

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6676544号  
(P6676544)

(45) 発行日 令和2年4月8日 (2020. 4. 8)

(24) 登録日 令和2年3月16日 (2020. 3. 16)

|                                 |                    |
|---------------------------------|--------------------|
| (51) Int. Cl.                   | F I                |
| <b>C O 7 K</b> 7/06 (2006. 01)  | C O 7 K 7/06 Z N A |
| <b>C O 7 K</b> 7/08 (2006. 01)  | C O 7 K 7/08       |
| <b>A 6 1 P</b> 31/00 (2006. 01) | A 6 1 P 31/00      |
| <b>A 6 1 P</b> 31/04 (2006. 01) | A 6 1 P 31/04      |
| <b>A 6 1 P</b> 37/04 (2006. 01) | A 6 1 P 37/04      |

請求項の数 10 (全 21 頁) 最終頁に続く

|                    |                               |           |                                         |
|--------------------|-------------------------------|-----------|-----------------------------------------|
| (21) 出願番号          | 特願2016-567361 (P2016-567361)  | (73) 特許権者 | 503208194                               |
| (86) (22) 出願日      | 平成27年5月8日 (2015. 5. 8)        |           | ユニベルシテイ、ユトレヒト、ホールディング ベスローテン、フェンノートシャップ |
| (65) 公表番号          | 特表2017-518976 (P2017-518976A) |           | UNIVERSITEIT UTRECHT HOLDING B. V.      |
| (43) 公表日           | 平成29年7月13日 (2017. 7. 13)      |           | オランダ国3584、セーエム、ユトレイト、ヤレラーン、40           |
| (86) 国際出願番号        | PCT/NL2015/050323             |           |                                         |
| (87) 国際公開番号        | W02015/170984                 | (74) 代理人  | 100101085                               |
| (87) 国際公開日         | 平成27年11月12日 (2015. 11. 12)    |           | 弁理士 横井 健至                               |
| 審査請求日              | 平成30年5月6日 (2018. 5. 6)        | (74) 代理人  | 100134131                               |
| (31) 優先権主張番号       | 14167718.7                    |           | 弁理士 横井 知理                               |
| (32) 優先日           | 平成26年5月9日 (2014. 5. 9)        | (74) 代理人  | 100185258                               |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 欧州特許庁 (EP)                    |           | 弁理士 横井 宏理                               |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新しい C A T H 2 誘導体。

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C MAP4-21、C MAP5-21、C MAP6-21、C MAP7-21、C MAP8-21、C MAP9-21、C MAP10-21、C MAP11-21、C MAP4-21 (F5→W)、C MAP4-21 (F5→Y)、C MAP4-21 (F12→W)、C MAP4-21 (F12→Y)、C MAP4-21 (F5, F12→W)、C MAP4-21 (F5, F12→Y)、C MAP4-21 (F5→W, F12→Y)、C MAP4-21 (F5→Y, F12→W)、C MAP7-21 (F12→W)、C MAP7-21 (F12→Y)、C MAP10-21 (F12→W) および C MAP10-21 (F12→Y) からなる群から選択される、N 末端切断型 C MAP27 誘導体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の C MAP27 誘導体を投与することを含む、家禽の卵内ワクチン接種のための方法。

【請求項 3】

前記家禽が鶏である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

動物またはヒトの免疫応答を活性化するための薬剤の製造のための請求項 1 に記載の C MAP27 誘導体の使用。

【請求項 5】

免疫応答の活性化が、DNA 取り込みの増加による Toll 様受容体活性化の増強、エンドトキシン中和、免疫細胞によるサイトカイン／ケモカイン産生の刺激、直接的な走化性、貪食作用の強化と免疫細胞の増殖と分化の刺激から選択される、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

請求項1に記載のCMAP27誘導体を含む免疫学的組成物。

【請求項7】

感染症の治療のための薬剤の調製またはワクチンの調製のための請求項1に記載のCMAP27誘導体の使用。

【請求項8】

抗生物質として使用するための請求項1に記載のCMAP27誘導体。

【請求項9】

動物の体重増加に使用するための請求項1に記載のCMAP27誘導体。

【請求項10】

家禽種の卵への請求項1に記載のCMAP27誘導体による卵内ワクチン接種により、家禽の体重を増加させる方法。 10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗生物質および免疫刺激物質、特にそのような活性を有するペプチドでCATH2としても知られるCMAP27由来のより特異的なペプチドに関する。

【背景技術】

【0002】

CATH2またはCMAP27は、抗菌性ペプチドの属の一員である。これまでに、多くの種類の抗菌性ペプチドが単離されており、過去数十年間に様々な供給源から配列決定がされている（選択された総説として、以下を参照のこと：Otvos Jr., L. *Cell. Mol. Life Sci.* 2002, 59:1138; Otvos, Jr., L. *J. Peptide Sci.* 2000, 6:497; Tan, Y.-T. et al., *Mol. Med. Today* 2000, 6:309; Scott, M.G. and Hancock, R.E.W., *Crit. Rev. Immunol.* 2000, 20:407; Hancock, R.E.W. and Chapple, D.S. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999, 43:1317; Hetru, C. et al., In: *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*; Brey, P. and Hultmark, D. Ed., Chapman and Hall, London, 1998, pp. 40-66; Hancock, R.E.W. et al., *Adv. Microb. Physiol.* 1995 37:135; Vaara, M. *Microbiol. Rev.* 1992, 395)。哺乳類および鳥類において、現在までに発見されたほとんどの抗菌ペプチドは、カテリシジンおよびデフェンシンスーパーファミリーに属する。カテリシジンは多様な種、すなわち哺乳動物、鳥類、魚類および爬虫類に広く分布していることが判明していて、進化の重要性を示しているが、それらのレパートリーは、種間でかなり異なっている。カテリシジンファミリーの抗菌性ペプチドは、プレプロペプチドとしてゲノムにコードされ、タンパク質分解的に切断されて、12から97個のアミノ酸の生物学的に活性なペプチドを形成する(Ramanathan, B. et al., 2002, *Microbes Infect.* 4:361-372)。それらの典型的な一次および二次構造に基づいて、放出されたC末端ペプチドは4つの主なクラスに分けることができ、すなわち、1)  $\alpha$ -ヘリックスペプチド、生物学的膜を模倣する環境と接触したときに両親媒性構造をとる線状ペプチド(LL-37, Agerberth, B., et al., *PNAS* 1995, 92:195; SMAP-29, Anderson, R. C., et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48:673); 2)  $\beta$ -ヘアピンペプチド、1つまたは2つの分子内ジスルフィド架橋(protegrins, Kokryakov, V. N., et al., *FEBS Lett.* 1993, 327:231; dodecapeptide, Romeo, D., et al., *J. Biol. Chem.* 1988, 263:9573); 3) トリプトファンに富むペプチド(インドリシジン)(Indolicidin, Selsted, M. E., et al., *J. Biol. Chem.* 1992, 267:4292)そして4) プロリン/アルギニンリッチペプチド(bactenecins, Gennaro, R., et al., *Infect. Immun.* 1989, 57:3142; PR39, Agerberth, B., et al., *Eur. J. Biochem.* 1991, 202:849)に分けることができる。 40

【0003】

多くのカテリシジンは、いくつかのグラム陰性細菌およびグラム陽性細菌、真菌、原虫およびエンベロープウイルスに対して広範な活性を示す(Zaiou, M. and Gallo, R.L., 2002, *J. Mol. Med.* 80: 549-561)。Van Dijkらは、ニワトリのcathelicidinファミリーの新しいタンパク質を発見した(2005, *Vet. Immunol. Immunopath.* 106: 321-327)。それ 50

はグループ1 ( $\alpha$ -ヘリカルな) ペプチドに属し、CMAP27と命名されているが、CATH-2としても知られている。カテリシジンファミリーの他のメンバーと同様に、CMAP27はプレプロペプチド(154アミノ酸)としてコードされ、タンパク質分解プロセッシング後に、強力な広域抗菌活性を示したC末端ペプチドが放出される。CMAP27またはCATH2と呼ばれるこのC末端ペプチドのアミノ酸配列は、RFGRLRKIRRFKPKVTITIQGSARFGである。

#### 【0004】

その間に、様々なCMAP27の誘導体が合成され、以前の研究(国際公開第2010/093245号を参照)で、C末端が切断されたCMAP27誘導体は、グラム陰性細菌に対するCMAP27の抗生物質特性を維持するだけでなく、黄色ブドウ球菌および炭疽菌のようなグラム陽性細菌に対する抗生物質効果も有していたことが示されている。これらは、良好に機能することが見出されているが、CMAP27のさらなる活性誘導体が依然として必要とされている。

#### 【発明の概要】

#### 【0005】

本発明者らは、CMAP27のさらなる誘導体を見出した。一実施形態において、本発明は、新規なN末端切断型CMAP27誘導体を含み、別の実施形態では、本発明は新規インベルソ(Inverso)およびレトロインベルソ(Retroinverso) CMAP27誘導体を含む。

#### 【0006】

さらに、本発明は、家禽、好ましくはニワトリの卵内ワクチン接種のためのCMAP27誘導体を投与することを含む方法であり、前記CMAP27誘導体は、C末端切断型CMAP27誘導体、N末端切断型CMAP27誘導体、Dアミノ酸型CMAP27誘導体、環状CMAP27誘導体、インベルソおよびレトロインベルソCMAP27誘導体の群から選択される。

#### 【0007】

また、本発明の一部は、動物またはヒトにCMAP27誘導体を提供する動物またはヒトの免疫応答を活性化する方法であって、前記CMAP27誘導体は、C末端短縮CMAP27誘導体、N末端短縮CMAP27誘導体、Dアミノ酸CMAP27誘導体、環状CMAP27誘導体、インベルソおよびレトロインバーソームCMAP27誘導体の群から選択され、好ましくは、免疫応答の活性化の方法については、DNA取り込みの増加、エンドトキシン中和、免疫細胞によるサイトカイン/ケモカイン産生の刺激、直接化学走化性、増強された食作用および免疫細胞の増殖および分化の刺激によるToll様受容体活性化の増強から選択される。

