする核酸分子が含有され、包装材料は、本発明の、ポリペプチド、変異体、または断片、あるいはポリペプチド、変異体、または断片をコードする核酸分子が食品媒介病または性感染症、たとえば梅毒、クラミジア、淋病、トリコモナス症、または鵞口瘡を治療するのに使用されうることを示すラベルを含む。

【００１８】
別の実施形態において、本発明は、配列番号４に特異的に結合する精製された抗体を提供する。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１９】
（発明の詳細な説明）
定義
「核酸」という用語は本明細書で使用する場合、リボース核酸と同様に、デオキシ核酸リボース核酸のポリマーを指す。該用語は、線形分子はもちろんのこと、共有閉環状分子も含む。それは、１本鎖分子はもちろんのこと、２本鎖分子も含む。
【００２０】
「単離された」という用語は、本明細書で使用する場合核酸分子に関連して、核酸分子が無関係の核酸配列、すなわち本発明の核酸が由来する生物の天然型ゲノムにおいて５’および３’末端に隣接する、他の遺伝子をコードする核酸配列を含まない、またはこのような他の遺伝子の発現に関与しないことを意味する。したがって本発明の「単離された核酸」は、いずれの天然型核酸の構造または３を超える別個の遺伝子におよぶ天然型ゲノム核酸のいずれの断片の構造とも異なる構造を有する。それゆえ「単離された核酸分子」という用語は、たとえば（１）天然型ゲノムＤＮＡ分子の一部の配列を有するが、それが自然に発生する生物のゲノムにおいて分子のその一部に隣接するコード配列の両方によって隣接されない、ＤＮＡ分子；（２）得られた分子がいずれの天然型ベクターまたはゲノムＤＮＡとも同一でないような方法で、ベクター内または原核生物または真核生物のゲノムＤＮＡ内に包含される核酸；（３）独立した分子、たとえばｃＤＮＡ、ゲノム断片、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって生成された断片、または制限断片；ならびに（４）ハイブリッド遺伝子の一部である組み換えヌクレオチド配列、すなわち融合タンパク質をコードする遺伝子を含む。本定義からは、（１）ＤＮＡ分子、（２）トランスフェクション細胞、および（３）細胞クローン、たとえばｃＤＮＡまたはゲノムＤＮＡライブラリなどのＤＮＡライブラリで発生する細胞クローンの混合物中に存在する核酸が特に除外される。
【００２１】
「精製された」という用語は、ポリペプチド、変異体または断片に関して、ポリペプチド、変異体または断片が天然関連成分、すなわちその天然状態でそれに付随する成分を実質的に含まないことを意味する。化学合成ポリペプチド、たとえば組み換えＤＮＡ技術を使用して生成されたもの、または本発明のポリペプチドが自然に生じる細胞系とは異なる細胞系で生成されたものは、その天然関連成分を実質的に含まない。「精製ポリペプチド」という用語は、複数の無関係なポリペプチドが分離されたタンパク質ゲルのレーンで分離されたポリペプチドを含まない。一般に本発明のポリペプチド、変異体または断片は、本発明のポリペプチドを含有するサンプルの約２５重量％を構成し、通常はサンプルの少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、特にサンプルの少なくとも約９５％または９９％以上を構成する。
【００２２】
「生物活性断片」という句は本明細書で使用する場合、本発明のポリペプチドまたは変異体に関連して、配列番号４に示した配列の少なくとも１５～２０個連続したアミノ酸を有して、また（１）抗菌活性を有する、および／または（２）免疫原性、免疫調節性、または免疫原性および免疫調節性の両方である、断片を意味する。
【００２３】
「ポリペプチド」という用語は本明細書で使用する場合、メチル化、グリコシル化またはホスホリル化などの翻訳後修飾とは無関係に、少なくとも１５個のアミノ酸で構成されるポリマーを意味する。「本発明の抗菌性ポリペプチド」または「本発明のポリペプチド」という句は、「Ｋ９ＣＡＴＨ」という用語と同様に、イヌカテリシジンポリペプチドはもちろんのこと、その誘導体も指す。

【００２４】
本明細書で使用する場合、「抗菌活性」という句は、１つ以上の細菌、真菌、ウィルスまたは原生動物に対する殺菌および／または静菌活性を意味する。殺菌活性は、標的微生物を死滅させるか、それに対する非可逆的な損傷を引き起こす能力を指す。静菌活性は、必ずしも標的微生物を死滅または非可逆的に損傷することなく、標的微生物の成長または増殖能力を抑制する能力を指す。
【００２５】
「免疫原性」という用語は、ポリペプチド、変異体または断片が、配列番号４のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異性の抗体の生成を誘発できることを意味する。「特異的に結合する」という句または「特異的な」という用語は、抗体に関連して、抗体が、少なくとも約５０％以上の親和性で、好ましくは約７５％以上の親和性で、さらに好ましくは約９０％以上の親和性で、配列番号４に８０％未満の同一性を有するポリペプチドではなく、配列番号４のポリペプチドに結合することを意味する。
【００２６】
「免疫調節性」という用語は、ポリペプチド、変異体または断片が正常な機能、たとえば刺激されていない動物の免疫系の細胞性に影響を及ぼしたり、またはそれを調節したりしないが、疾患によって変更された免疫系に影響を及ぼしたり、またはそれを調節したりすることを意味する。このような調節の非限定的な例としては、遅延型過敏（ＤＴＨ）反応の抑制、免疫細胞応答性の抑制、および抗原投与に応答する抗体生成の抑制が挙げられる。
【００２７】
本明細書で使用する場合、「抑制する」という用語は、制限なく、５％、１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または９５％超の低減、たとえば１００％の低減を含むいずれかの量の低減を意味する。
【００２８】
「治療的有効量」という用語は、疾患を治療する；特定の疾患の１つ以上の症状を改善、減弱、または除去する；あるいは疾患の１つ以上の症状の開始を予防または遅延する化合物または化合物の組み合せの量を意味する。
【００２９】
微生物の「成長を補助できる培地」という句は、中または表面で細菌、ウィルス、真菌または原生動物が生存または繁殖しうる気体状、液体または固体物質を含む。このような培地としては、ヒト、魚類、ニワトリまたは他の鳥類などの脊椎動物の組織または体液；水などの液体またはコンタクトレンズ溶液または洗眼液などの水溶液；食用農産物などの食物および抽出物、冷凍または脱水食品あるいは他の食品などの食品；チーズ、鶏肉または他の肉などの包装済み食品；およびたとえば食品を調製するまたは外科手術を実施するのに使用された器具の表面などの物体；ならびに外科手術の準備での麻酔に使用されるような気体が挙げられる。
【００３０】
別途定義しない限り、本明細書で使用するすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載するのと同様または同等の方法および材料が本発明の常法で使用されうるが、適切な方法および材料が以下で説明される。本明細書で言及するすべての刊行物、特許出願、特許および他の参考文献は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている。アミノ酸名称は、本発明が属する当業者によって一般に理解されるようなフルネーム、３文字、または１文字名称が挙げられる。矛盾がある場合には、定義を含む本明細書が制御する。加えて、材料、方法、および実施例は例証のためのみであり、制限するものではない。
【００３１】
本発明の他の特徴および利点は、次の詳細な説明から、そして請求項から明らかになるであろう。

【００３２】
本発明の抗菌性ポリペプチド、変異体および断片ならびにその使用
カテリシジンは、高度に保存されたＮ末端シグナルペプチドおよびプロ領域（カテリンドメイン）、ならびに高度に異質性のＣ末端抗菌性ドメインを有する、カチオン性ポリペプチドである（Ｚａｎｅｔｔｉ，Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．，７５：３９（２００４）；Ｂａｌｓら、Ｃｅｌｌ　Ｍｏｌ．Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉ．，６０：７１１（２００３）；Ｚａｉｏｕら、Ｊ．Ｉｎｖｅｓｔ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．，１２０：８１０（２００３））。カテリシジン宿主防御ペプチドは、好中球、マクロファージおよびマスト細胞の抗菌能力の重要な成分であり（Ａｇｅｒｂｅｒｔｈら、Ｂｌｏｏｄ，９６：３０８６（２０００）；Ｌａｒｒｉｃｋら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５２：２３１（１９９４）；Ｎｉｙｏｎｓａｂａら、Ｃｕｒｒ．Ｄｒｕｇ　Ｔａｒｇｅｔｓ　Ｉｎｆｌａｍｍ．Ａｌｌｅｒｇｙ，２：２２４（２００３））であり、肺、膀胱、腸、口腔粘膜、皮膚、および精巣の上皮細胞内での固有の防御機構における主要な要素でもある（Ｚａｉｏｕら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｍｅｄ．，８０：５４９（２００２）；Ｇｅｎｎａｒｏら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，５５：３１（２０００））。

【００３３】
本発明は、制限なくグラム陽性およびグラム陰性細菌、原生動物はもちろんのこと、酵母に対する活性を含む広範囲にわたる抗菌活性を有するイヌカテリシジンの発見に基づいている。したがって本発明は、イヌカテリシジン抗菌性ポリペプチド、その断片、その変異体または変異体の断片、単離された核酸分子および本発明のイヌカテリシジンポリペプチド、変異体または断片をコードする、単離された核酸分子を有する発現ベクター、このような核酸分子および／または発現ベクターを含有する単離された細胞、本発明のイヌカテリシジンポリペプチド、変異体または断片を含有する組成物、ならびに本発明のこのようなポリペプチド、変異体または断片あるいはそのための核酸を含有する製造品を提供する。本発明は、本発明のイヌカテリシジンポリペプチド、変異体または断片を生成する方法と、本発明の抗菌性ポリペプチド、変異体または断片、あるいはそのための核酸分子を使用する微生物の成長を抑制する方法と、脊椎動物の微生物感染を本発明の抗菌性ポリペプチド、変異体または断片、あるいはそのための核酸分子によって治療する方法も提供する。本発明のポリペプチド、変異体または断片を発現する細胞からの単離によって得られうる本発明のポリペプチド、変異体または断片は、化学合成されうるか、または組み換え核酸分子から発現されうる。

【００３４】
一実施形態において、本発明は広範囲の抗菌活性を有するポリペプチドを提供する。一実施形態において、本発明は、精製イヌカテリシジンポリペプチド、たとえば配列番号２または４を有するポリペプチドを提供する。本発明のイヌカテリシジンポリペプチド、変異体または断片は、広範囲の抗菌活性を有する。「広範囲の」という用語は本明細書で使用する場合、制限なくグラム陽性およびグラム陰性細菌、酵母および原生動物を含む、各種の真核または原核微生物の生存または成長を低減または抑制する能力を指す。グラム陽性細菌の例としては、制限なく、リステリア属およびスタフィロコッカス属のメンバが挙げられる。グラム陰性細菌の例としては、制限なく、エシェリキア属、クレブシエラ属、サルモネラ属、シュードモナス属、プロテウス属、トレポネーマ属、クラミジア属、およびナイセリア属が挙げられる。酵母の例としては、制限なく、カンジダ属のメンバが挙げられる。原生動物の例としては、制限なく、トリコモナス属のメンバが挙げられる。本発明のカテリシジンポリペプチドは、制限なく、リステリア・モノサイトゲネス、スタフィロコッカス・アウレウス、エシェリキア・コリ、クレブシエラ・ニューモニエ、サルモネラ・ティフィムリウム、シュードモナス・アエルギノザ、プロテウス・ミラビリス、サルモネラ・エンテリティディス、ナイセリア・ゴノレア、ウレアプラズマ・カニゲニタリウムおよびウレアプラズマ・ウレアリチカム；カンジダ・アルビカンス；トリポネーマ・パリダム、クラミジア・トラコマチスおよびトリコモナス・バギナリスを含む各種の微生物に対する抗菌活性を有する。

【００３５】
本発明のポリペプチドの変異体は、配列番号４に対するあるアミノ酸配列同一性を有することがあり、抗菌活性を有するか、または免疫原生であるか、あるいは両方である。「変異体」という用語としては、配列番号４の配列に対して少なくとも５３％の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。
【００３６】
本明細書で使用する場合、「％同一性」または「配列同一性」という用語は、２つ以上のポリペプチド配列の間の関係はもちろんのこと、２つ以上のポリヌクレオチド配列の間の関係を、すなわち参照配列と、参照配列と比較される所与の配列の間の関係を指す。配列同一性は、配列が最適に配列比較されて、このような配列のストリング間の一致によって決定されるような最高度の配列類似性が生成された後に、所与の配列を参照配列と比較することによって決定される。このような配列比較時に、配列同一性は位置ごとに確認され、たとえば配列は、特定の位置において、その位置でヌクレオチドまたはアミノ酸残基が同一である場合に、「同一」である。このような位置同一性の総数を次に、参照配列中のヌクレオチドまたは残基の総数で割って、％配列同一性を得る。
【００３７】
配列同一性は、これに限定されるわけではないが、Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｌｅｓｋ，Ａ．Ｎ．，ｅｄ．，Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８８），Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ，Ｓｍｉｔｈ，Ｄ．Ｗ．，ｅｄ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９３）；Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄａｔａ，Ｐａｒｔ Ｉ，Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ａ．Ｍ．，ａｎｄ Ｇｒｉｆｆｉｎ，Ｈ．Ｇ．，ｅｄｓ．，Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ（１９９４）；Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｖｏｎ Ｈｅｉｎｇｅ，Ｇ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９８７）；Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ，Ｇｒｉｂｓｋｏｖ，Ｍ．ａｎｄ Ｄｅｖｅｒｅｕｘ，Ｊ．，ｅｄｓ．，Ｍ．Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９９１）；およびＣａｒｉｌｌｏら、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈ．，４８：１０７３（１９８８）に記載されている方法を含む、既知の方法によってただちに計算でき、その教示は参照により本明細書に組み入れられている。
【００３８】
配列同一性を決定する好ましい方法は、試験した配列間で最大の一致を与えるように設計される。配列同一性を決定する方法は、所与の配列間で配列同一性を決定する公的に入手可能なコンピュータプログラムでコードされる。このようなプログラムの例としては、これに限定されるわけではないが、ＧＣＧプログラムパッケージ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１２：３８７（１９８４））、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮおよびＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．，２１５：４０３（１９９０））が挙げられる。ＢＬＡＳＴＸプログラムは、ＮＣＢＩおよび他の供給元から公的に入手可能である（ＢＬＡＳＴ Ｍａｎｕａｌ，Ａｌｔｓｃｈｕｌら、ＮＣＶＩ ＮＬＭ ＮＩＨ Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ ２０８９４，Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌｅｃ．Ｂｉｏｌ．，２１５：４０３（１９９０）、その教示は参照により本明細書に組み入れられている）。これらのプログラムは、所与の配列と参照配列との間の最高レベルの配列同一性を生成するために、デフォルトキャップ加重を使用して配列を最適に配列比較する。
【００３９】
例証として、参照アミノ酸配列に対して少なくともたとえば９５％配列同一性を有する所与のアミノ酸配列を有するポリペプチドによって、所与のポリペプチド配列が参照アミノ酸配列の各１００アミノ酸ごとに最大５つのアミノ酸変化を含みうることを除いて、ポリペプチドの所与のアミノ酸配列が参照配列と同一であると解釈される。言い換えれば、

参照アミノ酸配列との少なくとも９５％の配列同一性を有する所与のポリペプチド配列を得るために、参照配列内の５％までのアミノ酸残基が除去されうるか、または別のアミノ酸によって置換されうるか、あるいは参照配列内のアミノ酸残基の総数の５％までの数のアミノ酸が参照配列内に挿入されうる。参照配列のこのような変化は、参照アミノ酸配列のアミノまたはカルボキシ末端位置あるいは参照配列内の残基間に個別に、または参照配列内の１つ以上の連続基のどちらかに散在する、これらの末端位置の間のどこでも発生しうる。好ましくは、同一でない残基位置は、保存アミノ酸置換によって異なる。しかしながら保存的置換は、配列同一性を決定するときに一致として含められない。

【００４０】

本発明のポリペプチドは、配列番号４との５２％を超える同一性を、配列番号４とたとえば少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、または、少なくとも９７％同一であるアミノ酸配列を有しうる。

【００４１】

配列におけるこのようなバリエーションは、（ａ）置換の区域におけるペプチド主鎖の構造と、（ｂ）標的部位における分子の電荷または疎水性、あるいは（ｃ）側鎖のバルクに著しく影響を及ぼさないアミノ酸置換のためでありうる。天然型アミノ酸残基は、共通の側鎖特性に基づいてグループに分けられる：

（１）疎水性：ノルロイシン、ｍｅｔ、ａｌａ、ｖａｌ、ｌｅｕ、ｉｌｅ；
（２）中性親水性：ｃｙｓ、ｓｅｒ、ｔｈｒ；
（３）酸性：ａｓｐ、ｇｌｕ；
（４）塩基性：ａｓｎ、ｇｌｎ、ｈｉｓ、ｌｙｓ、ａｒｇ；
（５）鎖配向に影響を及ぼす残基：ｇｌｙ、ｐｒｏ；および
（６）芳香族；ｔｒｐ、ｔｙｒ、ｐｈｅ。

【００４２】

ポリペプチド配列内の１個のアミノ酸の、上で分類されたような同様の種類のアミノ酸による置換は、保存的アミノ酸置換と呼ばれる。当業者によって認識されるように、上の分類は絶対的ではない。複数のアミノ酸が２つ以上の特徴的な特性を示し、したがって２つ以上のカテゴリに含まれうる。たとえばチロシンは、非極性芳香環および極性ヒドロキシル基の両方を有する。それゆえチロシンは、非極性または酸性と呼ばれうる複数の特徴を有する。しかしながら非極性環は支配的であるので、チロシンは一般に疎水性であると見なされる。同様に、ジスルフィド結合を形成できることに加えて、システインは非極性特徴も有する。それゆえ疎水性または非極性アミノ酸として厳密に分類されないが、多くの例ではシステインはペプチドに疎水性または非極性を与えるために使用されうる。

【００４３】

本発明のポリペプチドは、ポリペプチドが本明細書で定義するように配列番号４の抗菌活性を有し、免疫原性である限り、１～９個の保存的アミノ酸置換を持つ配列番号４に一致するアミノ酸配列を有しうる。

【００４４】

本発明のポリペプチドの配列におけるバリエーションは、非保存的置換からも生じうる。非保存的置換は、上記のクラスの１つのメンバを別のクラスのメンバと交換することを伴う。このような変異体は、抗菌活性を消失させることなく、「非必須」アミノ酸残基、すなわち野生種配列において変化または除去されうる残基においてアミノ酸置換を有しうる。このような非必須残基は、本明細書に記載する方法または当分野で既知の方法を、たとえば部位特異的突然変異または除去／切断ミュータントの産生と、続いての後述する生物活性の判定および野生種配列との比較を使用して同定されうる。それゆえ置換が導入されるとき、得られた変異体は生物活性のそのレベルを確認または判定するために試験されうる。

【００４５】

変異体という用語は、配列番号２または４のイヌカテリシジンの対立遺伝子変異体も含

む。対立遺伝子変異体は、イヌ母集団で自然に存在する遺伝的多型から生じる。遺伝的多型および本発明のポリペプチドの対立遺伝子変異体を同定する方法の例は、核酸の節に記載されている。

【００４６】

本発明のポリペプチドは、抗菌活性を有するか、または免疫原性である、配列番号４の断片はもちろんのこと、配列番号４の変異体の断片でもありうる。本発明のポリペプチドを説明するのに使用されるような「断片」という用語は、参照配列、すなわち配列番号４またはその変異体配列の少なくとも１５個連続したアミノ酸の配列を指す。断片は、配列番号４に示す全長アミノ酸配列よりも長さが短い少なくとも１つのアミノ酸である。

【００４７】

したがって配列番号４の断片は、配列番号４が活性である１つ以上の微生物に対して抗菌活性を有しうる。抗菌活性は殺菌性または静菌性であり、たとえばリステリア・モノサイトゲネス、スタフィロコッカス・アウレウス、エシェリキア・コリ、クレブシエラ・ニューモニエ、サルモネラ・ティフィムリウム、シュードモナス・アエルギノザ、プロテウス・ミラビリス、サルモネラ・エンテリティディス、ナイセリア・ゴノレア、ウレアプラズマ・カニゲニタリウム、ウレアプラズマ・ウレアリチカム、カンジダ・アルビカンス、トリポネーマ・パリダム、クラミジア・トラコマチスおよびトリコモナス・バギナリスの１つ以上に対する配列番号４の活性の１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または９０％超でありうる。

【００４８】

それゆえ配列番号４の変異体または断片は、配列番号４と同じ抗菌活性プロフィールを有しうる、すなわち配列番号４の変異体または断片は、生物の同じグループ、特にリステリア・モノサイトゲネス、スタフィロコッカス・アウレウス、エシェリキア・コリ、クレブシエラ・ニューモニエ、サルモネラ・ティフィムリウム、シュードモナス・アエルギノザ、プロテウス・ミラビリス、サルモネラ・エンテリティディス、ナイセリア・ゴノレア、ウレアプラズマ・カニゲニタリウム、ウレアプラズマ・ウレアリチカム、カンジダ・アルビカンス、トリポネーマ・パリダム、クラミジア・トラコマチスおよびトリコモナス・バギナリスに対して活性であるという点で、配列番号４と同じ活性スペクトルを有する。１つ以上の微生物に対する活性を判定する方法は、本明細書に開示されているか、同業者に既知である。

【００４９】

配列番号４の断片の非限定的な例を、本発明の他のポリペプチドと同様に、表１に与える。

【００５０】

【表１】

表 1

配列番号	配列
4	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
6	LKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
8	KELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
10	ELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
12	LITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
14	ITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
16	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQP
18	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPR
20	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPRE
22	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREE
24	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEK
26	DRLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
28	IDRLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
30	KIDRLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS
32	KKIDRLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS

【００５１】

本発明のポリペプチドは、配列番号４のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する抗体に特異的に結合するポリペプチドも含む。配列番号４のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異的に結合する抗体を生成する方法は、当業者に既知である。抗体が選択した抗原に結合するかどうかを判定する方法は、当業者に既知である。

【００５２】

誘導体

本発明のポリペプチド、変異体または断片は、本発明のポリペプチド、変異体または断片、たとえば配列番号４が無関係の追加のアミノ酸、たとえばポリヒスチジンタグ、タンパク質Ａ、緑色蛍光タンパク質、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（ＧＳＴ）、分泌の異種シグナル配列（たとえばｇｐ６７、ｐｈｏＡ分泌シグナル、タンパク質Ａ）、または精製、検出または他の有用な特性を促進する他の機能性アミノ酸ドメインにさらに結合される融合タンパク質でもありうる。本発明の融合タンパク質において、無関係の異種ポリペプチドは、本発明の抗菌性ポリペプチド、変異体または断片のアミノまたはカルボキシ末端に結合されうる。融合ポリペプチドを産生する方法の例は、核酸の節で後述する。

