

(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2015-515264  
(P2015-515264A)

(43) 公表日 平成27年5月28日 (2015.5.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 Z N A A	4B024
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00	4B063
<b>C12N 1/15 (2006.01)</b>	C12N 1/15	4B065
<b>C12N 1/19 (2006.01)</b>	C12N 1/19	4C084
<b>C12N 1/21 (2006.01)</b>	C12N 1/21	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-561534 (P2014-561534)  
 (86) (22) 出願日 平成25年3月12日 (2013.3.12)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年11月7日 (2014.11.7)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2013/000845  
 (87) 国際公開番号 W02013/136180  
 (87) 国際公開日 平成25年9月19日 (2013.9.19)  
 (31) 優先権主張番号 61/609,523  
 (32) 優先日 平成24年3月12日 (2012.3.12)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514232269  
 スカラテック メディカル アーベー  
 スウェーデン国 エスー172 66 ス  
 ンドビベリ, ロフストロームス アレ  
 5アー  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔  
 (74) 代理人 230113332  
 弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 疾患の処置のためのキメラタンパク質

(57) 【要約】

キメラタンパク質は、(i) スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュールおよび(ii) 異なるスカベンジャーレセプター由来のアンカードメインの組み合わせから作製される。上記キメラタンパク質は、特定の病原体に結合し、種々の処置において有用である。本明細書で開示されるのは、病原体に結合させるために使用され得るキメラタンパク質である。簡潔には、各タンパク質は、哺乳動物スカベンジャーレセプターに由来する病原体認識モジュールを含む。

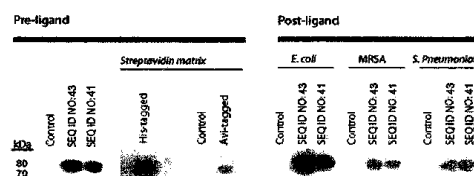


FIG. 18

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

組換えキメラタンパク質であって、

哺乳動物スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュール；および  
アンカードメイン

を含む、タンパク質。

## 【請求項 2】

前記病原体認識モジュールと前記アンカードメインとの間にリンカーをさらに含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

## 【請求項 3】

前記リンカーは、約 2 ～ 約 15 アミノ酸の配列である、請求項 2 に記載のタンパク質。

## 【請求項 4】

前記リンカーは、少なくとも 2 つの異なるアミノ酸を含む、請求項 2 に記載のタンパク質。

## 【請求項 5】

前記少なくとも 2 つの異なるアミノ酸は、アラニン、ヒスチジン、およびグリシンからなる群より選択される、請求項 4 に記載のタンパク質。

## 【請求項 6】

アフィニティータグをさらに含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

## 【請求項 7】

前記アフィニティータグは、ヘマグルチニン、A v i T a g、V 5、M y c、T 7、F L A G、H S V、V S V - G、6 - H i s、ビオチン、および S T R E P からなる群より選択される、請求項 6 に記載のタンパク質。

## 【請求項 8】

前記病原体認識モジュールは、C 末端にあり、前記アンカードメインは、哺乳動物スカベンジャーレセプターに由来する、請求項 1 に記載のタンパク質。

## 【請求項 9】

前記病原体認識モジュールは、哺乳動物クラス A スカベンジャーレセプターに由来する、請求項 8 に記載のタンパク質。

## 【請求項 10】

前記アンカードメインは、免疫グロブリンの F c 領域である、請求項 1 に記載のタンパク質。

## 【請求項 11】

前記アンカードメインは、前記病原体認識モジュールとは異なる哺乳動物スカベンジャーレセプターに由来する、請求項 1 に記載のタンパク質。

## 【請求項 12】

前記アンカードメインは、哺乳動物クラス A スカベンジャーレセプターに由来する - ヘリックスコイルドコイルドメインである、請求項 1 に記載のタンパク質。

## 【請求項 13】

前記病原体認識モジュールは、S R C R ドメイン、コラーゲン様ドメイン E、システインリッチドメイン、C タイプレクチン様ドメイン ( C T L D )、リソソーム膜タンパク質 ( L A M P ) 様ドメイン、ムチン様ドメイン、もしくは E G F 様ドメインである、請求項 8 に記載のタンパク質。

