(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2002 年9 月19 日 (19.09.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/072629 A1

(51) 国際特許分類[7]: C07K 14/47, A61K 38/17, A61P 37/04, C07K 5/08, 7/06, 7/08, A23J 3/34, A23L 1/305

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/02258

(22) 国際出願日: 2002 年3 月11 日 (11.03.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-67600 2001 年3 月9 日 (09.03.2001) JP

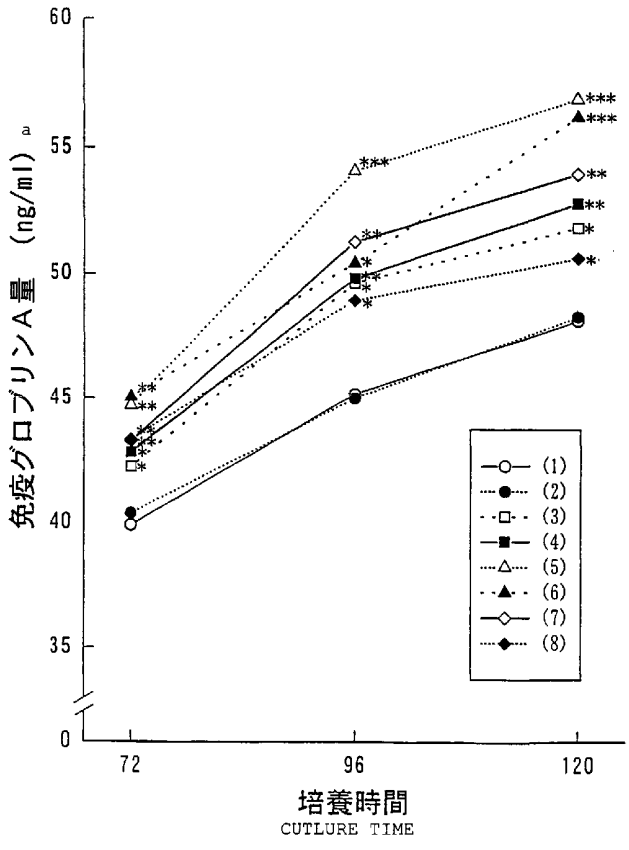
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治製菓株式会社 (MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.) [JP/JP]; 〒104-8002 東京都 中央区 京橋二丁目４番１６号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大谷 元 (OTANI,Hajime) [JP/JP]; 〒399-4598 長野県 上伊那郡 南箕輪村８３０４ 信州大学農学部内 Nagano (JP). 田代 靖人 (TASHIRO,Yasuhito) [JP/JP]; 〒212-0013 神奈川県 川崎市 幸区堀川町５８０ ソリッドスクエア西館３階 明治製菓株式会社 新素材事業部内 Kanagawa (JP). 杉原 道寿 (SUGIHARA,Michihisa) [JP/JP]; 〒212-0013 神奈川県 川崎市 幸区堀川町５８０ ソリッドスクエア西館３階 明治製菓株式会社 新素材事業部内 Kanagawa (JP).

[続葉有]

(54) Title: IMMUNOPOTENTIATORS

(54) 発明の名称: 免疫増強剤



a...IMMUNOGLOBULIN A (ng/ml)

(57) Abstract: It is intended to provide peptides having specific amino acid sequences and being excellent in immunopotentiating activity and immunopotentiators containing these peptides. Namely, immunopotentiators containing peptides having the following amino acid sequence (I): Q1-SerP-X-SerP-Q2 (I) wherein SerP represents phosphoserine; X represents 1 to 3 arbitrary amino acid residues; and either one or both of Q1 and Q2 are nil or Q1 and Q2 independently represent each one or more arbitrary amino acid residues.

[続葉有]

WO 02/072629 A1

(74) 代理人: 吉武 賢次, 外(YOSHITAKE,Kenji et al.); 〒100-0005 東京都 千代田区 丸の内三丁目２番３号 富士ビル３２３号 協和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

本発明の目的は、特定のアミノ酸配列を有する免疫増強活性にすぐれたペプチド、およびそのようなペプチドを含んでなる免疫増強剤を提供することである。本発明は、下記のアミノ酸配列（Ｉ）からなるペプチドを含んでなる免疫増強剤に関するものである。

Ｑ１－SerP－Ｘ－SerP－Ｑ２　　（Ｉ）

［式中、SerPはホスホセリン残基を表し、Ｘは１～３個の任意のアミノ酸残基を表し、かつＱ１およびＱ２は、いずれか一方もしくは両方が存在しないか、または、それぞれ独立して１個以上の任意のアミノ酸残基を表す］。

明　　細　　書

免疫増強剤

[発 明 の 背 景]

発明の分野

本発明は、特定のペプチドを含んでなる免疫増強剤に関するものである。

背景技術

牛乳はそれ自身栄養源であり、広く飲用されている。また、牛乳中に存在するタンパク質カゼインも、その消化性とそれより摂取される必須アミノ酸バランスが良好なことから、育児用調製乳や特殊調製乳のタンパク質源として古く利用されている。

カゼインは、一般的に、通常のタンパク質にはあまり存在しないリン酸基を有するホスホセリンというアミノ酸残基を含んでいる。カゼインを酵素で消化したものから、このホスホセリン残基を多く含む画分を分離・精製したものが、カゼインホスホペプチド（以下、「ＣＰＰ」と略すことがある）である。

ＣＰＰには、小腸で不溶化するカルシウムの可溶化状態を保ち、カルシウムの吸収を促進する作用があることが知られており、既に数々の食品または飼料原料として実用化されている。またＣＰＰには、培養細胞系または動物の消化管中で免疫グロブリンＡの産生を増強する作用があることも知られている（例えば、Milk Science vol.49 (2000), pp73-79、およびFood and Agricultural Immunology, 12 (2000), pp165-173）。

ＣＰＰは、カゼインを酵素で分解したものであるため、その抗原性はカゼインに比較すると低いものの、完全に消失はしてはいない。このため、牛乳カゼインに対してアレルギーのある者が、免疫増強を期待してＣＰＰを摂取すると、アレルギー反応を引き起こしてしまうことが懸念される。

またＣＰＰは、例えばＷＯ９６／２９３４０号公報に記載されている。ここでは、ＣＰＰは小腸におけるミネラル吸収を促進することが開示されているが、免疫増強活性に関しては何ら示唆されていない。

[発 明 の 概 要]

本発明者らは、今般、カゼイン由来のペプチドのうち、ホスホセリンを複数有する特定のアミノ酸配列を有するものが、優れた免疫増強作用を示すことを見出した。このようなペプチドは比較的小分子量のものであっても優れた免疫増強作用を示すものであった。本発明は、かかる知見に基づくものである。

したがって、本発明は、特定のアミノ酸配列を有し、かつ免疫増強活性にすぐれたペプチド、およびそのようなペプチドを含んでなる免疫増強剤を提供することをその目的とする。

そして、本発明による免疫増強剤は、下記のアミノ酸配列（Ｉ）からなるペプチドを含んでなる。

Ｑ１－SerP－Ｘ－SerP－Ｑ２　　（Ｉ）

[式中、

SerPはホスホセリン残基を表し、

Ｘは１～３個の任意のアミノ酸残基を表し、かつ

Ｑ１およびＱ２は、いずれか一方もしくは両方が存在しないか、または、それぞれ独立して１個以上の任意のアミノ酸残基を表す]。

また、本発明によるペプチドは、下記のアミノ酸配列（Ｉａ）からなる。

Ｑ１－SerP－Ｘ－SerP－Ｑ２　　（Ｉａ）

[式中、

SerPはホスホセリン残基を表し、

Ｘは１～３個の任意のアミノ酸残基を表し、

Ｑ１は０～１４個の任意のアミノ酸残基を表し、

Ｑ２は０～８個の任意のアミノ酸残基を表し、

（ただし、Ｑ１のアミノ酸残基の数が１４であって、かつＱ２のアミノ酸残基の数が８である場合を除く）]。

本発明によるアミノ酸配列（Ｉ）からなる前記ペプチドは、好ましくは免疫増強活性を有するものである。

本発明による免疫増強剤は、脾臓細胞のマイトジェン活性および免疫グロブリ

ンの産生増強活性のような免疫賦活作用に優れたものである。また、本発明の免疫増強剤に含まれるアミノ酸配列（Ｉ）からなるペプチドは、ホスホセリンを複数含有する小分子量の免疫増強作用を有するペプチドである。これは、従来から免疫増強活性の認められていた分子量３０００～５０００程度とされるＣＰＰとは、明らかに異なる物質である。このため、本発明のアミノ酸配列（Ｉ）からなるペプチドは、優れた免疫増強作用を有すると同時に、カゼインやＣＰＰを使用した場合に比べて引き起こされるミルクアレルギー反応が大幅に低減されるか、またはアレルギー反応を引き起こすことのないものである。すなわち、本発明による免疫増強剤は、安全性に優れたものである。