【００５３】

本発明のポリペプチドは、得られた誘導体ポリペプチドが対応する非修飾ポリペプチドと比較したときに長期間の安定性、活性または他の有用な特性の向上を有するように、１つ以上の非天然型アミノ酸、１つ以上のタンパク新生（すなわちアミノ酸は代謝経路を通じて細胞内のタンパク質に包含されうる）または非タンパク新生アミノ酸を含みうる。

【００５４】

それゆえアミノ酸への本明細書での言及はたとえば、天然型タンパク新生（Ｌ）－アミノ酸はもちろんのこと、（Ｄ）－アミノ酸、アミノ酸類似物質などの化学修飾アミノ酸、ノルロイシンなどの天然型非タンパク新生アミノ酸、およびアミノ酸の特徴を表すことが

当業界で既知の特性を有する化学合成化合物を含む。アミノ酸という用語は、遺伝子コードによってコードされないアミノ酸、たとえばベータアラニン（ｂｅｔａ－Ａｌａ）、または他のオメガアミノ酸、たとえば３－アミノプロピオン酸、２，３－ジアミノプロピオン酸（２，３－ｄｉａＰ）、４－アミノ酪酸など、アルファ－アミンイソ酪酸（Ａｉｂ）、サルコシン（Ｓａｒ）、オルニチン（Ｏｒｎ）、シトルリン（Ｃｉｔ）、ｔ－ブチルアラニン（ｔ－ＢｕＡ）、ｔ－ブチルグリシン（ｔ－ＢｕＧ）、Ｎ－メチルイソロイシン（Ｎ－ＭｅＩｌｅ）、フェニルグリシン（Ｐｈｇ）、およびシクロヘキシルアラニン（Ｃｈａ）、ノルロイシン（Ｎｌｅ）、２－ナフチルアラニン（２－Ｎａｌ）；１，２，３，４－テトラヒドロイソキノリン－３－カルボン酸（Ｔｉｃ）；ベータ－２－チエニルアラニン（Ｔｈｉ）；メチオニンスルホキシド（ＭＳＯ）；ホモアルギニン（Ｈａｒ）；ホスホセリン；ホスホトレオニン；ホスホチロシン；ヒドロキシプロリン；ガンマ－カルボキシグルタメート；馬尿酸；オクタヒドロインドール－２－カルボン酸；スタチン；ペニシラミン、α－メチル－アラニン、パラ－ベンゾイル－フェニルアラニン；ヒドロキシプロリン、カルボキシグルタメートおよびプロパギルグリシンも含む。他の修飾は、Ｌａｍｂｄｅｎら（１９８１）によって記載されているように、システイニルチオール基の２－メルカプトエタノールによる還元と、ヨードアセトアミドによるカルボキシメチル化とを含む。

【００５５】

本発明のポリペプチドは、制限なく、ＰＥＧ化（すなわちポリエチレングリコールへの共有結合）、アルキル化、アシル化、カルバミル化、ヨウ素化、エステル化、アミド化、還元、保護などの化学修飾、あるいはその安定性および／または生物学的利用能を改善することが既知の他のいずれかの修飾を有するポリペプチドも含みうる。ホルミル－メチオニン、ピログルタミンおよびトリメチル－アラニンは、ポリペプチドのＮ末端残基にて置換されうる。他のアミノ末端修飾は、アミノオキシペンタン修飾を含む（Ｓｉｍｍｏｎｓら、Ｓｃｉｅｎｃｅ，２７６：２７６（１９９７）を参照）。

【００５６】

誘導体という用語は、１個以上のアミド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）が－CH_2ＮＨ－、－CH_2Ｓ－、－CH_2CH_2、－ＣＨ＝ＣＨ－（シスおよびトランス）、－$COCH_2$－、－ＣＨ（ＯＨ）CH_2－および－CH_2ＳＯ－などの別の結合によって置換されているポリペプチドも含む。本置換は、当分野で既知の方法によって行うことができる（たとえばＳｐａｔｏｌａ，Ｖｅｇａ Ｄａｔａ Ｖｏｌ．１，Ｉｓｓｕｅ ３，（１９８３）；Ｓｐａｔｏｌａ，ｉｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ，ｅｄ．，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐ．２６７（１９８３）；Ｍｏｒｌｅｙ，Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．ｐｐ．４６３ ４６８（１９８０）；Ｈｕｄｓｏｎら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔ．Ｒｅｓ．，１４：１７７（１９７９）；Ｓｐａｔｏｌａら、Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．，３８：１２４３（１９８６）；Ｈａｎｎ，Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ．，１：３０７（１９８２）；Ａｌｍｑｕｉｓｔら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２３：１３９２（１９８０）；Ｊｅｎｎｉｎｇｓ－Ｗｈｉｔｅら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，２３：２５３３（１９８２）；Ｓｚｅｌｋｅら、ＥＰ ４５６６５（１９８２）；Ｈｏｌｌａｄａｙら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，２４：４４０１ １９８３）；およびＨｒｕｂｙ，Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．，３１：１８９（１９８２）を参照）。このような誘導体ポリペプチドとしては、制限なく、１つ以上の修飾アミノ酸、たとえばヒドロキシプロリン、カルボキシグルタメート、または上記のものはもちろんのこと、ペプチドによって結合されていないアミノ酸も挙げることができる。誘導体ペプチドとしては、参照ペプチドにおける１個以上のアミド結合（－ＣＯ－ＮＨ－）が－CH_2ＮＨ－、－CH_2Ｓ－、－CH_2CH_2、－ＣＨ＝ＣＨ－（シスおよびトランス）、－$COCH_2$－、－ＣＨ（ＯＨ）CH_2－および－CH_2ＳＯ－などの別の結合によって置換されているポリペプチドも挙げられる。本置換は、当分野で既知の方法によって行うことができる（たとえばＳｐａｔｏｌａ，

Ｖｅｇａ Ｄａｔａ Ｖｏｌ．１，Ｉｓｓｕｅ ３，（１９８３）；Ｓｐａｔｏｌａ，ｉｎ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｏｆ Ａｍｉｎｏ Ａｃｉｄｓ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ，Ｗｅｉｎｓｔｅｉｎ，ｅｄ．，Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐ．２６７（１９８３）；Ｍｏｒｌｅｙ，Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍ．Ｓｃｉ．ｐｐ．４６３ ４６８（１９８０）；Ｈｕｄｓｏｎら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｐｒｏｔ．Ｒｅｓ．，１４：１７７（１９７９）；Ｓｐａｔｏｌａら、Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．，３８：１２４３（１９８６）；Ｈａｎｎ，Ｊ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．Ｐｅｒｋｉｎ Ｔｒａｎｓ．，１：３０７（１９８２）；Ａｌｍｑｕｉｓｔら、Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２３：１３９２（１９８０）；Ｊｅｎｎｉｎｇｓ－Ｗｈｉｔｅら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，２３：２５３３（１９８２）；Ｓｚｅｌｋｅら、ＥＰ ４５６６５（１９８２）；Ｈｏｌｌａｄａｙら、Ｔｅｔｒａｈｅｄｒｏｎ Ｌｅｔｔ．，２４：４４０１（１９８３）；およびＨｒｕｂｙ，Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．，３１：１８９（１９８２）を参照）。

【００５７】

本発明のポリペプチド、変異体または断片を作製する方法

本発明のポリペプチド、変異体または断片は試験管内で、たとえば固相ペプチド合成方法によって、または酵素触媒ペプチド合成によって、または後述する本発明の核酸を使用する組み換えＤＮＡ技術を用いて合成されうる。固相ペプチド合成方法は確立され、幅広く使用される方法であり、次のような参考文献に記載されている：Ｓｔｅｗａｒｔら、Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ，Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ Ｃｏ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ（１９６９）；Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９（１９６３）；Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ ｉｎ“Ｈｏｒｍｏｎａｌ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ ａｎｄ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，”ｅｄ．；Ｃ．Ｈ．Ｌｉ，Ｖｏｌ．２（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９７３），ｐｐ．４８－２６７；およびＢａｖａａｙ ａｎｄ Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄ，“Ｔｈｅ Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，”ｅｄｓ．Ｅ．Ｇｒｏｓｓ ａｎｄ Ｆ．Ｍｅｉｅｎｈｏｆｅｒ，Ｖｏｌ．２（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，１９８０）ｐｐ．３－２８５。これらのペプチドは、免疫親和性またはイオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカまたはＤＥＡＥなどのアニオン交換樹脂でのクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ－ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿；たとえばＳｅｐｈａｄｅｘ Ｇ－７５を使用するゲル濾過；リガンド親和性クロマトグラフィー；あるいは非極性溶媒または非極性／極性溶媒混合物からの結晶化または沈殿によってさらに精製されうる。結晶化または沈殿による精製が好ましい。

【００５８】

いったん単離およびキャラクタリゼーションしたら、誘導体、たとえば所与の組み換えポリペプチドの化学由来誘導体は、当業者に周知の方法を使用してただちに調製されうる。１つの方法は、環化ペプチドである誘導体を調製することである（ＥＰＡ ４７１，４５３（アミド結合）；ＥＰＡ ４６７，７０１（ジスルフィド結合）；ＥＰＡ ４６７，６９９（チオエーテル結合）を参照）。他の修飾は、Ｊａｍｅｓｏｎら（Ｎａｔｕｒｅ，３６８：７４４（１９９４））；Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ｎｏ．４，９９２，４６３；およびＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ｎｏ．５，０９１，３９６に開示されている。たとえば遊離システイニルチオール基の酸化によってペプチドを環化するために、ペプチド（０．１ｍｇ ｍＬ$^{-1}$）をヨウ素（メタノール中１ｍＭ）と１時間、０℃にて反応させて、次に酸化をチオ硫酸ナトリウムによって停止させる。混合物は、セミ分取Ｚｏｒｂａｘ Ｃ８カラムでの逆相ＨＰＬＣと、続いてのＺｏｒｂａｘ ＧＦ２５０カラムでのゲル濾過にかけた。ゲル濾過によって分離される２つのピークは、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｂｉｏｌｏｎ ２０ Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒプラズマ脱離飛行時間型質量分析計を使用する質量分光法によってさらに分析した。第１ピークは、質量分析によって２つの種、部分保護モノマーペプチドと、ダイマーペプチドに分解された。物質は、飽和前のペプチドの高濃度（２０ｍｇ ｍＬ$^{-1}$）におけるエルマン試薬［５，５－ジチオ－ビス（２－

ニトロ安息香酸）；Ｓｉｇｍａ］を用いて、遊離システインチオール基について試験する。本ピークは環式ペプチドを表し、ｐＨ４．０、－２０℃にて使用するまで貯蔵される（Ｔａｍ＆Ｌｕ（１９８９）を参照）。

【００５９】

ポリペプチドのアミドは、カルボン酸基または前駆物質をアミドに変換するための当分野で周知の技法によっても調製されうる。Ｃ末端カルボキシル基におけるアミド形成の好ましい方法は、適切なアミンによって固体支持体からペプチドを開裂させて、またはアルコールの存在下で開裂させて、エステルを得ることと、続いての所望のアミンを用いたアミノ分解である。

【００６０】

本発明のポリペプチドのアミノ基のＮアシル誘導体は、最終縮合のためにＮアシル保護アミノ酸を利用することによって、または保護または非保護ペプチドをアシル化することによって調製されうる。Ｏアシル誘導体は、たとえば遊離ヒドロキシペプチドまたはペプチド樹脂のアシル化によって調製されうる。いずれのアシル化も、アシルハライド、無水物、アシルイミダゾールなどの標準アシル化試薬を使用して実施されうる。所望ならばＮアシル化およびＯアシル化の両方を一緒に実施できる。

【００６１】

本発明のポリペプチドのカルボキシル基の塩は、ポリペプチドに所望の塩基、たとえば金属水酸化物塩基、たとえば水酸化ナトリウム；金属炭酸塩または重炭酸塩塩基、たとえば炭酸ナトリウムまたは重炭酸ナトリウム；あるいはたとえばトリエチルアミン、トリエタノールアミンなどのアミン塩基の１当量以上を接触させることによって、通常の方法で調製されうる。

【００６２】

ポリペプチドまたは変異体ポリペプチドの、あるいはペプチドまたは変異体ペプチドのアミノ酸残基の酸添加塩は、ペプチドまたはアミンに所望の無機または有機酸、たとえば塩酸の１当量以上を接触させることによって調製されうる。ペプチドのカルボキシル基のエステルも、当分野で既知の通常の方法のいずれかによって調製されうる。

【００６３】

本発明のポリペプチドは、発現ベクターおよび宿主細胞に関する節で後述するような組み換え核酸からの発現によっても生成されうる。本発明のポリペプチドが組み換え細胞において発現されるとき、本発明の組み換えポリペプチドに関して実質的に相同である調製物を得るために、他の細胞タンパク質またはポリペプチドから組み換えペプチドを精製することが必要である。たとえば培養培地または溶解液を遠心分離して、粒子状細胞破片を除去できる。膜および溶解性タンパク質画分を次に分離する。本発明のポリペプチドは次に、溶解性タンパク質画分から精製されうる。あるいは本発明のポリペプチドは必要ならば、不溶性画分、すなわち屈折体から精製されうる（たとえばＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．４，５１８，５２６を参照）。本発明のポリペプチドは、免疫親和性またはイオン交換カラムでの分画；エタノール沈殿；逆相ＨＰＬＣ；シリカまたはＤＥＡＥなどのアニオン交換樹脂でのクロマトグラフィー；クロマトフォーカシング；ＳＤＳ－ＰＡＧＥ；硫酸アンモニウム沈殿；たとえばＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－７５を使用するゲル濾過；あるいはリガンド親和性クロマトグラフィー；によって、溶解性汚染物質または膜タンパク質およびポリペプチドから精製されうる。

【００６４】

融合ポリペプチドとして発現された場合、融合ポリペプチドは、融合ポリペプチドのカテリシジン部分に特異的な方法によって精製されうる。たとえば融合ポリペプチドがヒスチジン標識融合ポリペプチドである場合、融合ポリペプチドを精製するためにＮｉ－ＮＴＡ樹脂が利用されうる。

【００６５】

本発明のポリペプチドは、試験管内転写および翻訳反応によっても調製されうる。本発明の実質的に相同のポリペプチドの調製をもたらすために、発現カセットを利用して試験

管内で次に翻訳される遺伝子特異性転写物を産生できる。試験管内転写／翻訳反応での使用のためのベクターの構築は、このような反応の方法と同様に当業者に周知である。

【００６６】

本発明の核酸分子

本発明は、イヌカテリシジンポリペプチド、その変異体または断片をコードする単離された核酸分子も提供する。したがって本発明の核酸分子は、配列番号２または４のアミノ酸配列を有するポリペプチド、配列番号４の変異体のアミノ酸配列、またはその断片をコードしうる。配列番号２または４のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしうる本発明の核酸分子の例は、配列番号１または３のヌクレオチド配列を有する核酸である。本発明の核酸分子の非限定的な例は、次を含む：

【００６７】

【表２－１】

表２

配列番号	配列
3	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
5	ctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
7	aa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
9	gagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
11	ctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
13	atc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa

【００６８】

【表２－２】

配列番号	配列
15	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc c
17	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagg
19	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggag
21	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag
23	cggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aag
25	g accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
27	attg accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
29	aaaattg accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa
31	aagaaaattg accggctgaa agagctcatc acgacagggg ggcagaagat tggcgaaaag attaggagaa ttggccagag aatcaaggat ttttttaaga atcttcagcc cagggaggag aagtcctaa

【００６９】

イヌカテリシジンポリペプチドをコードする核酸としては、縮重変異体はもちろんのこと、対立遺伝子変異体も挙げられる。

【００７０】

「縮重変異体」という用語は、核酸を説明するために本明細書で使用する場合、遺伝子コードの縮重の結果として、核酸が配列番号１または３と異なるヌクレオチド配列を有するが、配列番号２または４それぞれのアミノ酸配列を有するポリペプチドをなおコードすることを意味する。縮重変異体は、選択した宿主細胞発現系におけるコドン使用優先度を反映する配列を有する核酸分子を含む。それゆえ特定の宿主細胞のコドン使用優先度を反映するように設計された核酸変異体は、アミノ酸レベルでの変化を示さない。

【００７１】

「対立遺伝子変異体」という用語は、本発明の核酸を説明するために本明細書で使用する場合、遺伝的多型の結果として、配列番号１または３の対立遺伝子変異体である核酸が、コードされたポリペプチドが配列番号２または４それぞれと異なるような方法で、配列番号１または３の配列と異なることを意味する。遺伝的多型は、天然の対立遺伝子変異のために母集団、たとえばイヌ母集団内の個体間に存在し、母集団、たとえばイヌ母集団内の特定のポリペプチドのアミノ酸配列の変化を引き起こす。このような天然の対立遺伝子変異は通例、所与の遺伝子のヌクレオチド配列において１～５％の分散を生じる。本明細書で使用する場合、「遺伝子」という用語は、本発明のポリペプチドをコードする読み取り枠を備えた核酸分子を指す。対立遺伝子は、所与の遺伝子座において代わりに発生する遺伝子の群の１つである。対立遺伝子変異体は、（１）各種の個々のイヌにおける同じ遺伝子座を同定および単離するために本発明のハイブリダイゼーションプローブ（上述）を使用することによって、そして次に（２）イヌ母集団における多数の異なる個体でイヌカテリシジンをコードする遺伝子を配列決定することによって同定されうる。天然対立遺伝子変異の結果であり、機能活性を変化させない、ありとあらゆるこのようなヌクレオチド変異および得られたアミノ酸多型または変異は、本発明の範囲内であるものとする。

【００７２】

核酸変異体は、配列番号４と少なくとも５３％同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸も含む。それゆえ核酸変異体は、配列番号４と少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、少なくとも９７％同一であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードしうる。

【００７３】

このような核酸変異体の例としては、配列番号１または３に対して少なくとも７０％、好ましくは少なくとも７５％、８０％、８５％、９０％、９５％または９５％超の同一性を有するヌクレオチド配列を有する核酸が挙げられる。

【００７４】

本発明の核酸分子は、高いストリンジェント条件または中程度のストリンジェント条件下で、配列番号４またはその相補体をコードする核酸配列にハイブリダイズするヌクレオチド配列も有しうる。このような核酸分子の例は、高いストリンジェント条件または中程度のストリンジェント条件下で、ヌクレオチド配列が配列番号１または３の相補体であるハイブリダイゼーションプローブにハイブリダイズする核酸分子である。

【００７５】

「ハイブリダイズする」という用語は、特定の条件下で第１の核酸分子と第２の核酸分子との間での安定な２重鎖の形成を意味する。２重鎖の安定性はハイブリダイゼーション条件によって変わり、ハイブリダイゼーション条件は、温度、イオン強度、および有機溶媒などの他の化合物の存在によって定義される。一般に、塩濃度が低くなればなるほど、そして洗浄温度が高くなればなるほど、ハイブリダイゼーション／洗浄条件はより厳密である。ストリンジェントは、ハイブリダイゼーションおよび洗浄温度を６５℃に維持しながら、塩、ＳＤＳまたは有機成分の濃度を変更することによっても調製されうる。高ストリンジェント下で、または高ストリンジェント条件において、９５％～１００％の相補的塩基を有する核酸のみが安定な２重鎖を形成するであろう。中程度ストリンジェント下で、または中程度ストリンジェント条件において、少なくとも７５％の相補的配列を有する核酸のみが安定な２重鎖を形成するであろう。

【００７６】

中および高ストリンジェント条件は、４５℃にて６Ｘ塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム（ＳＳＣ）中でのハイブリダイゼーションと、続く４８℃または６５℃それぞれでの０．２ＸＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳでの洗浄を指す。

【００７７】

本発明の核酸分子は、（１）本発明のポリペプチドをコードする核酸分子を同定するためにハイブリダイゼーションプローブとしての使用に十分である、または（２）核酸分子

の増幅または突然変異のためのポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）のプライマーとしての使用に適している、配列番号１または３の断片でもありうる。このような断片は通例、ストリンジェント条件下で配列番号１または３のヌクレオチド配列を有する核酸のセンスまたはアンチセンス鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列の領域を含み、ストリンジェント条件下で上記のような無関係の核酸にハイブリダイズしない。このような断片の例としては、制限なく、表２に示す配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１および３３が挙げられる。

【００７８】

本発明の核酸分子は、たとえば分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改善するために塩基部分、糖部分、またはホスフェート主鎖においても修飾されうる。たとえばプローブまたはプライマーとして使用するとき、本発明の核酸は、標識基、たとえば放射線同位体、蛍光化合物、酵素または酵素補助因子、ハイブリダイゼーション誘発開裂剤、あるいはハイブリダイゼーション誘発連結剤を含みうる。このような標識は、細胞膜を通じた輸送を促進するために、または検出を促進するために包含されうる。本発明の核酸も、後述するような発現制御配列に作動可能に連結されうる。

【００７９】

カテリシジンをコードする核酸を作製する方法

配列番号１または３のヌクレオチド配列を有する核酸分子などの本発明の核酸分子は、標準分子生物技法および本明細書で供給する配列情報を使用して単離されうる。

【００８０】

カテリシジン、その断片または変体体、あるいはその核酸相補体をコードするヌクレオチド配列源としては、いずれかのイヌ組織からの、たとえば生理液または組織からのＲＮＡ、あるいはゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡが挙げられる。本発明のＤＮＡ分子の他の源としては、イヌからのゲノムまたはｃＤＮＡライブラリが挙げられる。その上、本ＤＮＡ分子は試験管内で、たとえば長さが約２１５個の、好ましくは約１００個の、さらに好ましくは約５０個のヌクレオチドのオリゴヌクレオチドを合成することによって、あるいはイヌカテリシジンをコードするＤＮＡセグメントの一部をサブクローニングすることによっても調製されうる。

【００８１】

本発明のポリペプチドをコードする核酸分子は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ（１９８９）に記載されているような標準方法を使用して同定または単離されうる。たとえば逆転写酵素ＰＣＲ（ＲＴ－ＰＣＲ）を利用して、カテリシジンｃＤＮＡを単離およびクローニングできる。イヌカテリシジンをコードするＲＮＡに相補的であり、好ましくはＲＮＡの３’２／３にハイブリダイズするプライマーを逆転写酵素反応におけるプライマーとして使用して、興味のあるＲＮＡ配列を含有する単離されたＲＮＡから第１鎖ｃＤＮＡを調製しうる。ＲＮＡは、当分野で既知の方法によって、たとえばＴＲＩＺＯＬ（商標）試薬（ＧＩＢＣＯ－ＢＲＬ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，Ｍａｒｙｌａｎｄ）を使用して単離されうる。得られた第１鎖ｃＤＮＡは次に、ＰＣＲ反応で増幅される。