## 【請求項 14】

シグナルペプチドをさらに含む、請求項 1 に記載のタンパク質。

## 【請求項 15】

請求項 1 に記載のタンパク質をコードする、核酸配列。

## 【請求項 16】

請求項 1 に記載のタンパク質をコードする核酸配列を含む、ベクター。

## 【請求項 17】

請求項 1 に記載のタンパク質をコードする核酸配列を含む、ベクター。

10

20

30

40

50

請求項 1 に記載のタンパク質をコードする核酸配列を含むベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 18】

キメラタンパク質および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物であって、ここで該キメラタンパク質は、スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュール；およびアンカードメインを含む、薬学的組成物。

【請求項 19】

固相および該固相に固定化されたキメラタンパク質を含むアフィニティー媒体であって、ここで該キメラタンパク質は、スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュール；およびアンカードメインを含み、該アンカードメインは、該固相に結合する、アフィニティー媒体。

10

【請求項 20】

病原体もしくは病原体由来分子と関連する疾患を処置するための方法であって、該方法は、

固相および該固相に固定化されたキメラタンパク質を含むアフィニティー媒体を受容する工程であって、該キメラタンパク質は、(i)スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュールおよび(ii)アンカードメインを含む、工程と；

生物学的サンプルと該アフィニティー媒体とを接触させて、該病原体もしくは病原体由来分子を該アフィニティー媒体に結合させる工程、

とを包含する、方法。

【請求項 21】

病原性因子に対する試験アフィニティー媒体の効力を決定するための方法であって、該方法は、

20

該病原性因子を含む生物学的サンプルを受容する工程；

該生物学的サンプルと該試験アフィニティー媒体の病原体認識モジュールとを接触させる工程；および

該病原性因子と該病原体認識モジュールとの間の結合の量を検出する工程、

を包含する、方法。

【請求項 22】

前記病原性因子と前記試験アフィニティー媒体の病原体認識モジュールとの間の結合の量と、参照とを比較する工程をさらに包含する、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 23】

病原体もしくは病原体由来分子と関連する疾患の予防もしくは処置のための医薬であって、該医薬は、局所適用に適したキャリア中にキメラタンパク質を含む、医薬。

【請求項 24】

組換えキメラタンパク質であって、

シグナルペプチド；

少なくとも 1 つのアフィニティータグ；

リンカー；

哺乳動物スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュール；および

アンカードメイン

40

からなる、組換えキメラタンパク質。

【請求項 25】

前記病原体認識モジュールおよび前記アンカードメインは、異なる哺乳動物スカベンジャーレセプターに由来する、請求項 24 に記載の組換えキメラタンパク質。

【請求項 26】

患者が病原体もしくは病原体由来分子と関連する疾患を有するかどうかを診断するための方法であって、該方法は、

固相および該固相上の固定空間に固定したキメラタンパク質を含むアフィニティー媒体を受容する工程であって、該キメラタンパク質は、(i)スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュールおよび(ii)アンカードメインを含む、工程；

50

該患者から得られた生物学的サンプルを受容する工程；  
 該生物学的サンプルと該アフィニティー媒体とを接触させて、任意の病原体もしくは病原体由来分子を該固定空間に結合させる工程；ならびに  
 該固定空間を、任意の結合した病原体もしくは病原体由来分子の存在について試験する工程、  
 を包含する、方法。

【請求項 27】

前記試験する工程は、任意の結合した病原体もしくは病原体由来分子を標識プローブとハイブリダイズさせることによって行われる、請求項 26 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

背景

この出願は、2012年3月12日出願の米国仮特許出願第61/609,523号の優先権を主張する。その開示の全体は、参照によって本明細書において完全に援用される。

【0002】

配列表は、本明細書において、「SCAR200003\_\_ST25.txt」という名前を有するASCIIテキストファイルとして提出されていて、そのファイルは、2013年3月12日に作成され、123,236バイトのファイルサイズを有する。このテキストファイル中の資料は、参照によって本明細書において完全に援用される。

20

【0003】

本開示は、本明細書でハイブリッドスカベンジャーレセプターといわれ得る組換えキメラタンパク質の作製および使用を含む方法、材料、組成物、適用、および治療に関する。

【0004】

敗血症 (sepsis) は、集合的に全身性炎症反応症候群 (SIRS) として公知である病的感染 (pathologic infection) および生理学的変化の組み合わせとして一般に定義される。敗血症 (septicemia) は、血流中の病原性生物の存在 (これは、敗血症をもたらす) をいう関連用語である。これらの2つの用語は、一般に本明細書で交換可能に使用される。

