

(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2005-518355****(P2005-518355A)**(43) 公表日 **平成17年6月23日(2005.6.23)**

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 1
<b>A 6 1 K 35/64</b>	A 6 1 K 35/64	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 P 17/02	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 K 38/46</b>	A 6 1 K 37/02	
<b>A 6 1 L 15/44</b>	A 6 1 K 37/54	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 18 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-545347 (P2003-545347)	(71) 出願人	390040604
(86) (22) 出願日	平成14年11月18日 (2002.11.18)		イギリス国
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月20日 (2004.7.20)		THE SECRETARY OF ST
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/005171		ATE FOR DEFENCE IN
(87) 国際公開番号	W02003/043669		HER BRITANNIC MAJES
(87) 国際公開日	平成15年5月30日 (2003.5.30)		TY'S GOVERNMENT OF
(31) 優先権主張番号	0127618.7		THE UNETED KINGDOM
(32) 優先日	平成13年11月17日 (2001.11.17)		OF GREAT BRITAIN AN
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		D NORTHERN IRELAND
			イギリス国 ウィルシャー エスピー4
			ोजェイキュー ソールズベリー ポート
			ンダウン ディーエスティーエル
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 創傷を治療するための組成物及び方法

## (57) 【要約】

本発明は創傷の治療用組成物に関し、前記組成物は、ヒト又は非ヒト哺乳動物における創傷の治癒を促し、有効量のツール受容体（若しくはツール様受容体）リガンド又はその前駆体と適切な担体とを含む。前記リガンドは、ドロソフィラ・メラノガスター又はルシリア・セリカタのような昆虫に由来するシュベッツレ又はシュベッツレ様タンパク質であり得る。本発明は、本発明の組成物を創傷に施すことを含む創傷を治療する方法にも関し、本発明の組成物を有する支持材を含む創傷用包帯剤にも関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒト又は非ヒト哺乳動物における創傷の治癒を促す創傷治療用組成物であって、有効量のトール受容体リガンド又はその前駆体と適切な担体とを含む前記組成物。

**【請求項 2】**

トール受容体リガンド又はリガンド前駆体が、タンパク質のシステインノットスーパーファミリーのメンバー又はその活性な類似体である、請求項 1 記載の組成物。

**【請求項 3】**

トール受容体リガンド又はリガンド前駆体が、昆虫由来のタンパク質、その活性な部分、又はそれらの活性な類似体である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

10

**【請求項 4】**

タンパク質がドロソフィラ・メラノガスター又はルシリア・セリカタに由来する、請求項 3 記載の組成物。

**【請求項 5】**

タンパク質の活性な部分が C-末端 106 アミノ酸ペプチドを含む、請求項 3 又は 4 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

トール受容体リガンド前駆体をプロセッシングして活性なトール受容体リガンドを生成するのに適するプロテアーゼを更に含む、請求項 1 - 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

**【請求項 7】**

プロテアーゼが

- (i) 生物ルシリア・セリカタによって分泌される；
- (ii) FITC カゼインに対して pH 8.0-8.5 で最適なタンパク質分解活性を示す；
- (iii) トシル-Gly-Pro-Arg-AMC に対してタンパク質分解活性を示すが、Suc-Ala-Ala-Phe-AMC に対してはタンパク質分解活性を示さない；
- (iv) FITC カゼイン及びトシル-Gly-Pro-Arg-AMC に対するタンパク質分解活性が、セリンプロテアーゼ阻害剤 PMSF 及び APMSF によって阻害される；及び
- (v) 固定化したアミノベンズアミジンによって結合される；

ことによって特徴付けられる、請求項 6 記載の組成物。

20

**【請求項 8】**

ヒト又は非ヒト哺乳動物における創傷の治癒を促す創傷治療方法であって、請求項 1 - 7 のいずれか 1 項に記載の組成物を前記創傷に施すことを含む、前記方法。

30

**【請求項 9】**

請求項 1 - 7 のいずれか 1 項に記載の組成物を有する支持材を含む、創傷用包帯剤。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本発明は創傷の治療に関する。より詳しくは、本発明は創傷の治癒を促す物質、前記物質を取込んだ組成物及び包帯剤、並びに前記物質を用いて創傷を治療する方法に関する。

**【背景技術】**

40

**【0002】**

有効な創傷治療は、多くのメカニズムを伴う複雑な生理的過程であり、前記メカニズムとしては細胞の移動、増殖因子の分泌、脈管形成、組織の再整形及び創傷の固有なプロテイナーゼ/抗プロテイナーゼバランスが挙げられ、これらは協調して且つ明らかに段階的な様式で寄与して、制御された組織再生を速める。

創傷処置製品は、現在の医療行為に必要不可欠であり、特に慢性的な創傷又はやけどの患者の治療のために必要不可欠である。創傷の治癒に寄与する活性を有するとして、多くの様々な物質が以前に提示されている。そのような以前に提示された物質としては、ストレプトキナーゼ、コラゲナーゼ及びストレプトドルナーゼ（これらは全て細菌供給源から得られる）、プロメライン（パイナップル由来）、プラスミン及びトリプシン（ウシから

50

得られる)、並びにクリール(krill)酵素(甲殻類から得られる)が挙げられる。臨床試験データによって、これらの物質は創傷の治癒を促すことに部分的にのみ有効であることが示されている。