【００８２】

「ポリメラーゼ連鎖反応」または「ＰＣＲ」は、核酸、ＲＮＡおよび／またはＤＮＡの事前に選択された断片の量がＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ｎｏ．４，６８３，１９５に記載されているように増幅される手順または技法を指す。一般に、興味のある領域の末端またはそれ以上からの配列情報を利用して、少なくとも７～８のオリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドプライマーを設計する。これらのプライマーは配列内で、増幅されるテンプレートの逆鎖と同一または同様であるだろう。ＰＣＲを使用して、特異的ＲＮＡ配列、全ゲノムＤＮＡからの特異的ＤＮＡ配列、および全細胞ＲＮＡ、バクテリオファージまたはプラスミド配列から転写されたｃＤＮＡなどを増幅できる。たとえば一般にＭｕｌｌｉｓら、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．，５

１：２６３（１９８７）；Ｅｒｌｉｃｈ，ｅｄ．，ＰＣＲ ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＹ，（Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９）を参照。それゆえＰＣＲベースクローニング手法は、関係する遺伝子またはポリペプチド配列の配列比較から推定した保存配列に依存する。しかしながらこれに限定されるわけではないが、自律的配列特異的増幅（３ＳＲ）（Ｇｅｂｉｎｏｇａら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２３５：２５６（１９９６）；Ｆａｈｙら、ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌ，１：２５（１９９１）；Ｇｕａｔｅｌｌｉら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８７：１８７４（１９９０））、核酸配列ベース増幅（ＮＡＳＢＡ）（Ｃｏｍｐｔｏｎ，Ｎａｔｕｒｅ，３５０：９１（１９９１））、鎖置換増幅（ＳＤＡ）（Ｗａｌｋｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８９：３９２（１９９２）；Ｗａｌｋｅｒら、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．，２０：１６９１（１９９２））、プローブ環化（Ｌａｎｄｇｒｅｎ，Ｔｒｅｎｄｓ ｉｎ Ｇｅｎ．，９：１９９（１９９３））、またはＱベータレプリカーゼ、Ｓｐ６、Ｔ７、またはＴ３ ＲＮＡポリメラーゼベース増幅系を含む、当分野で既知の他の増幅ベース方法も利用されうる。たとえばＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ｎｏｓ．６２２，８２０、５，６２９，１５３、５，５３２，１２６、５，５７３，９１４および５，５１４，５４５を参照。

【００８３】

プライマーは、たとえば他のカテリシジン遺伝子の配列比較によってプライマーを産生するために同定および比較されたペプチドまたはヌクレオチド配列の高度に保存された領域と一致するように作製される。イヌカテリシジンをコードするＤＮＡ分子の、アンチセンス鎖にアニールすることが予想される１つのプライマーが調製され、センス鎖にアニールすることが予想される別のプライマーが調製される。

【００８４】

各ＰＣＲ反応の生成物はアガロースゲルによって分離され、一貫して増幅された生成物はすべてゲル精製され、既知のプラスミドベクターなどの適切なベクター内へ直接クローニングされる。得られたプラスミドは、制限エンドヌクレアーゼおよび２本鎖プラスミドＤＮＡのジデオキシ配列決定を受ける。あるいはゲル精製断片を直接配列決定できる。

【００８５】

ｃＤＮＡまたはゲノムライブラリは、コロニーハイブリダイゼーション手順を使用してスクリーニングされうる。一般に各マイクロタイタープレートを２通りのニトロセルロース濾紙上に複製して、コロニーを５０μｇ／ｍＬ Ａｍｐを含有するＬ寒天上に３７℃にて１４～１６時間にわたって成長させる。コロニーは、溶解させて、５００ｍＭ ＮａＯＨ、１．５Ｍ ＮａＣｌを用いた５分間の連続処置によってフィルタにＤＮＡ固定して、毎回５Ｘ標準食塩クエン酸（ＳＳＣ）で５分間、２回洗浄する。フィルタを空気乾燥させて、８０℃にて２時間焼いた。２通りのフィルタをフィルタ当たり１０ｍＬのＤＮＡハイブリダイゼーション緩衝液（５ｘＳＣＣ、ｐＨ７．０、５ｘデンハート溶液（ポリビニルピロリドンにＦｉｃｏｌｌおよびウシ血清アルブミンを添加；１ｘ＝それぞれ０．０２％）、ｐＨ７．０の５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液、０．２％ ＳＤＳ、２０μｇ／ｍＬ Ｐｏｌｙ Ｕ、および５０μｇ／ｍＬ変性サケ精子ＤＮＡ）によって、４２℃にて６～８時間にわたって予備ハイブリダイズする。

【００８６】

サンプルは、所望されるストリンジェントに応じた条件下でキナーゼプローブによってハイブリダイズされうる。代表的な中程度のストリンジェント条件は、４２℃の温度を２４～３６時間にわたって、１～５ｍＬ／フィルタのＤＮＡハイブリダイゼーション緩衝液含有プローブと共に利用する。より高いストリンジェントでは、高温および短時間が利用される。一般に、フィルタを３０分間にわたって４回、毎回３７℃にて２ｘＳＳＣ、０．２％ ＳＤＳおよびｐＨ７の５０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液で洗浄して、次に２ｘＳＳＣおよび０．２％ ＳＤＳで２回洗浄し、空気乾燥させて、－７０℃にて２～３日間オートラジオグラフにかけた。

【００８７】

制限消化物からのＤＮＡの所与の断片の回収および単離は、ポリアクリルアミドまたはアガロースゲル上での電気泳動による分離、興味のある断片の、その移動性と既知の分子量のマーカＤＮＡ断片の移動性との比較による同定、所望の断片を含有するゲル切片の除去、およびＤＮＡからのゲルの分離を利用しうる。Ｌａｗｎら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，９：６１０３（１９８１）、および Ｇｏｅｄｄｅｌら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，８，４０５７（１９８０）を参照。

【００８８】

したがって配列番号３の全部または一部をハイブリダイゼーションプローブとして使用して、本発明の核酸分子は標準ハイブリダイゼーションおよびクローニング技法を使用して単離できる。本発明の核酸分子は、テンプレートとしてのｃＤＮＡ、ｍＲＮＡまたはゲノムＤＮＡおよび適切なオリゴヌクレオチドを使用して、標準ＰＣＲ増幅技法に従って増幅されうる。このように増幅された核酸は、適切なベクター内にクローニングされて、ＤＮＡ配列解析によってキャラクタリゼーションされうる。本発明の核酸分子の全部または一部に一致するオリゴヌクレオチドは、標準合成技法によって、たとえば自動ＤＮＡ合成装置を使用して調製されうる。

【００８９】

本発明のポリペプチドの「生物活性断片」をコードする核酸は、生物活性を有するポリペプチドをコードする配列番号１、たとえば配列番号３、５、７、９、１１、１３、１５、１７、１９、２１、２３、２５、２７、２９、３１および３３のいずれかの一部を単離することと、たとえば試験管内での組み換え発現によってポリペプチドのコードされた断片を発現させることと、本明細書に記載した、または当分野で既知の方法を使用してポリペプチドのコードされた部分の活性を評価することとによって調製されうる。

【００９０】

カテリシジン核酸配列変体を作製する方法

イヌカテリシジンのアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当分野で既知の各種の方法によって調製される。これらの方法としては、これに限定されるわけではないが、天然源からの単離（天然型アミノ酸配列変異体または対立遺伝子変異体の場合）またはイヌカテリシジンの早期に調製された変異体または非変異体バージョンのオリゴヌクレオチド媒介（または部位特異的）突然変異誘発、ＰＣＲ突然変異誘発、およびカセット突然変異誘発による調製が挙げられる。

【００９１】

オリゴヌクレオチド媒介突然変異誘発は、イヌカテリシジンのアミノ酸置換変異体を調製するための好ましい方法である。本技法は、Ａｄｅｌｍａｎら、ＤＮＡ，２：１８３（１９８３）によって記載されているように当分野で周知である。簡潔にはイヌカテリシジンＤＮＡは、所望の突然変異をコードするオリゴヌクレオチドをＤＮＡテンプレートにハイブリダイズすることによって変化され、テンプレートはイヌカテリシジンの不変または未変性ＤＮＡ配列を含有するプラスミドまたはバクテリオファージの１本鎖形である。ハイブリダイゼーション後に、ＤＮＡポリメラーゼを使用して、オリゴヌクレオチドプライマーをそれゆえ包含して、イヌカテリシジンＤＮＡ内で選択した変化をコードするテンプレートの第２の相補的鎖全体を合成する。

【００９２】

一般に、長さが少なくともヌクレオチド２５個のオリゴヌクレオチドが使用される。最適なオリゴヌクレオチドは、突然変異をコードするヌクレオチドの両側でテンプレートに対して完全に相補的である１２～１５個のヌクレオチドを有するであろう。このことは、オリゴヌクレオチドが１本鎖ＤＮＡテンプレート分子に適正にハイブリダイズするようにする。オリゴヌクレオチドは、Ｃｒｅａら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，７５：５７６５（１９７８）によって記載されたような当分野で既知の技法を使用してただちに合成される。

【００９３】

ＤＮＡテンプレートは、バクテリオファージＭ１３ベクター（市販のＭ１３ｍｐ１８お

よびＭ１３ｍｐ１９ベクターが適切である）にいずれも由来するベクター、またはＶｉｅｒａら、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．，１５３：３（１９８７）によって記載されているような１本鎖ファージ複製起点を含有するベクターによって産生されうる。それゆえ突然変異されるＤＮＡは、これらのベクターの１つに挿入されて１本鎖テンプレートが産生されうる。１本鎖テンプレートの生成は、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，１９８９）の４．２１～４．４１節に記載されている。

【００９４】

あるいは１本鎖ＤＮＡテンプレートは、標準技法を使用して２本鎖プラスミド（または他の）ＤＮＡを変性することによって産生されうる。

【００９５】

（たとえばアミノ酸配列変異体を産生するための）未変性ＤＮＡ配列の変化では、オリゴヌクレオチドは適切なハイブリダイゼーション条件下で１本鎖テンプレートにハイブリダイズされる。ＤＮＡ重合構造、通常はＤＮＡポリメラーゼＩのクレノウ断片が次に添加され、合成のためのプライマーとしてオリゴヌクレオチドを使用して、テンプレートの相補的鎖を合成する。それゆえＤＮＡの一方の鎖がイヌカテリシジンの突然変異形をコードして、他方の鎖（元のテンプレート）がイヌカテリシジンの未変性不変配列をコードするように、ヘテロ２重鎖分子が形成される。本ヘテロ２重鎖分子は次に、適切な宿主細胞、通常はＥ．ｃｏｌｉ ＪＭ１０１などの原核生物へ形質転換される。細胞が成長した後に、それらをアガロースプレート上にプレーティングして、突然変異ＤＮＡを含有する細菌コロニーを同定するために３２－ホスフェートによって放射性標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを使用してスクリーニングする。次に突然変異領域を除去して、ペプチドまたはポリペプチド生成に適切なベクター内に、一般に適切な宿主の形質転換に通例利用される種類の発現ベクター内に配置される。

【００９６】

すぐ上に記載した方法は、プラスミドの両方の鎖が（複数の）突然変異を含有するホモ２重鎖分子が作製されるように修飾されうる。修飾は次の通りである：１本鎖オリゴヌクレオチドは上述のように１本鎖テンプレートにアリールする。３つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン（ｄＡＴＰ）、デオキシリボグアノシン（ｄＧＴＰ）、およびデオキシリボチミジン（ｄＴＴＰ）の混合物を、ｄＣＴＰ－（αＳ）と呼ばれる修飾チオデオキシリボシトシン（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎより入手できる）と組み合せる。本混合物をテンプレート－オリゴヌクレオチド複合体に添加する。ＤＮＡポリメラーゼの本混合物への添加時に、突然変異した塩基を除いてテンプレートと同一のＤＮＡの鎖が産生される。加えてＤＮＡのこの新しい鎖は、それを制限エンドヌクレアーゼ消化から保護する役割を果たすｄＣＴＰ－（αＳ）をｄＣＴＰの代わりに含有するであろう。

【００９７】

２本鎖ヘテロ２重鎖のテンプレート鎖を適切な制限酵素によって切断した後、テンプレート鎖はＥｘｏＩＩＩエンドヌクレアーゼまたは突然変異誘発される（複数の）部位を含有する領域を通過する他の適切なヌクレアーゼによって消化されうる。次に反応を停止させると、部分的にのみ１本鎖である分子が残る。４つすべてのデオキシリボヌクレオチド３リン酸、ＡＴＰ、およびＤＮＡリガーゼの存在下でＤＮＡポリメラーゼを使用して、完全な２重鎖ＤＮＡホモ２重鎖を次に形成する。本ホモ２重鎖分子は次に、Ｅ．ｃｏｌｉ ＪＭ１０１などの安定な宿主細胞に形質転換されうる。

【００９８】

たとえば本発明の好ましい実施形態は、配列番号４を有するイヌカテリシジンをコードする核酸を含む単離および精製されたＤＮＡ分子であり、該ＤＮＡセグメントは「サイレント」であるヌクレオチド置換を有する配列番号３、または配列番号３の変異体を含む。すなわちサイレントヌクレオチド置換がコドン内に存在するとき、同じアミノ酸は置換の

ないコドンによってコードされるように、ヌクレオチド置換のあるコドンによってコードされる。たとえばバリンはコドンＧＴＴ、ＧＴＣ、ＧＴＡおよびＧＴＧによってコードされる。ポリペプチドのプレプロ形の第４コドンにおける配列番号１の変異体（配列番号１のＧＴＴ）は、ＧＴＴのＧＴＣ、ＣＴＡまたはＧＴＧによる置換を含む。配列番号４に対応するポリペプチドをコードできる配列番号３の他の「サイレント」ヌクレオチド置換は、図３およびＳａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（１９８９）の付録Ｄのページ Ｄ１を参照することによって確認されうる。ヌクレオチド置換は、当分野で周知の方法によってＤＮＡセグメント内に導入されうる。たとえばＳａｍｂｒｏｏｋら、上掲を参照。同様に、他のイヌカテリシジンをコードする核酸分子が同様の方法で修飾されうる。それゆえイヌカテリシジンの少なくとも一部、またはそれに対する相補体をコードする核酸分子は、サイレントヌクレオチド置換を有する本発明の核酸分子を得るために、またはアミノ酸置換基を生じるヌクレオチド置換を有する核酸分子を得るために修飾されうる。

【００９９】

発現ベクターおよび宿主細胞

本発明の核酸は、本発明のポリペプチドをコードする核酸が発現制御配列に作動可能に連結された発現ベクターの形でもありうる。「ベクター」という用語は、核酸分子であって、それが結合されている別の核酸を運搬することができる核酸分子を指す。ベクターの例は、中に追加のＤＮＡ分子を結合できる環状２本鎖ＤＮＡ分子である、「プラスミド」である。別の例は、追加のＤＮＡセグメントをウィルスゲノム内に結合できるウィルスベクターである。あるベクター、たとえば細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳類ベクターは、それらが導入される宿主細胞における自己複製が可能であるが、他のベクター、たとえば非エピソーム哺乳類ベクターは、宿主細胞内への導入時に宿主細胞のゲノム内に組み込まれて、それゆえ宿主ゲノムに沿って複製する。あるベクター、特に発現ベクターは、それらが操作可能に結合される遺伝子の発現を指示できる。

【０１００】

本発明の発現ベクターは、宿主細胞内での核酸の発現に適切な形で本発明の核酸を含む。発現ベクターは、発現される核酸配列に作動可能に連結された、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択された１個以上の調節配列を含む。

【０１０１】

「作動可能に連結された」という用語は、本明細書で使用する場合、コード配列および調節配列、たとえばプロモータ、オペレータ、エンハンサ、または他の発現制御配列が、転写活性化因子タンパク質などの適切な分子が調節配列に結合されているときにコード配列からの発現を可能にするような方法で結合されていることを意味する。それゆえ「作動可能に連結された」は、興味のあるヌクレオチド配列、たとえば本発明のポリペプチドをコードする配列が、宿主細胞内にまたは試験管内転写／翻訳系にベクターが導入されるときにたとえば宿主細胞におけるヌクレオチド配列の発現を可能にする方法で（複数の）調節配列に結合されることを意味する。

【０１０２】

「調節配列」は制限なく、プロモータ、オペレータ、エンハンサおよび他の発現制御要素、たとえばポリアデニル化シグナルを含む。調節配列は当分野で既知であり、多くの種類の宿主細胞において、またはある宿主細胞においてのみ（たとえば組織特異的調節配列）本発明の核酸の構成的発現を指示しうる。発現ベクターの選択および設計は、本発明のポリペプチドの発現のレベルおよび使用される発現形、たとえば宿主細胞、たとえば原核または真核（哺乳類、酵母）あるいはたとえばＴ７系を使用する試験管内転写／翻訳を含む因子に依存する。

【０１０３】

本発明は、組み換え発現ベクターが中に導入された宿主細胞も提供する。「宿主細胞」という用語は、原核または真核でありうる、特徴が明確で相同である、生物学的に純粋な細胞の母集団を指す。真核細胞は、哺乳類起源であるのはもちろんのこと、植物、昆虫、

酵母、または真菌起源でもありうる。真核細胞は、一次細胞と同様に、当分野で既知の方法によって試験管内で腫瘍性であるか、または「不死化」されうる。宿主細胞は、原核、好ましくは細菌起源でありうる。原核宿主は、Ｅ．ｃｏｌｉの各種の菌株によって最も頻繁に表される。しかしながら他の微生物株、たとえばバチルスサブティリスなどのバチルス属、シュードモナスの多様な種、または他の細菌株も使用されうる。「宿主細胞」という用語は、発現ベクターが中に導入された特定の細胞はもちろんのこと、そのような細胞の子孫または潜在的な子孫も指す。このような子孫は親細胞と同一でありうるか、または突然変異または環境の影響によって後継世代で起こる修飾を含有しうる。

【０１０４】

発現ベクターは、制限なく、リン酸カルシウムまたは塩化カルシウム共沈殿、ＤＥＡＥ－デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、または核酸を細胞に導入するための市販の方法を含む、在来の形質転換またはトランスフェクション技法を使用して宿主細胞内へ導入されうる。

【０１０５】

「トランスフェクションされた」または「形質転換された」は本明細書に使用する場合、少なくとも１個の事前に選択されたＤＮＡ配列の存在によってそのゲノムが変化または増強させられたいずれの宿主細胞または細胞系も含むために使用され、該ＤＮＡは遺伝子工学の分野で「異種ＤＮＡ」、「組み換えＤＮＡ」、「外来性ＤＮＡ」、「遺伝子組み換えされた」、「非未変性」または「外来ＤＮＡ」とも呼ばれ、前記ＤＮＡは単離されて、遺伝子工学のプロセスによって宿主細胞または細胞系のゲノム内に導入された。本発明の宿主細胞は通例、プラスミド発現ベクター、ウィルス発現ベクターにおけるＤＮＡ配列によるトランスフェクションによって、または単離された線形ＤＮＡ配列として生成される。好ましくは、トランスフェクションＤＮＡは染色体的に組み込まれた組み換えＤＮＡ配列であり、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその相補体を含み、該宿主細胞は著しいレベルの自己または「未変性」カテリシジンを発現することも、発現しないこともある。

【０１０６】

宿主細胞における事前に選択したＤＮＡ配列の存在を確認するために、各種のアッセイが実施されうる。このようなアッセイとしては、たとえば当業者に周知の「分子生物学的」アッセイ、たとえばサザンおよびノザンブロッティング、ＲＴ－ＰＣＲおよびＰＣＲ；「生化学」アッセイ、たとえば免疫学的手段（ＥＬＩＳＡおよびウェスタンブロット）によって、または本明細書に記載したアッセイによって、本発明のポリペプチドの存在または非存在を検出することが挙げられる。

【０１０７】

製薬的組成物および製造品

一実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子を含む製薬組成物を提供する。このような製薬組成物を調製するために、本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子は、合成、またはそうでなければ入手されて、必要または要望に応じて精製され、次に凍結乾燥および安定化される。ポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子は、次に適切な濃度に調整されて、次に他の（複数の）薬剤または（複数の）製薬的に許容される担体と組み合されうる。「製薬的に許容される」とは、調合物の他の成分と適合性であり、そのレシピエントに有害でない担体、希釈剤、賦形剤、および／または塩を意味する。

【０１０８】

本発明の治療用ポリペプチド、その変異体または断片を含有する製薬調合物は、周知でただちに入手できる成分を使用して当分野で既知の手順によって調製されうる。たとえばポリペプチドは、一般的な賦形剤、希釈剤、または担体によって調合され、錠剤、カプセル剤、液剤、懸濁剤、粉剤、エアゾール剤などに形成されうる。このような調合物に適切である賦形剤、希釈剤および担体の例としては、緩衝剤はもちろんのこと、デンプン、セ

ルロース、糖、マンニトール、およびケイ酸誘導体などの充填剤および増量剤が挙げられる。結合剤、たとえばカルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよび他のセルロース誘導体、アルギナート、ゼラチン、およびポリビニルピロリドンも含まれうる。

【０１０９】

グリセロールなどの保湿剤、炭酸カルシウムおよび重炭酸ナトリウムなどの崩壊剤が含まれうる。パラフィンなどの溶解を遅延させる薬剤も含まれうる。４級アンモニウム化合物などの吸収促進剤も含まれうる。セチルアルコールおよびグリセロールモノステアレートなどの表面活性剤も含まれうる。カオリンおよびベントナイトなどの吸着性担体も添加されうる。タルク、カルシウムおよびマグネシウムステアレート、ならびの固体ポリエチルグリコールなどの潤滑剤も含まれうる。保存料も添加されうる。本発明の組成物は、セルロースおよび／またはセルロース誘導体などの増粘剤も含有しうる。それらはキサンタン、グアーまたはカルボガムあるいはアラビアガムなどのガム、あるいはポリエチレングリコール、ベントンおよびモンモリロナイトなども含有しうる。

【０１１０】

経口投与では、ポリペプチド、その変異体または断片は、粉剤、粒状調合物、液剤、懸濁剤、乳剤として、あるいはチューイングガムからの活性成分の摂取のための天然または合成ポリマーまたは樹脂中に存在しうる。活性ポリペプチドは、ボーラス、舐剤またはペースト剤としても存在しうる。調合物は、適切な場合、別個の単位投薬形で好都合に存在して、治療剤と液体担体、固体マトリクス、半固体担体、微粉化固体担体またはその組み合せとを混合することと、次に必要ならば生成物を所望の送達系へ導入または成形することとを含む、製薬分野で周知の方法のいずれかによって調製されうる。このような調合物中の全活性成分は、調合物の０．１～９９．９重量％を構成する。

【０１１１】

本発明のポリペプチド、その変異体または断片を含有する錠剤またはカプレット剤は、炭酸カルシウム、酸化マグネシウムおよび炭酸マグネシウムなどの緩衝剤を含みうる。カプレット剤および錠剤は、不活性成分、たとえばセルロース、アルファ化デンプン、二酸化ケイ素、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ステアリン酸マグネシウム、微結晶性セルロース、デンプン、タルク、二酸化チタン、安息香酸、クエン酸、コーンスターチ、鉱油、ポリプロピレングリコール、リン酸ナトリウム、ステアリン酸亜鉛なども含みうる。本発明の少なくとも１つのペプチドを含有する硬または軟ゼラチンカプセルは、ゼラチン、微結晶性セルロース、ラウリル硫酸ナトリウム、デンプン、タルク、および二酸化チタンなどの不活性成分はもちろんのこと、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）および植物油などの液体ビヒクルも含有しうる。その上、本発明の１つ以上のペプチドを含有する腸溶コーティングカプレット剤または錠剤は、胃における崩壊に耐えて、十二指腸のより中性～アルカリ性環境で溶解するように設計されている。