本発明による免疫増強剤は、免疫機能が弱い者に対して、免疫増強作用を賦与する食品素材または医薬品素材として有用である。例えば、本発明による免疫増強剤を乳児に与えることにより、免疫増強が期待できる。生後まもない乳児においては、母乳からの移行抗体により感染から守られている。母乳中の移行抗体は免疫グロブリンＡが主体である。このため、母乳を与えることができない母親が、乳児に本発明の免疫増強剤を与えれば、母乳を与えるのと同等の効果が期待できる。また、本発明による免疫増強剤は、抗原性のない小分子量のペプチドからなることができるので、ミルクアレルギーの幼児にも安心して与えることができる。さらに、加齢、疾病および疲労等に伴って免疫力が低下した成人においても、本発明の免疫増強剤を使用することにより、日常の健康増進を安全に図ることができる。

[図面の簡単な説明]

図１は、実施例の例１において、（１）～（８）のペプチドおよびコントロールについて、マウスの脾臓細胞の増殖活性へ及ぼす影響を調べた結果を示す。この図において、（１）～（８）は例１におけるペプチド（１）～（８）をそれぞれ表す。また図中、上付きの*印はコントロールに対する統計学的有意差を表し、それぞれ、上付きの**はＰ＜０．０１、上付きの***はＰ＜０．００１を意味する。

図２は、実施例の例１において、（１）～（８）のペプチドおよびコントロールが、マウス脾臓細胞培養系での免疫グロブリＡン産生に及ぼす影響を調べた結

果を示す。この図において、（１）～（８）は例１におけるペプチド（１）～（８）をそれぞれ表す。また図中、上付きの*印はコントロールに対する統計学的有意差を表し、それぞれ、上付きの*はＰ＜０．０５、上付きの**はＰ＜０．０１、および上付きの***はＰ＜０．００１を意味する。

図３は、実施例の例１において、（８）～（11）のペプチドおよび（１）のコントロールについて、マウスの脾臓細胞の増殖活性へ及ぼす影響を調べた結果を示す。この図において、（１）と（８）は例１におけるペプチド（１）および（８）をそれぞれ表し、（９）～（11）は例２におけるペプチド（９）～（11）をそれぞれ表す。また図中、上付きの*印はコントロールに対する統計学的有意差を表し、上付きの***はＰ＜０．００１を意味する。

図４は、実施例の例２において、（８）～（11）のペプチドおよび（１）のコントロールが、マウス脾臓細胞培養系での免疫グロブリン（ＩｇＧ＋ＩｇＭ＋ＩｇＡ）産生に及ぼす影響を調べた結果を示す。この図において、（１）と（８）は例１におけるペプチド（１）および（８）をそれぞれ表し、（９）～（11）は例２におけるペプチド（９）～（11）をそれぞれ表す。また図中、上付きの*印はコントロールに対する統計学的有意差を表し、それぞれ、上付きの*はＰ＜０．０５、上付きの**はＰ＜０．０１、および上付きの***はＰ＜０．００１を意味する。

図５は、実施例の例２において、（８）～（11）のペプチドおよび（１）のコントロールが、マウス脾臓細胞培養系での免疫グロブリンＡ産生に及ぼす影響を調べた結果を示す。この図において、（１）と（８）は例１におけるペプチド（１）と（８）をそれぞれ表し、（９）～（11）は例２におけるペプチド（９）～（11）をそれぞれ表す。また図中、上付きの*印はコントロールに対する統計学的有意差を表し、それぞれ、上付きの*はＰ＜０．０５、上付きの**はＰ＜０．０１、および上付きの***はＰ＜０．００１を意味する。

[発明の具体的説明]

ペプチド

本発明による免疫増強剤は、「SerP－Ｘ－SerP」の配列を少なくとも基本骨格として含むアミノ酸配列からなるペプチドを含んでなる。したがって、本発明に

よる免疫増強剤は、下記のアミノ酸配列（Ｉ）からなるペプチドを含んでなる。

Ｑ１－SerP－Ｘ－SerP－Ｑ２　　（Ｉ）

［式中、

SerPはホスホセリン残基を表し、

Ｘは１～３個の任意のアミノ酸残基を表し、かつ

Ｑ１およびＱ２は、いずれか一方もしくは両方が存在しないか、または、それぞれ独立して１個以上の任意のアミノ酸残基を表す］。

本発明において「免疫増強剤」とは、免疫増強活性を有する剤のことをいい、その用途が医薬に限られず、食品用、飼料用等であってもよい。

本発明において、「免疫増強活性を有する」とは、哺乳動物、特にヒトにおいて、脾臓細胞のマイトジェン活性および免疫グロブリンの産生増強活性のような免疫増強作用を増加させることができることをいい、例えば、本明細書の実施例の例１に記載の測定法と同様の条件において測定した場合に、脾臓細増殖および免疫グロブリン量増加のような指標によって免疫増強活性が有意に認められたと評価されることを意味する。

本発明において、「アミノ酸」とは、光学異性体、すなわちＤ体およびＬ体のいずれをも包含する。また、ここでいうアミノ酸には、天然のタンパク質を構成する２０種のα－アミノ酸のみならず、それら以外のα－アミノ酸、ならびにβ－、γ－、δ－アミノ酸および非天然のアミノ酸等も包含されてもよい。

本発明の好ましい態様によれば、前記アミノ酸配列（Ｉ）において、Ｘは１個の任意のアミノ酸残基からなる。

前記アミノ酸配列（Ｉ）におけるＸが１個の任意のアミノ酸残基からなる場合には、Ｘは、Leu、Glu、Ile、Thr、Ala、Arg、Lys、Asn、His、Val、およびSerPからなる群から選択されるものであることが好ましく、より好ましくは、ＸはSerPまたはLeuであり、さらに好ましくは、ＸはSerPである。

前記アミノ酸配列（Ｉ）において、Ｑ１が存在する場合には、Ｑ１は１個以上の任意のアミノ酸残基を表す。好ましくはＱ１におけるアミノ酸残基の数は１～２０１個であり、より好ましくは１～１２８個、さらに好ましくは１～４５個、さらにより好ましくは１～２３個、特に好ましくは１～１４個である。

また、Ｑ２が存在する場合には、Ｑ２は１個以上の任意のアミノ酸残基を表す。好ましくは、Ｑ２におけるアミノ酸残基の数は１～２０３個であり、より好ましくは１～１９２個、さらに好ましくは１～１５１個、さらにより好ましくは１～７６個、特に好ましくは１～３１個、最も好ましくは１～１１個である。

本発明の一つの好ましい態様によれば、前記アミノ酸配列（Ｉ）において、Ｑ１で表されるアミノ酸残基の数は０～１４個であって、かつＱ２で表されるアミノ酸残基の数は０～８個である。より好ましくは、Ｑ１のアミノ酸残基数は０～８個であって、かつＱ２のアミノ酸残基数は０～５個である。さらに好ましくは、Ｑ１のアミノ酸残基数は０～１個であって、かつＱ２のアミノ酸残基数は０～２個である。

なお、本発明による免疫増強剤に用いられるペプチドにおいては、好ましくは、Ｑ１のアミノ酸残基の数が１４であって、かつＱ２のアミノ酸残基の数が８である場合は除かれる。

本発明の別の態様によれば、新規なペプチドが提供され、そのペプチドは下記の式（Ｉａ）で表されるものである。

Ｑ１－SerP－Ｘ－SerP－Ｑ２　　（Ｉａ）

[式中、

SerPはホスホセリン残基を表し、

Ｘは１～３個の任意のアミノ酸残基を表し、

Ｑ１は０～１４個の任意のアミノ酸残基を表し、

Ｑ２は０～８個の任意のアミノ酸残基を表し、

（ただし、Ｑ１のアミノ酸残基の数が１４であって、かつＱ２のアミノ酸残基の数が８である場合を除く）]。

この新規なペプチドは、前記した式（Ｉａ）で表されるものに包含される限りにおいて、前記したアミノ酸配列（Ｉ）からなるペプチドと同一であることができる。

本発明の別の好ましい態様によれば、前記アミノ酸配列（Ｉ）において、Ｑ１およびＱ２で表されるアミノ酸残基はともに存在しない。すなわち、前記アミノ酸配列（Ｉ）は「SerP－Ｘ－SerP」からなるオリゴペプチドであることが好まし

い。このようにアミノ酸配列（Ｉ）のアミノ酸残基数が少ないものであると、抗原性が示されないので、免疫増強剤を使用した場合にアレルギー反応を引き起こさない。このため、安全性の高い免疫増強剤を得ることができる。