キンバエ(green bottle fly)のルシリア・セリカタ(Lucilia sericata)の幼虫(蛆虫)は、生きている生物として著しい創傷治癒属性を有することが知られている。ルシリア・セリカタの幼虫を用いる創傷清拭治療は、幅広く受け入れられた医療行為となっている。しかしながら、前記幼虫が通常処置不能な創傷を治癒する程度まで傷を清浄する仕事をする方法については、文献ではほとんど報告されていない。

効き目があっても、多くの患者にとって生きている幼虫は不快であり、生きている幼虫を創傷に対して使用すること及びその未精製分泌物を創傷に導入すること(生きている幼虫が用いられる場合に、必然的に起る)は、多くの患者及び多くの医療従事者にとって受け入れられない。生きている生物の使用は、患者における感染又はアレルギー反応の危険性も増加させる。

10

【発明の開示】

【0003】

(発明の提示)

大まかに言って、本発明は、ヒト又は非ヒト哺乳動物における創傷の治癒を促す創傷治療用組成物に関し、前記組成物は、有効量のトール(toll)受容体リガンド又はその前駆体と適切な担体とを含む。本明細書において“トール受容体”という用語は、ドロソフィラ(Drosophila)のトール受容体のヒト及び非ヒト相同体を含むものとして理解されるべきであって、前記相同体は、本技術分野ではしばしばトール様(toll-like)受容体(TLR)と呼ばれ、生得的な免疫認識受容体の保存されたファミリーを表している。前記生得的な免疫認識受容体は、哺乳動物、昆虫及び植物で保存されているシグナル経路に連結されており、生得的な免疫防御を媒介する遺伝子の活性化をもたらす。従って、疑いを避けるために、本明細書で用いられる用語“トール受容体”はトール受容体及びトール様受容体を意味し、本明細書で用いられる用語“トール受容体リガンド”は前記に応じて解釈されるべきである。本明細書において、用語“リガンド”は、天然に生成されたリガンド自体、及びそれらの合成類似体であって天然のリガンドと同じ機能を有するもののいずれもを含むものとして理解されるべきである。本発明の特定の態様によると、リガンドは、ヒトのトール受容体の構成性リガンド又は誘導性リガンドから選択されてもよく、セリンプロテアーゼのようなプロテアーゼによってプロセッシングされてもよく、又はされなくてもよい。

20

30

【0004】

典型的には、トール受容体リガンド又はそのリガンド前駆体は、タンパク質のシステインノット(cysteine knot)サブファミリーのメンバー、又はそれらの活性な類似体(analogue)である。前記ファミリーの各メンバーは、活性なC-末端ドメインに密集している7つのシステイン残基を含む。前記ファミリーの各メンバーは二量体を形成して特異的な受容体に結合し得るが、二量化の様式はそれぞれ異なる。前記タンパク質は全て、ユニークな立体的フォールディング(システインノット)をとり、細長いストランドと、珍しい結合性を示す3つのジスルフィド架橋とによって特徴付けられる。本発明の組成物に使用することができ且つタンパク質のシステインノットスーパーファミリーに属する特に適切なリガンドの例は、ドロソフィラ由来のシュベッツレ(spatzle)タンパク質、又はその活性な部分(例えば、Cell 76,677-688に記載されているC-末端106アミノ酸ペプチド)である。前記ファミリーに由来する他のリガンドは、TIBS 1998, July 23(7)(239-242)に記載されている。本発明の特に好ましい態様では、本発明のトール受容体リガンドが、前述のような幼虫生活環を有する昆虫の幼虫期の間に発現されるシュベッツレ様タンパク質又はその合成類似体である。そのような昆虫の例は、ドロソフィラ・メラノガスター(Drosophila melanogaster)及びルシリア・セリカタである。

40

【0005】

トール受容体リガンド前駆体を含む本発明の組成物は、トール受容体リガンド前駆体をプロセッシングして活性なトール受容体リガンドを生成するのに適切なプロテアーゼを、

50

更に含み得る。そのようなプロテアーゼは、典型的にはセリンプロテアーゼであって、例えばトリプシン様酵素又はキモトリプシン様酵素であろう。適切なトリプシン様プロテアーゼは、以下の点によって特徴付けられる：

- (i) 生物ルシリア・セリカタによって分泌される；
- (ii) FITC-カゼインに対して、pH 8.0-8.5にて最適なタンパク質分解活性を示す；
- (iii) トシル(tosyl)-Gly-Pro-Arg-AMCに対してタンパク質分解能力を示すが、Suc-Ala-Ala-Phe-AMCに対してタンパク質分解能力を示さない；
- (iv) FITC-カゼイン及びトシル-Gly-Pro-Arg-AMCに対するタンパク質分解活性が、セリンプロテアーゼ阻害剤PMSF及びAPMSFによって阻害される；及び
- (v) 固定化されたアミノベンズアミジンによって結合される。

本発明の組成物に有用なプロテアーゼは、ルシリア・セリカタの幼虫の排泄性/分泌性(ES)分泌物中に天然に存在している。

10

#### 【0006】

幼虫のES分泌物は、蛍光タンパク質基質フルオレセインイソチオシアネート-カゼイン(FITC-カゼイン)を加水分解する場合、8.0-8.5の古典的なpH最適条件を示す。FITC-カゼインの加水分解をモニターするのに先立って、不可逆性の低分子量阻害剤4-(アミジノフェニル)メタンスルホニルフルオリド(APMSF；全てのトリプシン様セリンプロテアーゼに対する阻害剤であるが、キモトリプシン様セリンプロテイナーゼに対する阻害剤ではない)又はフェニルメタンスルホニルフルオリド(PMSF；全てのセリンプロテイナーゼに対する阻害剤)を用いて幼虫のES分泌物をプレインキュベーションすることによって、幼虫のES分泌物が2つの種類のセリンプロテイナーゼ活性；トリプシン様活性及びキモトリプシン様活性を有することが示されている。そのような二重の活性は、蛍光ペプチド基質のトシル-Gly-Pro-Arg-AMC(トリプシン様プロテイナーゼに対して選択する)及びSuc-Ala-Ala-Phe-AMC(キモトリプシン様プロテイナーゼに対して選択する)の加水分解をモニターすることによって確かめられる。“AMC”は7-アミノ-4-メチルクマリンを表し、“Suc”はスクシニルを表している。