【０１１２】

本発明の経口投与治療用ポリペプチド、その変異体および断片は持続放出用にも調合されうる。この場合、本発明のペプチドは、コーティングされ、マイクロカプセル化され（ＷＯ９４／０７５２９およびＵ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏ．４，９６２，０９１を参照）、またはそうでなければ持続送達デバイス内に配置されうる。持続放出調合物は活性ペプチドをたとえば、腸管または気道の特定の部分に、おそらくある期間にわたって放出するように設計されうる。コーティング、エンベロープ、および保護マトリクスは、たとえばポリラクチド－グリコラート、リポソーム、マイクロエマルジョン、マイクロ粒子、ナノ粒子、またはワックスなどのポリマー物質から作製されうる。これらのコーティング、エンベロープ、および保護マトリクスは、留置デバイス、たとえばステント、カテーテル、腹膜透析チュービング、ドレーンデバイスなどをコーティングするのに有用である。

【０１１３】

本発明のポリペプチド、その変異体または断片は、好都合な経口投与用にエリキシル剤または液剤として、あるいはたとえば筋肉内、皮下、腹腔内または静脈内経路による非経

口投与に適した液剤としても調合されうる。本発明の治療用ペプチドの製薬調合物は、水性または無水液剤または分散剤の形も、あるいは乳剤または懸濁剤または軟膏の形も取りうる。

【０１１４】

それゆえポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子は、非経口投与（たとえば注射、たとえばボーラス注射または連続輸液による）用に調合され、アンプル、充填済み注射器、小容量輸液容器での単位用量形または複数回投薬容器で存在しうる。上記のように、保存料は投薬形の貯蔵寿命の維持を容易にするために添加されうる。活性ポリペプチドおよび他の成分は、油性または水性ビヒクルで懸濁剤、液剤、または乳剤を形成して、懸濁化剤、安定剤および／または分散化剤などの処方用剤を含有しうる。あるいは活性ポリペプチドおよび他の成分は、使用前の適切なビヒクル、たとえば発熱物質を含まない水による構成のために、滅菌固体の無菌単離によって、または溶液からの凍結乾燥によって得られる粉末形でありうる。

【０１１５】

これらの調合物は、当分野で周知である製薬的に許容される担体、ビヒクルおよびアジュバントを含有しうる。たとえば生理学的観点から許容され、水に加えて、アセトン、エタノール、イソプロピルアルコール、「ダワノール」という名称で販売されている製品などのグリコールエーテル、ポリグリコールおよびポリエチレングリコール、短鎖酸のC_1－C_4アルキルエステル、エチルまたはイソプロピルラクテート、「ミグリオール」という名称で販売されている製品などの脂肪酸トリグリセリド、イソプロピルミリステート、動物、鉱物および植物油ならびにポリシロキサンなどの溶媒より選択される１つ以上の有機溶媒を使用して液剤を調製することが可能である。

【０１１６】

必要ならば抗酸化剤、表面活性剤、他の保存料、膜形成剤、角質溶解剤または面皰溶解剤、香料、着香料および着色料より選択されるアジュバントを添加することも可能である。ｔ－ブチルヒドロキノン、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエンならびにα－トコフェロールおよびその誘導体などの抗酸化剤も添加されうる。

【０１１７】

ある実施形態において、ポリペプチド、その変異体または断片は殺菌剤として調合され、局所的にまたは膣、直腸、眼、鼻および口などの粘膜表面に投与される。局所投与では、治療剤は標的範囲への直接塗布用に当分野で既知であるように調合されうる。主に局所塗布用に調整された形は、たとえばクリーム、ミルク、ゲル、分散剤またはマイクロエマルジョン剤、より高いまたは低い程度まで濃縮されたローション、含浸パッド、軟膏またはスティック、エアゾール調合物（たとえばスプレーまたはフォーム）、石鹸、洗剤、ローションまたは石鹸ケークの形を取る。それゆえ一実施形態において、本発明のポリペプチドは、膣用クリームまたは局所的に塗布される殺菌剤として調合されうる。この目的のための他の在来の形としては、創傷ドレッシング、コーティング包帯または他のポリマーカバリング、軟膏、クリーム、ローション、ペースト、ゼリー、スプレー、およびエアゾールが挙げられる。それゆえ本発明の治療用ペプチドは、経皮投与用のパッチまたは包帯を通じて送達されうる。あるいはポリペプチドは、接着性ポリマー、たとえばポリアクリレートまたはアクリレート／酢酸ビニルコポリマーの一部として調合されうる。長期塗布の場合、皮膚の水和または浸軟が最小限に抑えられるように、微孔性および／または通気性裏当て積層材を使用することが望ましいことがある。裏当て層は、所望の保護および支持機能を与えるいずれの厚さでもよい。適切な厚さは一般に約１０～約２００ミクロンであろう。

【０１１８】

軟膏およびクリームはたとえば、適切な増粘剤および／またはゲル化剤の添加によって水性または油性ベースを用いて調合されうる。ローションは、水性または油性ベースを用いて調合でき、一般に１つ以上の乳化剤、安定剤、分散化剤、懸濁化剤、増粘剤、または着色料も含有するであろう。活性ペプチドは、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ　Ｎｏｓ．４，１４

０，１２２；４，３８３，５２９；または４，０５１，８４２によって開示されているように、イオン導入によっても送達されうる。局所調合物中に存在する本発明の治療剤の重量パーセントは各種の因子によって変わるが、一般に調合物の総重量の０．０１％～９５％、通例は０．１～８５重量％であろう。

【０１１９】

点滴剤、たとえば点眼薬または点鼻薬は、１つ以上の分散化剤、可溶化剤または懸濁化剤も含む水性または非水性ベース中で、ポリペプチド、その変異体または断片の１つ以上を用いて調合されうる。液体スプレーは加圧パックから好都合に送達される。点滴剤は、簡単な点眼薬キャップ付きボトルによって、または液体内容物を滴状に送達するのに適したプラスチックボトルによって特殊形状クロージャを介して送達される。

【０１２０】

ポリペプチド、その変異体または断片は、口または咽喉での局所投与用にさらに調合されうる。たとえば活性成分は、着香ベース、通常はスクロースおよびアラビアゴムまたはトラガカントをさらに含む口内錠；ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアラビアゴムなどの不活性ベース中に組成物を含むトローチ剤；および適切な液体担体中に本発明の組成物を含む洗口液として調合されうる。

【０１２１】

本発明の製薬調合物は任意の成分として、製薬的に許容される担体、希釈剤、可溶化剤または乳化剤、および当分野で利用できる種類の塩を含みうる。このような物質の例としては、生理的緩衝食塩溶液などの生理食塩水および水が挙げられる。本発明の生理的調合物で使用可能である担体および／または希釈剤の具体的な非制限的例としては、水および生理的に許容される緩衝食塩溶液、たとえばリン酸緩衝生理食塩水、ｐＨ７．０～８．０が挙げられる。

【０１２２】

本発明のポリペプチド、その変異体または断片、またはそのための核酸分子は、気道に投与することもできる。それゆえ本発明は、本発明の方法で使用するためのエアゾール製薬調合物および投薬形も提供する。一般にこのような投薬形は、感染の臨床症状を治療または予防するのに有効な、本発明の薬剤の少なくとも１つの量を含む。本発明の方法に従って治療された感染の１つ以上の症状の統計的に有意な減弱はいずれも、本発明の範囲内のそのような感染の治療であると見なされる。

【０１２３】

あるいは吸入または吹送による投与では、組成物は乾燥粉剤、たとえば治療剤およびラクトースまたはデンプンなどの適切な粉末ベースの粉末ミックスの形を取りうる。粉末組成物は、たとえばカプセル剤またはカートリッジ内の単位投薬形で、あるいは粉末が吸入器、吹送器、または定量吸入器（たとえばＮｅｗｍａｎ，Ｓ．Ｐ．ｉｎ Ａｅｒｏｓｏｌｓ ａｎｄ ｔｈｅ Ｌｕｎｇ，Ｃｌａｒｋｅ，Ｓ．Ｗ．ａｎｄ Ｄａｖｉａ，Ｄ．ｅｄｓ．，ｐｐ．１９７－２２４，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｌｏｎｄｏｎ，Ｅｎｇｌａｎｄ，１９８４に開示されている加圧定量吸入器（ＭＤＩ）および乾燥粉末吸入器を参照）の補助によって投与されうるたとえばゼラチンまたはブリスターパックで提供されうる。

【０１２４】

本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子は、エアゾールまたは吸入形で投与されるときに水溶液でも投与されうる。それゆえ他のエアゾール製薬調合物はたとえば、治療される適応症および疾患に対して特異的な本発明の１つ以上のペプチドの約０．００１ｍｇ／ｍＬ～約１００ｍｇ／ｍＬを含有する生理学的に許容される緩衝食塩溶液を含みうる。液体に溶解または懸濁されていない微粉化ペプチドまたは核酸粒子の形の無水エアゾールも、本発明の常法で有用である。本発明のポリペプチドは、散布剤として調合でき、約１～５μｍ、あるいは２～３μｍの平均粒径を有する微粉化粒子を含む。微粉化粒子は、当分野で周知の技法を使用して微粉砕およびスクリーン濾過によって調製されうる。粒子は、粉末の形でありうる微粉化物質の所定の量を吸入することによって投与されうる。必要な有効量は複数の投薬単位の投与によって達成されうる

ため、各投薬形の個別のエアゾール用量に含有される活性成分または成分の単位含有量それ自体が、特定の感染、適応症または疾患を治療するための有効量を構成する必要がないことが認識されるであろう。その上、有効量は、個別に、または一連の投与で投薬形での用量より少なく使用して達成されうる。

【０１２５】

吸入による上（鼻）または下気道への投与では、本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子は、ネブライザまたは加圧パックまたはエアゾールスプレーを送達する他の好都合な手段から好都合に送達される。加圧パックは、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、二酸化炭素または他の適切な気体などの適切な噴霧体を含みうる。加圧エアゾールの場合、投薬単位は定量を送達するためのバルブを用意することによって決定されうる。ネブライザはこれに限定されるわけではないが、Ｕ．Ｓ．Ｐａｔｅｎｔ Ｎｏｓ．４，６２４，２５１；３，７０３，１７３；３，５６１，４４４；および４，６３５，６２７に記載されているものを含む。本明細書に開示した種類のエアゾール送達システムは、Ｆｉｓｏｎｓ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ（Ｂｅｄｆｏｒｄ，Ｍａｓｓ．）、Ｓｃｈｅｒｉｎｇ Ｃｏｒｐ．（Ｋｅｎｉｌｗｏｒｔｈ，ＮＪ）およびＡｍｅｒｉｃａｎ Ｐｈａｒｍｏｓｅａｌ Ｃｏ．，（Ｖａｌｅｎｃｉａ，ＣＡ）を含む、多くの市販元から入手できる。鼻内投与では、治療剤は点鼻薬、プラスチックボトル噴霧器または定量吸入器による液体スプレーによっても投与されうる。代表的な噴霧器はＭｉｓｔｏｍｅｔｅｒ（Ｗｉｎｔｒｏｐ）およびＭｅｄｉｈａｌｅｒ（Ｒｉｋｅｒ）である。

【０１２６】

本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子は、１つ以上の既知の治療剤、たとえば鎮痛剤；抗ウィルス剤；抗菌剤；抗癌剤；抗炎症剤；抗ヒスタミン薬；気管支拡張薬およびその適切な組み合せと併用して、記載した状態または他の状態のどちらかにも使用されうる。

【０１２７】

本発明は、微生物の成長の抑制での使用のために標識された、または本明細書に記載したような食品媒介病または性感染症の治療での使用のために標識された本発明の製薬組成物またはポリペプチドを含む、製造品も提供する。このような製造品は、本発明の組成物またはポリペプチドはもちろんのこと、その断片、変異体または誘導体も含有する容器と、このような組成物またはポリペプチドを食品媒介病または性感染症の治療に使用するための説明書とを含む。説明書は、パッケージ材料に含まれる、またはパッケージ材料に印刷されたラベルの形でありうる。

【０１２８】

種々の組成物および製造品

一実施形態において、本発明は、本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子を含有する組成物を含む製造品を提供する。

【０１２９】

このような製造品は、食品パッケージング材料でありうる。非限定的な例としては、ケーシング；柔軟性プラスチック；箱の剛性ボール紙、紙、および木製品；柔軟性紙、たとえば袋；缶およびドラム缶などの剛性金属；柔軟性金属、たとえばアルミニウム箔；紙、プラスチックおよび箔を組み合せた積層体または多層；ガラス広口ビンおよびビン；ならびにプラスチック広口ビンおよびビンが挙げられる。本発明のペプチドまたは組成物は、パッケージング材料の製造中に食品パッケージング材料内に包含されうる。ペプチドまたは組成物は、パッケージング材料のマトリクス内に包含されうるか、またはパッケージング材料の内部表面にコーティングとして塗布されうる。

【０１３０】

本発明のポリペプチド、変異体または断片を含みうる製造品は、生鮮または加工済み、あるいは事前に包装された食品でありうる。非限定的な例としては、缶詰食品、冷凍食品、乾燥食品、包装済み肉、半調理食品、調理済み食品および乾燥混合物が挙げられる。

【０１３１】
本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸を含む組成物は、本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸を含有するカプセル化粉剤またはスプレー液剤の形でありうる。本発明のポリペプチドを含む組成物は、食品添加物、たとえば別の抗菌剤、抗酸化剤、天然または人工着色料、天然または人工着香料または風味相乗剤、漂白剤、キレート化剤、栄養添加物、増粘剤または安定剤、またはそのいずれかの組み合せを含みうる。食品添加剤は、プロピオン酸カルシウムプロピオナート、没食子酸プロピル、過酸化物、クエン酸、リンゴ酸、酒石酸、チアミン、リボフラビン、ナイアシン、レシチン、アセスルファームＫ、酢酸、過酸化アセトン、アジピン酸、寒天、アルギン、リン酸カリウムアルミニウム、硫酸アンモニウム、アミラーゼ、アナトー抽出物、アスコルビン酸、パルミチン酸アスコルビル、アスパルテーム、ベンズアルデヒド、過酸化ベンゾイル、ベータカロテン、ブチルヒドロキシアニソール（ＢＨＡ）、ブチルヒドロキシトルエン（ＢＨＴ）、ビオチン、臭素酸カリウム、カフェイン、塩化カルシウム、カゼインカルシウム、ヨウ素酸カルシウム、パントテン酸カルシウム、リン酸カルシウム、プロピオン酸カルシウム、サッカリンカルシウム、ケイ酸カルシウム、ステアロイル乳酸カルシウム、硫酸カルシウム、カルボキシメチルセルロース、イナゴマメガム、カラギナン、カラギーン、カルナウバワックス、セルロースガム（カルボキシメチルセルロース）、二酸化塩素、クエン酸、コバラミン、シアノコバラミン、コーンシロップ、コーンシロップ固体、デキストリン、デキストロース、グルコース、ジグリセリドおよびモノグリセリド、リン酸ジカリウム、２ナトリウムＥＤＴＡ、グアニル酸２ナトリウム、イノシン酸２ナトリウム、エチレンジアミン４酢酸、タルトラジン（ＦＤ　＆　Ｃ　ｙｅｌｌｏｗ　＃５）、ＦＤ　＆　Ｃ　ｙｅｌｌｏｗ　＃６、乳酸鉄、酸化鉄、リン酸鉄、ナトリウム鉄、硫酸鉄、フッ化物、フォラシンまたは葉酸、フルクトース（左旋糖）、フマル酸、フンガリルプロテアーゼ、フルセレラン、ゼラチン、グルコース、グリセリン／グリセロール、モノステアリン酸グリセロール、グアーガム、アラビアゴム、ヘプチルパラベン、高果糖、塩酸、過酸化水素、加水分解植物タンパク質、インベルターゼ、転化糖、ヨウ素、クエン酸イソプロピル、Ｌ－システイン、ラクトアルブミン、乳酸、ラクトバチルスブルガリカス、ラクトース、レシチン、左旋糖、カンゾウ、ローカストビーンガム、炭酸マグネシウム、リンゴ酸、マンニトール、アントラニル酸メチル、リン酸モノカルシウム、モノグリセリド、グルタミン酸、モノステアリン酸、硝酸および亜硝酸モノナトリウム、ナツメグ、オキシステアリン、パントテニルアルコール、メンチルパラベン、プロピルパラベン、ヘプチルパラベン、ペトロラタム、リン酸、ポリデキストロース、ポリソルベート６０、ポリソルベート８０、硫酸カリウムアルミニウム、亜硫酸水素カリウム、臭素酸カリウム、炭酸カリウム、クエン酸カリウム、ヨウ素酸カリウム、メタ重亜硫酸カリウム、リン酸カリウム、ソルビン酸カリウム、プロピオン酸塩、プロピオン酸、没食子酸プロピル、プロピレングリコール、ピロリン酸塩、キニン、サッカリン、塩化ナトリウム、硝石、二酸化ケイ素、酸性ピロリン酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、リン酸ナトリウムアルミニウム、アスコルビン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、カゼイン酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、エリソルビン酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、硝酸／亜硝酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、プロピオン酸ナトリウム、ピロリン酸ナトリウム、アルミノケイ酸ナトリウム、ステアロール乳酸ナトリウム、亜硫酸および亜硫酸水素ナトリウム、ステアロイルフマル酸ナトリウム、トリポリリン酸ナトリウム、ソルビン酸塩／ソルビン酸、ソルビトール、大豆タンパク、塩化第１スズ、デンプン、加工デンプン、スクロース、スクロースポリエステル、亜硫酸塩、糖、二酸化硫黄、タンニン、タンニン酸、酒石酸、ダイズによる植物性タンパク質、二酸化チタン、トコフェロール、トラガカントガム、リン酸３カルシウム、バニラ、バニリン、エチルバニリン、酢、ビタミンＣ、ビタミンＤ、ビタミンＥ、乳清、キサンタンガム、またはそのいずれかの組み合せでありうる。

【０１３２】
他の製造品は、膣リング、コンドーム、包帯または同様の治療器具などの治療的に有用

な器具を含みうる。該器具は、微生物の成長または生存を制御するための製薬組成物の治療的有効量を保持する。該器具は、使用説明書と共にキットとして包装されうる。製薬組成物は、本発明の少なくとも１つのポリペプチド、変異体または断片を、感染が制御されるような治療的有効量で含む。

【０１３３】

発明の方法

本発明の核酸分子および／または宿主細胞は、本発明のポリペプチド、その変異体または断片を生成するために使用されうる。したがって本発明は、本発明の核酸分子および宿主細胞を使用して、ポリペプチド、その変異体または断片を生成する方法を提供する。該方法は、ポリペプチド、変異体または断片が生成されるように、本発明の核酸分子が導入される宿主細胞を適切な培地中で培養することを含む。該方法は、培地または宿主細胞からポリペプチド、変異体または断片を精製することをさらに含みうる。

【０１３４】

本発明の核酸分子の他の使用は、本発明のポリペプチドをコードする核酸を検出、同定または産生するためのハイブリダイゼーションプローブまたはプライマーとしての使用を含む。本発明の核酸を検出、同定または産生する方法は、当分野で既知であり、本明細書にも記載されている。これらの方法としては制限なく、核酸ハイブリダイゼーション技法、たとえばサザン、ノザンハイブリダイゼーション、ライブラリスクリーニングでのプラークまたはコロニーハイブリダイゼーション；ＰＣＲ増幅および核酸配列決定が挙げられる。

【０１３５】

本発明のポリペプチド、変異体または断片は、特異的抗体を産生するための免疫原としても使用されうる。「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子、たとえばモノクローナル抗体、および免疫グロブリン分子の免疫活性部分を指す。モノクローナル抗体は、特定の抗原エピトープに特異的に結合する抗体分子の母集団である。免疫グロブリン分子の免疫活性部分としては、Ｆ（ａｂ）断片およびＦ（ａｂ’）２断片が挙げられる。配列番号２の全長ポリペプチドまたは配列番号４などの生物活性断片は、特異的抗体を産生するのに使用されうる。本発明のポリペプチドに向けられた抗体は特異的抗体であり、そのようなものとしてそれは、少なくとも５０％以上の親和性で、好ましくは約７５％以上の親和性で、さらに好ましくは約９０％以上の親和性で、配列番号４に対して１０％未満の同一性を有するポリペプチドよりも配列番号４のポリペプチドに結合するであろう。

【０１３６】

本発明の免疫原性ポリペプチド、その変異体または断片は、エピトープに対して産生された抗体がポリペプチドと特異的な免疫複合体を形成するように、ポリペプチドのエピトープを含む配列番号２または４のアミノ酸配列の、少なくとも２０個の、好ましくは３０、４０、５０、６０または６０個を超える連続アミノ酸残基を含む。

【０１３７】

抗体を産生する方法は当分野で周知である。たとえばポリクローナル抗体は、本発明の精製ポリペプチドまたはその免疫原性断片によって適切な哺乳類を免疫化することによって調製されうる。哺乳類はたとえばウサギ、ヤギ、またはマウスでありうる。ポリペプチドまたは抗原断片は、組み換えＤＮＡ技術を使用して発現され、化学合成によって調製され、または標準タンパク質精製技法を使用して生成されうる。免疫化後の適切な時期に、抗体分子を哺乳類から、たとえば哺乳類の血液または他の体液から分離して、制限なく硫酸アンモニウムを使用する沈殿、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーまたはタンパク質Ａを使用するアフィニティクロマトグラフィーを含む標準技法を使用してさらに精製できる。加えて哺乳類の抗体生成細胞を単離して、本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を調製するために使用できる。モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマ細胞を調製する技法は当分野で既知である。たとえばＫｏｈｌｅｒ ａｎｄ Ｍｉｌｓｔｅｉｎ，Ｎａｔｕｒｅ，２５６：４９５（１９７５）およびＫｏｚｂｏｒら、Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ，４：７２（１９８３

）を参照。モノクローナル抗体は、当分野で既知の他の方法、たとえば組み換えＤＮＡ分子からの発現、または本発明のポリペプチドを使用する組み換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリのスクリーニングを使用しても調製できる。したがって本発明は、非ヒト動物を配列番号２または４の免疫原性断片によって免疫することを含む、抗体を作製する方法も提供する。

【０１３８】

そのように産生された抗体を使用して、配列番号２または４の対立遺伝子変異体である本発明のポリペプチドを同定することを含めて、本発明のポリペプチドを同定および精製することができる。