本発明のより好ましい態様によれば、前記アミノ酸配列（Ｉ）は、

Glu-SerP-X-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu　（配列番号１）、

Glu-SerP-X-SerP-SerP　（配列番号２）、

SerP-X-SerP-Glu-Glu　（配列番号３）、

SerP-X-SerP、および

Glu-SerP-X-SerP-Glu　（配列番号４）、

からなる群より選択され、より好ましくは、

SerP-X-SerP

である。

本発明のさらに好ましい態様によれば、前記アミノ酸配列（Ｉ）は、

Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu　（配列番号５）、

Glu-SerP-Leu-SerP-SerP　（配列番号６）、

SerP-SerP-SerP-Glu-Glu　（配列番号７）、

SerP-Leu-SerP、

SerP-SerP-SerP、および

Glu-SerP-Leu-SerP-Glu　（配列番号８）、

からなる群より選択され、より好ましくは、

SerP-Leu-SerP、または

SerP-SerP-SerP

である。

本発明の別の好ましい態様によれば、前記アミノ酸配列（Ｉ）は、

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SerP-X-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg　（配列番号９）

であり、さらに好ましくは、

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg　（配列番号１０）

である。

本発明のさらに別の好ましい態様によれば、前記アミノ酸配列（Ｉ）は、

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Y-Ile-Asn-Lys　　（配列番号１１）

（式中、Ｙは１個の任意のアミノ酸残基であり、好ましくはArgまたはCysである）

であり、さらに好ましくは、

Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys　　（配列番号１２）

である。

本発明において、ペプチドというときには、該ペプチドの誘導体も包含される。ここでペプチドの誘導体とは、前記した免疫増強活性を有するものであって、かつ、ペプチドにおける前記した基本骨格配列「SerP－Ｘ－SerP」以外の部分について、アミノ酸末端（Ｎ末端）のアミノ酸または各アミノ酸の側鎖のアミノ基の一部もしくは全部、および／またはカルボキシル末端（Ｃ末端）のカルボキシル基または各種アミノ酸の側鎖のカルボキシル基の一部もしくは全部、および／または、ペプチドの各アミノ酸の側鎖のアミノ基およびカルボキシル基以外の官能基（例えば、水素基、チオール基、アミド基等）の一部もしくは全部が、適当な他の置換基によって修飾を受けたものをいう。適当な他の置換基による修飾は、例えば、ペプチド中に存在する官能基の保護、安全性および組織移行性の向上、または活性の増強等を目的として行われることがある。したがって、上記した配列番号１～１２のペプチドの誘導体も本発明に包含される。

本発明の好ましい態様によれば、本発明によるペプチドは、前記アミノ酸配列（Ｉ）を少なくとも２回反復した反復配列として含んでなる。

本発明によるペプチドにおけるアミノ酸配列（Ｉ）の反復回数は、少なくとも２回であり、好ましくは２～７０回、より好ましくは２～３０回、さらに好ましくは２～１０回、さらにより好ましくは２～４回である。前記効果をより顕著に発揮させる観点からは、その反復回数は多いほど好ましい。ただし、反復処理の煩雑によるコストの上昇、および免疫増強剤として使用する際の安全性もしくは

利便性等の観点からは、前記反復回数は、好ましくは２～１０回であり、より好ましくは２～４回である。

本発明の一つの好ましい態様によれば、本発明によるペプチドが前記アミノ酸配列（Ｉ）を少なくとも２回反復した反復配列として含んでなる場合には、該ペプチドを構成するアミノ酸の数は、２２４個以下であることが好ましく、より好ましくは１００個以下、さらに好ましくは３０個以下である。

ペプチドの製造法

本発明によるペプチドは、慣用の各種合成法を利用することによって製造したものであっても、天然起源のものであってもよい。本発明によるペプチドは、そのアミノ酸配列が決定されていることから、その配列全てを合成することによって得てもよく、また、天然起源のものを一部利用してそれを基にさらに合成を行って得たものであってもよい。

本発明によるペプチドを、天然起源のものとして得る場合には、例えば下記のような手順により得ることができる。

まず、カゼインとして例えば、αｓ１－カゼイン、αｓ２－カゼイン、β－カゼイン、フォスビチンのようなホスホセリンを複数含有するタンパク質を含む牛乳カゼイン、または、卵黄タンパク質を用意する。

次いで、これを慣用の条件下に所謂トリプシン処理に付して加水分解させた後、得られた上清を分離回収し、これよりカゼインホスホペプチド（ＣＰＰ）を得る。このようなＣＰＰ調製法の具体例としては、下記（１）～（３）のような方法が挙げられる：

（１）　結晶トリプシンでβ－カゼインを加水分解して、ＣＰＰを生成させ、次いでｐＨ４．７で未反応カゼインと一部の不純物を沈殿除去した後、上清部に塩化バリウムとエタノール（終濃度５０％(v/v)）を加えてＣＰＰを沈殿として回収する方法（例えば、R.F.Peterson, L.W.Norman and T.L.McMeekin, Journal of the American Chemical Society, 80, pp95-99(1958)）、

（２）　結晶トリプシンでβ－カゼインを加水分解して、ＣＰＰを生成させ、ついでトリクロロ酢酸で処理して不溶物を除去後、水酸化ナトリウムにより中和

(pH5.0) し、その後、ゲル濾過カラム (Sephadex G-25®, Pharmacia社) により粗分画し、さらにイオン交換カラム (Dowex 50x2®, Dow Chemical Co.) にいったん吸着させた後、ピリジン－酢酸緩衝液 (0.2規定pH2.5) で溶出させてＣＰＰを精製して得る方法 (H.Naito and H.Suzuki, Agricultural Biological Chemistry, 38, pp1543-1545(1974)) 、および

（３） カゼインをトリプシンにより所定の温度およびｐＨ等の条件 (例えばpH7.0-8.5、50℃) 下に加水分解し、ＣＰＰを生成させ、次いでｐＨ５前後で未反応カゼインと一部の不純物を沈殿除去した後、上清部にカルシウム塩もしくは酢酸カルシウムとエタノールなどの有機溶媒とを加えて、ＣＰＰを沈殿させて回収する方法 (特公平２－７６１６号公報)。

次いで、上記のようにして得られたＣＰＰを、トリプシン、キモトリプシン等のエンドプロテアーゼと、アミノペプチターゼ、カルボキシペプチターゼのような種々のペプチターゼとを必要により組み合わせたものを用いて処理する。これによって、用途に応じた所望する長さを有する本発明によるペプチドを得ることができる。

したがって、本発明の別の態様によれば、前記したペプチドの製造方法であって、

カゼインを用意し、

該カゼインをトリプシン処理した後、カルシウム塩とエタノールによる沈殿処理によって、ホスホペプチドを得、次いで

得られたホスホペプチドに、アミノペプチターゼ、カルボキシペプチターゼ、およびそれらの組合せからなる群より選択された酵素を作用させて、前記ペプチドを得る

ことを含んでなる方法が提供される。

また本発明によるペプチドを、慣用の各種合成法を利用することによって得る場合は、例えば下記のような手順により得ることができる。

すなわち、本発明によるペプチドは、慣用の方法、例えばPaquet等による方法 (A. Paquet and M. Johns, Int. J. Pept Protein Res, 36(2), pp97-103,(1990)) に従い、通常のペプチド合成法を応用することにより調製することができる。

具体例を挙げて示すと、まずアミノ酸をt－ブトキシカルボニル基（Ｂｏｃ）などで保護したホスホセリンと各種アミノ酸とをペプチド合成の常法である活性化エステル法や縮合法を用いて、段階的に鎖長を延ばすことにより、任意の位置にホスホセリン基を含有するホスホペプチドを調製することができる。この方法は液相法でも固相法であっても実施可能である。

免疫増強剤

本発明による免疫増強剤は、医薬、食品または飼料としての用途に用いることができる。

したがって、本発明の一つの好ましい態様によれば、医薬として用いられる免疫増強剤が提供される。より好ましくは、該免疫増強剤は、免疫グロブリン産生を増強するための医薬として用いられる。

本発明による免疫増強剤が医薬として用いられる場合には、免疫増強剤は、投与経路に応じて適当な剤形に調製することができる。具体的には、主として静注、筋注等の注射剤、カプセル剤、包み剤、ドロップ剤、錠剤、顆粒剤、散剤、丸剤、細粒剤、糖衣錠、トローチ錠等の経口剤、直腸投与剤、油脂性座剤等のいずれかの製剤形態に調製することができる。また、該免疫増強剤は必要に応じて、液剤や液剤封入カプセル剤等の形であってもよい。

これらの製剤は通常用いられている賦形剤、増量剤、結合剤、湿潤化剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤、分散剤、緩衝剤、保存剤、溶解補助剤、防腐剤、矯味矯臭剤、無痛化剤、安定化剤等の薬学上許容可能な製剤用添加剤をさらに用いて常法により製造することができる。すなわち、本発明による免疫増強剤は、薬学上許容可能な製剤用添加剤をさらに含んでなることができる。