20

#### 【0007】

ルシリア・セリカタのES分泌物中で検出される優勢なセリンプロテイナーゼ活性に加えて、他のあまり優勢でない活性が存在する。アスパルチル及びメタロプロテイナーゼ活性の存在が検出されたが、システイニル活性は全く見られない。FITC-カゼイン加水分解をモニターすることによって示されるアスパルチル活性は、pH 5.0において著しく、クラス特異的阻害剤ペプスタチンAによって都合よく阻害される。存在するメタロプロテイナーゼ活性は、ロイシンアミノペプチドを加水分解するES分泌物の能力によって証明され、エキソペプチダーゼの存在を明らかにしている。エキソペプチダーゼは、ペプチドにおける遊離の-NH<sub>2</sub>アミノ酸を認識する。ルシリア・セリカタESによるロイシンアミノペプチド加水分解は、古典的メタロプロテイナーゼ阻害剤であるZn<sup>2+</sup>キレート剤1,10-フェナントロリンによってのみ阻害される。この阻害は、メタロプロテイナーゼ酵素の性質を有するエキソペプチダーゼの存在を反映している。

30

ES分泌物は、約0.88 U/Lであると算出される -アミラーゼ活性を有する。さらに、幼虫のES分泌物中にフォスファターゼ活性(オルトリン酸のモノエステル結合の加水分解)が存在するが、その活性は、プロテイナーゼと比較した場合におよそ50倍低い。リパーゼ活性(脂肪酸エステル類に見出されるエステル結合の加水分解)も同定される。このリパーゼ活性は、ES分泌物が阻害剤PMSFと共にプレインキュベートされる場合には検出されず、このことは、前記加水分解が分泌物中のセリンプロテイナーゼによることを示している。

40

#### 【0008】

我々の研究から、幼虫のES分泌物の優勢な活性のクラスがセリンプロテイナーゼ活性であって、2種類のセリンプロテイナーゼ活性が存在し、その一つはキモトリプシン酵素由来、もう一つはトリプシン酵素由来であることが結論付けられ得る。プロセッシングプロテアーゼは、クロマトグラフィー法によって未精製のES分泌物から実質的に純粋な形態で

50

得られ得る。ES分泌物は、ルシリア・セリカタの幼虫から採取されて、固定化したアミノベンズアミジンを用いるアフィニティークロマトグラフィーを行われる。アミノベンズアミジンは、トリプシン様セリンプロテイナーゼの可逆性阻害剤である。クロマトグラフィー法によって“フロースルー(flow through)”材料、すなわち固定化した試薬によって結合されなかった材料を収集した後、固定化した試薬によって結合されている酵素は、遊離のアミノベンズアミジンの添加によって溶出されて、別々に収集され得る。

上述のような本発明のリガンドは、本技術分野で既知のペプチド合成及び精製の通常経路に従って、合成的に調製され精製されてもよい。リガンドは、活性を高めるため及び/又はリガンドが創傷部位で活性を維持する期間を延長させるために、アミノペプチダーゼ活性に対して保護されてもよい。アミノペプチダーゼ活性に対する保護は、例えば、非コード異常アミノ酸を用いるリガンドのCOOH置換部位におけるアミド化及び/又はイソスターによるCO-NHアミド結合の置き換えによって達成され得る。

10

#### 【0009】

本発明のリガンドは、創傷に施されて、治療につながる増殖因子の側面(profile)を導入し得る。例えば、純粋な形態又は無菌担体中の一つ以上のリガンドが、創傷部位を覆って散在させられてもよく、又は担体中に組込まれて創傷に施されてもよい。例えば、緩慢放出又は制御放出の様式でリガンドを創傷に送達し得る適切な材料中に、リガンドが取込まれても又は封入されてもよい。そのような適切な材料の例は、調剤されて制御放出の様式でペプチドを放出し得るポリ(ラクチド-コ-グリコリド)又はPLGAの粒子である。あるいは、一つ以上のリガンドが包帯剤中に取り込まれて、創傷を覆って施され得る。そのような包帯剤の例としては、創傷治癒材料を含む緩慢放出性親水コロイド粒子又は創傷治癒材料を含むスポンジが組込まれている段階状又は層状の包帯剤が挙げられ、前記包帯剤は任意で通常の包帯剤が層状にかぶせられていてもよい。現在使用されている種類の親水コロイド包帯剤、例えば“グラニューフレックス(Granuflex)”の商標の下で入手可能な親水コロイド包帯剤が改変されて、創傷に対してリガンドを放出してもよい。

20

本発明は、ヒト又は非ヒトにおける創傷の治癒を促す創傷の治療方法にも関し、その方法は、本発明の組成物を創傷に施すことを含む。さらなる側面では、本発明は、本発明の組成物を有する支持材を含む創傷用包帯剤を提供する。

#### 【0010】

(発明の詳細な説明)