【０１３９】

本発明のポリペプチド、その変異体または断片、またはそのための核酸分子は、上述のように殺菌剤または静菌剤として使用されうる。それは微生物の生存または成長を低減または抑制するために使用されうる。「抑制する」という用語は、いずれかの検出可能な量の、たとえば５％、１０％、２０％、４０％または４０％の低下を含み、カウント、たとえば細菌培養物またはウィルス価によって、あるいは微生物による感染に関連する１つ以上の症状の評価によって決定されうる。細菌、酵母または原生動物などの微生物による感染に関連する症状は、当業者に既知である。このような症状は、特定の感染性微生物および生じる状態に独自である。本発明のポリペプチドを使用できる状態としては、制限なく、食品媒介病および性感染症（ＳＴＤ）が挙げられる。

【０１４０】

本発明のポリペプチドが活性である微生物としては、グラム陰性およびグラム陽性細菌、酵母および原生動物などの原核および真核細胞が挙げられる。非限定的な例としては、リステリア・モノサイトゲネス、スタフィロコッカス・アウレウス、エシェリキア・コリ、クレブシエラ・ニューモニエ、サルモネラ・ティフィムリウム、シュードモナス・アエルギノザ、プロテウス・ミラビリス、サルモネラ・エンテリティディス、ナイセリア・ゴノレア、ウレアプラズマ・カニゲニタリウム、ウレアプラズマ・ウレアリチカム、カンジダ・アルビカンス、トリコモナス・バギナリス、トリポネーマ・パリダムまたはクラミジア・トラコマチス、あるいは腐敗性生物が挙げられる。ナイセリア・ゴノレア（ＡＴＣＣ１０１５０）、ウレアプラズマ・カニゲニタリウム（ＡＴＣＣ５１２５２）のポリペプチドの最小抑制濃度（ＭＩＣ）の例は、少なくとも約０．２５μＭの、さらに好ましくは少なくとも約０．１０μＭの、そして最も好ましくは約０．０６μＭのＭＩＣである。各種の微生物に対する本発明のポリペプチドのＭＩＣの他の例を表４にまとめる。ＭＩＣ抗菌活性は、選択したインキュベーション期間後に裸眼で判断されるような微生物の成長の完全な抑制を指す。ＭＩＣを決定する方法は、Ｓａｎｇら、Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ａｎｄ Ｉｍｍｕｎｉｔｙ，２６１１－２０（Ｍａｙ，２００５）に述べられている方法である。

【０１４１】

「脊椎動物」とは、制限なく、魚類、両生類、鳥類はもちろんのこと、哺乳類も含む。それゆえ脊椎動物は、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル、チンパンジー、ゴリラ、マウス、ブタ、ニワトリ、魚類およびヒトでありうる。それゆえ一実施形態において、本発明は、脊椎動物間の微生物感染の伝染を制限する方法を提供する。別の実施形態において、本発明は、脊椎動物における微生物感染を治療する方法を提供する。微生物感染は、皮膚感染、食品媒介病または性感染症を引き起こしうる。非限定的な例としては、淋病、梅毒、クラミジア、食中毒、カンジダ症、肺炎、気管支炎、口腔病変、トリコモナス症、あるいは口腔または膣鵞口瘡が挙げられる。それゆえ本発明は、上で同定した微生物のいずれかによる感染に関連する疾患状態を治療する方法も提供する。

【０１４２】

微生物の生存または成長を低減または抑制する方法は、微生物に本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子の有効量を接触させることを含む。微生物の成長または生存を補助しうる組成物は、本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子の有効量を多様な方法で接触させることができる

。たとえば組成物が食品である場合、本発明のポリペプチドは食品に直接添加されるか、それはパッケージング材料のマトリクス中に包含されるか、またはそれはパッケージング材料にコーティングされることができ、この場合にポリペプチドは貯蔵中に、水分と接触したカプセル化物質の溶解時に、または所定の温度にて放出されうる。組成物が体液である場合、本発明のポリペプチドは体液に直接添加されうる。

【０１４３】

脊椎動物はポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子に、制限なく次の経路：経口、非経口（皮下、静脈内、筋肉内および腹腔内を含む）、直腸、膣、皮膚、経皮（局所）、経粘膜、胸腔内、肺内および鼻内（呼吸）経路を使用する投与を含む、多様な方法で接触されうる。投与手段は、ポンプまたは他のいずれかの適切な機構を使用して、注射によることがある。

【０１４４】

本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子は脊椎動物に、たとえば投与目的が治療的または予防的であるかにかかわらずにレシピエントの生理学的状態に、そして熟練した医師に既知の他の因子に応じて、１回用量で、複数回用量で、連続または間欠的方法で投与されうる。本発明のペプチドの投与は、事前に選択した期間にわたって本質的に連続的でありうるか、または一連の間隔を置いた投薬でありうる。局所および全身投与の両方が考慮される。

【０１４５】

脊椎動物に投与される投薬量は、感染を低減または予防するのに、あるいは感染に関連する少なくとも１つの症状を治療するのに適切ないずれの量でもよい。適切な投薬量を決定するある因子は、当業者に周知であり、日常的な実験作業によって対処されうる。たとえば物理化学的、毒物学的および薬物動態学的特性の判定は、標準化学および生物アッセイを使用して、化学、薬理学および毒物学分野で既知の数学的モデル化の使用によって行われる。治療的有用性および投与計画は、このような技法の結果から、適切な薬物動態学的および／または薬力学的モデルの使用によって外挿されうる。他の因子は、年齢、身体的状態、サイズ、体重、治療される状態、状態の重症度、およびいずれの同時治療も含む、個々の患者のパラメータによって変わるであろう。投薬量は選択した薬剤と、予防または治療が達成されるかどうか、そして薬剤が化学修飾されているかどうかによっても変化するであろう。このような因子は臨床医によってただちに決定されうる。

【０１４６】

脊椎動物に投与される正確な量は、担当医の責任であろう。しかしながら所望の（複数の）効果を達成するために、本発明の薬剤、またはその組み合せは、他の投薬量は有益な結果を与えうるが、少なくとも約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約５００～７５０ｍｇ／ｋｇの、少なくとも約０．０１ｍｇ／ｋｇ～約３００～５００ｍｇ／ｋｇの、少なくとも約０．１ｍｇ／ｋｇ～約１００～３００ｍｇ／ｋｇの、あるいは少なくとも約１ｍｇ／ｋｇ～約５０～１００ｍｇ／ｋｇ体重の１回または分割投薬量として投与されうる。

【０１４７】

単位用量に含まれる本発明の所与のポリペプチド、その変異体または断片の絶対重量は、幅広く変化しうる。たとえば本発明の少なくとも１つのポリペプチド、または複数のポリペプチドの約０．０１～約２ｇ、または約０．１～約５００ｍｇが投与されうる。あるいは単位投薬量は、約０．０１ｇ～約５０ｇ、約０．０１ｇ～約３５ｇ、約０．１ｇ～約２５ｇ、約０．５ｇ～約１２ｇ、約０．５ｇ～約８ｇ、約０．５ｇ～約４ｇ、または約０．５ｇ～約２ｇで変化しうる。

【０１４８】

本発明のポリペプチド、その変異体または断片の１日用量も同様に変化しうる。このような１日用量はたとえば、約０．１ｇ／日～約５０ｇ／日、約０．１ｇ／日～約２５ｇ／日、約０．１ｇ／日～約１２ｇ／日、約０．５ｇ／日～約８ｇ／日、約０．５ｇ／日～約４ｇ／日および約０．５ｇ／日～約２ｇ／日の範囲で変化しうる。

【０１４９】

本発明のポリペプチド、その変異体または断片、あるいはそのための核酸分子は単独で、または第２の薬剤と組み合せて使用されうる。第２の薬剤は、たとえばβ－ラクタム、マクロライドまたは他の抗生剤、たとえばアジスロマイシン、ドキシサイクリン、テトラサイクリン、およびエリスロマイシンなどの既知の抗菌剤；クロトリマゾール、ナイスタチン、フルコナゾール、ケトコナゾール、アンホテリシンＢ、カスポファンギン、またはボリコナゾールなどの抗真菌剤；たとえばメトロニダゾールまたはチニダゾールなどの原生動物に対して有効な薬剤でありうる。第２の薬剤は、アバカビル、アシクロビル、アマンタジン、ジダノシン、エムトリシタビン、エンフュヴィルタイド、エンテカビル、ガンシクロビル、ガーダシル、ラミブジン、ネビラピン、ネルフィナビル、オセルタミビル、リバビリン、リマンタジン、リトナビル、スタブジン、バラシクロビル、ビダラビン、ザルシタビン、およびジドブジンなどの抗ウィルス剤でもありうる。第２の薬剤の有効量は、第２の薬剤の製造者の勧告、担当医の判断に従い、ＰＨＹＳＩＣＩＡＮ’Ｓ ＤＥＳＫ ＲＥＦＥＲＥＮＣＥに示されたような量および投薬についてのプロトコルおよび管理因子によって指示されるであろう。

【０１５０】

治療方法の有効性は、上述のような微生物感染の徴候および症状について脊椎動物を監視することはもちろんのこと、制限なく、ポリメラーゼ連鎖反応、転写媒介増幅または細胞培養を含む当分野で既知の方法を使用して、血液中に存在する微生物の存在および／または量、たとえば細胞カウントを決定することによっても評価されうる。

【０１５１】

本発明を、請求項に記載した本発明の範囲を制限しない、次の実施例でさらに説明する。

【実施例】

【０１５２】

（実施例１）

Ｋ９ＣＡＴＨ遺伝子の同定およびクローニング

Ｋ９ＣＡＴＨのｃＤＮＡ同定は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ ＧｅｎＢａｎｋ（商標）をマイニングすることによって確立した。ヒトｈＣＡＰ１８／ＬＬ－３７（ＧｅｎＢａｎｋ（商標）アクセション番号ＮＭ００４３４５）、ウシカテリシジン１（ＮＭｌ７４８２５）、およびブタＰＲ－３９（Ｌ２３８２５）の相補的ＤＮＡ配列を配列比較して、縮重プライマーを対応するポリペプチドのプレプロ領域をコードする保存配列を特異的に標的とするように設計した。プライマー（フォワード、５’－ＴＣＡＣＴＧＫＴＧＣＴＹＣＴＧＣＴＧＣＴ－Ｓ’（配列番号３９）、およびリバース５’－ＴＧＧＣＣＴＧＧＴＹＳＡＲＧＧＴＳＡＣＴＧＴ－３’（配列番号４０）；ここでＹ＝ＣまたはＴ、Ｋ＝ＧまたはＴ、Ｓ＝ＣまたはＧ、およびＲ＝ＡまたはＧ）は、ヒト遺伝子の翻訳開始コドンに対する位置４０～５９および２４１～２６２にそれぞれ一致する（表３）。

【０１５３】

【表３】

表3
K9CATHのためのRACEプライマーおよびRT－PCRプライマー

プライマー名	配列(配列番号)	cDNA内の位置 (nt)	生成物サイズ (bp)	GenBank™ アクセッション番号
RACE プライマー				
センス外側プライマー	5'-TCACTGKTGCTYCTGCTGCT-3' (配列番号 39)	180-199		NM004345
アンチセンス外側プライマー	5'-TGGCCTGGTYSARGGTSACTGT-3' (配列番号 40)	493-472	293	NM004345
センス内側プライマー	5'-CCTTAGCTACAGGGAGGCTGTG-3' (配列番号 41)	133-154		AY392089
アンチセンス内側プライマー	5'-GACTGTCCCTTCACACTGTTTCAC-3' (配列番号 42)	373-350	241	AY392089

【０１５４】

設計したプライマーおよびテンプレートとしてのスクリーニングした組織からの全ＲＮＡを使用して、１ステップＲＴ－ＰＣＲ反応（ＡｃｃｅｓｓＱｕｉｃｋ（商標）ＲＴ－ＰＣＲ ｓｙｓｔｅｍ，Ｐｒｏｍｅｇａ）を実施して、Ｋ９ＣＡＴＨ ｃＤＮＡを生成した。増幅生成物をＫ－Ｓｔａｔｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ａｎｄ Ｇｅｎｏｔｙｐｉｎｇ Ｆａｃｉｌｉｔｙ（Ｍａｎｈａｔｔａｎ，ＫＳ）にてＡＢＩ ３７００ ＤＮＡ Ａｎａｌｙｚｅｒによって配列決定し、既知のカテリシジンとの相同性を持つ読み取り枠（Ｏ

ＲＦ）をコードすることを確認した。全長ｃＤＮＡを得るために、非切断５’－キャップドｍＲＮＡを選択する、改良ｃＤＮＡ端高速増幅プロトコル（ＲＡＣＥ）（Ａｍｂｉｏｎ，ＦｉｒｓｔＣｈｏｉｃｅ（ＴＭ）ＲＬＭ－ＲＡＣＥキット）を使用した。５’－ＲＡＣＥは（独立して骨髄、脾臓および精巣からの）全ＲＮＡの逆転写によって得られ、５’端アダプタ配列に対応するネステッドプライマーおよび２個のネステッドアンチセンスプライマー（すなわち上記のリバースプライマー、および内側リバースプライマー５’－ＧＡＣＴＧＴＣＣＣＴＴＣＡＣＡＣＴＧＴＴＴＣＡＣ－３’（配列番号４２））を用いた２回のＰＣＲを続けた。

【０１５５】

同様のストラテジーを３’－ＲＡＣＥに、３’端アダプタに対応するネステッドプライマーおよび２個のネステッドセンスプライマー（すなわち上記のフォワードプライマーおよび内側フォワードプライマー５’－ＣＣＴＴＡＧＣＴＡＣＡＧＧＧＡＧＧＣＴＧＴＧ－３’（配列番号４１））（表３）と共に使用した。ネステッドＰＣＲ生成物を、カラムベースＰＣＲ精製キット（Ｑｉａｇｅｎ）によって精製して、ｐＧＥＭ（登録商標）－ＴＥａｓｙ Ｖｅｃｔｏｒ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用してプラスミド内にクローニングした。５’－または３’－ｃＤＮＡ ＲＡＣＥ配列を、少なくとも５個のクローンを配列決定することから産生させた。全長ｃＤＮＡを次に５’－および３’－配列の連結ならびにアダプタおよび重複領域の除去によって産生させた。ＲＴ手順の効率は、ＰＣＲによって増幅したハウスキーピング遺伝子ＧＡＰＤＨの比較可能なレベルの保証によって標準化した。

【０１５６】

高度に保存されたカテリンドメイン配列に基づき、ヒト、ウシおよびブタカテリシジンの配列比較された配列を使用してプライマーのセットを決定した。このプライマーのセットは、ヒト、ブタおよびイヌ骨髄細胞からカテリシジン配列をうまく増幅した。イヌ骨髄からの増幅バンドは、ヒトＬＬ－３７およびブタＰＲ－３９のバンドと同様のサイズ範囲を示した（図１Ａ）。イヌ骨髄ｍＲＮＡからのｃＤＮＡ単位複製配列の配列は、ウマ、ブタおよびヒトカテリシジンの関連領域に対して８０％を超える類似性を示した（Ａｇｅｒｂｅｒｔｈら、Ｂｌｏｏｄ，９６：３０８６（２０００）；Ｓｃｏｃｃｈｉら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，４１７：３１１（１９９７）；Ｓｃｏｔｔら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６９：３８８３（２００２））。イヌｃＤＮＡ配列に基づく遺伝子特異的プライマーを使用して、推定上のイヌカテリシジンの全長ｃＤＮＡ配列を同定した。イヌカテリシジンの完全ｃＤＮＡ配列および翻訳ペプチドを図１Ｂに示す。イヌｃＤＮＡ分子は短い５’および３’－非翻訳領域を持つ６３０ｂｐに及び、５１９ｂｐコード領域に主に占有されている。ｃＤＮＡは１７２個のアミノ酸残基の予測されたペプチドをコードする。Ｓｉｇｎａｌ ＩＰおよびＰＳＯＲＴ（ＥｘＰＡＳｙ、ｈｔｔｐ：／／ａｕ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ／ｔｏｏｌｓ／＃ｐｒｏｔｅｏｍｅ）による計算的予測は、２９アミノ酸シグナルペプチドがそのＮ末端に位置することを示す。

【０１５７】

（実施例２）

Ｋ９ＣＡＴＨの組織発現

Ｋ９ＣＡＴＨのｍＲＮＡ発現を判定するために、Ｋａｎｓａｓ Ｓｔａｔｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ Ａｎｉｍａｌ Ｃａｒｅ ａｎｄ Ｕｓｅ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅによって承認された手順に従って、臨床的に健康なイヌから組織サンプルを収集した。すべてのサンプルは、収集直後に液体窒素中に置いて、使用まで－１３５℃にて貯蔵した。すべてのイヌは完全な臨床検査ならびに血液学、血液化学、および検尿を含む日常的なスクリーニングを、組織収集前に受けた。すべての臨床実験結果は正常範囲内であった。ヒト骨髄ＲＮＡはＣｌｏｎｔｅｃｈ（Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ，ＣＡ）から購入して、ブタ骨髄ＲＮＡを入手した（Ｗｕら、Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．，６８：５５５２（２０００））。液体窒素中で凍結組織を粉砕した後に、全ＲＮＡをＴＲＩ試薬（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）によって抽出した。

【０１５８】
１ステップＲＴ－ＰＣＲを使用して、Ｋ９ＣＡＴＨ　ｍＲＮＡの発現を検出した［３０］。簡潔には、全ＲＮＡをＲＱ１　ＲＮａｓｅ－ｆｒｅｅ　ＤＮＡｓｅ　Ｉ（Ｐｒｏｍｅｇａ）で処理して、いずれのゲノムＤＮＡ汚染も除去した。次にＲＮＡサンプル（２５０ｎｇ）を、０．１μＭ濃度の各センスおよびアンチセンスプライマー（すなわちＲＡＣＥ反応で使用したネステッド遺伝子特異的プライマー）を含むＲＴ－ＰＣＲ反応混合物２５μＬ中で使用した。既存のワンステップＲＴ－ＰＣＲは、ＡｃｃｅｓｓＱｕｉｃｋ（商標）ＲＴ－ＰＣＲ　Ｓｙｓｔｅｍキット（Ｐｒｏｍｅｇａ）を使用して実施した。相補的ＤＮＡ合成および予備変性は、４８℃にて４５分間、９５℃にて３分間を１サイクル実施した；増幅は、９５℃にて３０秒間、５５℃にて３０秒間、および７２℃にて３０秒間を４０（Ｋ９ＣＡＴＨ）または２５（グリセルアルデヒド３－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ＧＡＰＤＨ）サイクル実施して、最終伸長は反応混合物２５μＬ中で７２℃にて１０分間実施した。増幅後、各反応混合物１０μＬを１．５％アガロースゲル電気泳動によって分析して、臭化エチジウム染色後にバンドを描出した。

【０１５９】
それゆえ健康なイヌ組織におけるＫ９ＣＡＴＨ　ｍＲＮＡの発現は、半定量的ＲＴ－ＰＣＲ分析によって評価した。図２に示すように、イヌカテリシジンは骨髄前駆細胞（骨髄）で主に発現され、脾臓、肝臓および精巣でより低い程度で発現された。健康な肺、腎臓および小腸組織では、最小限のＫ９ＣＡＴＨ発現が検出された。骨髄、脾臓、肝臓および精巣からのＲＴ－ＰＣＲ単位複製配列を、ＲＡＣＥ生成物で先に記載したようにｐＧＥＭ（登録商標）－Ｔ　Ｅａｓｙ　Ｖｅｃｔｏｒ内へクローニングして、配列決定した。すべての増幅バンドは、実施例１と同じカテリシジン分子であることが確認された。

【０１６０】
（実施例３）
イヌＣａｔｈｅＫ９ＣＡＴＨ遺伝子の構成
Ｋ９ＣＡＴＨの推定されたアミノ酸配列を使用して、ＧｅｎＢａｎｋで非冗長（ＮＲ）、高スループットゲノム配列（ＨＴＧ）、および全ゲノムショットガン配列（ＷＧＳ）データベース内で翻訳ゲノム配列を、Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｃｅｎｔｅｒ　ｆｏｒ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）（ウェブサイトｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｅｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ＢＬＡＳＴ／）のデフォルト設定でＴＢＬＡＳＴＮプログラム（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２１５：４０３（１９９０））を使用することによって、検索した。Ｋ９ＣＡＴＨ遺伝子構造を得るために、イヌ遺伝子を含有するゲノム配列をＧｅｎＢａｎｋから検索して、ＮＣＢＩウェブサイトのＳｐｉｄｅｙプログラム（ｈｔｔｐ：／／ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｂ／ＩＥＢ／Ｒｅｓｅａｒｃｈ／Ｏｓｔｅｌｌ／Ｓｐｉｄｅｙ）を使用することによって、そのｃＤＮＡ配列と比較した。Ｋ９ＣＡＴＨ遺伝子の染色体位置は、Ｍａｐ　Ｖｉｅｗｅｒ　Ｐｒｏｇｒａｍ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｍａｐｖｉｅｗ）を使用することによって明らかにされた。

【０１６１】
ＧｅｎＢａｎｋで現在利用可能なすべてのイヌゲノム配列からの予測されたＫ９ＣＡＴＨペプチド配列の検索は、２つのＷＧＳ配列を同定した：Ｋ９ＣＡＴＨ配列全体を含有したＡＡＥＸ０２０２１３１０およびアミノ酸配列６７～１２６のみを含んでいたＡＡＣＮ０１０６９８１１５。したがってＷＧＳ配列ＡＡＥＸ０２０２１３１０を全長Ｋ９ＣＡＴＨ　ｃＤＮＡ配列との配列比較に使用して、Ｓｐｉｄｅｙプログラムを使用して遺伝子構造を得た。図４に示すように、Ｋ９ＣＡＴＨの読み取り枠を３個のイントロン６２７、１３７、および５７５ｂｐによって分離したが、これは他の哺乳類カテリシジン遺伝子と似ている（Ｎｉｙｏｎｓａｂａら、Ｃｕｒｒ．Ｄｒｕｇ　Ｔａｒｇｅｔｓ　Ｉｎｆｌａｍｍ．Ａｌｌｅｒｇｙ，２：２２４（２００３）；Ｎｉｙｏｎｓａｂａら、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，１０６：２０（２００２）；Ｇｅｎｎａｒｏら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，５５：３１（２０００））。推定上の成熟配列は最後のエキソンによってコードされるが、最初