30

【0005】

敗血症は、高死亡率と関連し、その死亡率は、抗生物質での処置にも拘わらず、重篤に罹患した患者では、20%~50%と報告されている。敗血症は、非冠疾患の集中治療室 (「ICU」) 中にいる患者のうちの死亡原因の第2位であり、米国全体では、死亡原因の第10位である。欧州に関しても、数字は似たようなものである。さらに、敗血症は、若年の個体では死亡原因の第1位であり、生存者の中では、クオリティー・オブ・ライフの長期の低下が認められる。現在の敗血症治療は、広域スペクトルの抗生物質および臓器支持から主になり、しばしば効果がない。治療の効力は、病原体の中で抗生物質耐性が増加するとともに低下することが予測される。

【0006】

40

過去22年間の敗血症発生率では実質的な増加が認められ、病院内死亡率が全体として低下しているにも拘わらず、死亡数の増加が起こっている。ICD-9コードを使用して、退院記録から米国での敗血症のプロフィールが作られており、重篤な敗血症のうちの751,000超の症例が1年間に起こっていると推測され、入院の2.1%~4.3%、ICUに入院している全員のうちの11%を占めている。米国での敗血症の発生率は、過去20年間にわたってかなり増加しているとも推定されている。この増加の考えられる理由としては、侵襲性の方法の使用の増加；免疫抑制薬、化学療法、および移植；ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 感染の流行の出現；ならびに微生物の耐性の増加が挙げられる。特定の原因生物の相対的頻度は、時間が経つにつれ変化したが、近年は、グラム陽性生物が傑出している。警戒心を抱かせるほどに、敗血症に起因する臓器不全の発生は、時間が

50

経つにつれ増加しており、死亡率の主な寄与因子である。同じことが欧州でも起こっているようである。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

(簡単な説明)

本明細書で開示されるのは、病原体に結合させるために使用され得るキメラタンパク質である。簡潔には、各タンパク質は、哺乳動物スカベンジャーレセプターに由来する病原体認識モジュールを含む。各タンパク質はまた、キメラタンパク質を適所に固定するためのアンカードメインを含む。

10

【0008】

種々の実施形態において、哺乳動物スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュール；およびアンカードメインを含む組換えキメラタンパク質が本明細書で開示される。

【0009】

上記タンパク質は、上記病原体認識モジュールと上記アンカードメインとの間にリンカーをさらに含み得る。上記リンカーは、約2～約5アミノ酸の配列であり得る。上記リンカーは、少なくとも2つの異なるアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態において、これらの2つの異なるアミノ酸は、アラニン、ヒスチジン、およびグリシンからなる群より選択される。

【0010】

上記タンパク質は、アフィニティータグをさらに含み得る。上記アフィニティータグは、ヘマグルチニン、V5、Myc、T7、FLAG、HSV、VSV-G、6-His、ビオチン/ストレプトアビジン、およびSTREPからなる群より選択され得る。

20

【0011】

上記病原体認識モジュールは、哺乳動物細胞表面レセプターファミリー由来の病原体結合ドメイン(例えば、SCARA3、CD36、CD163、CD68、LOX-1、SREC-1もしくはSCARA5など)であり得る。これらのスカベンジャーレセプターは、保存されたSRCRドメイン、Cタイプレクチン様ドメイン(CTLD)、もしくはコラーゲン様配列などの病原体結合ドメインを含む。

【0012】

上記アンカードメインは、免疫グロブリンのFc領域であり得る。あるいは、上記アンカードメインは、哺乳動物スカベンジャーレセプター由来の -ヘリックスコイルドコイルドメインであり得る。上記アンカードメインはまた、アフィニティータグであり得る。本開示の特定の実施形態において、上記病原体認識モジュールが由来する哺乳動物スカベンジャーレセプターは、上記アンカードメインが由来する哺乳動物スカベンジャーレセプターとは異なる。

30

【0013】

上記タンパク質は、シグナルペプチドをさらに含み得る。

【0014】

本明細書で開示されるのはまた、以下である：キメラレセプタータンパク質をコードする核酸配列；このような核酸配列を含むベクター；およびこのようなベクターを含む宿主細胞。