使用可能な製剤用添加剤としては、例えば乳糖、果糖、ブドウ糖、デンプン、ゼラチン、炭酸マグネシウム、合成ケイ酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、メチルセルロース、またはその塩、アラビアゴム、ポリエチレングリコール、シロップ、ワセリン、グリセリン、エタノール、プロピレングリコール、クエン酸、塩化ナトリウム、亜硫酸ソーダ、リン酸ナトリウム等が挙げられる。

本発明による免疫増強剤が医薬として用いられる場合には、免疫増強剤の投与形態は、経口投与、非経口投与、吸入、経直腸投与、局所投与などの各種形態を採用することができる。このうち、非経口投与には、皮下注射、静脈内投与、筋肉内投与、鼻腔内投与または注入などが含まれる。従って、例えば鼻、口腔、舌下、直腸等の粘膜投与あるいは経皮投与、埋め込み剤による投与であってもよい。したがって、このようないずれかの投与経路により、本発明による免疫増強剤を、ヒトおよびヒト以外の動物からなる群より選択される患者に投与することができる。

投与量は、用法、患者の年齢、性別、症状の程度等を考慮して適宜決定されるが、免疫増強剤における前記ペプチド量換算で、通常成人１日１人当たり約１０～１０００ｍｇ、好ましくは５０～５００ｍｇの投与量であり、これを１日１回または数回にわけて投与することができる。

このように医薬の形態で提供される本発明による免疫増強剤は、種々の感染症の治療または予防や、アレルギー性の疾患や自己免疫疾患のような疾患の治療等において有利に使用することができる。

すなわち、乳汁中に分泌される免疫グロブリンである分泌型ＩｇＡは、強力な病原性をもつ微生物の腸管粘膜への結合阻害および細菌毒素と特異的に結合してその作用を不活化すること、および、アレルゲンとして作用する食餌性の抗原と結合し消化管壁を通過することを防止してアレルギー反応を抑制すること等が知られている。一方で、分泌型ＩｇＡのない育児粉乳で育てられた人工栄養児およびＩｇＡ欠損症の患者では、食餌性抗原に対するＩｇＧ抗体が高頻度に出現し、アレルギー性の疾患や自己免疫疾患の発現頻度が高いことが知られている。本発明の免疫増強剤によれば、感染防御やアレルギー反応の抑制効果を有するＩｇＡの体内での誘導を促進することができるので、生体の免疫能を増強させることができる。

本発明による免疫増強剤が食品として用いられる場合には、免疫増強剤は、ガム、ビスケット、チョコレート、キャンディ、ゼリー、錠菓、粉乳、および飲料などの形で提供されてもよい。

このように本発明による免疫増強剤が食品形態で提供されることは、体力的に

劣る幼年者や老年者、病後の患者等の栄養補給や健康増進、さらには、アレルギー性疾患のような疾患を有する患者の健康増進等を図る上で有効である。

本発明による免疫増強剤が飼料として用いられる場合には、免疫増強剤は、乳牛用飼料、養豚用飼料、養鶏用飼料等の家畜用飼料、ペットフード、各種配合飼料などの形で提供されてもよい。

このとき給与量は、家畜動物の種類、年齢、体重、性別、給餌する環境等を考慮して適宜決定されるが、飼料としての免疫増強剤成分が、給与する飼料全量に対して０．０１～１重量%含まれることが好ましく、より好ましくは０．０５～０．５重量%含まれる。これを一定期間、好ましくは３週間以上、より好ましくは５週間程度継続して子ブタのような家畜動物に給与することが好ましい。

飼料形態で提供される本発明による免疫増強剤は、家畜動物の免疫能を簡便に増強することができるものであり、したがって、例えば、牧場等における牛のような家畜動物の感染症やアレルギー性疾患等の治療および予防を図ることができる。

また本発明による免疫増強剤を飼料として利用することにより、ＣＰＰを用いる飼料に比べて、その使用量を少なくし、他の飼料成分の比率を高めることができる。

本発明の別の態様によれば、免疫力の低下したまたは免疫力の弱い患者に、本発明によるペプチドを投与することを含んでなる、前記患者の免疫力を増強させる方法が提供される。

本発明のさらに別の態様によれば、免疫増強剤を製造するための本発明によるペプチドの使用が提供される。

[実　施　例]

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

例１

ペプチドの調製：

βーカゼイン１－２８域の活性中心の同定を検討するため、以下の実験を行なった。

βーカゼイン（純度９０％以上）（シグマ社より入手可能）を、濃度１５％(w/w)とし、これにトリプシン（Novo社製）を加えて、ｐＨ７．０、６０℃の条件下において、２時間反応させた。その後、ｐＨ４．５に調整して不純物を沈殿として除去した。得られた上清に、カルシウムを対液１．１％、およびエタノールを終濃度５０％（v/v）添加し、沈殿としてカゼインホスホペプチド（ＣＰＰ）を得た。これは、下記に示したペプチド(８)のような１－２８域からなるホスホペプチドであった。

得られた前記ホスホペプチドのアミノ酸配列に基づいて、その部分構造に相当する下記ペプチド(３)～(７)のような５種類の合成ホスホペプチドを合成した。これらのホスホペプチドは、Ｆｍｏｃアミノ酸を用いた固相合成法により行った。具体的には、これらの合成は、樹脂に側鎖を保護したαーアミノ酸を順次結合させることにより合成した。このときαアミノ酸保護基には、強塩基で除去できるＦｍｏｃ基（9-Fluorenylmethoxycarbonyl group）を用い、この保護基を取り除いた後、結合剤を用いて次のアミノ酸を結合させた。このようにして得られたペプチドを、強酸によって樹脂から切断し、同時に側鎖の保護基を除去し、その後、得られた粗ペプチドをＨＰＬＣにより精製して目的の合成ペプチドを得た。

なお、ペプチド(７)は株式会社バイオロジカ社製に、またペプチド(３)～(６)は株式会社ベックス社製に、それぞれ合成を委託して入手した。これらは、それぞれ純度８０％であり、ペプチド量は１０ｍｇであった。

前記した合成ペプチド(３)～(７)の他に、さらに、ホスホセリンのみからなるもの（ペプチド(２)）と、アミノ酸またはペプチドを無添加とするコントロール（ペプチド(１)）と、１～２８域からなるカゼインホスホペプチド（ペプチド(８)）とを用意した。

ペプチド(１)：　コントロール

ペプチド(２)：　SerP　（単独）

ペプチド(３)：　　$SerP^{15}$-Leu-$SerP^{17}$-NH_2

ペプチド(４)：　Glu^{14}-SerP-Leu-$SerP^{17}$-　　Glu^{21}

ペプチド(５)： $SerP^{17}$-SerP-SerP-Glu-Glu^{21}

ペプチド(６)： Glu^{14}-SerP-Leu-SerP- $SerP^{18}$-NH_2

ペプチド(７)： Glu^{14}-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu- Glu^{21}

ペプチド(８)： Arg^{1}-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu^{14}-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu^{21}-Ser-Ile-Thr-Arg-Ile-Asn-Lys^{28}

評価試験１：

以上で得られたペプチド(１)～(８)を、下記のような評価試験に付して、各ペプチドの免疫増強能を評価した。

試験で使用したマウス脾臓細胞は、６週齢のＣ３Ｈ／ＨｅＮ系雄マウスから無菌的に採取した。これを、１００Ｕ／ｍｌのペニシリンと１００μｇ／ｍｌのストレプトマイシンとを含むCelgrosser-P培地において培養した。

マイクロプレート中で５×10^{6}個の脾臓細胞に対して、前記したサンプルである各ペプチドをそれぞれ２ｎＭの濃度になるように添加し、さらに、０．５μｇのコンカナバリン（ＣｏｎＡ）、５μｇのフィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）、または５０μｇのリポ多糖（ＬＰＳ）のいずれかを、それぞれに加えて、それらを、３７℃、５％の炭酸ガス下において培養した。

試験１Ａ： 細胞の増殖活性

細胞の増殖活性は、４８時間後の細胞数で評価した。

培養終了後、免疫細胞の増殖は、色素ＭＴＴ法 (Mosman, T., J. Immunol. Method, 65 (1983), pp55-63) により測定し、フォルマゾンの生成は、５７０ｎｍの吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio-Rad model 450) で測定することにより求めた。

なお、効果の有意差の判定は、Studentのｔ検定を用いた。

結果は、図１に示されるとおりであった。

試験１Ｂ： 免疫グロブリン産生

免疫グロブリンの産生は、７２～１２０時間の培養で測定した。

免疫グロブリンＡの量は、サンドイッチＥＬＩＳＡ法 (Williams, D.J.L. et al., Vet. Immunol. Immunopath., 24 (1990), pp267-283) により測定した。す

なわち、ブタの抗マウス免疫グロブリンＡをコートしたプレートに細胞培養液を添加し、洗浄後、西洋ワサビパーオキシダーゼを標識した羊の抗マウス免疫グロブリンＡ抗体を反応させることにより求めた。