の３個のエキソンはシグナルおよびプロ配列をコードする。この遺伝子構成は、調査したすべての哺乳類種で十分に保存される（Ｔｏｍａｓｉｎｓｉｇら、Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｅｐｔ．Ｓｃｉ，６：２３（２００５）；Ｇｅｎｎａｒｏら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，５５：３１（２０００））。Ｋ９ＣＡＴＨ遺伝子は、Ｍａｐ Ｖｉｅｗｅｒ Ｐｒｏｇｒａｍ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｍａｐｖｉｅｗ）を使用して染色体２０に配置した。各エキソンおよびイントロンの長さを表４に示す；各エキソンによってコードされたアミノ酸配列も示す。カテリンプロ領域内の４個のシステインに下線が付けてあり、成熟抗菌ペプチド配列は太字で下線が付けられている。イヌカテリシジンのヌクレオチド配列はＧｅｎＢａｎｋ（商標）データベースにアクセション番号ＡＹ３９２０８９で登録されている。カテリシジンのエキソン－イントロン境界も哺乳類種では高度に保存されることに注目する（データは示さず）。

【０１６２】

（実施例４）

Ｋ９ＣＡＴＨポリペプチドの合成

成熟Ｋ９ＣＡＴＨのＣ末端３８アミノ酸より成るペプチドを化学的に合成した（ＢｉｏＭｅｒ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｃｏｎｃｏｒｄ ＣＡ．）。本ペプチドの配列は、配列番号４と呼ばれ、次の通りである：ＲＬＫＥＬＩＴＴＧＧＱＫＩＧＥＫＩＲＲＩＧＱＲＩＫＤＦＦＫＮＬＱＰＲＥＥＫＳ。合成分子は、ＲＰ－ＨＰＬＣにおいて単一ピークで溶離して、質量分析法によって確認した。ペプチドの最終純度は、分子量４５１２．１で＞９９％であった。ペプチドを凍結乾燥させて、ストック溶液として２ｍｇ／ｍＬ（約０．５ｍＭ）で０．０１％酢酸に溶解させて、使用するまで－１３５℃で貯蔵した。ペプチド濃度は、ＢＣＡタンパク質アッセイキット（Ｐｉｅｒｃｅ Ｉｎｃ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）を使用して決定した。滅菌ヒト血清アルブミン（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）をペプチド溶液に添加して、抗菌アッセイ前に０．１％の最終濃度を達成した。

【０１６３】

（実施例５）

Ｋ９ＣＡＴＨの構造解析

膜模倣環境におけるＫ９ＣＡＴＨの２次構造を決定するために、Ｊａｓｃｏ－７１５スペクトル偏光計で円偏光二色性実験を実施した。スペクトルは、１９０～２５０ｎｍ範囲にわたって０．１ｃｍパス長セルを使用して取り込んだ Ｓｏｕｌａｇｅｓら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６：３４１６２（２００１））。スペクトルは２５℃にて１ｎｍごとに、ポイント当たり２秒平均時間および１ｎｍバンドパスで収集した。ペプチドは、ＴＦＥを含まないのと同様に、異なる濃度のトリフルオロエタノール（ＴＦＥ）（１０％、２０％、４０％、および６０％）またはＳＤＳミセル（０．２５％および０．５％）を含む、５０ｍＭリン酸カリウム緩衝液中で測定した。平均残基楕円率（ＭＲＥ）は、$[\theta]_{MRE}$（ｄｅｇ．ｃｍ^{2}．ｄｍｏｌ$^{-1}$）として表された。αらせん含量は、２２２ｎｍの二色性極小から概算した（Ｃｈｅｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１３：３３５０（１９７４））。ＣＤ分光測定は、Ｋ９ＣＡＴＨが、水溶液中でαらせん構造が一切ない完全なランダムコイル配座を採ることを明らかにした。ペプチドはしかしながら、らせん誘発剤ＴＦＥの濃度上昇と共にらせん配座の向上を示し、６０％ ＴＦＥでは７２％のらせん性を示した。同様に脂質模倣環境では、Ｋ９ＣＡＴＨは、０．１％ ＳＤＳの存在下で３０％のらせん含量を持つ構造を採った。

【０１６４】

相同性モデル化によってカテリシジンペプチドの構造モデルも産生させた。標的構造は、ＣＡＰ１８へのＮＭＲ溶液構造との配列比較によって予測された（Ｃｈｅｎら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，３７０：４６（１９９５）。これらの２つの系の初期配列比較はＣｌｕｓｔａｌ－Ｗプログラム（Ｔｈｏｍｐｓｏｎら、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．，２２：４６７３（１９９４））によって、Ｂｌｏｓｕｍ ３０置換マトリクスをギャップ・オープニング・ペナルティ１０およびギャップ・エクステンション・ペナルティ０．１で使用して実施した。得られた配列比較および対応する３次元ＣＡＰ１８ペプチド構造

を次に、Ｍｏｄｅｌｌｅｒプログラム（Ｓａｎｃｈｅｚら、Ｍｅｔｈ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，１４３：９７（２０００）によって処理して、カテリシジン標的の構造予測を得た。Ｍｏｄｅｌｌｅｒのデフォルトのシミュレートされたアニーリングサイクルを構造改良に使用した。得られた構造に対してペプチド２次構造および表面特徴の分析をＳＹＢＹＬ（ＳＹＢＹＬ（登録商標）６．９．２，ＴＲＩＰＯＳ　Ｉｎｃ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）によって実施して、２次構造予測はＰＳＩＰＲＥＤプログラム（ＭｃＧｕｆｆｉｎら、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，１６：４０４（２０００））を使用して検証した。

【０１６５】

Ｋ９ＣＡＴＨの構造は、Ｃａｐ１８（ＰＤＢ　ＩＤ：１１ｙｐ）のＮＭＲ溶液構造との配列比較によって予測した。主要なモチーフは、ウサギおよびＫ９ＣＡＴＨ構造の配列比較に、特にウサギ配列内で観察されたαらせんの中心部分に向かって保存された（図６）。これは、図６Ａ上パネルに示すものに似た、イヌ構造の多くが同様のらせん構造（図６Ｂ）を採るはずであるという合理的な確信を与える。ウサギおよびイヌの表面モデルの比較を３次元表現によって図６ＡおよびＢに示す。ウサギおよびイヌのカテリシジンの配列比較されたらせん部分内において、正味の静電プロフィールに実質的な相違がある：ウサギ構造は１３個の塩基性残基および１個のみの酸（ｐＨ＝７において＋１２の正味電荷）を有するのに対して、イヌペプチドは９個の塩基性残基および３個の酸（わずか＋６の正味電荷）を有する。この差異は、これらの２つのカテリシジンの環境的な優先度および潜在的な分子間結合の感知可能な相違を引き起こしうる。最後に、図６ＡおよびＢに示したイヌカテリシジン構造について、観察されたウサギモデルに存在しない７個のＣ末端残基（ＱＰＲＥＥＫＳ）が疎水性／極性振動パターンを保持しないが、むしろ集団的に非常に極性であることが観察される。まとめると、Ｋ９ＣＡＴＨは中性ｐＨ電荷における正電荷およびαらせん構造などの、各種の抗菌ペプチドに共通の特徴を示した。

【０１６６】

要するに、Ｋ９ＣＡＴＨの構造解析は、円偏光二色性（ＣＤ）および計算３次元構造解析を使用して実施した。Ｋ９ＣＡＴＨの折り畳みは、カテリシジンペプチドを含めて、天然抗菌ペプチドの中で最も一般的な空間配置であるαらせん配座を取る（Ｇｅｎｎａｒｏら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，５５：３１（２０００））。この論点を裏付けるのは、１０／３αらせんねじれと釣り合った周波数を持つ、疎水性残基と極性残基との間の特徴的な振動である。図６に描いた３次元表現に示すように、この振動は、らせんの並置された疎水性側および極性側の形成をもたらす：親油性／疎水性相互作用がこれらのペプチドに同様の分子と、または膜表面にてのどちらかで、その疎水性側を分子間結合に使用して、その極性側を好ましい溶媒相互作用のために外側に向けて、凝集させうることを示唆する構造的特徴。予備解析は、Ｋ９ＣＡＴＨが、ウサギよりも純粋で連続的な疎水性表面のために、このような挙動の影響をより受けやすいことを示唆する。しかしながらウサギカテリシジンにおける疎水性連続を最も明白に中断する１つの残基（すなわち位置１４のリジン）が代わりに、イヌカテリシジンでは利用できない会合性分子間塩橋に実際に関与しうることが考えられる。Ｋ９ＣＡＴＨの独自の構造的特徴は、Ｃ末端に位置する７個の余分なアミノ酸残基の存在である。これらのアミノ酸は集合的に非常に極性であるため、これらの残基が構造の最初の３１個の残基中に存在するらせん構造を永続させるはずであることを示唆する明白な証拠はない。Ｃ末端が溶媒に露出され、いくらか乱されやすいということを仮定するのがより合理的である（図６Ｂ）。先のＣＤ試験は、αらせんカテリシジンペプチドのらせん含量が、微小環境（たとえばらせん誘発剤の存在）およびペプチドの起源によって、３０～９０％の範囲で変化することも示している［１２］。同様に本ＣＤ試験は、ＴＦＥ　２０％および６０％それぞれの存在下で４２～７２％の範囲で変化するＫ９ＣＡＴＨのαらせん含量を示した。加えて、生理学的状態に近い環境（すなわち脂質模倣）において、Ｋ９ＣＡＴＨのαらせん含量はより低いが、まだ他の哺乳類カテリシジンから報告された範囲内である。３次元構造解析およびＣＤ試験の結果を組み合せると、このようにＫ９ＣＡＴＨが誘導性αらせん構造を持つことが結論付けられうる。大半の直鎖カテリシジンが実際に、主としてαらせん状であるので、このことはこれらのペプチド

の幅広い抗菌範囲がαらせん構造に直接関連付けられており、αらせん構造がこれらの内因性抗菌ペプチドの細菌膜との相互作用を促進して、それゆえ病原性微生物の迅速な消滅をもたらす（Ｚａｎｅｔｔｉ，Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．，７５：３９（２００４）；Ｇｅｎｎａｒｏら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，５５：３１（２０００）；Ｚａｎｅｔｔｉら、Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｄｅｓ．，８：７７９（２００２）；Ｒａｍａｎａｔｈａｎら、Ｍｉｃｒｏｂｅｓ　Ｉｎｆｅｃｔ．，４：３６１（２００２）；Ｏｒｅｎら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，４７：４５１（１９９８））。

【０１６７】

（実施例６）

Ｋ９ＣＡＴＨ抗菌活性

広範囲の微生物に対するＫ９ＣＡＴＨの抗菌活性を評価した。抗菌アッセイに使用したＫ９ＣＡＴＨペプチドは、エキソン４領域によってコードされた成熟ペプチド全体からの予測されたアミノ酸配列を表す（ヒトカテリシジンの開裂部位を使用してイヌカテリシジンの開裂部位を予測した）。

【０１６８】

評価した微生物は：カンジダ・アルビカンスＡＴＣＣ１１００６および１４０５３、エシェリキア・コリＡＴＣＣ２５９２２、７００３３６、７００３７８、およびＢＡＡ－４５７、クレブシエラ・ニューモニエＡＴＣＣ１００３１、リステリア・モノサイトゲネスＡＴＣＣ１９１５５、プロテウス・ミラビリスＡＴＣＣ１２４５３、シュードモナス・アエルギノザＡＴＣＣ１０１４５、サルモネラ・エンテリティディスＡＴＣＣ１３０７６、サルモネラ・ティフィムリウムＡＴＣＣ１３３１１、スタフィロコッカス・アウレウスＡＴＣＣ１０８３２、ウレアプラズマ・カニゲニタリウムＡＴＣＣ５１２５２、およびウレアプラズマ・ウレアリチカムＡＴＣＣ２７６１９であった。Ｃ．アルビカンスをジャガイモデキストロース寒天上で一晩（３５℃）で培養して、ＮＣＣＳＬ規格（Ｐｆａｌｌｅｒら、Ｍａｎｕａｌ　ＮＣＣＬＳ　＃Ｍ２７－Ａ２，６ｔｈ　ｅｄ．，５　Ｗａｙｎｅ，ＰＡ（２００２））にしたがって管理した。Ｕ．カニゲンタリウムおよびＵ．ウレアリチカムは尿素ブロス１０Ｂ中で－２０℃にて貯蔵して（ＡＴＣＣ仕様書による）、アッセイ前夜に５℃にて解凍した。すべての細菌をトリプチケースソイ寒天（Ｄｉｆｃｏ，Ｄｅｔｒｏｉｔ，ＭＩ）プレート上で３７℃に維持した。単一細胞コロニーをトリプチケースソイブロス（Ｄｉｆｃｏ）に移して、中対数期の細菌を増殖させ、次に３７℃で３時間のインキュベーションおよびホモジネーションを行った。４℃、９００ｘｇでの１０分間の遠心分離後に細菌ペレットを得て、１回洗浄し、次に１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液（ＰＢ、ｐＨ７．４、［Ｎａ＋］＝１７．８３ｍＭ）で懸濁させた。初期細菌濃度を決定した（Ｆｅｒｒａら、Ｍａｎｕａｌ　ＮＣＣＬＳ　＃Ｍ７－Ａ６，６ｔｈ　ｅｄ．，Ｗａｙｎｅ，ＰＡ（２００３））。10^8ＣＦＵ／ｍＬの初期細胞母集団を、６００ｎｍにおける０．１の光学密度（ＯＤ）で得た。Ｃ．アルビカンスは推奨された０．８５％生理食塩溶液を１０ｍＭ　ＰＢと替えたことを除いて、ＮＣＣＬＳ規格（Ｐｆａｌｌｅｒら、Ｍａｎｕａｌ　ＮＣＣＬＳ　＃Ｍ２７－Ａ２，６ｔｈ　ｅｄ．，Ｗａｙｎｅ，ＰＡ（２００２））にしたがって、１０ｍＭ　ＰＢ中で、初期10^8ＣＦＵ／ｍｌでは０．５のＭｃＦａｒｌａｎｄ規格まで懸濁させた。すべての微生物連続希釈は１０ｍＭ　ＰＢ中で実施して、10^3ＣＦＵ／ｍＬ作用希釈液を得た。

【０１６９】

改良ブロス微量希釈法（Ｐｆａｌｌｅｒら、Ｍａｎｕａｌ　ＮＣＣＬＳ　＃Ｍ２７－Ａ２，６ｔｈ　ｅｄ．，Ｗａｙｎｅ，ＰＡ（２００２）；Ｆｅｒｒａｒｏら、Ｍａｎｕａｌ　ＮＣＣＬＳ　＃Ｍ７－Ａ６，６ｔｈ　ｅｄ．，Ｗａｙｎｅ，ＰＡ（２００３））を使用して、Ｋ９ＣＡＴＨの抗菌活性を決定した（Ｓａｎｇら、Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．，７３：２６１１（２００５））。簡潔には、Ｋ９ＣＡＴＨ作用ストック５０μＬを、３０ｍＭナトリウムＰＢ　２５μＬ（ｐＨ７．４、［Na^+］＝５３．４９ｍＭ）、H_2O　２５μＬ、および微生物懸濁物５０μＬが先に混合されていたマイクロタイタープレートのウェルに添加した。マイクロタイタープレートを振とうインキュベータ（１００ＲＰＭ

）内で３７℃で２時間インキュベートして、次に対応する栄養ブロス１５０μＬを添加した。抗菌活性は、３７℃でのインキュベーションの２４時間後に培地（尿素ブロス１０Ｂ）における濁度の欠如または色変化によって示されるような、微生物増殖が防止される最低濃度として定義される最小抑制濃度（ＭＩＣ）を確立することによって決定した。処理済み淋菌懸濁物（５０μＬ）をチョコレート寒天にスポット播種して、ＭＩＣを、５％ CO_2 中３７℃での２４時間インキュベーション後にコロニーが発生しない最低濃度として定義した。これはＮ．ゴノレアがＧＣブロス中での成長の証拠として濁度を示さないためと、また液体培地中でのその高い自己溶解活性のために行われた。Ｋ９ＣＡＴＨ抗菌活性に対する塩の効果を決定するために、グラム陰性Ｅ．コリＡＴＣＣ２５９２２およびグラム陽性Ｌ．モノサイトゲネスＡＴＣＣ１９１１５を含む、２つの代表的な細菌を使用した。殺菌混合物の最終ナトリウム濃度は、ＮａＣｌによって１５、３０、５０、１４０、および３００ｍＭまで調整した。加えてリポポリサッカライド（Ｅ．コリＯ１１１：Ｂ４　ＬＰＳ；Ｓｉｇｍａ）のＫ９ＣＡＴＨおよびＥ．ｃｏｌｉ活性に対する効果を０．０１、０．１、１、および１０μｇ／ｍＬで評価した。１０、２０、３０、４０、５０、および７５％のウシ胎仔血清（ＦＢＳ）の効果を１４０ｍＭ　ＮａＣｌにて評価した。すべてのアッセイは３通り実施した。

【０１７０】

それゆえＫ９ＣＡＴＨの抗菌活性を決定するために、全長成熟予測アミノ酸配列に対応する３８アミノ酸ペプチドを化学合成して、すべての抗菌アッセイに使用した。Ｋ９ＣＡＴＨはグラム陽性およびグラム陰性細菌、酵母、ならびにウレアプラズマ種を効果的に死滅させた。その幅広い抗菌活性は、他の合成または天然カテリシジンペプチドについて報告されたものに匹敵していた（Ｂａｌｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５；９５４１（１９９８）；Ｓｋｅｒｌａｖａｊら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１：２８３７５（１９９６）；Ｙｕら、Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｒｅｓ．，６０：１（２００２）；Ｍｕｒａｋａｍｉら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１７２：３０７０（２００４）；Ｓｈｉｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，２８５：１０４６（２００１））（表４）。

【０１７１】

【表４】

表 4

K9CATHの抗菌活性

微生物	ATCC	MIC (μM)
カンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）	11006	44.33
カンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）(血行性)	14053	11.08
エシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）	25922	1.11
エシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）	700336	1.11
エシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）	700378	1.11
エシェリキア・コリ（*Escherichia coli*）	BAA-457	1.11
クレブシエラ・ニューモニエ　（*Klebsiella pneumoniae*）	10031	1.11
プロテウス・ミラビリス　（*Proteus mirabilis*）	12453	1.11
シュードモナス・アエルギノザ（*Pseudomonas aeruginosa*）	10145	1.11
サルモネラ・エンテリティディス（*Salmonella* Enteritidis）	13076	0.44
サルモネラ・ティフィムリウム（*Salmonella* Typhimurium）	13311	1.11
ナイセリア・ゴノレア（*Neisseria gonorrhoeae*）	10150	0.06
スタフィロコッカス・アウレウス（*Staphylococcus aureus*）	10832	44.33
リステリア・モノサイトゲネス（*Listeria monocytogenes*）	19115	0.44
ウレアプラズマ・カニゲニタリウム（*Ureaplasma canigenitalium*）	51252	0.06
ウレアプラズマ・ウレアリチカム（*Ureaplasma urealyticum*）	27619	44.33

MICは、NCCLSから採用したブロス微量希釈法によって決定した。

【０１７２】

Ｃ．アルビカンスのＫ９ＣＡＴＨのＭＩＣは、ウシおよびヒツジカテリシジンＢＭＡＰ

－２７およびＳＭＡＰ－２９［１６，４９］それぞれについて報告されたものよりも高く、ヒトＬＬ－３７について報告されたものよりも低かった（Ｇｅｎｎａｒｏら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，５５：３１（２０００）；Ｍｕｒａｋａｍｉら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１７２：３０７０（２００４））。同様に合成イヌカテリシジンは、膣上皮から単離することと比較して、血行性起源から単離されたＣ．アルビカンスを死滅させるのにより効果的であり、Ｋ９ＣＡＴＨがその幅広い抗菌効果を全身レベルで発揮することを示唆した。興味深いことに、２つの性感染症細菌Ｎ．ゴノレアおよびウレアプラズマ・カニゲリタリウムは今日までに報告されている、すべての抗菌ペプチドの記録された最低濃度によって殺滅された（０．０６２５μＭ）、現在同定された、イヌの精巣由来β－デフェンシン（Ｓａｎｇら、Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎ．，７３：２６１１（２００５））。サルモネラ・ティフィムリウムおよびエンテリティディス（食中毒の症例で一般に関与している細菌）もＫ９ＣＡＴＨによって効果的に死滅させられる。この点で、Ｋ９ＣＡＴＨの抗菌活性は哺乳類同属種の抗菌活性と一致していた（Ｇｅｎｎａｒｏら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，５５：３１（２０００）；Ｓｋｅｒｌａｖａｊら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１：２８３７５（１９９６）；Ｙｕら、Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｒｅｓ．，６０：１（２００２）；Ｓｈｉｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，２８５：１０４６（２００１））。シュードモナス・アエルギノザのＫ９ＣＡＴＨに対する感受性は、マウス（Ｙｕら、Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｒｅｓ．，６０：１（２００２））、ウシ（Ｓｋｅｒｌａｖａｊら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１：２８３７５（１９９６））、およびヒツジ（Ｓｈｉｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，２８５：１０４６（２００１））カテリシジンに匹敵したが、ヒトＬＬ－３７のカテリシジンよりも３倍活性であった。反対に重要な表皮病原菌であるＳ．アウレウスはより高い濃度（５０μＭ）にて抑制され、このことはＫ９ＣＡＴＨ抗菌活性が全身レベルに集中して、皮膚表面にはより低い程度であることを示唆している。それにもかかわらずヒトカテリシジン（ＬＬ－３７）は、皮膚Ｓ．アウレウスを匹敵する濃度（＞６４μＭ）で抑制した（Ｍｕｒａｋａｍｉら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１７２：３０７０（２００４）；Ｍｕｒａｋａｍｉら、Ｊ．Ｄｅｎｔ．　Ｒｅｓ，８１：８４５（２００２））。

【０１７３】

Ｋ９ＣＡＴＨの細菌活性は、Ｅ．コリおよびＬ．モノサイトゲネスに対する試験管内アッセイで使用した微小環境の塩濃度（１５～３００μＭ）とは無関係であった（図７）。この発見は、ヒト（ＬＬ－３７）およびウシ（ＢＭＡＰ－２７）からのカテリシジンの報告された塩感受性活性と対照を成す（Ｇｅｎｎａｒｏら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，５５：３１（２０００）；Ｓｋｅｒｌａｖａｊら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１：２８３７５（１９９６）；Ｙｕら、Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｒｅｓ．，６０：１（２００２）；Ｍｕｒａｋａｍｉら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１７２：３０７０（２００４））。その上、本データは、血清（ウシ胎仔血清）が５～７５％　ＦＢＳの範囲にわたってＥ．コリに対するＫ９ＣＡＴＨ活性を２０～１５０倍低下させることを示す（表５）。

【０１７４】

【表５】

表５

異なる血清濃度でのK9CATHに対するE. コリの感受性

FBS[a] (%)	MIC[b] (μM) *E.* コリ ATCC 25922
0	1.25
5	12.5
10	12.5
20	50
30	200
50	200
75	200

[a]ウシ胎仔血清
[b]MIC: 最小抑制濃度:微生物の増殖が防止される最低濃度

【０１７５】
ＬＰＳは、より低い濃度（０．０１μｇ／ｍＬ）にて抗Ｅ．コリ活性に影響を及ぼさなかったが、ＭＩＣはＬＰＳが０．１～１０μｇ／ｍＬの範囲で使用されたときに６０倍上昇した（表６）。
【０１７６】
【表６】