#### 【0008】

本発明のさらなる部分は、N末端切断型CMAP27誘導体、インベルソおよびレトロインベルソCMAP27誘導体の群から選択される、CMAP27誘導体を含む免疫学的組成物である。

#### 【0009】

また、本発明には、感染症の治療のための薬剤の調製のための、または、ワクチンの調製のための、N末端が切断されたCMAP27誘導体、インベルソおよびレトロインベルソCMAP27誘導体の群から選択されるCMAP27誘導体の使用が含まれ、具体的には、前記使用は、抗生物質としての使用またはこのような化合物で処置した動物の体重の増加のための使用である。

#### 【0010】

さらに、本発明の一部は、CMAP27誘導体による前記家禽種の卵の卵内接種による家禽の体重増加方法であって、前記CMAP27誘導体は、C末端切断型CMAP27誘導体、N末端切断型CMAP27誘導体、Dアミノ酸型CMAP27誘導体、環状CMAP27誘導体、インベルソおよびレトロインベルソCMAP27誘導体の群から選択される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0011】

【図1】  $10^6$ CFUのトリ病原性サルモネラ腸炎pt13aを皮下注射した後の感染後2日における鶏末梢血白血球の差および合計数。A) 合計数。B) 差分数。

【図2】  $10^6$ のトリ病原性サルモネラ腸炎pt13aを皮下注射した後の死亡率。A) 感染後7日間のペプチド処置および非処置鳥の生存曲線。B) 未処理感染鳥(+ 対照)と比較した死亡率(%)の低下。

10

20

30

40

50

【図3】トリ病原性サルモネラ腸炎pt13aを $10^6$ CFUで皮下注射し、感染後7日で病変スコアを測定した。左右の胸部気管（気道）、肝臓および心臓（全身感染）を、0 = 病変なし、1 = 軽度病変、2 = 中程度病変および3 = 重度病変とのスコアリングシステムを用いて別々に評価した。平均病変スコア（MLS）は、1鳥当たりの病変スコアの合計として計算した。A) サルモネラ症陽性トリの割合（MLS>1）および未処理の感染トリと比較したサルモネラ症陽性トリの減少。B) 未処理感染トリと比較した平均病変スコア。

【図4】 $10^6$ CFUのトリ病原性大腸菌506の気管内注射による感染後2日目の鶏末梢血白血球の差分数および合計数。A) 合計数。 B) 差分数。

【図5】 $10^6$ CFUのトリ病原性大腸菌506の気管内注射後の死亡率。A) 感染後7日間のペプチド処置および非処置トリの生存曲線。 B) 未処理感染トリと比較した死亡率（%）の低下。

【図6】トリ病原性大腸菌506を $10^6$ CFUで気管内注射し、感染後7日で病変スコアを測定した。左右の胸部気管（気道）、肝臓および心臓（全身感染）を、0 = 病変なし、1 = 軽度病変、2 = 中程度病変および3 = 重度病変とのスコアリングシステムを用いて別々に評価した。平均病変スコア（MLS）は、トリ1羽当たりの病変スコアの合計として計算した。A) 未処理感染トリと比較した大腸菌症陽性トリの割合（MLS>1）および大腸菌症陽性トリの減少。B) 未処理感染トリと比較した平均病変スコア。

【図7】 $10^6$ CFUのトリ病原性大腸菌506の気管内注射7日後の胸腔空気嚢の計測数。

【図8】孵化時（D0）（図8A）および孵化後7日目（D7）（図8B）のRoss308ブロイラーの体重を評価した。ブロイラーは、18日目に1mg/kgペプチドまたは溶媒が注射された。

【図9】トリ病原性大腸菌078（APEC 078）圃場分離株に対するin vitroでのCMAP27由来ペプチドの抗菌活性。A) コロニーカウントアッセイを用いた50% ミューラー・ヒントンブロス中のAPEC 078（ $2 \times 10^6$ CFU/ml）に対するペプチド（5  $\mu$ M）の抗菌活性。B) コロニー数アッセイを用いた10% ウシ胎仔血清（FCS）を含むDMEM中のAPEC 078（ $3 \times 10^5$ CFU/ml）に対するペプチド（5  $\mu$ M）の抗菌活性。C) 生存または熱死滅APEC 078（ $3 \times 10^5$ CFU/ml）で37℃で2時間インキュベートした後の、DMEM/10%FCS中、5  $\mu$ Mペプチドの存在下または非存在下でインキュベートしたJ774.A1細胞（ELISA）によるTNF  $\alpha$  産生。データは3つの独立した実験からの平均値±標準誤差を表す。

【図10】HD11細胞におけるCMAP27誘導ペプチドによるケモカイン誘導。HD11細胞を、RPMI-1640/10%FCS中の96ウェル組織培養処理プレート（ $2 \times 10^5$ 細胞/mL）に播種し、ペプチド（20  $\mu$ M）補充培地と37℃（5%CO<sub>2</sub>）で4時間（白色棒グラフ）または24時間（黒色棒グラフ）インキュベートした。インターロイキン-1 $\beta$ 、IL-8（CXCLi2）、単球走化性タンパク質-3（MCP-3）およびRANTES（CCLi4）の転写レベルをリアルタイムPCRによって決定した。有意水準：\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.001。データは3-4回の独立した実験からの平均値±標準誤差を表す。

【図11】CMAP27誘導ペプチドによって誘導されるHD11細胞におけるリポ多糖誘導性インターロイキン-1 $\beta$ 産生誘導および酸化窒素生産の中和。HD11細胞を、RPMI-1640/10%FCS中96ウェル組織培養処理プレート（ $2 \times 10^5$ 細胞/mL）に播種した。最終濃度50ng/mlのLPSを20  $\mu$ Mのペプチド添加または非添加で37℃（5%CO<sub>2</sub>）で30分間プレインキュベートし、細胞に添加して4時間および24時間インキュベートした。A) インターロイキン-1の転写レベルがリアルタイムPCRによって決定された（4時間のみ）。B) 上清は、Griess法を用いた一酸化窒素産生の測定のために収集された（24時間のインキュベーションのみ）。有意水準：\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\*P<0.001。データは3-4回の独立した実験からの平均値±標準誤差を表す。

【図12】トリプトファンによるフェニルアラニン残基の置換は、CMAP27由来ペプチドのインビトロにおけるLPS中和能を高める。HD11細胞を、RPMI-1640/10%FCS中96ウェル組織培養処理プレート（ $2 \times 10^5$ 細胞/mL）に播種した。最終濃度50ng/mlのLPSを20  $\mu$ Mのペプチド添加または非添加で37℃（5%CO<sub>2</sub>）で30分間プレインキュベートし、細胞に添加して4時間および24時間インキュベートした。A) インターロイキン-1の転写レベルがリアルタイムPCRによって決定された（4時間のみ）。B) 上清は、Griess法を用いた一酸化窒素産

10

20

30

40

50

生の測定のために収集された（24時間のインキュベーションのみ）。有意水準：\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ 。データは3-4回の独立した実験からの平均値±標準誤差を表す。

【図13】CMAP27誘導ペプチドは、DNA摂取およびDNA誘導活性化を増強する。A) CMAP27誘導ペプチド（5  $\mu\text{M}$ ）の非存在下および存在下で、2.5nMのAlexa-Fluor488標識化ODN-2006にて4時間、HD11細胞を刺激した後、DNA取り込みをフローサイトメトリーで分析した。B) これらの同じ条件下でより長い時間（17時間）刺激したHD11細胞の上清を回収し、Griess法を用いた酸化窒素生成の測定に使用した。データは3-4回の独立した実験からの平均値±標準誤差を表す。

【発明を実施するための形態】

## 【0012】

### 定義

本明細書において使用される「CMAP27」または「CATH2」は、アミノ酸配列RFGRFLRKIRRFRPKVTITIQGSARFGを有するタンパク質として定義されるだけでなく、C末端でアミド化されたバージョンRFGRFLRKIRRFPRPKVTITIQGSARF-NH<sub>2</sub>（これもCMAP1-26-NH<sub>2</sub>と命名されている）がこの定義に含まれる。カテリシジンでは、C末端グリシン残基のアミド化が官能基に付加することが知られているので、CMAP1-26-NH<sub>2</sub>がペプチドの活性型であることが示唆されている（Shinnar, A.E. et al., 2003, Bioorg. Chem. 31:425-436; Tomasinsig, I. and Zanetti, M, 2005, Curr. Prot. Pept. Sci. 6:23-34）。

## 【0013】

本明細書で使用される「ペプチド」という用語は、ペプチド結合によってカップリングされたアミノ酸の配列を意味し、アミノ酸は20個の天然のペプチド構築アミノ酸の1つであり、アミノ酸の1つまたは全てがL-D-アロ配置のイソロイシンおよびトレオニン（キラル中心の1つにおいて反転のみ）のいずれかである。本発明によるペプチドは、直鎖であってもよく、すなわち、配列の最初のアミノ酸および最後のアミノ酸はそれぞれ遊離NH<sub>2</sub>またはCOOH基を有するか、またはN末端（アセチル化）および/またはC末端（アミド化）修飾されている。