30

#### [1. 本発明のプロセッシングプロテアーゼの単離及びアッセイ]

アミノベンズアミジンアガロース上におけるルシリア・セリカタESのアフィニティークロマトグラフィーによって、トリプシン様セリンプロテイナーゼを精製した。0.5 M NaClを含む0.025 M トリス-HCl緩衝液pH 8.0を20 mL用いて、カラムマトリックス(1 mL)を平衡化した。未精製ES(0.5 mL、70 µg/mLタンパク質)は、カラムに装荷する前に、等体積の緩衝液で希釈した。クロマトグラフィーを通して、画分(0.5 mL)を収集した。カラム体積の6.5倍の緩衝液を用いて洗滌して、非結合タンパク質を除去した後、遊離アミノベンズアミジンリガンド(400 µM、2 mL)を用いて、結合材料の溶出を誘発した。前記画分の280 nmにおける吸光度の読みを用いて非結合(フロースルー)ピーク及び結合ピークの位置を確立し、次にそれらピークをアッセイのために収集した。溶出プロフィールは、図1に示されている。

40

#### 【0011】

アミノベンズアミジンアガロースは、トリプシン様セリンプロテイナーゼを結合する。前記カラムへの幼虫酵素分泌物の装荷に続いて、非結合材料がそのまま通り抜け、これを“フロースルー”(ピークI)として収集した。カラム緩衝液への遊離アミノベンズアミジンの添加は、結合プロテイナーゼの溶出(ピークII)を誘発した。非結合(フロースルー)材料は、APMSFによって影響されないプロテイナーゼ活性を含んでいた(おそらくは、キモトリプシン様酵素を含んでいる)。一方、アミノベンズアミジン溶出ピークにおける活性はAPMSFによって実質的に(80%)消失し、これによりトリプシン様セリンプロテイナーゼ活性の精製が示された。カラム画分の残留活性は、図2で示されている。

50

カラム画分を、非還元性SDSサンプル緩衝液（4% SDS、20% グリセロール及び0.02% ブロモフェノールブルーを含む0.5 M トリス-HCl、pH 6.8）を用いて、0.1% ヒトヘモグロビンを含む12% SDSポリアクリルアミドゲル上の電気泳動によって調べた。2.5% トリトン X-100中（1時間）と蒸留水中（15分間）とで洗滌することによって、SDSを除去した。0.1 M トリス-HCl緩衝液pH 8.0の中で37℃にて一晩インキュベーションすることにより、ゲル中のヘモグロビン基質のタンパク質分解を行い、クーマシーブリリアントブルーでのタンパク質染色によって、プロテイナーゼ酵素の位置に対応する明瞭なバンドが現れた（図3）。出発画分及びフロースルー画分の各々は複数のプロテイナーゼ活性を示したが、アミノベンズアミジン溶出画分はただ一つのバンドを示した。このように、アミノベンズアミジン溶出画分において先に同定した（図2）トリプシン様酵素は、およそ25 kDaの分子量を有することが示された（図3）。 10

#### 【0012】

##### [ 2. FITC-カゼインを用いた幼虫酵素（ES）のタンパク質分解作用の調査 ]

FITC-カゼインのタンパク質分解におけるルシリア・セリカタESの活性を、pH 8にて、次のようにES(0.25 µg)の異なる提示を用いて調査した。

- A . ES + H<sub>2</sub>O
- B . ES + エタノール
- C . 0.2 mM PMSFでプレインキュベートしたES
- D . 0.6 mM PMSFでプレインキュベートしたES
- E . 1 mM PMSFでプレインキュベートしたES
- F . 0.04 mM APMSFでプレインキュベートしたES
- G . 0.12 mM APMSFでプレインキュベートしたES
- H . 0.2 mM APMSFでプレインキュベートしたES

20

#### 【0013】

ルシリア・セリカタESのタンパク質分解活性は、不可逆性セリンプロテイナーゼ阻害剤PMSFとプレインキュベーションすると阻害された。ESを1 mM PMSFでプレインキュベートした場合に、そのタンパク質分解活性は全て阻害された。PMSFはエタノールに溶解し、ESの活性に対するこの溶媒の影響は無視できた。対照的に、ESを不可逆性“トリプシン様”特異的阻害剤APMSFでプレインキュベートした場合は、およそ50%の残留セリンプロテイナーゼ活性がESから検出された。APMSFの存在下の残留活性は、キモトリプシン様酵素の存在を示す。得られた活性（%）の値は、次のようであった。 30

- A . 100%
- B . 85.5%
- C . 13.8%
- D . 18%
- E . 0%
- F . 43.5%
- G . 47%
- H . 54%

これらの結果は、図4にグラフ化して示されている。 40

#### 【0014】

##### [ 3. 特異的基質に対する幼虫酵素（ES）のタンパク質分解活性の調査 ]

APMSF及びPMSF存在下でのトシル-Gly-Pro-Arg-AMC（a）とSuc-Ala-Ala-Phe-AMC（b）とに対するルシリア・セリカタES（0.25 µg）の活性を、次のようにESの異なる提示を用いて調査した。

#### （a）

- A . ES
- B . 0.025 mM APMSFでプレインキュベートしたES
- C . 0.05 mM APMSFでプレインキュベートしたES
- D . 1 mM PMSFでプレインキュベートしたES

50

(b)

- E . ES
- F . 0.2 mM APMSFでプレインキュベートしたES
- G . 1 mM PMSFでプレインキュベートしたES

【0015】

得られた残留活性(%)の値は、次のようであった。

(a)