表６

LPS[a]の影響下でのK9CATHに対するE. コリの感受性

LPS[a] (μg/ml)	MIC[b] (μM)
	E. コリ ATCC 25922
0	1.25
0.01	1.25
0.1	75
1	75
10	75

[a]LPS: E. コリO111:B84からのリポポリサッカライド
[b]MIC: 最小抑制濃度:微生物の増殖が防止される最低濃度

【０１７７】
（実施例７）
ＬＰＳ結合アッセイ
ＬＰＳのＫ９ＣＡＴＨへの結合は、動力学的色素産生性カブトガニ変形細胞溶解液（ＬＡＬ）アッセイによって測定した（Ｋｉｎｅｔｉｃ－ＱＣＬ１０００キット；ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ）（Ｔｕｒｎｅｒら、Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．，４２：２２０６（１９９８）；Ｔａｃｋら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２６９：１１８１（２００２））。簡潔には、連続希釈ペプチド２５μＬを、０．５エンドトキシン単位／ｍＬを含有するＥ．コリＯ１１１：Ｂ４リポポリサッカライド（ＬＰＳ）２５μＬに２通り添加して、３７℃にて３０分間インキュベートした。変形細胞溶解液試薬５０μＬおよび色素産生性基質Ａｃ－ＩＩｅ－Ｇｌｕ－Ａｌａ－Ａｒｇ－ｐ－ニトロアニリド１００μＬの添加後、４０５ｎｍにおける光学密度をマイクロプレートリーダ（Ｍｏｄｅｌ　Ｅｌｘ８００，Ｂｉｏ－Ｔｅｋ，Ｗｉｎｏｏｓｋｉ，ＶＴ）によってインキュベーションの１０および１６分後に測定した。ＬＰＳ結合パーセントは（［ΔＤ１－（ΔＤ２－ΔＤ３）］／ΔＤ１）ｘ１００として計算し、式中、ΔＤ１は、ＬＰＳのみを含有するサンプルでの１０分と１６分との光学密度の差を表し、ΔＤ２は、ＬＰＳおよび異なる濃度のＫ９ＣＡＴＨを含有するサンプルでの１０分と１６分との光学密度の差を表し、ΔＤ３は、異なる濃度のペプチドを含有して、ＬＰＳを含有しないサンプルでの１０分と１６分との光学密度の差を表す。ヒルプロット（Ｔｕｒｎｅｒら、Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．，４２：２２０６（１９９８）；Ｔａｃｋら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２６９：１１８１（２００２））は、$\log_{10}$Ｋ９ＣＡＴＨ濃度を$\log_{10}$［$Ｆ_{1}$／（１．０－$Ｆ_{1}$）］に対してプロットすることによって実施して、$Ｆ_{1}$はＬＰＳ結合活性の部分抑制であった。
【０１７８】
結果は、Ｋ９ＣＡＴＨがＬＰＳを、約１０．６μＭにて生じる５０％の結合で結合できることを示す（図８、左パネル）。イヌカテリシジン結合等温線の代表的なＳ字形状は協同性を示す。データをヒルプロットでグラフにすると、４．４９の係数を示し（図８、右パネル）、ＬＰＳのＫ９ＣＡＴＨへの結合が高く裏付けられる。この特徴は、ヒトＬＬ－３７／ｈＣＡＰ－１８（（Ｔｕｒｎｅｒら、Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ　Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．，４２：２２０６（１９９８））およびヒツジＳＭＡＰ－２９（Ｔａｃｋら、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２６９：１１８１（２００２））などの、２、３

の他のカテリシジンにも見られている。

【０１７９】

（実施例８）

Ｋ９ＣＡＴＨ溶血活性

Ｋ９ＣＡＴＨの溶血活性を決定した（Ｓｋｅｒｌａｖａｇ，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，４６３：５８（１９９９）；Ｙｕら、Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｒｅｓ．，６０：１（２００２））。簡潔には、イヌ血液４ｍＬをＥＤＴＡ含有採血管（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）に収集した。次に全血を１０，０００ｘｇで１分間、室温にて遠心分離にかけた。血漿（上清）を捨て、赤血球をＰＢＳで２回洗浄し、再懸濁させて０．５％（体積／体積）ＰＢＳ溶液として、９０μＬを９６ウェルマイクロタイタープレートに分配した。０．０１％酢酸に溶解させた各種濃度のＫ９ＣＡＴＨをイヌ細胞に２通り添加し、３７℃にて２時間インキュベートした。８０００ｘｇでの１０分間の遠心分離の後、上清を新しい９６ウェルマイクロタイタープレートに移して、４０５ｎｍでの吸収を測定することによって放出されたヘモグロビンを監視した。０および１００％溶血の対照は、ＰＢＳのみおよび１．０％ ＴｒｉｔｏｎＸ－１００にそれぞれ懸濁させた細胞より構成されていた。溶血のパーセンテージ（％）は、［（$OD_{415nm、ペプチド溶液}$－$OD_{415nm、PBSのみ}$）／（$OD_{415nm、1\%\ TritonX-100}$－$OD_{415nm、PBSのみ}$）］ｘ１００として計算した。ウシ骨髄抗菌ペプチド２８（ＢＭＡＰ－２８$_{(1-18)}$（Ｓｋｅｒｌａｖａｊら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１：２８３７５（１９９６）；Ｙｕら、Ｊ．Ｐｅｐｔ．Ｒｅｓ．，６０：１（２００２）；Ｒｉｓｓｏら、Ｃｅｌｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１８９：１０７（１９９８））のＮ末端１８アミノ酸セグメントを正の対照として使用した。種にわたるＫ９ＣＡＴＨの試験管内溶血活性を評価するために、ニワトリおよびヒトからの赤血球を上に挙げたのと同じプロトコルに従ってＫ９ＣＡＴＨで処理した。

【０１８０】

Ｋ９ＣＡＴＨの溶血活性はイヌ、ヒト、およびニワトリ赤血球を使用して決定した。図９に示すように、Ｋ９ＣＡＴＨは無視できる溶血活性を示し、赤血球の＜５％をこれらの３つの種の１００ｍＭにて溶解させた。ＢＭＡＰ－２８$_{(1-18)}$（すなわちウシカテリシジンＢＭＡＰ－２８のＮ末端ペプチド）を対照として使用して、約２０％、２５％および３０％のニワトリ、イヌ、およびヒト赤血球をそれぞれ、前の報告に一致する１００μＭにて溶血させた（Ｓｋｅｒｌａｖａｊら、Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７１：２８３７５（１９９６））。Ｋ９ＣＡＴＨは、ＢＭＡＰ－１８と比較したときに、１０～２０倍低いイヌおよびニワトリ赤血球に対する試験管内溶血活性を示した。

【０１８１】

（実施例９）

Ｋ９ＣＡＴＨと他のカテリシジンとの配列比較

ＣＬＵＳＴＡＬ－Ｗを使用して、Ｋ９ＣＡＴＨの予測されたアミノ酸配列を高度に保存されたプレプロ領域を持つ、異なる種からの６つの哺乳類カテリシジンと配列比較した（図３）。

【０１８２】

イヌカテリシジンＫ９ＣＡＴＨは、シグナルペプチド、カテリンドメイン、および２９、１０３および３８アミノ酸残基ぞれぞれの成熟ペプチドを有する。Ｋ９ＣＡＴＨは、プロ領域配列内に埋め込まれた４個のシステインの存在および同一位置も保存しており、これはカテリシジンペプチドファミリの高度に保存された特徴である。この古典的な４システインモチーフは、カテリンドメインをシステイン残基Ｃ８５－Ｃ９６とＣ１０７－Ｃ１２４との間の２個のジスルフィド結合によって安定化させると考えられる（図３を参照）。

【０１８３】

イヌカテリシジンは、示したすべてのカテリシジンのＮ末端カテリンドメイン領域と比較したときに＞８０％の類似性を示した。加えてこれらの哺乳類カテリシジンでの全体的

な類似性は約７０％であった；しかしながら、示したすべてのカテリシジンの抗菌性Ｃ末端成熟ペプチド領域は高可変性配列を示した。Ｋ９ＣＡＴＨの推定成熟ペプチド（配列番号４）は、ヒトＬＬ－３７（配列番号３３）に４６％の最大類似性を、そして他の種のそれらには、はるかに低い（＜１０％）同一性を示す（配列番号３３～３８）。プロリンに豊富な抗菌ペプチドであるブタＰＲ－３９（配列番号３８）またはウシＣＡＴＨ２（配列番号３４）と異なり、Ｋ９ＣＡＴＨはその抗菌配列にプロリンを１個のみ所有する（Ｐｅｓｔｏｎｊａｍａｓｐら、Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，２２：１６４３（２００１）；Ｃａｓｔｉｇｌｉｏｎｉら、Ｃｙｔｏｇｅｎｅｔ．Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔ．，７５：２４０（１９９６）；Ｚｈａｎｇら、Ｖｅｔ．Ｒｅｓ．，３１：２７７（２０００））。

【０１８４】

（実施例１０）

系統発生解析

近隣結合簡約樹（図１０）を、３９の報告されたカテリシジンから得たプレプロ領域ｃＤＮＡ配列のポアソン補正距離から構築した。重要度の低い枝（５０％未満の１０００複製からのブートストラップ値）を除去して、多分岐簡約樹を形成した。試験ではＭＥＧＡ（バージョン３．１、Ｔｈｅ Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ Ｓｔａｔｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐａｒｋ，ＰＡ）を使用した。

【０１８５】

各ペプチド間の正確な距離を考慮せずにパターン枝の信頼できる部分を強調した、簡約多分岐樹が生成された。簡約樹の枝の長さは、本解析がトポロジーに基づいていたので、ヌクレオチドまたはアミノ酸置換基の数に比例していない。この方法で、系統発生再構築はＫ９ＣＡＴＨを、他のすべての哺乳類配列から隔てられた、異なる遺伝子クラスターに配置した。Ｋ９ＣＡＴＨは単一のカテリシジン遺伝子であるように思われるので、イヌは、これらの肉食動物の進化史においてこの先祖遺伝子の複製がないモノカテリシジン種に属することが示唆されうる。試験されたすべてのモノカテリシジン種は今までのところは、αらせんとして単一カテリシジン遺伝子を発現する（Ｔａｏｍａｓｉｎｓｉｇら、Ｃｕｒｒ．Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｅｐｔ． Ｓｃｉ．，６：２３（２００５））。

【０１８６】

（実施例１１）

トリコモナスに対するＫ９ＣＡＴＨの効果

トリコモナス・バギナリス株Ｔ１（１９９３年にＴａｉによって報告された臨床分離株［完全な引用を与えてください］）を、１０％熱不活性化ウマ血清、１０Ｕペニシリン、１０μｇストレプトマイシン、１８０μＭ硫酸鉄（ＩＩ）アンモニウムおよび２８μＭスルホサリチル酸を添加したＴＹＭ培地で培養した。寄生生物を毎日継代した（１０ｍＬＴＹＭ培地中に寄生生物約1×10^6個）。

【０１８７】

寄生生物のイヌカテリシジン（Ｋ９ＣＡＴＨ）による処理は、寄生生物の運動性および生存能に即時であるのはもちろんのこと、安定な効果を生じた（図１１）。試験を行った最高濃度（１００μＭ Ｋ９ＣＡＴＨ）において、寄生生物培養物の約８０％が死滅した。５０μＭおよび２５μＭのＫ９ＣＡＴＨが寄生生物生存能に対して中程度の効果を有したが、１２．５μＭ以下のＫ９ＣＡＴＨは寄生生物生存能に対して無視できる効果を有した。

【０１８８】

（実施例１２）

概要

Ｋ９ＣＡＴＨはＳＴＤの原因である細菌を、今日までに試験されたすべてのプロテグリンを含む、いずれかの天然または合成抗菌ペプチドについて報告された高い効力によって効果的に死滅させる（Ｏｓｔｂｅｒｇら、Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，２６：１９７（２００５））。細菌起源のＳＴＤはイヌでごく時折記録されており、報告された病原体と臨床疾患との間の関連は議論の余地が残されている（Ｃａｒｍｉｃｈａｅｌら、Ｃｏｒｎｅｌｌ Ｖ

ｅｔ．，７８：６３（１９８８）；Ｄｏｉｇら、Ｃａｎ．Ｊ．Ｃｏｍｐ．Ｍｅｄ．，４５：２３３（１９８１）；Ｈａｒａｓａｗａら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ｓｙｓｔ．Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，４３：６４０（１９９３））。これらの発見は、ヒトＳＴＤで共通の病原体に対して新たに同定されたＫ９ＣＡＴＨの優れた抗菌能力を明らかに示している。Ｎ．ゴノレアは、ヒト抗菌ペプチドＬＬ－３７の発現をダウンレギュレートして（Ｂｅｒｇｍａｎら、Ｃｅｌｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．，７：１００９（２００５））、ポリミキシンＢなどのカチオン性抗菌ペプチドに耐性であることが報告されている（Ｔｚｅｎｇら、Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，１８７：５３８７（２００５））。Ｎ．ゴノレアに対するＫ９ＣＡＴＨの抗菌活性は、報告された最も強力な天然カテリシジン（すべての合成類似物質を含む）の抗菌活性より約４～８倍大きい（Ｏｓｔｂｅｒｇら、Ｐｅｐｔｉｄｅｓ，２６：１９７（２００５））。同様の活性は、イヌＳＴＤの原因因子の１つとして示唆されてきたウレアプラズマ・カニゲニタリウムに対して観察された。

【０１８９】

Ｋ９ＣＡＴＨの抗菌活性は塩依存性を示さず（図７）、塩依存性は、このイヌカテリシジンが各種の環境条件に対するペプチドの回復力を向上させることによって高度の効力を確保する別の特徴でありうる。Ｋ９ＣＡＴＨは０．０１μｇ／ｍＬでのＬＰＳ処理によっても影響を受けなかったのに対して、ＭＩＣの６０μＭへの上昇は０．１および１０μｇ／ｍＬで認められ、ペプチドが内毒素を見かけの非可逆的結合によって中和することを示唆した。推測上のシナリオは、Ｋ９ＣＡＴＨのＣ末端７アミノ酸高極性非コイル部分（図６）が物理化学的アンカーとして作用して、内毒素を捕捉および固定して、潜在的に有害な微生物成分の除去を引き起こすことでありうる。他の報告（Ｂａｒｔｌｅｔｔら、Ｉｎｔ．Ｊ．Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｎｅｔｓ，２３：６０６（２００４）；Ｃｉｏｒｎｅｉら、Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．，４９：２８４５（２００５））と一致して、Ｅ．コリに対するＫ９ＣＡＴＨ活性の著しい低下が上昇する血清濃度によって検出された（表５）。これは、血中でのカテリシジンの存在のために宿主動物の細胞が潜在的な細胞毒性効果からの防御を保証される機構でありうる。

【０１９０】

Ｋ９ＣＡＴＨの独自の特徴は、３つの種（イヌ、ヒトおよびニワトリ）での顕著に低い溶血活性である。現在までに同定された最も強力なカテリシジンペプチドの１つであるＳＭＡＰ－２９（Ｇｅｎｎａｒｏら、Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ，５５：３１（２０００）；Ｔｒａｖｉｓら、Ｉｎｆｅｃｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，６８：２７４８（２０００））は、８０μＭの濃度でヒトＲＢＣの６７％の溶血を引き起こす（Ｓｋｅｒｌａｖａｊら、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．，４６３：５８（１９９９））。対照的に本試験は、Ｋ９ＣＡＴＨが同じ濃度でヒト赤血球の最小限の溶血（＜５％）のみを示すことを示した。他のカテリシジン（たとえばＣＲＡＭＰ－１８）（Ｓｈｉｎら、Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．，２７５：９０４（２０００）が最小限の溶血活性しか示さなかったという事実にもかかわらず、この特徴がＫ９ＣＡＴＨペプチドの場合と同様に（図９）異なる種でも持続するかどうかは不明である。

【０１９１】

要するに、イヌ骨髄前駆細胞からの新規哺乳類カテリシジンペプチドＫ９ＣＡＴＨが同定された。Ｋ９ＣＡＴＨは、グラム陽性細菌（リステリア・モノサイトゲネス、およびスタフィロコッカス・アウレウス）、グラム陰性細菌（エシェリキア・コリ、クレブシエラ・ニューモニエ、サルモネラ血清型ティフィムリウム、シュードモナス・アエルギノザ、プロテウス・ミラビリス、サルモネラ・エンテリティディス、およびナイセリア・ゴノレア）、および酵母（カンジダ・アルビカンス）に対してだけでなく、寄生生物（すなわちトリコモナス・バギナリス）に対しても幅広い抗菌活性を示す。Ｋ９ＣＡＴＨの抗菌活性は、生得的防御系におけるこれらの宿主防御分子の役割に関連するより深い機構試験のための有用な生体内モデルを与えうる、ＳＴＤに関連する病原体、ナイセリア・ゴノレアに対して特に強力であった。本データは、Ｋ９ＣＡＴＨがイヌにおける生得的防御機構に関与する中心的なエフェクタ分子でありうることを示唆する。さらにこの抗菌ペプチドの特

異的特徴は、化合物の殺滅能力および各種の微小環境生化学条件に対するその独自の耐性の幅広さを考慮すると、なお広範な用途に向かいうる。

【０１９２】

【表７－１】

参考文献

[1] Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. J Leukoc Biol 2004;75:39-48.

[2] Boman HG. Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. J Intern Med 2003;254:197-215.

[3] Tomasinsig L, Zanetti M. The cathelicidins--structure, function and evolution. Curr Protein Pept Sci 2005;6:23-34.

[4] Zaiou M, Gallo R. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. Journal of Molecular Medicine 2002;80:549-61.

[5] Bals R, Wilson JM. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. Cell Mol Life Sci 2003;60:711-20.

[6] Zanetti M, Del Sal G, Storici P, et al. The cDNA of the neutrophil antibiotic Bac5 predicts a pro-sequence homologous to a cysteine proteinase inhibitor that is common to other neutrophil antibiotics. J Biol Chem 1993;268:522-6.

[7] Zaiou M, Nizet V, Gallo RL. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. J Invest Dermatol 2003;120:810-6.

[8] Agerberth B, Charo J, Werr J, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. Blood 2000;96:3086-93.

[9] Larrick JW, Hirata M, Zheng H, et al. A novel granulocyte-derived peptide with lipopolysaccharide-neutralizing activity. J Immunol 1994;152:231-40.

[10] Niyonsaba F, Hirata M, Ogawa H, et al. Epithelial cell-derived antibacterial peptides human beta-defensins and cathelicidin: multifunctional activities on mast cells. Curr Drug Targets Inflamm Allergy 2003;2:224-31.

[11] Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. Immunology 2002;106:20-6.

[12] Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. Biopolymers 2000;55:31-49.

【０１９３】

【表７－２】

[13] Zhao C, Nguyen T, Boo LM, et al. RL-37, an alpha-helical antimicrobial peptide of the rhesus monkey. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:2695-702.

[14] Bals R, Lang C, Weiner DJ, et al. Rhesus monkey (Macaca mulatta) mucosal antimicrobial peptides are close homologues of human molecules. Clin Diagn Lab Immunol 2001;8:370-5.

[15] Bals R, Wang X, Zasloff M, et al. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95:9541-6.

[16] Skerlavaj B, Gennaro R, Bagella L, et al. Biological characterization of two novel cathelicidin-derived peptides and identification of structural requirements for their antimicrobial and cell lytic activities. J Biol Chem 1996;271:28375-81.

[17] Scocchi M, Wang S, Zanetti M. Structural organization of the bovine cathelicidin gene family and identification of a novel member. FEBS Lett 1997;417:311-5.

[18] Shamova O, Brogden KA, Zhao C, et al. Purification and properties of proline-rich antimicrobial peptides from sheep and goat leukocytes. Infect Immun 1999;67:4106-11.

[19] Bagella L, Scocchi M, Zanetti M. cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins. FEBS Lett 1995;376:225-8.

[20] Zanetti M, Storici P, Tossi A, et al. Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells. J Biol Chem 1994;269:7855-8.

[21] Vunnam S, Juvvadi P, Merrifield RB. Synthesis and antibacterial action of cecropin and proline-arginine-rich peptides from pig intestine. J Pept Res 1997;49:59-66.

[22] Scocchi M, Bontempo D, Boscolo S, et al. Novel cathelicidins in horse leukocytes(1). FEBS Lett 1999;457:459-64.

[23] Skerlavaj B, Scocchi M, Gennaro R, et al. Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides. Antimicrob Agents Chemother 2001;45:715-22.

[24] Pestonjamasp VK, Huttner KH, Gallo RL. Processing site and gene structure for the murine antimicrobial peptide CRAMP. Peptides 2001;22:1643-50.

【０１９４】

【表７－３】

[25] Termen S, Tollin M, Olsson B, et al. Phylogeny, processing and expression of the rat cathelicidin rCRAMP: a model for innate antimicrobial peptides. Cell Mol Life Sci 2003;60:536-49.

[26] Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, et al. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. J Immunol 2001;167:3329-38.

[27] Levy O, Weiss J, Zarember K, et al. Antibacterial 15-kDa protein isoforms (p15s) are members of a novel family of leukocyte proteins. J Biol Chem 1993;268:6058-63.

[28] Zanetti M. The Role of Cathelicidins in the Innate Host Defenses of Mammals. Current Issues in Molecular Biology 2005;7:179-96.

[29] Wu H, Zhang G, Minton JE, et al. Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and Salmonella enterica serovar typhimurium infection. Infect Immun 2000;68:5552-8.

[30] Sang Y, Ortega MT, Blecha F, et al. Molecular Cloning and Characterization of Three {beta}-Defensins from Canine Testes. Infection and Immunity 2005;73:2611-20.

[31] Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol 1990;215:403-10.

[32] Soulages JL, Arrese EL, Chetty PS, et al. Essential role of the conformational flexibility of helices 1 and 5 on the lipid binding activity of apolipophorin-III. J Biol Chem 2001;276:34162-6.

[33] Chen YH, Yang JT, Chau KH. Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. Biochemistry 1974;13:3350-9.

[34] Chen C, Brock R, Luh F, et al. The solution structure of the active domain of CAP18--a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. FEBS Lett 1995;370:46-52.

[35] Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 1994;22:4673-80.

【０１９５】

【表７－４】

[36] Sanchez R, Sali A. Comparative protein structure modeling. Introduction and practical examples with modeller. Methods Mol Biol 2000;143:97-129.

[37] McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT. The PSIPRED protein structure prediction server. Bioinformatics 2000;16:404-5.

[38] Pfaller MA, Chaturvedi V, Espinel-Ingroff A, et al. Manual NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA. NCCLS 2002;22.

[39] Ferraro MJ, Wikler MA, Craig WA, et al. Manual NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. NCCLS 2003;23.