結果は、図２に示されるとおりであった。

例２

ペプチドの調製：

例１と同様にして下記のような合成ペプチドを得た。ここでペプチド(11)が本発明に関するものである。

ペプチド(９)： Glu^{14}-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser-Glu-Glu^{21} （配列番号１３）

ペプチド(10)： SerP-SerP

ペプチド(11)： $SerP^{17}$-SerP-$SerP^{19}$

なお、ペプチド(９)～(11)は株式会社ベックス社製にそれぞれ合成を委託して入手した。これらは、それぞれ純度８０％で、ペプチド量は１０ｍｇであった。

また、これら合成ペプチド(９)～(11)の他に、アミノ酸またはペプチドを無添加とするコントロール（ペプチド(１)）と、１～２８域からなるカゼインホスホペプチド（ペプチド(８)）とを用意した。

評価試験２：

以上で得られたペプチド(９)～(11)、およびペプチド(１)および(８)を、下記のような評価試験に付して、各ペプチドの免疫増強能を評価した。

試験で使用したマウス脾臓細胞は、上記例１と同様にして、用意し培養を行った。

試験２Ａ： 細胞の増殖活性

マウスにおける脾臓細胞の増殖促進活性について、上記例１と同様にして評価した。

細胞の増殖数は、上記例１と同様に、５７０ｎｍの吸光度によるＭＴＴ値により求めた。

結果は、図３に示されるとおりであった。

試験２Ｂ：　免疫グロブリン産生

免疫グロブリンの産生は７２～１２０時間の培養で測定した。

免疫グロブリンの量は、サンドイッチＥＬＩＳＡ法（Williams, D.J.L. et al.,Vet. Immunol. Cell Biol., 74 (1990). pp323-329）により測定した。すなわち、ヤギの抗マウス免疫グロブリン（ＩｇＧ＋ＩｇＭ＋ＩｇＡまたはＩｇＡ）をコートしたプレートに細胞培養液を添加し、洗浄後、西洋ワサビパーオキシダーゼを標識したヤギの抗マウス免疫グロブリン抗体（ＩｇＧ＋ＩｇＭ＋ＩｇＡ）または同様の羊の抗マウス免疫グロブリン抗体Ａを反応させることにより求めた。

結果は、図４および図５に示されるとおりであった。

請 求 の 範 囲

1． 下記のアミノ酸配列（Ｉ）からなるペプチドを含んでなる、免疫増強剤：

Ｑ１－SerP－Ｘ－SerP－Ｑ２ （Ｉ）

［式中、

SerPはホスホセリン残基を表し、

Ｘは１～３個の任意のアミノ酸残基を表し、かつ

Ｑ１およびＱ２は、いずれか一方もしくは両方が存在しないか、または、それぞれ独立して１個以上の任意のアミノ酸残基を表す］。

2． Ｘが１個の任意のアミノ酸残基からなる、請求項１に記載の免疫増強剤。

3． ＸがSerPまたはLeuである、請求項２に記載の免疫増強剤。

4． Ｑ１で表されるアミノ酸残基の数が０～１２８個であり、かつ、Ｑ２で表されるアミノ酸残基の数が０～１９２個である、請求項１～３のいずれか一項に記載の免疫増強剤。

5． Ｑ１で表されるアミノ酸残基の数が０～１４個であり、かつ、Ｑ２で表されるアミノ酸残基の数が０～８個である、請求項１～３のいずれか一項に記載の免疫増強剤。

6． Ｑ１およびＱ２で表されるアミノ酸残基がともに存在しない、請求項１～５のいずれか一項に記載の免疫増強剤。

7． 前記アミノ酸配列（Ｉ）が、

Glu-SerP-X-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu （配列番号１）、

Glu-SerP-X-SerP-SerP （配列番号２）、

SerP-X-SerP-Glu-Glu （配列番号３）、
SerP-X-SerP、および
Glu-SerP-X-SerP-Glu （配列番号４）、
からなる群より選択される、請求項５に記載の免疫増強剤。

８． 前記アミノ酸配列（Ｉ）が、
Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu （配列番号５）、
Glu-SerP-Leu-SerP-SerP （配列番号６）、
SerP-SerP-SerP-Glu-Glu （配列番号７）、
SerP-Leu-SerP、
SerP-SerP-SerP、および
Glu-SerP-Leu-SerP-Glu （配列番号８）、
からなる群より選択される、請求項７に記載の免疫増強剤。

９． 前記アミノ酸配列（Ｉ）が、
Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SerP-X-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg （配列番号９）
である、請求項５に記載の免疫増強剤。

１０． 前記アミノ酸配列（Ｉ）が、
Arg-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Y-Ile-Asn-Lys （配列番号１１）
（式中、Ｙは１個の任意のアミノ酸残基である）
である、請求項１に記載の免疫増強剤。

１１． 請求項１～１０のいずれか一項に記載のアミノ酸配列（Ｉ）を、少なくとも２回反復した反復配列として含んでなるペプチドを含んでなる、免疫増強剤。

１２．　医薬として用いられる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の免疫増強剤。

１３．　薬学上許容可能な製剤用添加剤をさらに含んでなる、請求項１２に記載の免疫増強剤。

１４．　食品として用いられる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の免疫増強剤。

１５．　飼料として用いられる、請求項１～１１のいずれか一項に記載の免疫増強剤。

１６．　下記のアミノ酸配列（Ｉａ）からなる、ペプチド：

Ｑ１－SerP－Ｘ－SerP－Ｑ２　　（Ｉａ）

［式中、

SerPはホスホセリン残基を表し、

Ｘは１～３個の任意のアミノ酸残基を表し、

Ｑ１は０～１４個の任意のアミノ酸残基を表し、

Ｑ２は０～８個の任意のアミノ酸残基を表し、

（ただし、Ｑ１のアミノ酸残基の数が１４であって、かつＱ２のアミノ酸残基の数が８である場合を除く）］。

１７．　Ｘが１個の任意のアミノ酸残基からなる、請求項１６に記載のペプチド。

１８．　ＸがSerPまたはLeuである、請求項１７に記載のペプチド。

１９．　Ｑ１およびＱ２で表されるアミノ酸残基がともに存在しない、請求項１６～１８のいずれか一項に記載のペプチド。

２０．　前記アミノ酸配列（Ｉａ）が、

Glu-SerP-X-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu　（配列番号１）、

Glu-SerP-X-SerP-SerP　（配列番号２）、

SerP-X-SerP-Glu-Glu　（配列番号３）、

SerP-X-SerP、および

Glu-SerP-X-SerP-Glu　（配列番号４）、

からなる群より選択される、請求項１６～１８のいずれか一項に記載のペプチド。

２１．　前記アミノ酸配列（Ｉａ）が、

Glu-SerP-Leu-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu　（配列番号５）、

Glu-SerP-Leu-SerP-SerP　（配列番号６）、

SerP-SerP-SerP-Glu-Glu　（配列番号７）、

SerP-Leu-SerP、

SerP-SerP-SerP、および

Glu-SerP-Leu-SerP-Glu　（配列番号８）、

からなる群より選択される、請求項２０に記載のペプチド。

２２．　請求項１６～２１のいずれか一項に記載のアミノ酸配列（Ｉａ）を、少なくとも２回反復した反復配列として含んでなる、ペプチド。

２３．　免疫増強活性を有するものである、請求項１６～２２のいずれか一項に記載のペプチド。

２４．　請求項１６～２３のいずれか一項に記載のペプチドの製造方法であって、

カゼインを用意し、

該カゼインをトリプシン処理した後、カルシウム塩とエタノールによる沈殿処理によって、ホスホペプチドを得、次いで

得られたホスホペプチドに、アミノペプチターゼ、カルボキシペプチターゼ、およびそれらの組合せからなる群より選択された酵素を作用させて、前記ペプチドを得る
ことを含んでなる、方法。