- A . 100%
- B . 14.3%
- C . 3.6%
- D . 0%

10

(b)

- E . 100%
- F . 86.8%
- G . 1.3%

これらの結果は、図5にグラフ化して示されている。

(a)に対する結果は、ルシリア・セリカタESにおける“トリプシン様”セリンプロテイナーゼ活性の存在を明らかにしている。トシル-Gly-Pro-Arg-AMCの加水分解(セリンプロテイナーゼであるトロンビン及びプラスミンに対して選択的)は、1 mM PMSF及び0.05 mM APMSFによって阻害された。しかしながら、ルシリア・セリカタによるキモトリプシン基質Suc-Ala-Ala-Phe-AMCの加水分解は、PMSF(1 mM)によってのみ阻害され、過剰量のAPMSF(キモトリプシンを阻害しない)によっては阻害されなかった。この結果は、二つの異なるサブクラスのセリンプロテイナーゼがESに存在することの更なる証拠を提供する。

20

【0016】

[4. トール受容体及びトール様受容体に対するリガンド]

上述するように、本発明の組成物に用いられ得るリガンドは、特定の態様に従って、ヒトのトール受容体に対する構成性リガンド及び誘導性リガンドから選択されてもよく、またセリンプロテアーゼのようなプロテアーゼによってプロセッシングされても又はされなくてもよい。具体的な例は、ドロソフィラ・メラノガスターから得られるトール受容体リガンドであるシュベツツレタンパク質であって、そのプロセッシング前及びプロセッシング後の両方の形態がある。シュベツツレは、Cell(1994), 76, 677-688に記載され特徴付けられている。

30

ルシリア・セリカタの異なる発育段階に由来するシュベツツレ様タンパク質(シュベツツレの相同体又は類似体)も、本発明でトール受容体リガンドとして用いられ得る。前記タンパク質は、ドロソフィラのシュベツツレタンパク質に対して生じた抗体を用いて同定され得る。前記タンパク質はルシリア・セリカタのシュベツツレ様タンパク質に富む発育段階から精製されてもよく、生理食塩水中への抽出によって抽出物を得て、次にその抽出物を抗体アフィニティークロマトグラフィーカラムに装荷して、精製が達成され得る。このように同定されたシュベツツレ様タンパク質は、ヒト白血球のトール受容体と結合する(engage)能力についてテストされ得る。ヒト末梢血単核(HPBM)細胞がルシリア・セリカタ由来のシュベツツレ様タンパク質と共培養されてから前記HPBM細胞の増殖がチミジン取り込みを用いて測定されてもよい。それと提携して、ルシリアシュベツツレの相同体又は類似体のサイトカイン分泌(TNF-)を誘導する能力が、既知のトール受容体(LPS-細菌性リポポリサッカライド)と並行してモニターされ得る。

40

トール様受容体のリガンドは、Cytokine and Growth Factor Reviews 11(2000)219-232に記載されている。

【0017】

(実施例)

誘導した蛆虫血リンパにおけるLPS様活性を同定する研究を行った(ルシリア・セリカタの幼虫を用いた)。

50

L.セリカタの幼虫は、無菌の肝臓/寒天溶液中、シュードモナス・エルジノザ (*Pseudomonas aeruginosa*) の存在下 (誘導) 又は非存在下 (非誘導) で育てた。無菌のL.セリカタの幼虫は、Surgical Materials Testing Laboratory SMTL (Princess of Wales Hospital, Bridgend CF31 1RQ) から入手した。幼虫は、Sherman (1995) により記載された培地で育てた。前記培地は、腐敗したブタの肝臓とバクトアガーとを含み、閉鎖容器中でオートクレーブすることによって滅菌した。前記閉鎖容器は、容器の内側と外側との間で気体及び水分の交換は可能にされているが、細菌の容器内への侵入は妨げられている。幼虫用の栄養培地の薄い層を、前記容器の底に用意した。

無菌の第一齢幼虫 (200) を200  $\mu$ Lの滅菌したリン酸緩衝生理食塩水に懸濁して、前記容器に移した。28 にておよそ48時間加湿器において無菌状態で育てて、幼虫を樹立させた。シュードモナス・エルジノザの変異体PA0 P47を10 mLのルーリア-ベルターニ (LB) 培地に接種して、振盪しながら37 にて一晚育てた。その培養物の1 mL (生存数およそ $10^8$ ) を前記容器に接種し、前記幼虫を前記細菌の存在下で育てた。

10

P.アルジノザ培養物での接種を用いなかったことを除いて、上述の手順を繰り返した。

#### 【0018】

48時間インキュベーションした後、上述する手順から得た第二齢後期の幼虫を、次のように別々に処理した。

無菌状態で、前記幼虫を肝臓-寒天溶液から取り出して、滅菌したユニバーサルチューブへ移した。蛆虫を滅菌した冷PBSで洗滌し、次に70%エタノール中で洗滌して、最後にフィルターペーパー上で乾かした。次に、滅菌した外科手術刀を用いて幼虫のかぎ状器官 (hooks) の基部を切断した。次に、滅菌した黄色エッペンドルフチップを有する20  $\mu$ Lのピペットを用いて、血リンパを採取し、20  $\mu$ g/mLのアプロチニン (プロテアーゼ阻害剤) 及び40  $\mu$ Mのフェニルチオカルバミド (メラニン化阻害剤) を含む予備冷却したエッペンドルフチューブの中に移した。15,000 gで4 にて10分間遠心分離した後、予備冷却したチューブに上清を収集して、必要とするまで-80 で保持した。この方法を用いたとき、消化管内容物は血リンパに混入しなかった。また、LB溶液又はプレートでの一晚培養によって判断して、血リンパにはP.アルジノザが混入していなかった。