## 【0014】

「C末端短縮型CMAP27-誘導体」は、本明細書において、国際公開第2010/093245号に記載されている切断型ペプチドとして、特にCMAP26-NH<sub>2</sub>、CMAP26、CMAP26 (P14→G)、CMAP26 (P14→L)、CMAP1-21、CMAP1-15、CMAP1-15 (F2→L)、CMAP1-15 (F5→L)、CMAP1-15 (F12→L)、CMAP1-15 (3xF→L)、CMAP1-15 (F2→W)、CMAP1-15 (F5→W)、CMAP1-15 (F12→W)、MAP1-15 (F2→W; F5→W; F12→W)、CMAP1-13、CMAP1-12、CMAP1-11およびCMAP1-10、ならびにそれらのアセチル化および/またはアミド化誘導体として挙げられるペプチドとして定義される。さらに好ましくは、CMAP1-21 (F2→W)、CMAP1-21 (F5→W)、CMAP1-21 (F12→W)、CMAP1-21 (F2, 5→W)、CMAP1-21 (F5, 12→W)、CMAP1-21 (F2, 12→W)、CMAP1-21 (F2, 5, 12→W)、CMAP1-21 (F2→Y)、CMAP1-21 (F5→Y)、CMAP1-21 (F12→Y)、CMAP1-21 (F2, 5→Y)、CMAP1-21 (F5, 12→Y)、CMAP1-21 (F2, 12→Y)、CMAP1-21 (F2, 5, 12→Y)、CMAP1-21 (F2→W; F5→Y)、CMAP1-21 (F2→Y; F5→W)、CMAP1-21 (F5→W; F12→Y)、CMAP1-21 (F5→Y; F12→W)、CMAP1-21 (F2→W; F12→Y)、CMAP1-21 (F2→Y; F12→W)、CMAP1-21 (F2→W; F5→Y; F12→Y)、CMAP1-21 (F2→Y; F5→W; F12→Y)、およびCMAP1-21 (F2→Y; F12→Y; F12→W)である。上記で同定されたCMAPタンパク質はまた、CATH2ペプチドとして示され得る。CMAP1-21はCATH2 (1-21) になる。

## 【0015】

「N末端切断型CMAP27誘導体」は、CMAP27のN末端アミノ酸（アルギニン）で切断されたCMAP-27誘導体である。特に挙げられるのは、CMAP1-21のN末端切断型変異体：CMAP4-21、CMAP5-21、CMAP6-21、CMAP7-21、CMAP8-21、CMAP9-21、CMAP10-21、CMAP11-21、CMAP4-21 (F5→W)、CMAP4-21 (F5→Y)、CMAP4-21 (F12→W)、CMAP4-21 (F12→Y)、CMAP4-21 (F5, F12→W)、CMAP4-21 (F5, F12→Y)、CMAP4-21 (F5→W, F12→Y)、CMAP4-21 (F5→Y, F12→W)、CMAP7-21 (F12→W)、CMAP7-21 (F12→Y)、CMAP10-21 (F12→W)およびCMAP10-21 (F12

→Y)である。

【0016】

「D-アミノ酸CMAP27-誘導体」または「D-アミノ酸CATH2-誘導体」は、本明細書で定義されるCMAP-27/CATH2誘導体（上記に定義されたC末端およびN末端が切断されたCMAP27誘導体を含む）D-立体配置のアミノ酸を含む。これらのD-アミノ酸CMAP27/CATH2誘導体の特別なカテゴリーは、Dアミノ酸のみからなる（すなわち、Lアミノ酸は存在しない）ペプチドである。この特別なカテゴリーは、本明細書において、D-only CMAP27-誘導体として定義される。また、CMAP27/CATH2自体は、1つ以上の、または全部でDアミノ酸を含むが、この定義内に含まれる。

【0017】

好ましいD-アミノ酸CMAP27-誘導体は、以下の全D-アミノ酸CATH2-誘導体（全てのアミノ酸がD-型である）である：

D-C(1-26) (DCATH2) *RFGRFLRKIRRRFRPKVTITIQGSARF-NH<sub>2</sub>*  
 D-C(1-21) *RFGRFLRKIRRRFRPKVTITIQ-NH<sub>2</sub>*  
 D-C(4-21) *RFLRKIRRRFRPKVTITIQ-NH<sub>2</sub>*  
 D-C(7-21) *RKIRRRFRPKVTITIQ-NH<sub>2</sub>*  
 D-C(7-21)F/W *RKIRRRWRPKVTITIQ-NH<sub>2</sub>*  
 D-C(7-21)F/Y *RKIRRRYRPKVTITIQ-NH<sub>2</sub>*  
 D-C(10-21)F/W *RRWRPKVTITIQ-NH<sub>2</sub>*  
 D-C(1-15) *RFGRFLRKIRRRFRPK-OH*

【0018】

「環状CMAP27-誘導体」または「環状CAH2-誘導体」は、非隣接アミノ酸の少なくとも2つが結合して環構造を形成するCMAP27/CATH2誘導体である。原理的には、上述のCMAP27誘導体のいずれかの2つの非隣接アミノ酸をシステイン（これらのシステインがS-S結合を形成する）で置換するような任意の化学的結合構造を用いることができるが、好ましい結合方式は、Bpg（Fmoc-L-ビスモルプロパギルグリシン）とアジド樹脂によるもので、Bpgが内部のアルギニン、ロイシン、フェニルアラニンまたはトリプトファン残基に結合し、アジド樹脂がC末端のグルタミン酸残基に結合している。特に、このような環状誘導体は、：

|                                   |                                                |
|-----------------------------------|------------------------------------------------|
| cycCMAP(1-21)[Lys8]               | <i>RFGRFLR(Bpg)IRRRFRPKVTITIQ(azido-resin)</i> |
| cycCMAP(1-21)[Arg7]               | <i>RFGRFL(Bpg)KIRRRFRPKVTITIQ(azido-resin)</i> |
| cycCMAP(1-21)[Leu6]               | <i>RFGRF(Bpg)RKIRRRFRPKVTITIQ(azido-resin)</i> |
| cycCMAP(1-21)[Leu6],Phe2/Trp      | <i>RWGRF(Bpg)RKIRRRFRPKVTITIQ(azido-resin)</i> |
| cycCMAP(1-21)[Leu6],Phe2,5/Trp    | <i>RWGRW(Bpg)RKIRRRFRPKVTITIQ(azido-resin)</i> |
| cycCMAP(1-21)[Leu6],Phe2,5,12/Trp | <i>RWGRW(Bpg)RKIRRRWRPKVTITIQ(azido-resin)</i> |
| cycCMAP(1-21)[Leu6],Phe5,12/Trp   | <i>RFGRW(Bpg)RKIRRRWRPKVTITIQ(azido-resin)</i> |
| cycCMAP(1-21)[Leu6],Phe12/Trp     | <i>RFGRF(Bpg)RKIRRRWRPKVTITIQ(azido-resin)</i> |

【0019】

“インベルソ”および“レトロインベルソ”または、“I”-CMAP27および“RI”-CMAP27-誘導体（“I”-CATH2および“RI”-CATH2誘導体）は、これらのアミノ酸が逆の順序で互いに連結されているという意味で、上記CMAP27誘導体に対して逆位の配列を有するペプチドである。次いで、CMAP27/CATH2のIおよびRI等価なものはGFRASGQITITVKPRFRRIRKRLFRGFRとなり、このようなIまたはRI-CMAP27-誘導体の他の好ましい例は、：

10

20

30

40

|                |                       |
|----------------|-----------------------|
| RI-C(1-21)     | QITITVKPRFRRIKRLFRGFR |
| RI-C(4-21)     | QITITVKPRFRRIKRLFR    |
| RI-C(7-21)     | QITITVKPRFRRIKR       |
| RI-C(7-21)F/W  | QITITVKPRWRRRIKR      |
| RI-C(7-21)F/Y  | QITITVKPRYRRRIKR      |
| RI-C(10-21)F/W | QITITVKPRWRR          |

## 【0020】

もちろん、IおよびRI-CMAP27誘導体は、N末端がアセチル化されていてもよく、および／またはC末端がアミド化されていてもよい。逆位CMAP27誘導体が1つ以上のDアミノ酸を含む場合、それらは「レトロインベルソ(Retroinverso)」または「RI」と呼称する。逆位誘導体がL-アミノ酸のみを含む場合、これは「インベルソ(Inverso)」または「I」と呼称する。

10

## 【0021】

本発明のペプチドは、合成的に、または適用可能であれば、従来の方法によって組換え製造することができる。CMAP27由来抗生物質ペプチドの特定の実施形態は、以下の実験部分に詳細に開示されている。好ましくは、本発明のペプチドまたはペプチド誘導体は、例えばMerrifield (J. Am. Chem. Soc. (1963) 85:2149-2154) によって開示されているような、公知の化学合成技術によって慣用的に調製される。これらは、逆相HPLCのようなクロマトグラフィー法によって反応混合物から単離することができる。

20

## 【0022】

あるいは、本発明のペプチドは、宿主微生物または細胞内で、上記のペプチドの1つをコードする核酸配列を有するDNA断片をクローニングおよび発現させることにより、組換えDNA技術によって作製することができる。核酸コード配列は、合成的に調製することができ、または部位特異的突然変異誘発によって既存の核酸配列（例えば、野生型CATH2をコードする配列）から誘導することができる。次いで、これらの核酸配列を適当な発現ベクターにクローニングし、大腸菌、バチルス、乳酸菌、ストレプトマイセス、哺乳動物細胞（例えばCHO、HEKまたはCOS-1細胞）、酵母（例えば、サッカロマイセス (Saccharomyces)、シゾフィラム (Schizopyllum)）、昆虫細胞、またはウイルス発現系、例えばバキュロウイルス系、または植物細胞などの適切な宿主細胞に形質転換またはトランスフェクトしてもよい。当業者は、核酸配列を構築し、その発現を可能にする手段を提供する技術を知っているであろう。

30

## 【0023】

このような場合のペプチドはヒトまたは動物に直接的に、すなわちそれ以上精製することなく経口投与することができるので、植物細胞を本発明のペプチドの発現に有利に用いることができる。続いて、宿主細胞の培養物からペプチドを単離することができる。これは、当技術分野で利用可能な一般的なタンパク質精製および単離技術によって達成することができる。このような技術は、例えば、免疫吸着またはクロマトグラフィーを含む。迅速な結合および精製を可能にする合成中にタグ（例えばヒスチジンタグなど）をペプチドに提供することも可能であり、その後タグを酵素的に除去して活性ペプチドを得る。

40

## 【0024】

あるいは、ペプチドは、Invitrogen社のExpressway<sup>TM</sup> cell-free systemのような無細胞系で産生させることができる。

## 【0025】

ペプチドの調製に適用できる方法のいくつかのより包括的な要約は、W. F. Anderson, Nature 392 Supp., 30 April 1998, p. 25-30; Pharmaceutical Biotechnology, Ed. D. J. A. Crommelin and R. D. Sindelar, Harwood Academic Publishers, 1997, p. 53-70, 167-180, 123-152, 8-20; Protein Synthesis: Methods and Protocols, Ed. R. Martin, Humana Press, 1998, p. 1-442; Solid-Phase Peptide Synthesis, Ed. G. B. Fields, Academic Press, 1997, p. 1-780; Amino Acid and Peptide Synthesis, Oxford Unive