40

【0015】

本明細書で開示されるのはまた、キメラタンパク質および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物であって；ここで上記キメラタンパク質は、スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュール；およびアンカードメインを含む、薬学的組成物である。

【0016】

本明細書で開示されるのはまた、固相および上記固相に固定化されたキメラタンパク質を含むアフィニティ媒体であって；ここで上記キメラタンパク質は、スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュール；任意選択のリンカー；およびアンカードメインを

50

含み、上記アンカードメインは、上記固相に結合する、アフィニティー媒体である。

【0017】

さらに、本開示は、結合した病原体もしくは病原体由来分子が取り除かれる一方で、上記固相内の、および上記キメラタンパク質と上記固相との間のカップリングが乱されないままであるように、開示されるアフィニティー媒体を処理することによって、上記媒体を必要に応じて再生するための方法を記載する。

【0018】

本開示はまた、病原体もしくは病原体由来分子と関連する疾患を処置するための方法を記載し、上記方法は、固相および上記固相に固定化されたキメラタンパク質を含むアフィニティー媒体を受容する工程であって、上記キメラタンパク質は、(i)スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュールおよび(ii)アンカードメインを含む、工程；ならびに生物学的サンプルと上記アフィニティー媒体とを接触させて、上記病原体もしくは病原体由来分子を上記アフィニティー媒体に結合させる工程、を包含する。

10

【0019】

病原性因子に対する試験アフィニティー媒体の効力を決定するための方法もまた本明細書で記載され、上記方法は、上記病原性因子を含む生物学的サンプルを受容する工程；上記生物学的サンプルと上記試験アフィニティー媒体の病原体認識モジュールとを接触させる工程；および上記病原性因子と上記病原体認識モジュールとの間の結合の量を検出する工程を包含する。この方法は、上記病原性因子と上記試験アフィニティー媒体の病原体認識モジュールとの間の結合の量を、参照と比較する工程をさらに包含し得る。

20

【0020】

病原体もしくは病原体由来分子と関連する疾患の予防もしくは処置のための医薬が、本明細書の実施形態で開示され、上記医薬は、局所適用に適したキャリア中にキメラタンパク質を含む。

【0021】

シグナルペプチド；少なくとも1つのアフィニティータグ；任意選択のリンカー；哺乳動物スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュール；およびアンカードメインからなる組換えキメラタンパク質もまた開示される。

【0022】

患者が病原体もしくは病原体由来分子と関連する疾患を有するかどうかを診断するための方法もまた、本明細書で開示され、上記方法は、固相および上記固相上の固定空間(fixed space)に固定したキメラタンパク質を含むアフィニティー媒体を受容する工程であって、上記キメラタンパク質は、(i)スカベンジャーレセプター由来の病原体認識モジュールおよび(ii)アンカードメインを含む、工程；上記患者から得られた生物学的サンプルを受容する工程；上記生物学的サンプルと上記アフィニティー媒体とを接触させて、任意の病原体もしくは病原体由来分子を上記固定空間に結合させる工程；ならびに任意の結合した病原体もしくは病原体由来分子の存在について上記固定空間を試験する工程、を包含する。上記試験する工程は、任意の結合した病原体もしくは病原体由来分子を標識プローブとハイブリダイズさせることによって行われ得る。

30

【0023】

これらおよび他の非限定的な特徴は、以下でより詳細に記載される。

40

【図面の簡単な説明】

【0024】

特許もしくは出願ファイルは、カラーで仕上げられた少なくとも1つの図面を含む。カラー図面(複数可)付きのこの特許もしくは特許出願公報のコピーは、請求および必要な料金を払えば、当該官庁によって提供される。

【0025】

以下は、図面の簡単な説明であり、これは、本明細書で開示される例示的实施形態を例証する目的で提示されるのであって、これを限定する目的で提示されるのではない。

【0026】

50

【図1A】図1Aおよび図1Bは、スカベンジャーレセプタータンパク質の種々のクラス間での構造の類似性および差を示すダイアグラムである。上記ダイアグラムは、Platt, N. et al. Trends Cell Biol. Volume 8, Issue 9, 1 September 1998, Pages 365-372から改変している。上記ダイアグラムは、これらのタンパク質の相対的サイズを正確に示しているわけではない。