20

(上述のように調製した) 誘導及び非誘導血リンパ上清のTNF- 放出に対する影響を、‘サンドイッチ’ ELISAを用いてヒト末梢血単核細胞 (PBMC) でテストして、LPSと比較した。

30

三人の健康なヒトボランティア (ドナー1、2及び3) から承諾を得て、血液標本を入手した。三人のドナーの各々に由来するヒト末梢血単核細胞 (PBMC) を、Histopaque 1077 (Sigma, Poole, UK) による600 gにて20分間の浮遊密度遠心分離によって、ヘパリン処理した全血から単離した。中間層から採取したPBMCを、RPMI 1640培地を用いて2回洗滌し、AIM-V培地に再懸濁した。

#### 【0019】

次に、 $10^5$  個のPBMCを96ウェルプレート上に蒔いて培養し、増加性濃度の非誘導/誘導血リンパと、ポジティブコントロールとしてのE.coli血清型055:B5由来のLPSとを100  $\mu$ Lずつでインキュベートした。24時間のインキュベーションの後、細胞上清を収集して、マウス抗ヒトTNF- 抗体でプレコーティングした96ウェルプレート上に添加した。20 ng/mLから出発する標準ヒトTNF- の連続希釈物を並列に並べて含めた。見込まれるTNF- を、一晚放置して捕捉して、0.05% (v/v) PBS/Tween 20で3回洗滌した後、ビオチン化マウス抗ヒトTNF- 抗体の添加を用いて、捕捉抗体を検出した。0.05% (v/v) PBS/Tween 20を用いた最終洗滌の後、ストレプトアビジン-ホースラディッシュペルオキシダーゼをウェルに添加して、テトラメチルベンジジンを経基質として用いて10分間発色させて、その発色をDynexプレートリーダーで450 nmにて読取った。全てのアッセイは、二連で行った。

40

この結果は、図6にグラフ化して示されている。図6において、(A)列は三人のドナーの各々に由来するLPS処理したPBMCについて得られたプロットを示しており、LPS ( $\mu$ g/mL) に対して検出したTNF- (ng/mL) の関係が示されている。(B)列は、血リンパ処理したPBMCサンプルの各々について、血リンパ濃度に対する最大LPS応答を超えて生成した% TNF

50



- (% LPSとして示される)を示している。(B)列のプロットは、誘導血リンパ及び非誘導血リンパの両方についての結果を示している。この研究によって、誘導血リンパはヒトPBMCからのTNF- $\alpha$ 分泌を刺激することが実証される。ここで記述すべき重要なことは、LB溶液又はプレートにおける一晚培養によって判断して、血リンパにはP.アルジノザが全く混入していなかったことである。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】アミノベンズアミジンアガロースからのセリカタ・ルシリアESの溶出プロフィールを示す。

【図2】アミノベンズアミジンアガロースゲルからセリカタ・ルシリアESを溶出したカラム画分のプロテイナーゼ残留活性を示す。

【図3】アミノベンズアミジンアガロースゲルからセリカタ・ルシリアESを溶出したカラム画分に電気泳動を行い、クーマシーブリリアントブルーでタンパク質染色した結果を示す。

【図4】APMSF/PMSFの存在下でのL.セリカタES(0.25  $\mu$ g)によるFITC-カゼインの加水分解活性を示す。

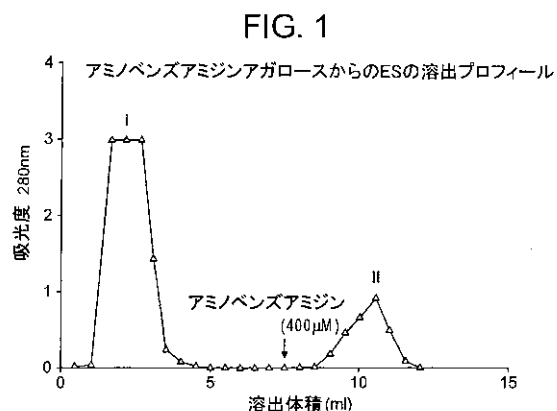
【図5】APMSF/PMSFの存在下でのL.セリカタES(0.25  $\mu$ g)によるトシル-Gly-Pro-Arg-AMC及びSuc-Ala-Ala-Phe-AMCの加水分解活性を示す。