50

rsity Press, 1997, p. 1-89. に記載される。

#### 【0026】

本明細書において開示される新規ペプチドは、当業者によって容易に作製され得る。

#### 【0027】

本発明のCMAP27-またはCATH2-誘導体は、単独で、または多量体の形態で組み合わせて使用することができる。本発明のペプチドの適切な組み合わせは、スパーサーを介して、たとえばペプチド二量体、ペプチド三量体などの形で互いに連続的に結合された本発明のペプチドの連結体を含み、個々のペプチドは続いて整列される。単一ペプチドまたはペプチド模倣鎖は、ヒト血清アルブミン、ヒト化抗体、リポソーム、ミセル、合成ポリマー、ナノ粒子、およびファージなどの生体適合性タンパク質に結合され得る。あるいは、本発明の個別に組み合わせられたペプチドの多量体は、3つ以上のペプチドが1つの共通の中心に連結されているデンドリマーまたはクラスターの形態で調製することができる。

10

#### 【0028】

さらに、本発明のペプチドが表面に露出したビーズによって、多量体の形態の他の組み合わせを形成することができる。ビーズは、ペプチドのための担体として機能し、同様に検出可能な標識として機能し得る。多量体は、例えば、ペプチド鎖のN末端をビオチン化し、続いてストレプトアビジンと複合体化することによって調製することができる。ストレプトアビジンは高親和性で4つのビオチン分子または複合物に結合することができるので、非常に安定な四量体ペプチド複合体をこの方法によって形成することができる。多量体は、本発明による同一または異なるペプチドまたはペプチド模倣物から構成され得る。しかしながら、好ましくは、本発明の多量体は、2種以上のペプチドまたはペプチド模倣物から構成され、各成分は全殺生物活性（標的指向化、抗菌活性、不要物の除去）の一つの利点を構成する。

20

#### 【0029】

本発明の医薬組成物は、治療上有効な量の本発明の1種以上のCMAP27誘導体を含む。処方されると、本発明の医薬組成物は、治療を必要とする対象に本発明の組成物の治療有効量を投与することを含む、細菌感染を治療する方法において対象に直接投与することができる。また、本発明の医薬組成物は、免疫系を調節する方法において使用することができる。

#### 【0030】

組成物の直接送達は、経口的、非経口的、皮下的、舌下、病巣内、腹腔内、静脈内または筋肉内、肺内、または組織の間質腔に送達される局所適用または他の形態の投与によって一般的に達成される。

30

#### 【0031】

特に想定される1つの投与方法は、CMAP-27誘導体を卵内に提供することである。「卵内投与」とは、鳥類、好ましくは孵卵の第4四半期の卵の卵への投与を意味する。すなわち、ニワトリの卵については、投与は、好ましくはインキュベーションの約15から19日目、より好ましくはインキュベーションの約18日目に行われる。七面鳥の卵については、投与は、好ましくはインキュベーションの約21から26日目、より好ましくはインキュベーションの約25日目に行われる。そのような投与は、1種以上のCMAP-27誘導体を殻を介して卵に導入する任意の方法によって行うことができる。好ましい投与方法は注射によるものである。注射は、約18から22ゲージの針が取り付けられた従来の皮下注射器または米国特許第4,681,063号、第4,040,388号、第4,469,047号および第4,593,646号に記載されているような高速自動化卵注入システムのような、周知の卵注入装置のいずれかを用いて行うことができる。

40

#### 【0032】

薬学的組成物はまた、適切な薬学的に許容される担体または希釈剤を含むことができ、カプセル、錠剤、ロゼンジ、糖衣錠、丸薬、液滴、座薬、粉末、スプレー、ワクチン、軟膏、ペースト、エアロゾルなどが挙げられる。薬学的に許容される担体として、特定の剤形に最も適しており、ペプチドまたはペプチド複合体と適合性である、任意の溶媒、

50

希釈剤または他の液体ビヒクル、分散または懸濁助剤、界面活性剤、等張剤、増粘剤または乳化剤、保存剤、カプセル化剤、固体結合剤または潤滑剤を使用することができる。

#### 【0033】

従って、医薬組成物は、薬学的に許容される担体を含有することができる。「薬学的に許容される担体」という用語はまた、抗体またはポリペプチド、遺伝子および他の治療剤のような治療剤の投与のための担体も含む。この用語は、組成物を受ける個体に有害な抗体の産生をそれ自体誘導せず、かつ過度の毒性を伴わずに投与することができる任意の医薬担体を指す。適切な担体は、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー、および不活性ウイルス粒子のような大きくてゆっくりと代謝される巨大分子であってもよい。そのような担体は、当業者に周知である。

10

#### 【0034】

ペプチドまたは機能的等価物の塩は、ペプチドを酸付加塩を形成するための薬学的に許容される酸と、または塩基付加塩を形成するための薬学的に許容される塩基と混合することを典型的に含む既知の方法によって調製される。酸または塩基が薬学的に許容されるか否かは、化合物の特定の意図された用途を考慮した後、当業者によって容易に決定され得る。たとえば、生体外での適用に許容可能な全ての酸および塩基を治療用組成物に使用できるわけではない。意図された使用に依存して、薬学的に許容される酸は、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、乳酸、グリコール酸、シュウ酸、ピルビン酸、コハク酸、マレイン酸、マロン酸、桂皮酸、硫酸硝酸、過塩素酸、リン酸、およびチオシアン酸からなる群から選択される少なくとも1つの化合物を含み、これらはペプチドおよび機能的等価物の遊離アミノ基とアンモニウム塩を形成する。遊離カルボキシル基のペプチドおよび機能的等価物とカルボン酸塩を形成する薬学的に許容される塩基には、エチルアミン、メチルアミン、ジメチルアミン、トリエチルアミン、イソプロピルアミン、ジイソプロピルアミンおよび他のモノ-、ジ- およびトリアルキルアミンならびにアリアルアミンが含まれる。さらに、薬学的に許容される溶媒和物も包含される。

20

#### 【0035】

薬学的に許容される塩、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの無機酸塩；および酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸の塩が挙げられる。薬学的に許容される賦形剤の徹底的な議論は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991) において利用可能である。

30

#### 【0036】

本発明の誘導体は、単独で、または薬学的に許容される担体または希釈剤と組み合わせ、先に示した経路によって投与することができ、このような投与は、単回または複数回の投与で行うことができる。より具体的には、活性化合物は、多種多様な異なる剤形で投与することができ、すなわち錠剤、カプセル剤、ロゼンジ剤、トローチ剤、ハードキャンディー剤、散剤、スプレー剤、クリーム剤の形態で、ゼリー、ゲル、ペースト、ローション、軟膏、水性懸濁液、注射用溶液、エリキシルシロップなどの形態で投与することができる。このような担体には、固体希釈剤または充填剤、滅菌水性媒体および種々の無毒性有機溶媒などが含まれる。さらに、経口医薬組成物は、適切に甘味および/または風味付けすることができる。一般に、活性化合物は、約5.0重量%から約70重量%の範囲の濃度レベルでそのような剤形で存在する。

40

#### 【0037】

経口投与の場合、微晶質セルロース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸二カルシウムおよびグリシンなどの様々な賦形剤を含有する錠剤を、ポリビニルピロリドン、スクロース、ゼラチンおよびアカシアのような造粒結合剤と一緒に含むデンプン（および好ましくはトウモロコシ、ジャガイモまたはタピオカデンプン）、アルギン酸およびある種の複合ケイ酸塩といった様々な崩壊剤と共に使用することができる。さらに、ステアリン酸マグネシウム、ラウリル硫酸ナトリウムおよびタルクのような潤滑剤は、多くの場合、打錠目的に非常に有用である。同様のタイプの固体組成物もまた、ゼラチンカプセル中の充填剤として使用することができ、これに関連して好ましい材料はまた、ラクトース

50

または乳糖ならびに高分子量ポリエチレングリコールを含む。経口投与のために水性懸濁液および/またはエリキシル剤が所望される場合、活性化合物は、様々な甘味剤または香味剤、着色剤または色素、および必要に応じて乳化剤および/または懸濁化剤と、そのような希釈剤水、エタノール、プロピレングリコール、グリセリン、およびそれらの様々な類似の組合せとして使用することができる。

#### 【0038】

非経口投与のために、ゴマ油またはピーナツ油または水性プロピレングリコール中の活性化合物の溶液を使用することができる。水溶液は、必要に応じて適切に緩衝されるべきであり（好ましくはpH8以上）、液体希釈剤は最初に等張にされるべきである。これらの水溶液は、静脈注射目的に適している。油性溶液は、関節内、筋肉内および皮下注射目的に適している。滅菌条件下でのこれら全ての溶液の調製は、当業者に公知の標準的な製薬技術によって容易に達成される。

10

#### 【0039】

さらに、本発明の活性化合物を局所的に投与することも可能であり、これは、標準的な薬務に従って、クリーム、ゼリー、ゲル、ペースト、パッチ、軟膏などによって行うことができる。

#### 【0040】

ヒト以外の動物、例えばウシまたは家畜に投与する場合、活性化合物は動物の飼料中に、または水薬組成物として経口的に投与することができる。

#### 【0041】

活性化合物はまた、小さな単層ベシクル、大きな単層ベシクルおよび多層ベシクルなどのリポソーム送達系の形態で投与することもできる。リポソームは、コレステロール、ステアリアルアミンまたはホスファチジルコリンなどの様々な（リン酸）脂質から形成することができる。