２５． 免疫力の低下したまたは免疫力の弱い患者に、請求項１６～２３のいずれか一項に記載のペプチドを投与することを含んでなる、前記患者の免疫力を増強させる方法。

２６． 免疫増強剤を製造するための、請求項１６～２３のいずれか一項に記載のペプチドの使用。

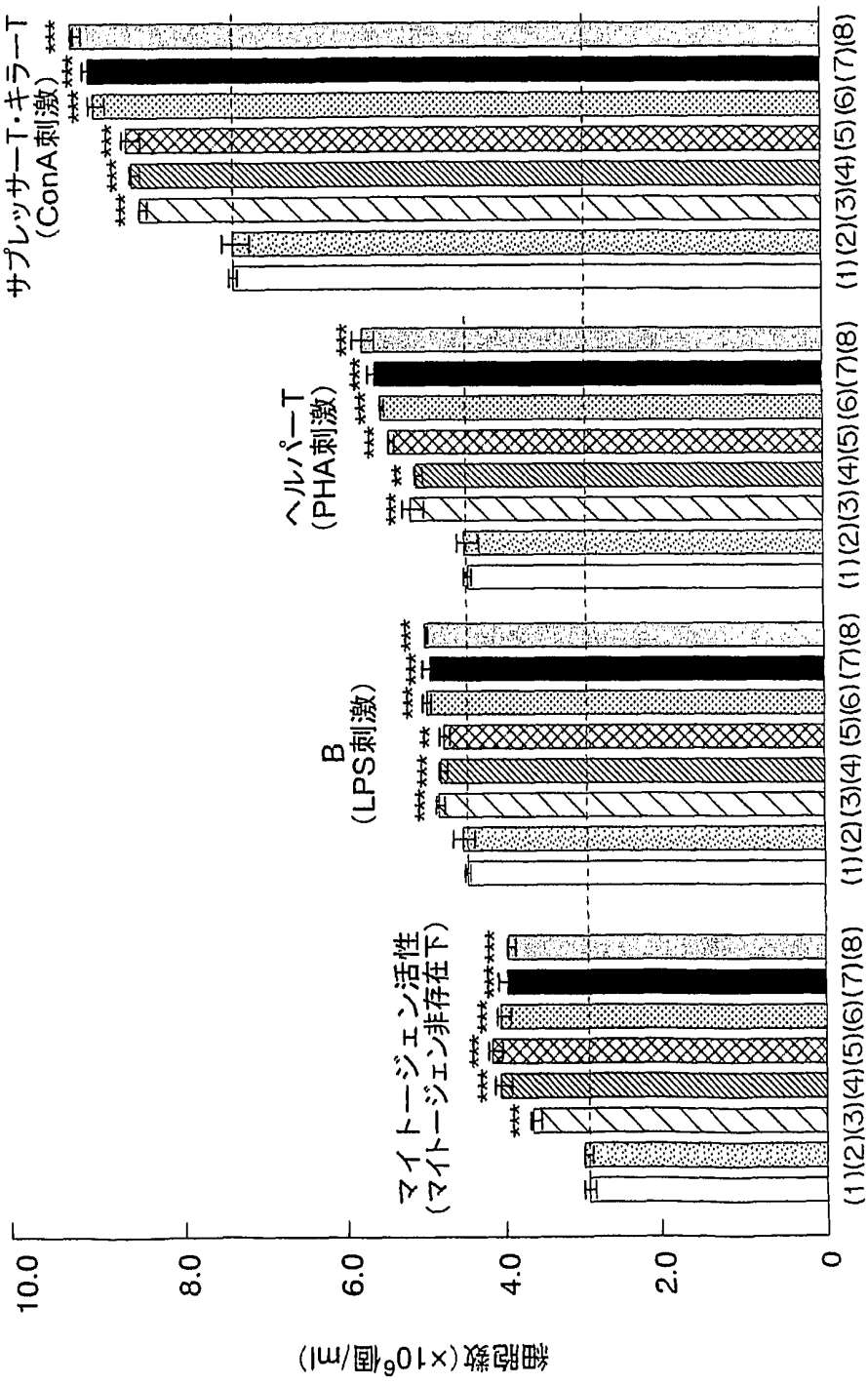

細胞数(×10⁶個/ml)
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0
マイトージェン活性
(マイトージェン非存在下)
B
(LPS刺激)
ヘルパーT
(PHA刺激)
サプレッサーT・キラーT
(ConA刺激)
(1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)