[40] Turner J, Cho Y, Dinh NN, et al. Activities of LL-37, a cathelin-associated antimicrobial peptide of human neutrophils. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:2206-14.

[41] Tack BF, Sawai MV, Kearney WR, et al. SMAP-29 has two LPS-binding sites and a central hinge. Eur J Biochem 2002;269:1181-9.

[42] Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, et al. SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. FEBS Lett 1999;463:58-62.

[43] Yu K, Park K, Kang SW, et al. Solution structure of a cathelicidin-derived antimicrobial peptide, CRAMP as determined by NMR spectroscopy. J Pept Res 2002;60:1-9.

[44] Risso A, Zanetti M, Gennaro R. Cytotoxicity and apoptosis mediated by two peptides of innate immunity. Cell Immunol 1998;189:107-15.

[45] Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, et al. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. J Immunol 2002;169:3883-91.

[46] Castiglioni B, Scocchi M, Zanetti M, et al. Six antimicrobial peptide genes of the cathelicidin family map to bovine chromosome 22q24 by fluorescence in situ hybridization. Cytogenet Cell Genet 1996;75:240-2.

[47] Zhang G, Ross CR, Blecha F. Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. Vet Res 2000;31:277-96.

【０１９６】

【表７－５】

[48] Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, et al. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. J Immunol 2004;172:3070-7.

[49] Shin SY, Park EJ, Yang ST, et al. Structure-activity analysis of SMAP-29, a sheep leukocytes-derived antimicrobial peptide. Biochem Biophys Res Commun 2001;285:1046-51.

[50] Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, et al. Cathelicidin antimicrobial peptides are expressed in salivary glands and saliva. J Dent Res 2002;81:845-50.

[51] Ostberg N, Kaznessis Y. Protegrin structure-activity relationships: using homology models of synthetic sequences to determine structural characteristics important for activity. Peptides 2005;26:197-206.

[52] Zanetti M, Gennaro R, Skerlavaj B, et al. Cathelicidin peptides as candidates for a novel class of antimicrobials. Curr Pharm Des 2002;8:779-93.

[53] Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, et al. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. Microbes Infect 2002;4:361-72.

[54] Oren Z, Shai Y. Mode of action of linear amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides. Biopolymers 1998;47:451-63.

[55] Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. Blood 2001;97:3951-9.

[56] Carmichael LE, Joubert JC. Transmission of Brucella canis by contact exposure. Cornell Vet 1988;78:63-73.

[57] Doig PA, Ruhnke HL, Bosu WT. The genital Mycoplasma and Ureaplasma flora of healthy and diseased dogs. Can J Comp Med 1981;45:233-8.

[58] Harasawa R, Imada Y, Kotani H, et al. Ureaplasma canigenitalium sp. nov., isolated from dogs. Int J Syst Bacteriol 1993;43:640-4.

[59] Bergman P, Johansson L, Asp V, et al. Neisseria gonorrhoeae downregulates expression of the human antimicrobial peptide LL-37. Cell Microbiol 2005;7:1009-17.

[60] Tzeng YL, Ambrose KD, Zughaier S, et al. Cationic antimicrobial peptide resistance in Neisseria meningitidis. J Bacteriol 2005;187:5387-96.

【０１９７】

【表７－６】

[61] Bartlett KH, McCray PB, Jr., Thorne PS. Reduction in the bactericidal activity of selected cathelicidin peptides by bovine calf serum or exogenous endotoxin. Int J Antimicrob Agents 2004;23:606-12.

[62] Ciornei CD, Sigurdardottir T, Schmidtchen A, et al. Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. Antimicrob Agents Chemother 2005;49:2845-50.

[63] Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, et al. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. Infect Immun 2000;68:2748-55.

[64] Shin SY, Kang SW, Lee DG, et al. CRAMP analogues having potent antibiotic activity against bacterial, fungal, and tumor cells without hemolytic activity. Biochem Biophys Res Commun 2000;275:904-9.

【０１９８】

本明細書で引用および言及したすべての特許および刊行物は、参照によりその全体が個別に包含されているか、またはその全体が本明細書に述べられているのと同じ程度まで、参照により本明細書に組み入れられている。

【０１９９】

本明細書に記載した具体的な方法および組成物は代表であり、本発明の範囲の制限としてではない。他の目的、態様、および実施形態が、本明細書を考慮したときに当業者の心に浮かぶことがあり、請求項の範囲によって制限されるような本明細書の範囲内に含まれる。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、本明細書に開示された発明に各種の置換および修飾が行われることが、当業者にただちに明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【０２００】

【図１】イヌカテリシジンの同定。（Ａ）ＲＴ－ＰＣＲを変性プライマーと共に使用して、イヌ、ヒト、およびブタ骨髄から増幅したｃＤＮＡ。ヒトおよびブタサンプルを正の対照として使用した。（Ｂ）イヌカテリシジンの全ｃＤＮＡ（配列番号１）および予想ペプチド配列（配列番号２）。ｃＤＮＡ配列の開始および停止コドンは太字である。コード領域は三重コドン形式であり、未翻訳領域は小文字である。予想シグナルペプチド（Ｎ末端２９アミノ酸）はイタリック体であり、矢印で示される。

【図２】イヌカテリシジンの組織発現プロフィール。反応物２５ｍＬ中で全ＲＮＡ　４００ｎｇを使用し、遺伝子特異性プライマーを使用して４０サイクルにわたって、１ステップＲＴ－ＰＣＲを実施した。グリセルアルデヒド－３－ホスフェートデヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）の相補性ＤＮＡ断片は、同じＲＮＡサンプルを使用して増幅させた。結果は、２匹のイヌからの組織を使用して同様のパターンによる２回の独立した実験を表す。

【図３】異なる種によるカテリシジンの類似性比較。カテリシジンドメインには下線が付いている；カテリシジンドメイン内の保存システイン残基は囲まれている。矢印は、Ｃ末端合成ペプチドの産生の予測部位を示す。イヌカテリシジン（Ｋ９ＣＡＴＨ、配列番号２）の類似性および同一性のパーセンテージを配列の後に示す。関連する配列のＧｅｎＢａｎｋアクセション番号は：ヒト（Ｈｓ）ＬＬ－３７、Ｐ４９９１３（配列番号３３）；ウマ（Ｅｃ）ＣＡＴＨＬ２、ＣＡＡ１２２２７（配列番号３４）；　ウシ（Ｂｔ）ＣＡＴＨＬ１、ＮＰ７７７２５０（配列番号３５）；ウシＣＡＴＨＬ７、ＮＰ７７７２５６（配列番号３６）；ブタ（Ｓｓ）ＰＭＡＰ３７、Ｐ４９９３２（配列番号３７）；およびブタＰＲ－３９、Ｐ８００５４（配列番号３８）である。

【図４】イヌカテリシジン遺伝子の構造的構成。Ｋ９ＣＡＴＨは、３個のイントロンによって隔離される４個のエキソンより構成される。各エキソンおよびイントロンの長さが示されている。各エキソンによってコードされるアミノ酸配列（配列番号４３～４６）も示

されている。カテリンプロ領域内の４個のシステインに下線が付けてあり、成熟ペプチド配列にも下線が付けられ、太字になっている。

【図５】円偏光二色性分析－イヌカテリシジンの２次構造に対するＴＦＥ（Ａ）およびＳＤＳ（Ｂ）の効果。ペプチドがＴＦＥまたはＳＤＳの存在下で高度にα－らせん状となることに注目する。

【図６】Ｋ９ＣＡＴＨの３次元構造帰属および表面分析。最左カラムは、４つのペプチドのαらせん（紫）、およびコイル（シアン）２次構造要素を示すリボンダイアグラムを描いている（βシート要素は存在しない）。２つの最右カラムは、ペプチド溶媒接近可能表面の前面図および背面図を描いている。酸性（アニオン性）残基は赤色に着色され、塩基性（カチオン性）は青色に着色され、疎水性は黄色である。

【図７】Ｋ９ＣＡＴＨの抗菌活性に対する塩化ナトリウムの効果。ブロスマイクロ希釈法を使用して、各種の塩濃度中での２系統の細菌、グラム陰性Ｅ．ｃｏｌｉ（ＡＴＣＣ２５９２２）およびグラム陽性Ｌ．ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ（ＡＴＣＣ１９１１５）に対するｃＢＤのＭＩＣを決定した。殺菌混合物の最終ナトリウム濃度は、ＮａＣｌによって１５、３０、５０、１４０、および３００ｍＭまで調整した。塩感受性抗菌性ペプチドであるイヌβ－デフェンシンを比較に使用した。すべてのアッセイは３通り実施した。

【図８】イヌカテリシジンによるＬＰＳの結合。アッセイは、先に記載したような（４７）定量的色素産生性カブトガニ変形細胞溶解液（ＬＡＬＡ）アッセイキット（ＱＣＬ－１０００キット、ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ，ＵＳＡ）を使用して実施した。右パネル－データをヒルプロットでもグラフにして、係数４．４９を示した。データは、２つの独立した実験による２通りの値の平均を示す。

【図９】イヌカテリシジンの溶血活性。アッセイは、先に記載したように（４９）ニワトリ赤血球を用いて使用した。データは、２つの独立した実験による２通りの値の平均を示す。

【図１０】カテリシジンの分子系統学。ブートストラップ値を分岐に示す。トポロジーのみが表示されている。Ｋ９ＣＡＴＨが他のすべての哺乳類配列から分離されることに注目する。分析にはＭＥＧＡバージョン３．１ソフトウェア（Ｔｈｅ Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａ Ｓｔａｔｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐａｒｋ，ＰＡ）を使用した。

【図１１】Ｋ９ＣＡＴＨの駆虫性効果。Ｋ９ＣＡＴＨの駆虫性効果は時間に対して安定性である。Ｋ９ＣＡＴＨ濃度と寄生生物運動性との間に反比例関係があり（より低い運動性は、より高い寄生生物死亡率を示す）、駆虫性効果が濃度依存性であることを示す。試験した最高濃度である１００μＭ　Ｋ９ＣＡＴＨにおいて、寄生生物培養物の約８０％が死滅した（図には２０％運動性寄生生物として示す）。

【図１】

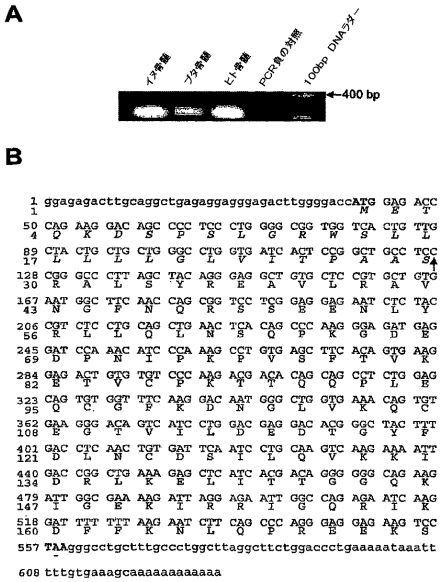


Fig. 1

【図２】

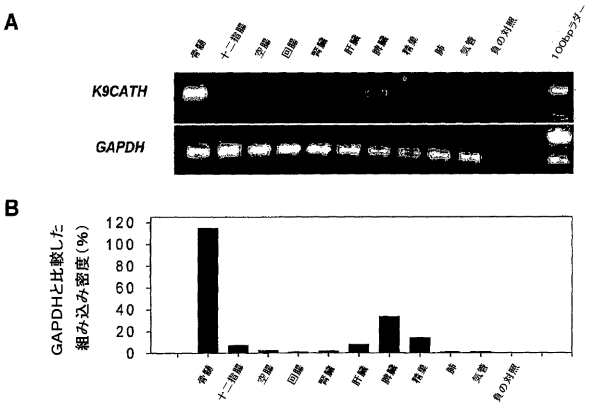


Fig. 2

【図３】

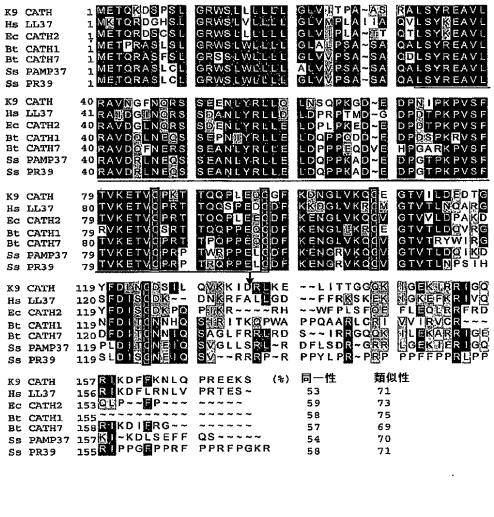


Fig. 3

【図４】

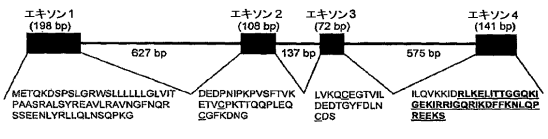
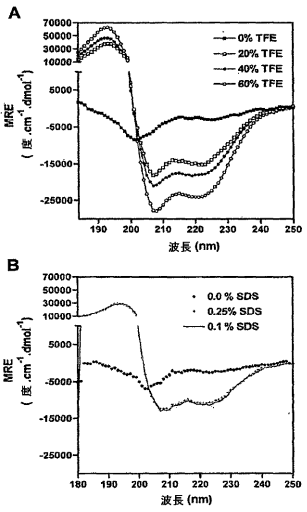


Fig. 4

【図５】



	0% SDS (緩衝液)	0.1% SDS	0.25% SDS
αらせん含量：	0	約 29.%	29 %

TFE	0% (緩衝液)	20%	40%	60%
αらせん含量：	0	42 %	52%	72%

Fig. 5

【図６】

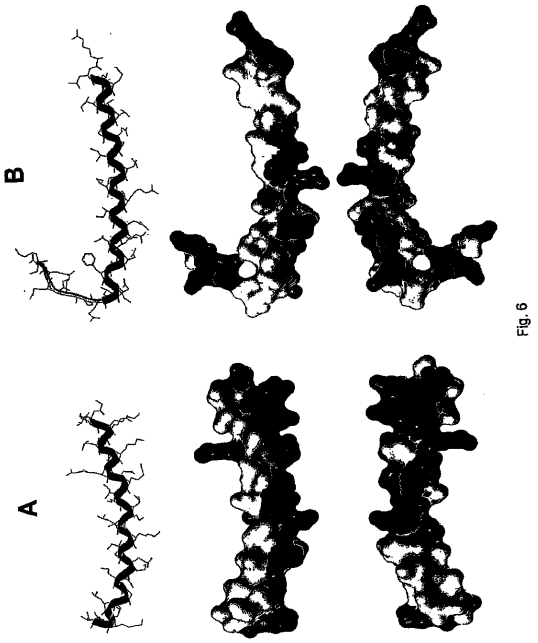


Fig. 6

【図７】

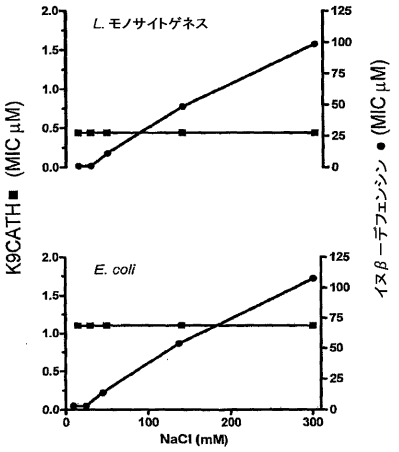


Fig. 7

【図８】

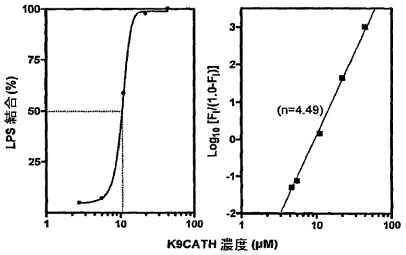


Fig. 8

【図９】

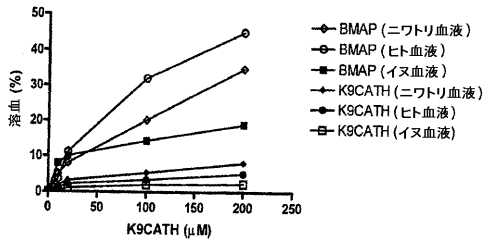
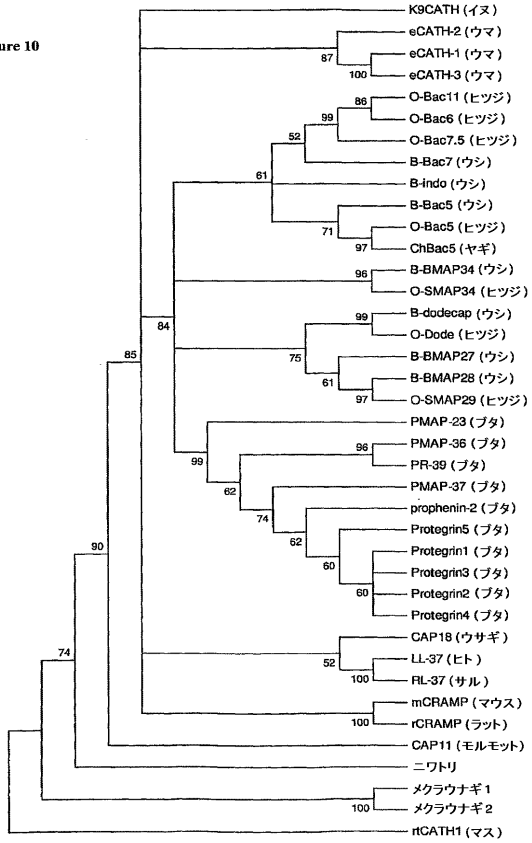


Fig. 9

【図１０】

Figure 10



【図１１】

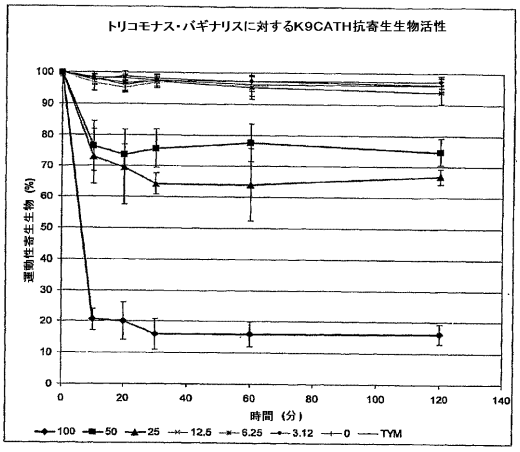


Figure 11

【配列表】

2009521932000001.app

【国際調査報告】

60800640057

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/49637

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: C07K 14/47(2006.01)

USPC: 530/324
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
U.S. : 530/324

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	SANG et al. Canine Cathelicidin: cloning of a novel antimicrobial peptide. Gene Bank, 01 May 2004, accesion Number AY392089.	1-5, 10-12 --- 25
X --- Y	WO 2005/040201 A1 (GALLO et al.) 06 May 2005 (06.05.2005), see the entire document, especially Fig 1 (SEQ ID NO. 9), page 1/22.	1-5, 10-12 --- 25
X --- Y	WO 2005/040192 A2 (GALLO et al.) 06 May 2005 (06.05.2005), see the entire document, especially Fig 1 (SEQ ID NO. 9), page 1/22.	1-5, 10-12 --- 25

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
26 November 2007 (26.11.2007)

Date of mailing of the international search report
26 JUN 2008

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Authorized officer
Mary Audet
Telephone No. 571-272-1600

18.11.2008

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/49637

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 6-9, 13-24
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
Please See Continuation Sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

3)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US06/49637

BOX III. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions, which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I, claims 1-5, drawn to a purified polypeptide comprising SEQ ID NO: 4, a variant of SEQ ID NO: 4 having at least 80% amino acid sequence identity to SEQ ID NO: 4, or a fragment thereof having at least 15 contiguous amino acids, wherein the polypeptide, the variant thereof or the fragment thereof has antimicrobial activity.

Group II, claims 10-12, drawn to an isolated nucleic acid molecule that encodes SEQ ID NO: 4, comprising a nucleotide sequence that is at least 100 nucleotides in length and that hybridizes to SEQ ID NO: 3 or its complement under moderately stringent or highly stringent conditions.

Group III, claim 25, drawn to a purified antibody that binds specifically to SEQ ID NO: 4.
The inventions are linked by the technical feature of canine cathelicidin polypeptide having a broad-spectrum antimicrobial activity. However, this feature is not special because it does not constitute an advance over the prior art.

Sang et al. (Gene Bank Accession Number AY392089.1, 01st May 2004) teach a cathelicidin isolated from *Canis lupus familiaris* (see alignment below).

Query	1	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS	38
		RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS	
Sbjct	135	RLKELITTGGQKIGEKIRRIGQRIKDFFKNLQPREEKS	172

Furthermore, each group involves multiple amino acid sequences and nucleic acids encoding amino acids, or variants or fragments thereof, each with a different chemical structure and having a different function. The nucleic acid sequence or amino acid sequences do not share a substantial common structure, which is a significant structural element, and which do not impart a common property or effect.

Groups I-III, first through third products, require an isolated nucleic acid sequence selected from SEQ ID NO: 3, a purified polypeptide comprising SEQ ID NO: 4 and a purified antibody that binds specifically to SEQ ID NO: 4, respectively, not required by the other groups.

Additionally, the instant claims 6-9 and 13-24 have been found unsearchable and thus withdrawn because they are improper multiple dependent claims. See PCT Rule 6.4(a).

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
PGPub, EPO JPO, MEDLINE, STNEasy.
Search terms: Canine cathelicidin, antimicrobial activity.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｎ 5/10	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
Ｃ１２Ｐ 21/02	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｎ 1/00	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ 1/00	Ｔ	
Ｃ０７Ｋ 16/18	*(2006.01)*	Ｃ０７Ｋ 16/18		
Ａ６１Ｋ 38/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ 37/02		
Ａ６１Ｐ 31/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 31/04		
Ａ６１Ｐ 33/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 33/02		
Ａ６１Ｐ 31/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ 31/10		
Ｃ１２Ｐ 21/08	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｐ 21/08		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 メルガレホ, トナティウー
アメリカ合衆国 カンザス ６６５０２, マンハッタン, キャンパス ロード １５１５
(72)発明者 ブレチャ, フランク
アメリカ合衆国 カンザス ６６５０２, マンハッタン, ディープ クリーク ロード ２１６１
(72)発明者 サン, ヨンミン
アメリカ合衆国 カンザス ６６５０２, マンハッタン, サニー サークル ２５０３
(72)発明者 オルテガ, マリア テレサ
アメリカ合衆国 カンザス ６６５０２, マンハッタン, カークウッド ２７０４

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA43 BA80 CA02 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11 HA03
4B064 AG01 AG27 CA02 CA05 CA10 CA11 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA06 AA07 BA02 BA08 BA19 BA22 CA17 NA14 ZB32 ZB35
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA18 CA40 DA76 DA86 EA29 EA50 FA72 FA74 GA26