20

#### 【0042】

活性化合物はまた、標的化可能な薬物担体として可溶性ポリマーと結合されてもよい。そのようなポリマーは、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミドフェニル、ポリヒドロキシエチルアスパルアミド - フェノール、またはパルミトイル残基で置換されたポリフェニレンオキシド - ポリリジンを含むことができる。さらに、活性化合物は、薬物、たとえば、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリ乳酸とポリグリコール酸とのコポリマー、ポリエプシロンカプロラクトン、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリアセタールなどの制御された放出を達成するのに有用なクラスの生分解性ポリマー、ポリシアノアクリレートおよびヒドロゲルのクロスリンクまたは両親媒性ブロックコポリマーが挙げられる。治療的処置のために、ペプチドまたはペプチドコンジュゲートは、上記のように産生され、それを必要とする被験体に適用され得る。ペプチドまたはペプチドコンジュゲートは、任意の適切な経路、好ましくはそのような経路に適合した医薬組成物の形態および意図される治療に有効な用量で対象に投与することができる。

30

#### 【0043】

本発明の薬学的組成物は、従来の抗生物質（例えば、バンコマイシン、ストレプトマイシン、テトラサイクリン、ペニシリンなど）または他の抗菌性化合物などの他の活性剤、たとえば、イトラコナゾールまたはミコナゾールなどの抗真菌剤を含有してもよい。また、発熱（例えば、サリチル酸）または皮膚発疹などの他の感染症候を緩和する化合物を添加することもできる。

40

#### 【0044】

ヒトまたは動物被験体の身体における細菌感染を処置するために必要とされるペプチドまたはペプチドコンジュゲートの治療的に有効な投与量は、例えば動物モデルを使用することによって、当業者によって容易に決定され得る。

#### 【0045】

本明細書で使用される用語「治療有効量」は、治療剤の量、細菌の増殖および定着を減

50

少または防止するため、または検出可能な治療的もしくは予防的効果を発揮するために、本発明のペプチドまたはペプチド複合体を使用することができる。その効果は、例えば、生検を培養し、細菌活性をアッセイすることによって、または細菌感染の進行または重症度を評価する他の任意の適切な方法によって検出することができる。被験体の正確な有効量は、被験体のサイズおよび健康状態、状態の性質および程度、ならびに投与のために選択される治療薬または治療薬の組み合わせに依存する。したがって、正確な有効量を予め指定することは有用ではない。しかしながら、所与の状況の有効量は、日常的な実験によって決定することができ、臨床医または実験者の判断の範囲内である。具体的には、本発明の組成物は、細菌感染および/または付随する生物学的もしくは物理的症状（例えば、発熱の低下）を低減または防止するために使用することができる。臨床医が最初の投薬量を確立することを可能にする方法は、当技術分野で公知である。投与することが決定された投薬量は、安全かつ有効でなければならない。

10

#### 【0046】

本発明の目的において、有効用量は、投与される個体あたり約0.01  $\mu\text{g/kg}$ から50mg/kg、好ましくは0.5  $\mu\text{g/kg}$ から約10mg/kgのペプチドまたはペプチド複合体となるであろう。本明細書に記載の医薬組成物の治療効果を達成するための用量は、当業者によって容易に決定され得る。卵内適用の場合、同じ用量を使用することができるが、胚の重量に関して再計算する。

#### 【0047】

さらに別の代替実施形態では、本発明のペプチドまたはペプチド複合体または組成物は、被験体の体内に挿入された制御放出マトリクスまたは持続放出マトリクスから投与され得る。

20

#### 【0048】

また、本発明の化合物を経粘膜剤形で投与することが有利であり得る。この投与経路は非侵襲的であり、したがって、治療される被験体および治療を提供する被験体にとっては煩わしいものではない。同時に、化合物が経口投与と比較して、特に化合物が消化器系の液体中で安定でない場合、または腸から吸収するには大きすぎる場合に、化合物の生物学的利用能が改善される。経粘膜投与は、例えば、鼻、頬、舌下、歯肉または膺の剤形を介して可能である。これらの剤形は、公知の技術によって調製することができる。それらは、点鼻薬またはスプレー、インサート、フィルム、パッチ、ゲル、軟膏、または錠剤を表すように処方することができる。好ましくは、経粘膜剤形に使用される賦形剤は、粘膜接着を提供する1つ以上の物質を含み、それゆえに剤形と吸収部位との接触時間が長くなり、吸収の程度が潜在的に増大する。

30

#### 【0049】

さらなる実施形態では、化合物は、定量吸入器、噴霧器、エアロゾルスプレー、または乾燥粉末吸入器を使用して、肺経路を介して投与される。適切な製剤は、公知の方法および技術によって調製することができる。経皮、直腸または眼への投与が可能である場合もある。

#### 【0050】

本発明の化合物をより効果的に送達するために、先進の薬物送達または標的化方法を使用することが有利であり得る。例えば、非経口投与経路が選択される場合、適切な投与形態は、化合物の利用可能性を高める任意の物質または物質の混合物であり得る生物学的利用率向上剤を含み得る。これは、例えば、酵素阻害剤または抗酸化剤などによる分解からの化合物の保護によって達成され得る。より好ましくは、増強剤は、典型的には粘膜である吸収障壁の透過性を増加させることによって、化合物の生物学的利用率を増加させる。透過促進剤は、様々な機構を介して作用することができる。いくつかのものは粘膜の流動性を増加させるが、他のものは粘膜細胞間のギャップジャンクションを開くかまたは広げる。さらに粘膜細胞層を覆う粘液の粘性を低下させるものもある。好ましい生物学的利用率のエンハンサーは、コール酸誘導体、リン脂質、コレステロールおよびその誘導体、エタノール、脂肪酸、オレイン酸、脂肪酸誘導体、EDTA、カルボマー、ポリカルボフィルお

40

50

よびキトサンなどの両親媒性物質である。

#### 【0051】

本発明のCMAP27誘導体を使用することができる適応症は、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の両方による細菌感染であり、例えば、大腸菌(*E. coli*)、アグロバクテリウム・ツメファシエンシス(*Agrobacterium tumefaciens*)、サルモネラ・ティフィムリウム(*Salmonella typhimurum*)、エルウィニア・カロトヴォーラ(*Erwinia carotovora*)、エルウィニア・ハービコラ(*E. herbicola*)、エルウィニア・クリサンセミ(*E. chrysanthemi*)、クレブシエラ・ニューモニエ(*Klebsiella pneumoniae*)、インフルエンザ菌(*Haemophilus influenzae*)、フランチェッセン・テラレンシス(*Francisella tularensis*)、アルカノバクテリウム・ピオゲネス(*Archanobacterium pyogenes*)、アビバクテリウム・パラガリナラム(*Avibacterium paragallinarum*)、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)、バチルス・メガテリウム(*Bacillus megaterium*)、炭疽菌(*Bacillus anthracis*)、ボルデテラ属(*Bordetella* spp.)、ブラキスピラ属(*Brachyspira* spp.)、ブルセラ種(*Brucella* spp.)、カンピロバクター種(*Campylobacter* spp.)、ボツリヌス菌(*Clostridium botulinum*)、クロストリジウム・パーフリンジェンシス(*Clostridium perfringens*)、クロストリジウム・セプチカム(*Clostridium septicum*)、コリネバクテリウム・ピオゲネス(*Corynebacterium pyogenes*)、コクシエラ・バーネッティイ(*Coxiella burnetii*)、エンテロコッカス属(*Enterococcus* spp.)、ヘモフィルス・ソムヌス(*Haemophilus somnus*)、エルシニア・ペスティス(*Yersinia pestis*)、リステリアモノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)、マンヘイミア・ヘモリチカ(*Mannheimia haemolytica*)、マイコバクテリウム・ツベルクローシス(*Mycobacterium tuberculosis*)、マイコバクテリウム・アビウム(*Mycobacterium avium*)、マイコプラズマ・ガリセプティクム(*Mycoplasma gallisepticum*)、マイコプラズマ・シノビエ(*Mycoplasma synoviae*)、オルニソバクテリウム・ライノトラケアレ(*Ornithobacterium rhinotracheale*)、パスツレラ・アエルギノサ(*Pasteurella aeruginosa*)、パスツレラ・ムルトシダ(*Pasteurella multocida*)、肺炎球菌種(*Pneumococcus* spp.)、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、リエレラ・アナティペスティファー(*Riemerella anatipestifer*)、サルモネラ種(*Salmonella* spp.)、ストレプトコッカス・ウベリス(*Streptococcus uberis*)、ストレプトコッカス種(*Streptococcus* spp.)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、スタフィロコッカス・パイロゲネス(*Staphylococcus pyrogenes*)、トルペレラ・ピオゲネス(*Truperella pygoenes*)、コレラ菌(*Vibria cholerae*)、ミクロコッカス・ルテウス(*Micrococcus luteus*)、モラクセラ(*Moraxella*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoea*)、エンテロバクター属(*Aerobacter*)、ボレリア(*Borellia*)がある。細菌感染とは別に、ウイルス、真菌、酵母および寄生虫による感染のような他の感染も、本発明のペプチドで治療することができる。

#### 【0052】

本発明の化合物の有効性は、その抗生物質効果だけでなく、その免疫調節効果によっても提供される。さらに、新たに発見された免疫活性化効果(下記参照)は、本発明の化合物のさらなる利点を提供する。

#### 【0053】

感染症の治療のための治療的使用に次いで、本発明の抗生物質ペプチドを、表面および/または装置の洗浄に使用することができる殺菌組成物に使用することも可能である。もう1つの適用分野は包装であり、微生物によって容易に分解可能な食品または他の材料の包装のためにペプチドを包装材料に結合または包埋することができる。本発明のCMAP27誘導体は、接触または摂取の際に毒性がないので、包装に特に有用である。

#### 【0054】

獣医学的用途、特に家禽類におけるCMAP27誘導体の適用が、特に有用である。サルモネラ・エンテリティディス(*Salmonella enteritidis*)の感染は、若いニワトリの死亡率および罹患率を著しく低下させる可能性がある。特に、孵化後の最初の2週間で、後天性免疫系がまだ十分に発達していない場合、ブロイラーニワトリの雛は非常に感受性が高い。ブロイラーニワトリの健康状態を改善する可能性のある戦略は、徐々に失われていく母鶏