FIG. 1

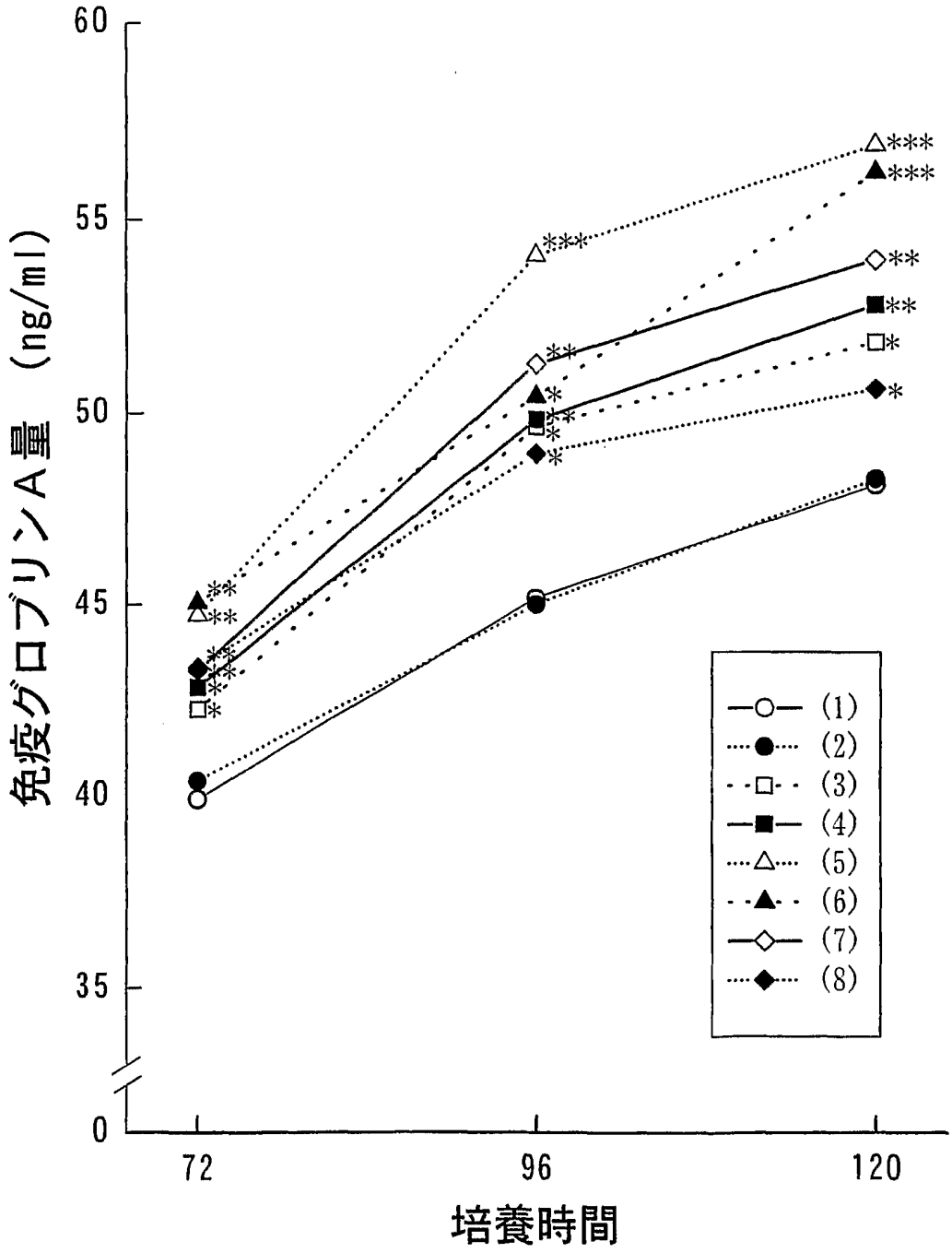


FIG. 2

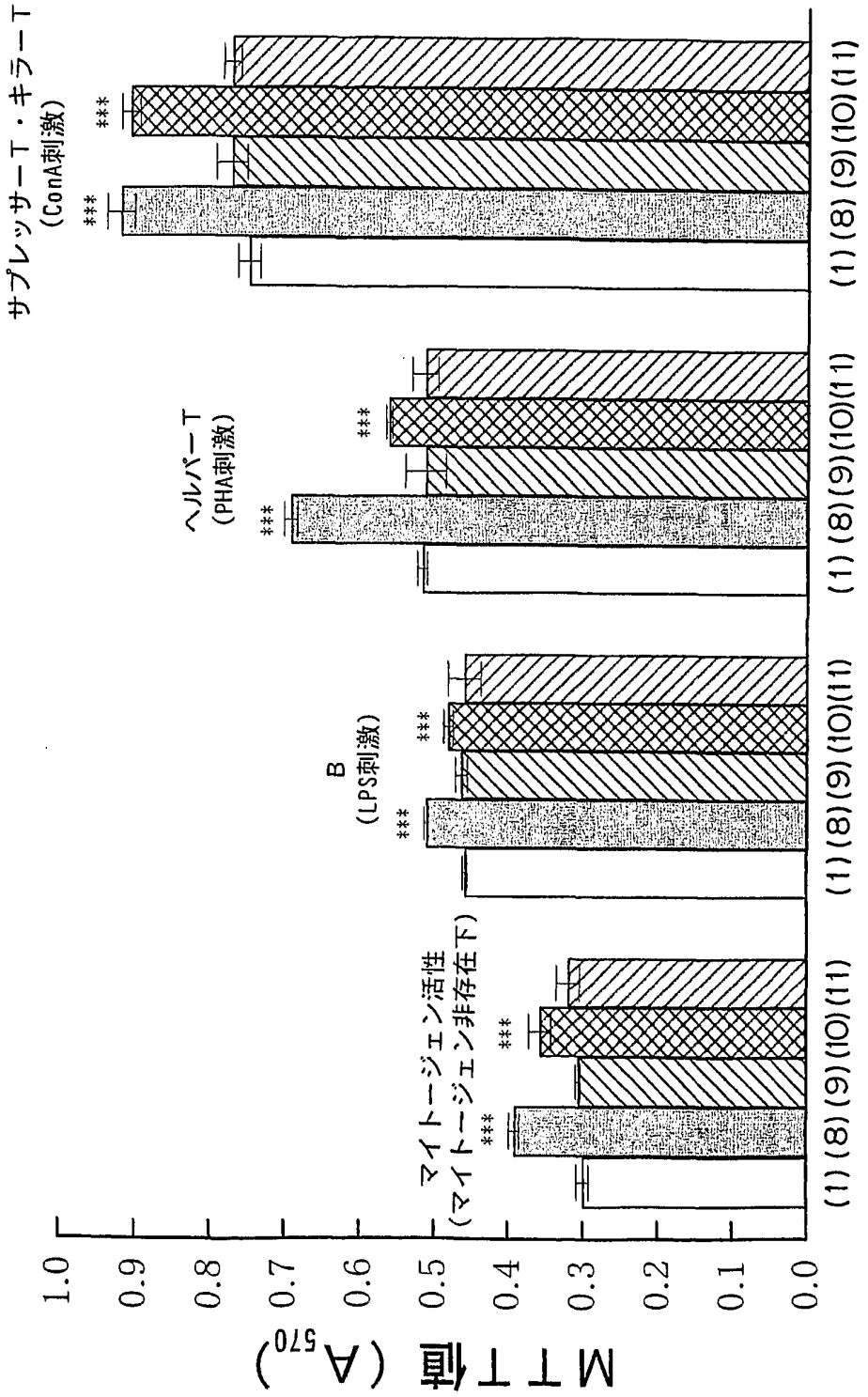

MTT値 (A_{570})
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
マイトージェン活性
(マイトージェン非存在下)
B
(LPS刺激)
ヘルパーT
(PHA刺激)
サプレッサーT・キラーT
(ConA刺激)
***
(1)(8)(9)(10)(11)
(1)(8)(9)(10)(11)
(1)(8)(9)(10)(11)
(1)(8)(9)(10)(11)

FIG. 3

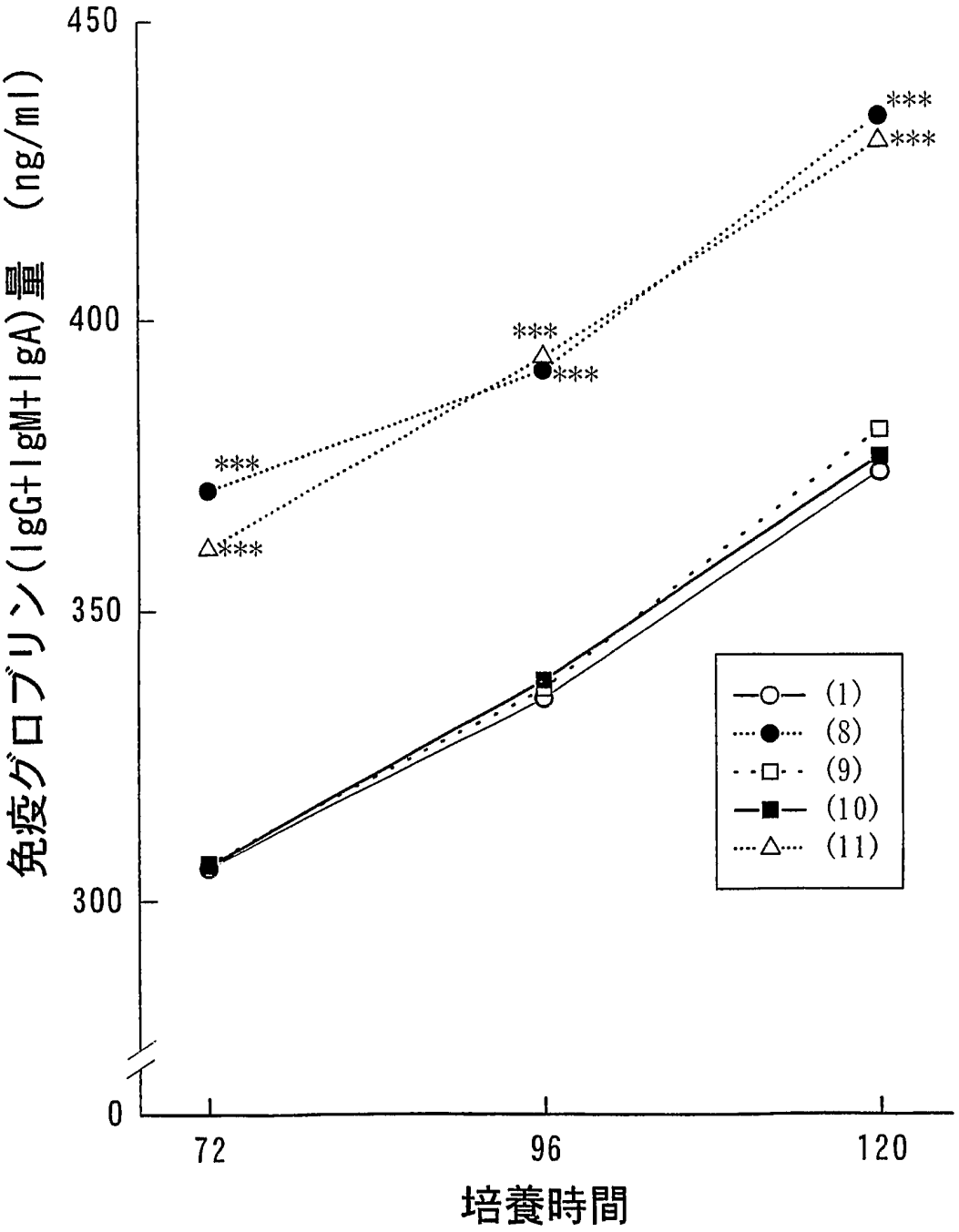

免疫グロブリン(IgG+IgM+IgA)量 (ng/ml)
450
400
350
300
0
72
96
120
培養時間
***
(1)
(8)
(9)
(10)
(11)