【図6】ヒト末梢血単核細胞からのTNF- $\alpha$ 放出に対する誘導及び非誘導血リンパ上清の影響を示す。

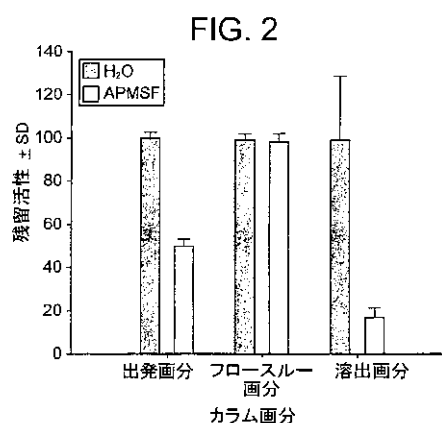
10

20

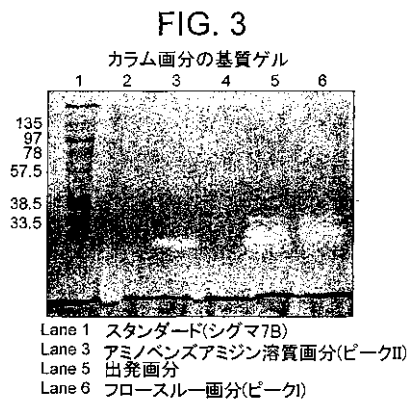
【図1】



【図2】

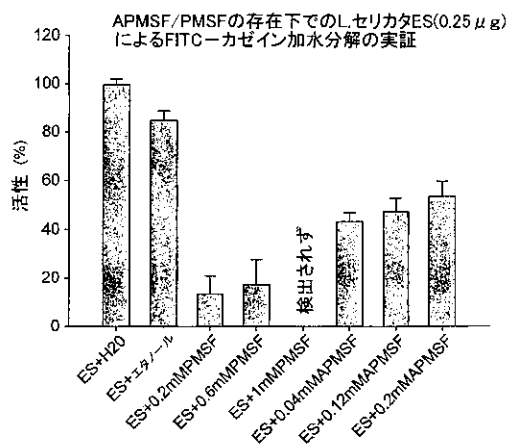


【図3】



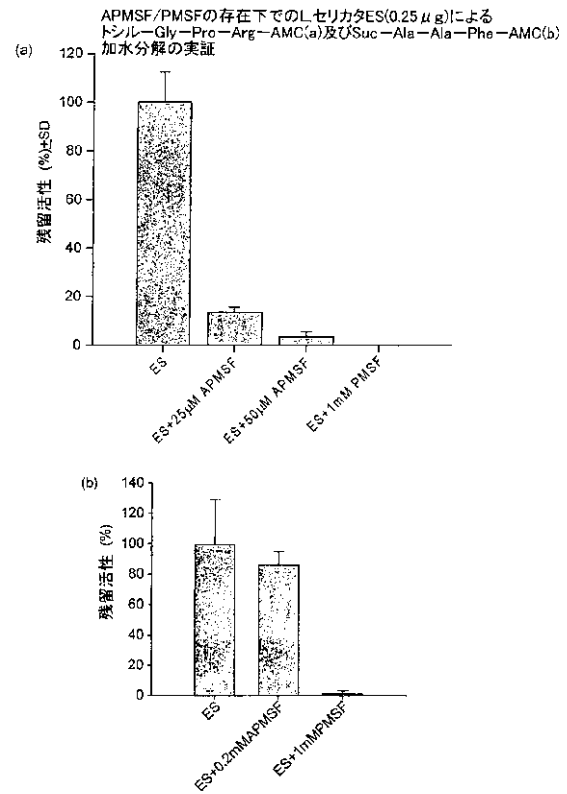
【 図 4 】

FIG. 4



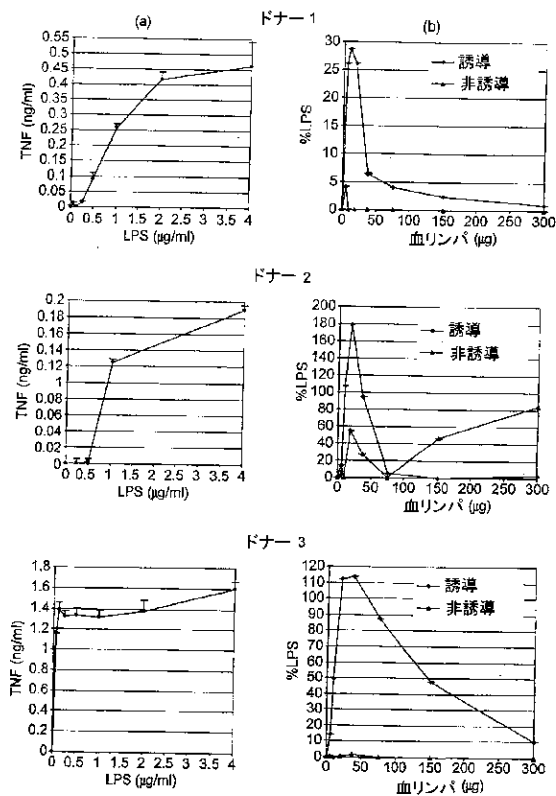
【 図 5 】

FIG. 5



【 図 6 】

FIG. 6



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		PCT/GB 02/05171
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC 7 A61L15/38 A61L15/40		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 A61L C07K A61F A61K		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, CHEM ABS Data, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 020 197 A (FLEISCHMANN WILHELM DR MED) 19 July 2000 (2000-07-19)	1-5
Y	column 3, line 32-49 column 4, line 51 claims 1,2,7,8	1-9
Y	--- WO 01 31033 A (PRITCHARD DAVID IDRIS ;UNIV NOTTINGHAM (GB)) 3 May 2001 (2001-05-03) the whole document	1-9
A	--- WO 98 50547 A (SCHERING CORP) 12 November 1998 (1998-11-12) page 3, line 25-31 claims	1
---		-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
22 May 2003		23. 05. 2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Böhm, I