由来の保護と適応免疫の成熟との間のギャップを埋めるために、自然免疫系を高めることである。インビトロにおけるニワトリ カテリシジン-2 (CATH2またはCMAP27) 誘導体の免疫調節特性は、本発明の化合物が若鶏のブロイラーの自然免疫応答を高めるために使用できることを示している。これは、ニワトリ胚の卵内予防接種または若いニワトリへのワクチン接種によって達成され得る。驚くべきことに、そのような卵内ワクチン接種はまた、家禽、好ましくは(ブロイラー) チキンの成長および発生中の抗生物質治療から知られている効果、すなわち非処置動物と比較して体重の増加をもたらすという効果を有する。したがって、この一回卵内ワクチン接種は、動物の成長中に抗生物質の使用を置き換えることができます。

#### 【0055】

これらおよび他の獣医学的用途において、CATH2またはCMAP27誘導体を含む組成物は、獣医学的に許容される担体をさらに含む。そのような獣医学的に許容される担体は、溶媒、分散媒、コーティング、アジュバント、安定化剤、希釈剤、防腐剤、抗真菌剤、等張剤、吸着遅延剤などを含み得る。希釈剤は、水、生理食塩水、デキストロース、エタノール、グリセロールなどを含むことができる。等張剤は、特に塩化ナトリウム、デキストロース、マンニトール、ソルビトールおよびラクトースを含むことができる。安定剤としては、特にアルブミンが挙げられる。

#### 【0056】

本発明の方法における使用に適したアジュバントには、以下が含まれるが、これらに限定されない：ミネラルゲル、例えば、水酸化アルミニウム；リゾレシチンのような表面活性物質；グリコシド、例えばQuil AまたはGPI-0100（米国特許第5,977,081号）などのサポニン誘導体；カチオン性界面活性剤、例えばDDA、プルロニックポリオール；ポリアニオン；非イオン性ブロックポリマー、例えばプルロニックF-127（B.A.S.F.、米国）；ペプチド；鉱物油、例えば、例えば、モンタニドISA-50（セピック社、パリ、フランス）、カルボポール、Amphigen（ハイドロニクス、オマハ、ネブラスカ州、米国）、アルハイドロゲル（Superfos Biosector、フリズリクソン、デンマーク） BayolF / Arlacel Aのような鉱油と水のエマルジョン、または植物油、水およびレシチンのような乳化剤のエマルジョン；ミョウバン、コレステロール、rmLT、サイトカインおよびそれらの組み合わせが挙げられる。免疫原性成分はまた、リポソームに組み込まれ得るか、またはワクチン製剤に使用するために多糖類および/または他のポリマーにコンジュゲートされ得る。本方法における使用のために製品に含まれ得る追加の物質には、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、メルチオレートなどの二ナトリウム塩または四ナトリウム塩などの一種以上の防腐剤が含まれるが、これらに限定されない。抗原に対する免疫系の応答を増強する免疫刺激剤もまた、製品に含まれ得る。適切な免疫刺激剤の例には、IL-12またはIL-2などのサイトカイン、またはムラミルジペプチド、アミノキノロン、リポ多糖などの刺激分子が含まれる。

#### 【0057】

上記で定義したN末端切断型CMAP-27誘導体は、依然として抗菌効果を維持するが、それらはまた、それらの免疫調節効果を維持することが見出されている。この免疫調節効果は、N末端が切断されたCMAP-27誘導体がLPS誘発炎症誘発性サイトカイン（IL-1 $\beta$ ）転写を中和する能力によって示される。しかしながら、上記のようなN末端切断型誘導体を含むCMAP-27誘導体の全てが、既に知られている（N末端が切断された）CMAP27誘導体とは区別される免疫活性化活性を示すことがさらに見出されている。これらの免疫活性化効果は、DNA取り込みの増加による増強されたToll様受容体活性化、免疫細胞によるサイトカイン/ケモカイン産生の刺激、直接走化性、増強された食作用および免疫細胞の増殖および分化の刺激を含む多くのメカニズムを含み得、ペプチド誘導体の免疫調節効果および抗生物質効果を開示している。

#### 【0058】

これらの免疫活性化効果、特に免疫細胞の増殖および分化に対する効果が、ワクチン接種、特に卵内ワクチン接種に使用される場合の化合物の強い利点であることは、本発明の一部である。

10

20

30

40

50

【0059】

【実施例】

【0060】

実施例1 - CMAP-27誘導体ペプチドの卵内における有効性。

【0061】

DCATH2ペプチド (CMAP1-26の完全D-アミノ酸類似体) をコレステロール/PBS製剤に懸濁させた。Ross308卵を、胚期の18日目に羊膜液に100  $\mu$  lのDCATH2含有懸濁液を注入し、孵卵するために孵卵器に戻した (～21日目の胚齢)。両方の対照群に羊膜液にコレステロール/PBS製剤を注射した。1mg/kg体重の用量のペプチドを、22gの胚体重に基づいて計算した。孵化後、鳥を処置 (n=40/群) 毎に4つの囲いに移した。孵化の3日後、ネガティブコントロールを除くすべての鳥類に、トリ病原性サルモネラ・エンテリティディス (*Salmonella enteritidis*) pt13a株を、1羽当たり  $5 \times 10^6$  CFUの用量で皮下接種した。曝露後2日目に、1群あたり12匹の鳥を屠殺し、血液および臓器分析のためのサンプルを採取するために使用した。血液試料を採取して総白血球数および白血球分化を決定した。7日の曝露の間、死亡率は日々登録された。7日間の曝露の後、残りの全ての鳥を屠殺し、左右の胸部気嚢、肝臓及び心臓を病変スコアについて検査した。

10

【0062】

注射2日後に得られた血液塗抹標本の分析により、本発明の化合物で処理されたブロイラーは、非感染鳥と比較して末梢血白血球の総数が有意に上昇したことが明らかになった (図1A)。この増加は未処理の感染した鳥類には存在しなかった。ギムザ染色された血液塗抹標本における白血球の手動計数は、非感染鳥と比較して、DCATH2処置鳥において末梢血ヘテロフィルの絶対数が有意に高いことを明らかにした (図1B)。ヘテロフィルの数は、感染状態の影響を受けなかった。ヘテロフィルは哺乳動物の好中球の鳥類の対応物であり、鳥類ではヘテロフィルが細菌感染に対する保護の中心的な役割を果たすことが示されている。

20

【0063】

サルモネラ症の発症およびサルモネラ関連病変の重篤度を7日間測定した。サルモネラ・エンテリティディス (*Salmonella enteritidis*) の接種では、死亡率は未処理の感染鳥では35%まで徐々に増加した。DCATH2処理鳥では、感染後3日までの遅延が観察された (図2A)。感染後7日目に、DCATH2処理鳥で死亡率は50%減少した (図2B)。

30

【0064】

未処理の感染群におけるサルモネラ症陽性鳥類、すなわち平均病変スコア>1を有する割合は、約85%であった；この値が、DCATH2処置群aにおいては53%減少した (図3A)。さらに、サルモネラ症陽性鳥における病変の重篤度は、DCATH2処理鳥において69%減少した (図3B)。

【0065】

結論として、1mg/kgのDCATH2ペプチドを用いた卵巣処置では、感染後7日で50%のサルモネラ誘発死亡率を減少させ、生存している鳥類ではサルモネラ症陽性鳥類の数が53%減少し、病変の重症度を69%低下させた。DCATH2処理鳥類におけるサルモネラ感染の感受性の低下は、部分的には、異種募集および造血の増加によって説明される可能性がある。

40

【0066】

実施例2 - ペプチドの卵内投与後の大腸菌感染に対する防御。

【0067】

DCATH2ペプチドをコレステロール/PBS製剤に懸濁した。Ross308卵を、胚期の18日目に羊水に100  $\mu$  lのDCATH2含有懸濁液を注入し、孵卵するために孵卵器に戻した (～21日目の胚齢)。両方の対照群に羊膜液にコレステロール/PBS製剤を注射した。DCATH2ペプチドの1mg/kg体重用量を、22gの胚体重に基づいて計算した。孵化後、処置毎に鳥を分離単位に移した (n=54/群)。孵化の3日後、ネガティブコントロールを除く全ての鳥類にトリ病原性大腸菌506株 (UU株) を  $1 \times 10^6$  CFU/羽で気管内接種した。チャレンジの2日後、1群あたり13匹の鳥を屠殺し、血液および臓器分析のためのサンプルを採取するために使用した。

50

血液試料を採取して総白血球数および白血球分化を決定した。曝露した7日の間、死亡率は日々登録された。7日間の曝露の後、残りの全ての鳥を屠殺し、左右の胸部気囊、肝臓及び心臓を病変スコアについて検査した。

#### 【0068】

大腸菌症の発症は7日間にわたって測定された。感染後2日目に、卵内処理された鳥のDCATH2は、未処理の非感染鳥と比較して、末梢血白血球および異種細胞の絶対数が有意に高かった（図4）。無処置動物、非感染動物と比較した場合、DCATH2処理鳥における単球およびリンパ球数の絶対数に差は見られなかった。

#### 【0069】

大腸菌曝露は、未処理の感染した鳥類では27%まで段階的に増加する死亡率をもたらした（図5A）。感染後7日目に、鳥類処置鳥類におけるDCATH2の死亡率は30%低下した（図5B）。

10

#### 【0070】

大腸菌症陽性鳥の割合は、未治療の感染群では65%であった。これは、DCATH2処理鳥において52%減少した（図6A）。大腸菌症関連病変の重篤度は、CATH2処置鳥では64%減少した（図6B）。さらに、大腸菌による気囊のコロニー形成も、卵内処理で93%、DCATH2で減少した（図7）。

#### 【0071】

結論として、1mg/kgのDCATH2ペプチドを用いた卵巣処置では、感染後7日目に（気道）大腸菌誘導性死亡率が30%減少し、生き残った鳥のうち、大腸菌陽性鳥の数は52%減少し、病変の重症度を64%低下させ、大腸菌による空気囊のコロニー形成を93%減少させた。DCATH2処理鳥類における大腸菌曝露に対する感受性の低下は、部分的には、ヘテロフィル動員および造血の増加によって説明され得る。