【図1B】図1Aおよび図1Bは、スカベンジャーレセプタータンパク質の種々のクラス間での構造の類似性および差を示すダイアグラムである。上記ダイアグラムは、Platt, N. et al. Trends Cell Biol. Volume 8, Issue 9, 1 September 1998, Pages 365-372から改変している。上記ダイアグラムは、これらのタンパク質の相対的サイズを正確に示しているわけではない。

10

【0027】

【図2】図2は、本開示のキメラタンパク質の1つの可能な使用を示すダイアグラムである。

【0028】

【図3】図3は、固相（ここではビーズ）に結合したタンパク質を示すデンストメトリー分析のために使用されるマイクロ写真である。

【0029】

【図4】図4は、固相に結合したタンパク質の量の分析に使用されるBradfordアッセイ標準曲線を示すグラフである。

20

【0030】

【図5A】図5は、4種の異なる細菌が第1のキメラタンパク質を有するアフィニティー媒体に曝される場合の結果を示すグラフのセットである。上記グラフは、上記アフィニティー媒体から洗浄された連続画分にわたって生きている細菌の量、および実験の経過にわたって生存している細菌全部の数を示す。

【図5B】図5は、4種の異なる細菌が第1のキメラタンパク質を有するアフィニティー媒体に曝される場合の結果を示すグラフのセットである。上記グラフは、上記アフィニティー媒体から洗浄された連続画分にわたって生きている細菌の量、および実験の経過にわたって生存している細菌全部の数を示す。

30

【0031】

【図6A】図6は、4種の異なる細菌が第2のキメラタンパク質を有するアフィニティー媒体に曝された場合の結果を示すグラフのセットである。上記グラフは、上記アフィニティー媒体から洗浄された連続画分にわたって生きている細菌の量、および実験の経過にわたって生存している細菌全部の数を示す。

【図6B】図6は、4種の異なる細菌が第2のキメラタンパク質を有するアフィニティー媒体に曝された場合の結果を示すグラフのセットである。上記グラフは、上記アフィニティー媒体から洗浄された連続画分にわたって生きている細菌の量、および実験の経過にわたって生存している細菌全部の数を示す。

40

【0032】

【図7】図7は、広いスペクトルの $\beta$ -ラクタマーゼ生成E. coli (ESBL)細菌が第3のキメラタンパク質を有するアフィニティー媒体に曝される場合の結果を示すグラフのセットである。上記グラフは、上記アフィニティー媒体から洗浄された連続画分にわたって生きている細菌の量、および実験の最後にカラムに残留する生存している細菌の数を示す。

【0033】

【図8】図8は、広いスペクトルの $\beta$ -ラクタマーゼ生成E. coli (ESBL)細菌が第4のキメラタンパク質を有するアフィニティー媒体に曝された場合の結果を示すグラフのセットである。上記グラフは、上記アフィニティー媒体から洗浄された連続画分にわたって生きている細菌の量、および実験の最後にカラムに残っている生存している細菌の

50

数を示す。3つの別個の実験から得られる平均値および標準偏差を示す。

【0034】

【図9A】図9Aおよび図9Bは、実施例1からの各カラムの画分（すなわち、上記第1のキメラタンパク質）に曝された末梢血単核細胞（PBMC）におけるTNF生成を示すグラフである。

【図9B】図9Aおよび図9Bは、実施例1からの各カラムの画分（すなわち、上記第1のキメラタンパク質）に曝された末梢血単核細胞（PBMC）におけるTNF生成を示すグラフである。

【0035】

【図10A】図10Aおよび図10Bは、実施例2からの各カラムの画分（すなわち、上記第2のキメラタンパク質）に曝された末梢血単核細胞（PBMC）におけるTNF生成を示すグラフである。

【図10B】図10Aおよび図10Bは、実施例2からの各カラムの画分（すなわち、上記第2のキメラタンパク質）に曝された末梢血単核細胞（PBMC）におけるTNF生成を示すグラフである。

【0036】

【図11】図11は、2種の異なるキメラタンパク質（インタクトなSCARA5およびコントロール）への熱不活化E.coliおよびアセチル化低密度リポプロテイン（acLDL）の結合を示す写真のセットである。発現を、抗SCARA5抗体を使用して確認した。