FIG. 4

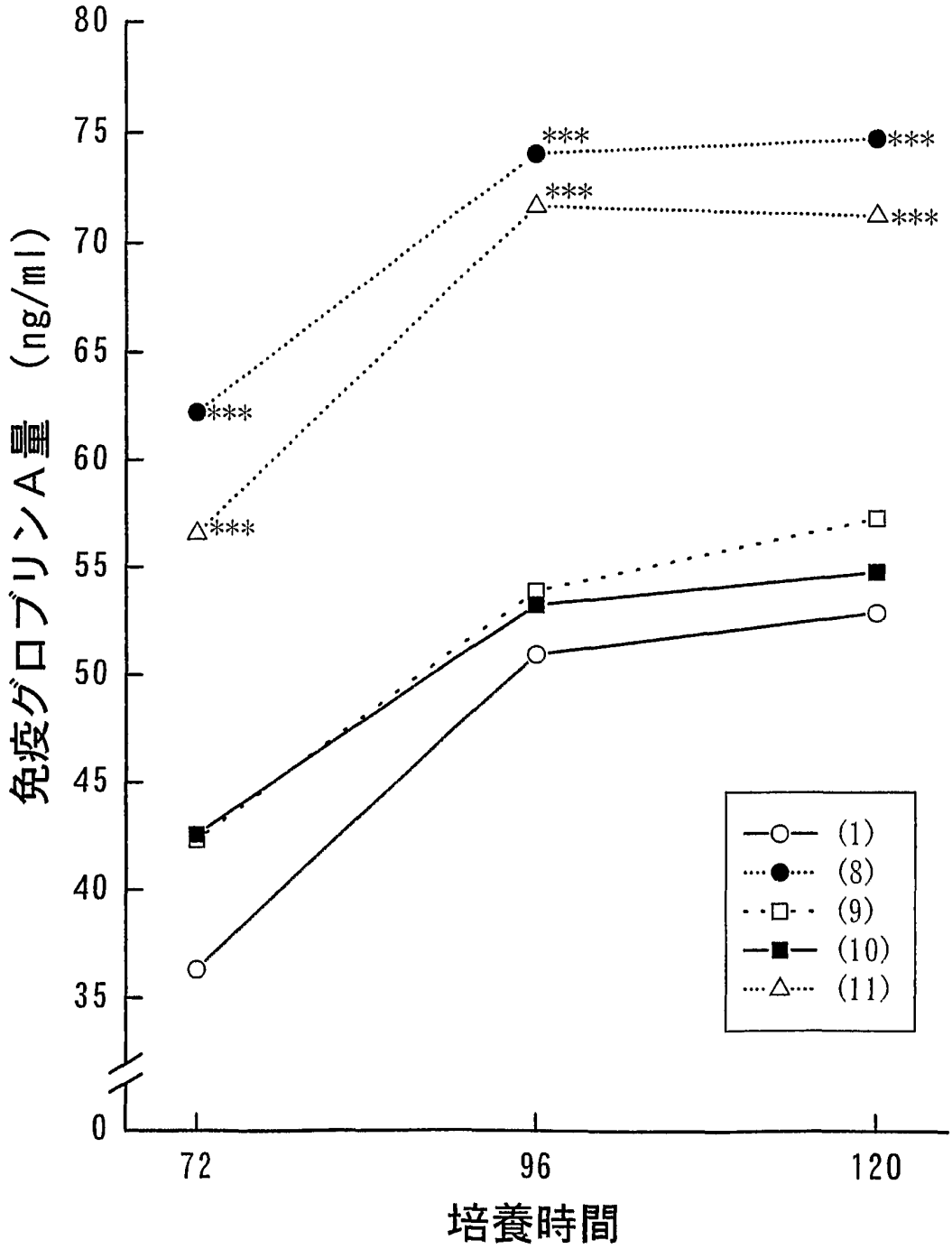

80
75
70
65
60
55
50
45
40
35
0
免疫グロブリンA量 (ng/ml)
72
96
120
培養時間
***
(1)
(8)
(9)
(10)
(11)

FIG. 5

SEQUENCE LISTING

<110> MEIJI SEIKA KAISHA, LTD.

<120> Immuno potentiator

<130> 13012401

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid, and "Xaa" is represented 1 to 3 any amino acids.

<400> 1

Glu Ser Xaa Ser Ser Ser Glu Glu
1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid, and "Xaa" is represented 1 to 3 any amino acids.

<400> 2

Glu Ser Xaa Ser Ser
1 5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid, and "Xaa" is represented 1 to 3 any amino acids.

<400> 3

Ser Xaa Ser Glu Glu
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic

peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid, and "Xaa" is represented 1 to 3 any amino acids.

<400> 4

Glu Ser Xaa Ser Glu
1 5

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid.

<400> 5

Glu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu
1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid.

<400> 6

Glu Ser Leu Ser Ser

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid.

<400> 7

Ser Ser Ser Glu Glu

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid.

<400> 8

Glu Ser Leu Ser Glu

1 5

<210> 9

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid, and "Xaa" is represented 1 to 3 any amino acids.

<400> 9

Arg Glu Leu Glu Glu Leu Asn Val Pro Gly Glu Ile Val Glu Ser Xaa
1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Thr Arg
20 25

<210> 10

<211> 25

<212> PRT

<213> Bos sp.

<400> 10

Arg Glu Leu Glu Glu Leu Asn Val Pro Gly Glu Ile Val Glu Ser Leu
1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Thr Arg
20 25

<210> 11

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide; In the sequence, "Ser" is modified by phosphoric acid, and "Xaa" is represented 1 to 3 any amino acids.

<400> 11

Arg Glu Leu Glu Glu Leu Asn Val Pro Gly Glu Ile Val Glu Ser Leu
1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Thr Xaa Ile Asn Lys
20 25

<210> 12

<211> 28

<212> PRT

<213> Bos sp.

<400> 12

Arg Glu Leu Glu Glu Leu Asn Val Pro Gly Glu Ile Val Glu Ser Leu
1 5 10 15

Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ile Thr Arg Ile Asn Lys
20 25

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic peptide

<400> 13

Glu Ser Leu Ser Ser Ser Glu Glu

1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/02258

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C07K14/47, A61K38/17, A61P37/04, C07K5/08, C07K7/06, C07K7/08, A23J3/34, A23L1/305

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)
Int.Cl[7] C07K14/47, A61K38/17, A61P37/04, C07K5/08, C07K7/06, C07K7/08, A23J3/34, A23L1/305

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)
CA(STN) REGISTRY(STN) WPI(DIALOG) BIOSIS(DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	I. HATA et al., Identification of a phosphopeptide in bovine alpha s1-casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures., J. Diary Res. (1998), Vol.65, No.4, pages 569 to 578	1-24,26
X	I. HATA et al., Immunostimulatory action of a commercially available casein phosphopeptide preparation, CCP-III, in cell cultures., Milchwissenschaft (1999), Vol.54, No.1, pages 3 to 7	1-24,26
X	JP 7-502020 A (The University of Melbourne), 02 March, 1995 (02.03.95), & US 5227154 A & EP 651633 A1 & WO 93/3707 A1	16-18,20, 21

[X] 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 document but 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	Date of mailing of the international search report
23 April, 2002 (23.04.02)	14 May, 2002 (14.05.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/02258

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PERICH JW. et al., Epitope analysis of the multiphosphorylated peptide alpha sl-casein (59-79)., J. Pept. Sci. (1999), Vol.5, No.5, pages 221 to 233	16,17,20
X	WO 97/46099 A1 (Neorx Corp.), 11 December, 1997 (11.12.97), & EP 906015 A1	16-18
A	H. OTANI et al., Enhancement of intestinal IgA levels in piglets by oral administration of a commercially available casein phosphopeptide preparation., Milchwissenschaft (2000), Vol.55, No.8, pages 429 to 432	1-24,26
A	Hajime OTANI et al., The Immunoenhancing Property of a Dietary Casein Phosphopeptide Preparation in Mice., Food and Agricultural Immunology (2000), Vol.12, No.2, pages 165 to 173	1-24,26
P,X	H. OTANI et al., Effects of bovine beta-casein (1-28) and its chemically synthesized partial fragments on proliferative responses and immunoglobulin production in mouse spleen cell cultures., Biosci Biotechnol Biochem (2000), Vol.65, No.11, pages 2489 to 2495	1-24,26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/02258

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 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. [X] Claims Nos.: 25

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 25 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

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.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０２／０２２５８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7]　C07K14/47, A61K38/17, A61P37/04, C07K5/08, C07K7/06, C07K7/08, A23J3/34, A23L1/305

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl[7]　C07K14/47, A61K38/17, A61P37/04, C07K5/08, C07K7/06, C07K7/08, A23J3/34, A23L1/305

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA(STN)　REGISTRY(STN)　WPI(DIALOG)　BIOSIS(DIALOG)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	I.HATA et al., Identification of a phosphopeptide in bovine alpha s1-casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures., J.Dairy Res.(1998), Vol.65, No.4, p.569-578	1－24, 26
X	I.HATA et al., Immunostimulatory action of a commercially available casein phosphopeptide preparation, CCP-Ⅲ, in cell cultures., Milchwissenschaft (1999), Vol.54, No.1, p.3-7	1－24, 26

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２３．０４．０２	14.05.02

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	冨永　みどり	４Ｎ	９１５２
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	JP 7-502020 A (ザ・ユニヴァーシティ・オブ・メルボルン) 1995.03.02 & US 5227154 A　& EP 651633 A1　& WO 93/3707 A1	１６－１８，２０，２１
X	PERICH JW.,et al., Epitope analysis of the multiphosphorylated peptide alpha s1-casein(59-79)., J.Pept.Sci.(1999), Vol.5, No.5, p.221-233	１６，１７，２０
X	WO 97/46099 A1 (NEORX CORPORATION) 1997.12.11 & EP 906015 A1	１６－１８
A	H.OTANI et al., Enhacement of intestinal IgA levels in piglets by oral administration of a commercially available casein phosphopeptide preparation., Milchwissenschaft (2000), Vol.55, No.8, p.429-432	１－２４，２６
A	Hajime OTANI et al., The Immunoenhancing Property of a Dietary Casein Phosphopeptide Preparation in Mice., Food and Agricultural Immunology (2000), Vol.12, No.2, p.165-173	１－２４，２６
PX	H.OTANI et al., Effects of bovine beta-casein(1-28) and its chemically synthesized partial fragments on proliferative responses and immunoglobulin production in mouse spleen cell cultures., Biosci Biotechnol Biochem (2000), Vol.65, No.11, p.2489-2495	１－２４，２６

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０２／０２２５８

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☒ 請求の範囲 ＿＿＿２５＿＿＿は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲２５は、人の身体の治療による処置方法に該当するものであるから、ＰＣＴ１７条(２)(ａ)及びＰＣＴ規則３９(ⅳ)の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2．☐ 請求の範囲 ＿＿＿＿＿＿＿＿は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求の範囲 ＿＿＿＿＿＿＿＿は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。