20

#### 【0072】

実施例3 - ニワトリの卵内処理による体重増加。

#### 【0073】

DCATH2ペプチドおよび切断された類似体D-CMAP（1-21）およびD-CMAP（4-21）をコレステロール/PBS製剤に懸濁した。Ross308卵は、胎生期の18日目に羊膜液に懸濁液100μlを注入し、孵卵するために孵卵器に戻した（胚齢21日目）。両方の対照群に羊膜液にコレステロール/PBS製剤を注射した。1mg/kg体重の用量のペプチドを、22gの胚体重に基づいて計算した。孵化後、すべての鳥の体重を個別に測定し（D0）、治療毎に隔離飼育器に移した（n=120/群）。鳥類を自由に摂食させ、孵化後7日目に（D7）個々の鳥の体重を評価した。

30

#### 【0074】

胚齢18日目のペプチド処理は孵化率に影響を与えなかった（表1）。

#### 【0075】

胚発生の18日目における卵巣ペプチド処置では、孵化時のブロイラー雛の体重に有意な影響はなかった（D0、図8A）。しかし、孵化後7日目に、1mg/kgのペプチドDCATH2、D-CMAP（1-21）またはD-CMAP（4-21）で卵内処理した鳥は、溶媒処理鳥と比較して有意に高い体重を示した（図8B）。

40

#### 【0076】

表1 有効性実験III。胚発生の18日目に1mg / kgのペプチドまたは溶媒を注射したRoss308卵の孵化可能性。

【表 1】

| 卵内処理              | 孵化可能性 |
|-------------------|-------|
| 溶媒                | 98%   |
| 1 mg/kg DCATH2    | 97%   |
| 1 mg/kg D-C(1-21) | 95%   |
| 1 mg/kg D-C(4-21) | 94%   |

10

## 【0077】

実施例 4 - インビトロでのCMAP27由来ペプチドの抗菌活性。

## 【0078】

DCATH2ペプチドの卵効果を実証するために使用されるトリ病原性大腸菌078 (APEC 078) フィールド単離株を使用して、*in vitro*でのCMAP27由来ペプチドの抗菌活性を調べた。ミューラー・ヒントンブロス (MHB) 中、37℃で一晩培養した培養液を、50%ミューラー・ヒントンブロス中で $2 \times 10^6$  CFU/mlの濃度に希釈し、ペプチド (1.25から40  $\mu$ Mの最終濃度) と1:1の比で96ウェルポリプロピレンマイクロウェルプレート中で混合した。3時間のインキュベーションの後、サンプルを培地で連続希釈し、トリプトン大豆寒天培地に広げ、24時間のインキュベーション後に計数した。試験したすべてのペプチドは、5から14  $\mu$ Mの範囲の最小阻害濃度でAPEC 078野外分離株に対して抗菌活性を示した (図9 A)。

20

## 【0079】

ペプチドがより困難な条件下で細菌を阻害することができるかどうかを試験するために、例えば、塩および血清タンパク質の存在下で、APEC 078を、10%ウシ胎仔血清を含むDMEM培地中でペプチドとインキュベートした。簡単に説明すると、5  $\mu$ Mのペプチドの存在下または非存在下、DMEM/10%FCS中、 $3 \times 10^5$  CFU/mlのAPEC 078を37℃で2時間インキュベートすることによって細菌の生存を推定し、その後逐次希釈を行い、培地およびコロニーを、37℃で24時間のインキュベーション後に計数した。MHB培地での試験とは対照的に、10%ウシ胎児血清のみを含むDMEM中で試験したペプチドのうち、CMAP1-26-NH<sub>2</sub>、CMAP1-21-NH<sub>2</sub>およびCMAP4-21-NH<sub>2</sub>は、実質的に細菌増殖を阻害し (図9 B)、CMAP1-26-NH<sub>2</sub>の場合には100細胞/mlの検出限界以下に低下した。

30

## 【0080】

生存または熱死滅APEC 078によって誘導されたマクロファージ活性化のペプチド媒介性阻害を、マウスマクロファージ細胞株であるJ774.A1細胞を用いて調べた。この目的のために、10%FCSを含有するDMEM中で培養したJ774.A1細胞 (150,000細胞/ウェル) を37℃で2時間、5  $\mu$ Mのペプチドを含むまたは含まない $3 \times 10^5$  CFU/mlのAPEC 078に曝露した後、上清を収集し、TNF $\alpha$ 産生 (ELISA) を決定するために使用した。これらの条件下で、生存および熱死滅 (70℃で30分間) の両方の細菌は、ペプチドの非存在下でJ774.A1細胞によるTNF $\alpha$ 産生を強く誘導した (図9 C)。ペプチドCMAP1-26-NH<sub>2</sub>およびCMAP1-21-NH<sub>2</sub>は、生存および熱死菌によって誘発されたTNF $\alpha$ 産生を実質的に阻害した。

40

## 【0081】

さらにCMAP1-21-NH<sub>2</sub>のN末端切断は、熱殺菌した細菌によって誘発されたTNF $\alpha$ 産生の阻害の漸減をもたらし、生細菌によって誘発されたTNF $\alpha$ 産生の完全な喪失をもたらした。熱死菌によって誘導されるTNF $\alpha$ 産生も、これらの条件下で抗菌活性を欠くペプチド、例えば CMAP7-21-NH<sub>2</sub>によってある程度抑制された。

## 【0082】

結論として、CMAP27誘導ペプチドは、相対的に高い塩および血清タンパク質を有する状

50

態を含めて、インビトロで抗菌活性を示す。直接的な抗菌活性は、ペプチドCMAP1-21-NH<sub>2</sub>のさらなるN末端切断によって急速に失われる。さらに、抗菌活性のこの損失は、生細菌によって産生されるTNF $\alpha$ 産生を阻害するペプチドの能力と相関する。

#### 【0083】

実施例5 - HD11細胞におけるケモカイン誘導。

#### 【0084】

ニワトリマクロファージ細胞株であるHD11細胞を、RPMI-1640/10%FCS中の96ウェル組織培養処理プレート（ $2 \times 10^5$ 細胞/mL）に播種し、37°C（5%CO<sub>2</sub>）でペプチド（20  $\mu$ M）補充培地で4時間または24時間培養した。インターロイキン-1 $\beta$ 、-8（CXCLi2）、単球走化性タンパク質-3（MCP-3）およびRANTES（CCLi4）の転写レベルを、リアルタイムPCRによ

10

#### 【0085】

CMAP1-26-NH<sub>2</sub>は、HD11細胞においてケモカインCXCLi2/IL-8、MCP-3およびCCLi4/RANTESの転写を誘導するが、炎症誘発性サイトカインIL-1 $\beta$ は誘導されなかった（図10）。切断された類似体を、HD11細胞におけるケモカイン転写を誘導する能力について調べた。15アミノ酸残基までのCMAP1-21-NH<sub>2</sub>のN末端短縮型類似体、すなわちCMAP7-21-NH<sub>2</sub>は、CXCLi2およびMCP-3転写を誘導する能力を維持した。CCLi4の発現を誘導するためには、長期間の刺激（24時間）が必要であった。

#### 【0086】

結論として、CMAP由来ペプチドによるHD11細胞におけるケモカイン発現の選択的誘導は、これらのペプチドが単球/マクロファージに対する間接的な走化性効果を有し、これらのペプチドが免疫細胞の動員および活性化においてこのような方法で関与し得ることを示唆する。

20

#### 【0087】

陽性対照LL-37として、ヒトカテリシジンペプチド（たとえば、Durr, U.H. et al., 2006, Biochim. Biophys. Acta 1758:1408-1425; Zuiderduijn, S. et al., 2006, J. Allergy Clin. Immunol. 117:1328-1335）が使用されている。

#### 【0088】

実施例6 - インビトロでのCMAP27由来ペプチドの抗炎症活性。

#### 【0089】

HD11細胞を、RPMI-1640/10%FCS中96ウェル組織培養処理プレート（ $2 \times 10^5$ 細胞/mL）に播種した。50ng/mlのサルモネラ・ミネソタLPSの最終濃度を、20  $\mu$ Mのペプチド有りまたは無しで37°C（5%CO<sub>2</sub>）で30分間プレインキュベートし、細胞に適用し、4時間および24時間インキュベートした。A）インターロイキン-1の転写レベルを、リアルタイムPCR（4時間のみ）によって決定した。B）Griessアッセイを用いて、一酸化窒素産生（24時間のインキュベーションのみ）の測定のために上清を収集した。

30

#### 【0090】

HD11細胞におけるLPS誘発性IL-1 $\beta$ 発現は、CMAP1-26-NH<sub>2</sub>ペプチド（90.8%）および短縮型類似体CMAP1-21-NH<sub>2</sub>（93.5%）およびCMAP4-21-NH<sub>2</sub>（80.5%）によってブロックされた（図11A）。ペプチドCMAP1-26-NH<sub>2</sub>およびCMAP1-21-NH<sub>2</sub>は、LPS誘発（50ng/ml）NO

40

#### 【0091】

短縮型類似体におけるトリプトファン残基によるフェニルアラニンの置換は、HD11細胞におけるLPS誘発IL-1 $\beta$ 発現をブロックする能力を有意に増強し（図12A）、ペプチドCMAP4-21-NH<sub>2</sub>媒介性阻害を80.5%から95.1%に改善した。さらに、ペプチドCMAP7-21-NH<sub>2</sub>およびCMAP10-21-NH<sub>2</sub>はLPS中和活性を欠いているが、それらのPhe/Trp置換類似体は、HD11細胞によるLPS誘発炎症性サイトカイン産生、すなわちそれぞれ86.3%および71.9%を強く阻害した。さらに、短縮CMAP27由来ペプチドにおけるトリプトファンによるフェニルアラニンの置換は、LPS誘発NO産生を阻害するC（1-21）およびC（4-21）の能力を増加させるようであった（図12B）。

50

## 【0092】

結論として、CMAP27由来ペプチドは、IL-1 $\alpha$ のような前炎症性メディエーターのリポ多糖誘導産生を中和することができ、そしてそのようにして過剰な炎症反応を抑制することができる。さらに、フェニルアラニン残基の置換を使用して、CMAP27由来ペプチドの抗炎症能を増強/導入することができる。