【0037】

【図12】図12は、コントロールCrb2細胞と比較して、SCARA5トランスフェクト細胞による細菌リポポリサッカリド（LPS）のインターナリゼーションを示す写真のセットである。SCARA5およびCrb2の発現を、抗SCARA5抗体および抗Crb2抗体を使用して確認した。

【0038】

【図13】図13は、ヒト血清中で混合した病原体を異なるキメラレセプタータンパク質に結合させたビーズを含むカラムに通過させることによって得られたカラムフロースルーに曝したドナー由来の末梢血単核細胞（PBMC）において誘導されたTNF生成を示すグラフの第1のセットである。コントロール群は、キメラレセプターが結合していないビーズからなった。

【0039】

【図14】図14は、図13と同様であるが異なる病原体を用いた、グラフの第2のセットである。

【0040】

【図15】図15は、図13および図14と同じ装置を使用するが、結合した病原体をコントロールビーズおよびキメラレセプター（配列番号35、配列番号43および配列番号41）をロードしたビーズから溶離するために異なる洗浄溶液を使用して行ったドットプロットの結果を示す。この場合、ビオチン化MRSAは、抗ビオチンHRP結合体化抗体を使用して、上記カラムに適用される材料（ローディング）、ならびに通過および洗浄後（ビオチンの検出）において示される。洗浄溶液1は、環境条件のいずれにおいても結合したMRSAを溶離しないが、洗浄溶液2は、配列番号41および配列番号43をロードしたビーズに関しては溶離する。上記ビーズから洗浄溶液3で全てを溶離した後、結合した細菌フラグメント（ビオチン）は、上記コントロールビーズにおいても、配列番号35を装填したビーズにおいても検出されない。

【0041】

【図16】図16は、図17と比較される、アフィニティータグの1セットでタグ化したタンパク質の5つの免疫組織化学検査（IHC）の写真のセットである。存在するタンパク質の量は、高い。

【0042】

10

20

30

40

50



【図17】図17は、図16と比較される、アフィニティータグの別のセットでタグ化したタンパク質の5つの免疫組織化学検査（IHC）の写真のセットである。存在するタンパク質の量は、低い。

【0043】

【図18】図18は、病原性細菌もしくは裸のマトリクスの3種に対して、2種のキメラレセプター（配列番号43および配列番号41から発現する）の親和性を示すウェスタンプロットのセットである。左の区画は、最初の溶液中の各レセプタータンパク質の存在を示す。右の区画は、上記タンパク質が、種々の細菌の添加および洗浄プロトコルを実行した後にビーズになお結合していることを示す。TALONビーズに結合したHisタグ化タンパク質、ならびにストレプトアビジン被覆アガロースに結合したAvitag化した  
10  
ピオチン化タンパク質についても同様のことが当てはまる。グラム陽性細菌に関してはキメラレセプターの濃度が混合後に低下した（グラム陰性E. coliやHisタグ化タンパク質についてはそうではない）ことが認められ得る。このことは、病原体分子/アガロースとキメラレセプターとの間で結合が起こり、その結果、あるタンパク質はもはや上記溶液中にはないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0044】

（詳細な説明）

本明細書で開示される組成物および方法のより完全な理解は、添付の図面を参照することによって得られ得る。これらの図面は、便宜上および本開示を明らかに示すことの容易  
20  
さに基づいて模式的に示しているに過ぎず、従って、例示的实施形態の範囲を定義することも限定することも意図しない。

【0045】

特定の用語が明快さのために以下の記載において使用されるものの、これらの用語は、図面で図示するための選択される実施形態の特定の構造のみ言及することを意図しており、本開示の範囲を定義することも限定することも意図しない。図面および以下に続く説明において、類似の番号呼称は、類似の機能の構成要素に言及することは、理解されるべきである。