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/GB 02/05171

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ARMSTRONG P B: "The contribution of proteinase inhibitors to immune defense" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 22, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01), pages 47-52, XP004255852 ISSN: 1471-4906 page 48, paragraph 5 page 49, paragraphs 3,4 ---	1
A	HULTMARK D: "Drosophila immunity: paths and patterns" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX, vol. 15, no. 1, February 2003 (2003-02), pages 12-19, XP004399366 ISSN: 0952-7915 page 13, paragraphs 4,5 page 16, paragraph 2 ---	1-5
A	GUEGUEN Y ET AL: "Immune gene discovery by expressed sequence tags generated from hemocytes of the bacteria-challenged oyster, Crassostrea gigas" GENE: AN INTERNATIONAL JOURNAL ON GENES AND GENOMES, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, BARKING, GB, vol. 303, 16 January 2003 (2003-01-16), pages 139-145, XP004404822 ISSN: 0378-1119 the whole document ---	1
A	DEAROLF C R: "Fruit fly 'leukemia'" BBA - REVIEWS ON CANCER, ELSEVIER SCIENCE BV, AMSTERDAM, NL, vol. 1377, no. 1, 20 February 1998 (1998-02-20), pages M13-M23, XP004281794 ISSN: 0304-419X page 13, paragraph 2 page 16; figure ---	1
A	MARTIN M U ET AL: "Summary and comparison of the signaling mechanisms of the Toll/interleukin-1 receptor family" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. MOLECULAR CELL RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 1592, no. 3, 11 November 2002 (2002-11-11), pages 265-280, XP004391605 ISSN: 0167-4889 page 267, paragraphs 2-5 page 269, paragraph 2 ---	1-5
	---	-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 02/05171

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JOHNSON G B ET AL: "Evolutionary clues to the functions of the Toll-like family as surveillance receptors" TRENDS IN IMMUNOLOGY, ELSEVIER, CAMBRIDGE, GB, vol. 24, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 19-24, XP004398540 ISSN: 1471-4906 page 21, paragraph 2 ---	1
A	PRETE P E: "GROWTH EFFECTS OF PHAENICIA SERICATA LARVAL EXTRACTS ON FIBROBLASTS: MECHANISM FOR WOUND HEALING BY MAGGOT THERAPY" LIFE SCIENCES, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, vol. 60, no. 8, 1997, pages 505-510, P000905619 ISSN: 0024-3205 the whole document ---	1
A	COHN J ET AL: "Innate immunity in plants" CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, XX, vol. 13, no. 1, 1 February 2001 (2001-02-01), pages 55-62, XP004257762 ISSN: 0952-7915 the whole document ---	1
A	YOUNG A R ET AL: "CHARACTERIZATION OF ES PRODUCTS INVOLVED IN WOUND INITIATION BY LUCILIA CUPRINA LARVAE" INTERNATIONAL JOURNAL OF PARASITOLOGY, PERGAMON PRESS, GB, vol. 26, no. 3, 1996, pages 245-252, XP000978826 ISSN: 0020-7519 the whole document ---	1
A	PARKER, J S ; MIZUGUCHI K ; GAY N J: "A family of proteins related to spatzle, the toll receptor ligand, are encoded in the drosophila genome" PROTEINS, STRUCTURE, FUNCTION AND GENETICS, vol. 45, no. 1, - 1 October 2001 (2001-10-01) pages 71-80, XP001150341 the whole document ---	1-5
E	DE 101 38 303 A (AVENTIS PHARMA GMBH) 6 March 2003 (2003-03-06) column 1, line 8-15 column 4, line 8-12 ---	1
	---	
	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/GB 02/05171

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	<p>CHAMBERS J C ; PRITCHARD D I: "Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva lucilia sericata used for the clinical debridement of non-healing wounds" BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY, vol. 148, no. 1, - January 2003 (2003-01) pages 14-23, XP001150327 the whole document -----</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/GB 02/05171**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 reason:

1. ☒ Claims Nos.: -  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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.

International Application No. PCT/GB 02/05171

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claim 8 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

-----

Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 02/05171

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1020197 A	19-07-2000	DE 19901134 A1	20-07-2000
		AT 234122 T	15-03-2003
		DE 29924318 U1	19-09-2002
		DE 59904527 D1	17-04-2003
		EP 1247536 A1	09-10-2002
		EP 1020197 A1	19-07-2000
		US 6359189 B1	19-03-2002
		US 6555729 B1	29-04-2003
WO 0131033 A	03-05-2001	AU 7934500 A	08-05-2001
		EP 1222285 A2	17-07-2002
		WO 0131033 A2	03-05-2001
WO 9850547 A	12-11-1998	AU 740333 B2	01-11-2001
		AU 7175498 A	27-11-1998
		BR 9808747 A	11-07-2000
		CN 1263555 T	16-08-2000
		EP 0980429 A2	23-02-2000
		JP 2002514083 T	14-05-2002
		NO 995458 A	08-11-1999
		NZ 338073 A	28-09-2001
		PL 336535 A1	03-07-2000
		SK 146599 A3	11-07-2000
		WO 9850547 A2	12-11-1998
		US 2003032090 A1	13-02-2003
		HU 0001462 A2	28-07-2000
DE 10138303 A	06-03-2003	DE 10138303 A1	06-03-2003
		WO 03013557 A1	20-02-2003

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード(参考)

A 6 1 P 17/02

A 6 1 L 15/03

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,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,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,N,O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100084009

弁理士 小川 信夫

(74)代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 プリチャード ディヴィッド イドリス

イギリス ノッティンガム エヌジー 7 2 アールディー ユニヴァーシティー パーク スク  
ール オブ ファーマシューティカルサイエンス ザ ユニヴァーシティー オブ ノッティン  
ガム

Fターム(参考) 4C081 AA02 CE02 DA05

4C084 AA02 CA49 DC02 MA63 MA70 NA14 ZA891 ZB221

4C087 AA01 AA02 BB21 CA16 MA63 NA14 ZA89 ZB22