## 【0093】

実施例7 - CMAP27誘導ペプチドは、DNAによる免疫細胞の取り込みおよび活性化を促進する。

## 【0094】

DNAの取り込みに対するペプチドの影響を研究するために、CMAP27誘導ペプチド（5 $\mu$ M）の非存在下および存在下で2.5nMのAlexa-Fluor 488標識ODN-2006で4時間刺激した24ウェルプレートにHD11細胞を3x10<sup>5</sup>細胞を播種した）、その後、DNA取り込みをフローサイトメトリーにより分析した。HD11細胞の活性化は、同じ条件下で17時間後に上清を収集し、酸化窒素産生を測定することによって調べた。

## 【0095】

CMAP1-26-NH<sub>2</sub>、CMAP1-21-NH<sub>2</sub>、CMAP4-21-NH<sub>2</sub>、CMAP5-21-NH<sub>2</sub>、およびCMAP7-21-NH<sub>2</sub>のすべてが、HD11細胞によるODN-2006の取り込みを増強し（図13A）、DNAに誘導される一酸化窒素産生を増加させた（図13B）。増強されたDNA取り込みおよびDNA誘発活性化は相関しており、CMAP27由来ペプチドによるDNAの取り込みの増強が、DNA誘発活性化を促進する重要な段階であることを示している。

## 【0096】

結論として、CMAP27誘導ペプチドの存在下では、細菌CpG-DNAは感染時に免疫細胞によってより容易に検出され得る。

## 【図1】

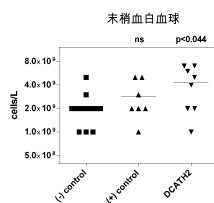


図 1A

## 【図2】

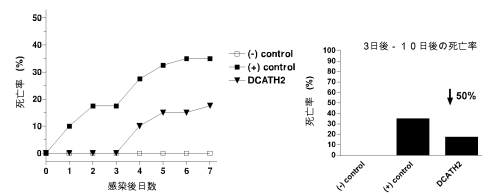


図 2A

図 2B

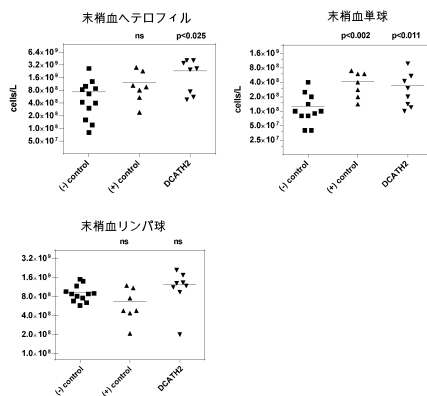


図 1B

## 【図3】

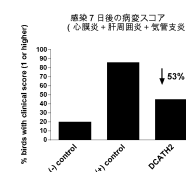


図 3A

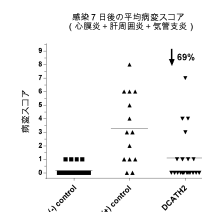


図 3B

【図 4】

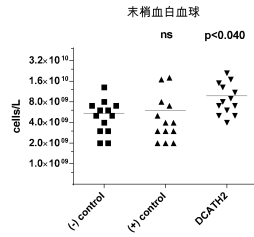


図 4 A

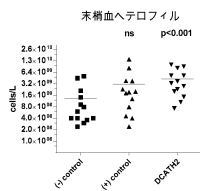
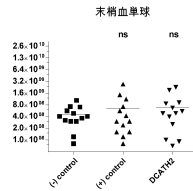
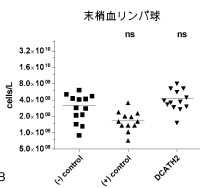


図 4 B



【図 5】

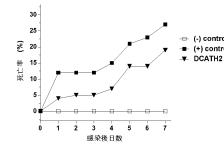


図 5 A

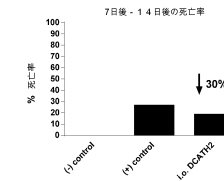


図 5 B

【図 6】

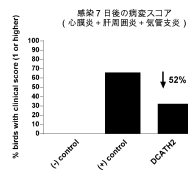


図 6 A

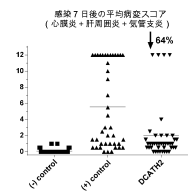


図 6 B

【図 8】

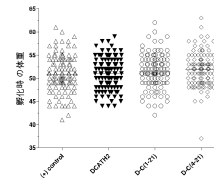


図 8 A

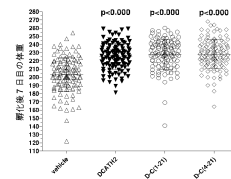


図 8 B

【図 7】

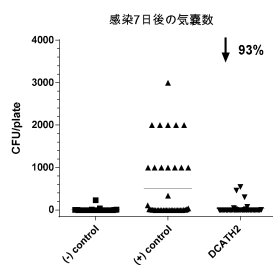


図 7

【図 9】

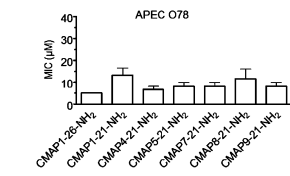


図 9 A

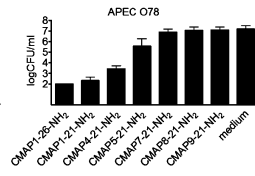


図 9 B

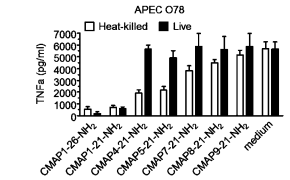


図 9 C

【図 10】

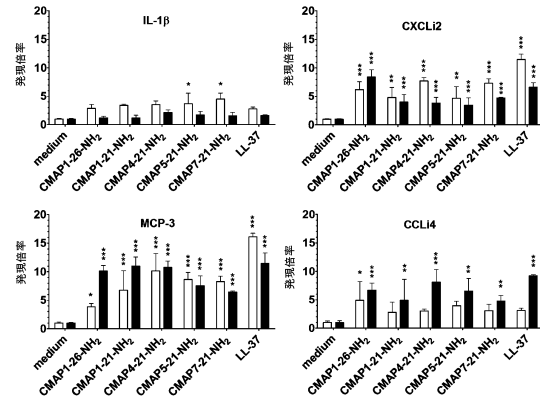


図 10

【図 11】

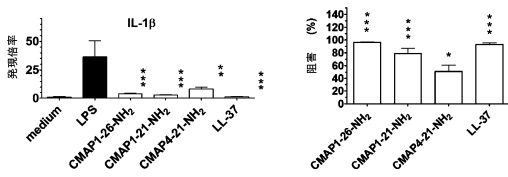


図 11 A

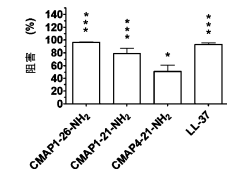


図 11 B

【図 12】

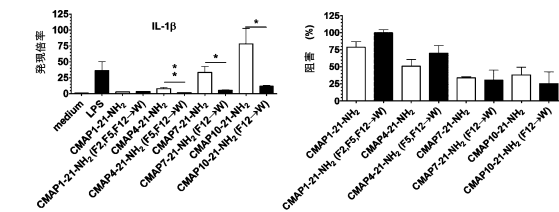


図 12 A

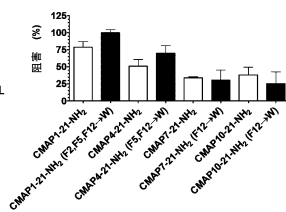


図 12 B

【図 13】

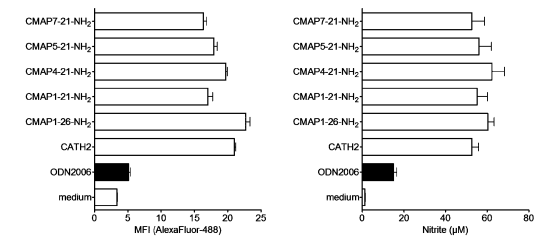


図 13 A

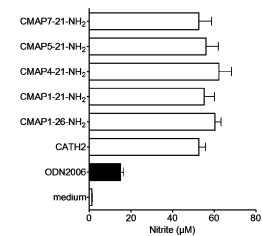


図 13 B

フロントページの続き

|             |        |           |         |        |       |
|-------------|--------|-----------|---------|--------|-------|
| (51)Int.Cl. |        |           | F I     |        |       |
| A 6 1 P     | 3/02   | (2006.01) | A 6 1 P | 3/02   |       |
| A 6 1 K     | 38/04  | (2006.01) | A 6 1 K | 38/04  |       |
| A 6 1 K     | 38/16  | (2006.01) | A 6 1 K | 38/16  |       |
| A 6 1 P     | 43/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 43/00  | 1 0 5 |
| A 6 1 K     | 39/00  | (2006.01) | A 6 1 K | 39/00  | A     |
| A 2 3 K     | 20/147 | (2016.01) | A 2 3 K | 20/147 |       |

- (72)発明者 ハークスマン, ヘンドリック ペーター  
オランダ王国 3 5 8 4 CM ユトレヒト, ヤレラーン 4 0
- (72)発明者 フォン ディック, アルベルト  
オランダ王国 3 5 8 4 CM ユトレヒト, ヤレラーン 4 0
- (72)発明者 ヴェルトヘイゼン, エドウィン ヨハネス アドリアヌス  
オランダ王国 3 5 8 4 CM ユトレヒト, ヤレラーン 4 0

審査官 澤田 浩平

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2008/0119405 (US, A1)  
特表2010-516688 (JP, A)  
特表2004-506019 (JP, A)  
特表2007-513138 (JP, A)  
XIAO, Y. et al., J Innate Immun, 2009年, Vol. 1, pp. 268-280  
DIJK A. et al., Molecular Immunology, 2009年, Vol. 46, pp. 2465-2473  
DIJK A. V. et al., Veterinary Microbiology, 2011年, Vol. 153, pp. 27-36  
MOLHOEK E. M. et al., Peptides, 2011年, Vol. 32, pp. 875-880

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C12N15, C07K, A61K38  
UniProt/GeneSeq  
MEDLINE/BIOSIS/EMBASE/CAPLUS/REGISTRY (STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)