【0046】

本明細書で考察される全ての刊行物、特許および特許出願は、それらの全体において参  
30  
考として本明細書に援用される。

【0047】

本開示は、哺乳動物スカベンジャーレセプタータンパク質（本開示の目的のために、スカベンジャーレセプター、もしくは単にSRと略記される）に基づくキメラタンパク質に関する。古代のおよび高度に保存されたタンパク質モジュール-スカベンジャーレセプターシステインリッチ（SRCR）ドメインの1つまたは複数の存在を有する約30のヒトレセプタータンパク質（可溶性および膜結合型の両方）が存在する。SRCRドメインは、約90~110アミノ酸長であり、高く、十分に規定されたシステイン含有量を有する。それらのSRCRドメインの特徴に依存して、SRメンバーのうちの2つのタイプが報告されている：タイプAドメイン（SCARA；少なくとも2つのエキソンによってコードされ、6個のシステイン残基を含む）を有するもの、およびタイプBドメイン（単一のエキソンによってコードされ、8個のシステイン残基を含む）を有するもの。いくつかの例外は存在する（4個のシステインを含む短縮型SRCRドメインを提示する1つのSCARAが挙げられる）。同様に、6個のシステインを含む単離されたドメインは、CD5、CD163、WC1、およびMC16の場合のように、グループBのメンバーの中で見  
40  
いだされている。さらに、Sp / AIM、WC1 / T19およびCRP-ductin（マウスDMBT1）は、7個のシステインを含む個々のドメインを有する。しかしタイプAおよびタイプBのドメインが同じスカベンジャーレセプターに同時に存在することは、これまで一度も報告されていない。配列分析から、SRCRドメインが異なるレベルの相同性を共有するものの、ジスルフィド結合のパターンと同様に、システインの相対的位  
50

置は上記ドメイン内でよく保存されていることが明らかになった。従って、配列分析から、システインC1およびC4は、グループBに常に存在するが、グループAには存在しないので、ジスルフィド結合を形成することが明らかになった。タンパク質分解分析は、ジスルフィド結合を形成する他のシステイン対が、C2 - C7、C3 - C8、およびC5 - C6であることを示した。これらの結果は、結晶化された個々のタンパク質ドメインの構造分析によって確認された。

#### 【0048】

考察された上記SRCRドメインの他に、上記SRのうちのいずれも、造血系統の免疫担当細胞の垂集団の表面上のそれらの位置によって特徴付けられる。さらに、SR発現の数および程度の変化は、ほぼ全て他の細胞タイプにおいて見いだされ得る。そこから、それらは、多数の内因性リガンドを結合し得る。これらは、アセチル化低比重コレステロールもしくは酸化低比重コレステロール(LDL)、ならびに正常の高比重コレステロール(HDL)、ヘモグロビン、鉄および炭水化物を含む。SRはまた、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の両方を結合する。

10

#### 【0049】

図1は、スカベンジャーレセプター(SR)の種々のクラスの構造的特徴を図示する。

#### 【0050】

クラスA SRは、トリマー糖タンパク質であり、その中には、いくつかのサブタイプが存在する：SR-AタイプIおよびタイプII(SCARA1)、MARCO(SCARA2)、SR-CLタイプIおよびタイプII(SCARA4)、ならびにSCARA5。SCARA3サブタイプは、ここでは例示されていない。上記トリマー分子は、細胞質ドメインA、膜貫通ドメインB、スペーサドメインC、ヘリックスコイルドコイルドメインD、コラーゲン様三重螺旋ドメインE、システインリッチドメインF、もしくはCタイプレクチン様ドメインGを含むブロックから構成される。タイプI SR-Aレセプターは、6個のドメインを有する一方で、タイプIIレセプターは、システインリッチドメインFを有しない。MARCOレセプターは、ヘリックスコイルドコイルドメインDを有さず、比較的長いコラーゲン様三重螺旋ドメインEを有する。SR-CLタイプIレセプターにおいて、上記システインリッチドメインFは、上記Cタイプレクチン様ドメインGによって置き換えられる。SCARA5レセプターは、6個のドメインを有するSR-AタイプIレセプターに類似である。クラスA SRにおいて、上記コラーゲン様ドメインE、上記システインリッチドメインF、もしくはCタイプレクチン様ドメインGは、アセチル化低比重リポタンパク質もしくは細菌および他のリガンドの結合部位を含む。クラスA SRにおいて、N末端が細胞質にあることにもまた、注意すべきである。

20

30

#### 【0051】

クラスB SRとしては、例えば、CD36およびCD163が挙げられる。CD36タンパク質は、2つの膜貫通ドメインBおよび2つの細胞質ドメインAが隣接した細胞外ドメインHを有して、ダイトピック(ditopic)配置をとる。上記細胞外ドメインは、疎水性ドメイン、プロリンリッチ領域、およびいくつかの結合部位を含む。CD163タンパク質は、そのC末端にある細胞質ドメインA、膜貫通ドメインB、ならびに9つのクラスB SRCRドメインJ(そのN末端でSRCR1と番号付けされ、そのC末端近傍でSRCR9と番号付けされている)からもっぱらなる細胞外ドメインを有する。上記クラスB SRCRドメインは、4つのジスルフィド架橋を有するのに対して、クラスA SRCRドメインは、3つのジスルフィド架橋を有する。

40

#### 【0052】

クラスD SRとしては、例えば、CD68(マクロシアリンとしても公知)が挙げられる。CD68のC末端は、細胞質にある。CD68は、細胞質ドメインA、膜貫通ドメインB、リソソーム膜タンパク質(LAMP)様ドメインK、およびムチン様ドメインLを含む。

#### 【0053】

唯一の最新のクラスE SRは、LOX-1である。LOX-1のN末端は、細胞質に

50

ある。LOX-1は、細胞質ドメインA、膜貫通ドメインBおよびCタイプレクチンドメインGを含む。レクチンを含むCタイプレクチン様ドメイン(CTLD)は、Ca<sup>2+</sup>依存性炭水化物結合タンパク質である。その構造スーパーファミリーはまた、Ca<sup>2+</sup>非依存性レクチンおよびレクチン様ドメインを有するタンパク質を含むが、炭水化物を結合できない。しかし、上記CTLDの折りたたみは、その4つの(いくつかの場合には、6つ)の保存されたシステイン残基から認識され得る。CTLDを有するタンパク質は、必須の(obligatory)SRではないが、いくつかの可溶性タンパク質、例えば、マンノース結合レクチン(MBL)および界面活性タンパク質(SP-AおよびSP-D)などのコレクチンもまた含む。しかし、CTLDは、SRマンノースレセプターであるLOX-1、およびSCARA4に存在することは公知である。

10

## 【0054】

唯一の最新のクラスF SRは、SREC-1である。SREC-1のC末端は、細胞質にある。SREC-1は、細胞質ドメインA、膜貫通ドメインB、および5個のEGF様ドメインMを有する細胞外ドメインを含む。

## 【0055】

SCARA3タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号46である。SCARA3の構造は、SCARA1スプライスパリアントIIに類似しており、N末端細胞質ドメイン、膜貫通ドメイン、スペーサドメイン、コイルドコイルドメイン、およびコラーゲン様ドメインを含む。上記C末端コラーゲン様ドメインのアミノ酸残基440~543および513~572は、切断およびポリアデニル化特異的因子3(cleavage and polyadenylation-specific factor 3)(CPSF3)などのリガンドの結合部位、ならびにX連鎖アポトーシス抑制タンパク質(X-linked inhibitor of apoptosis protein)(XIAP)を含む。

20

## 【0056】

CD36タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号47である。上記CD36タンパク質は、アミノ酸155~183、アミノ酸28~93、およびアミノ酸120~155の間にOXLDL結合部位を含む。他の結合部位はまた、アミノ酸93~120の間に存在する。アミノ酸139~184、アミノ酸146~164、およびアミノ酸145~171の間のドメインはまた、PfEMP-1との結合を媒介することが示された。

30

## 【0057】

CD163タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号48である。各別個のSRCRドメインJは、隣接するSRCRドメインの組み合わせと同様に、結合ドメインである。SRCR1ドメインは、アミノ酸1~148によってコードされる。SRCR2ドメインは、アミノ酸149~255によってコードされる。SRCR3ドメインは、アミノ酸256~362によってコードされる。SRCR4ドメインは、アミノ酸363~469によってコードされる。

## 【0058】

CD68タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号49である。上記LAMP様ドメインKおよび上記ムチン様ドメインLはともに、結合部位である。

40

## 【0059】

LOX-1タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号50である。上記CタイプレクチンドメインGは、結合部位である。

## 【0060】

SREC-1タンパク質のアミノ酸配列は、配列番号51である。各EGF様ドメインMは、結合部位である。EGF様ドメインは、30~40アミノ酸残基および2~3個のジスルフィド結合を含み、2つのシート構造を有する。

## 【0061】

合成抗生物質とは異なり、上記SRは、ヒト病原体と共進化してきており、パターン認識レセプターとして、特に細菌性病原体に対して作用することによって、先天性免疫防御

50

の重要な部分を構成する。いくつかのSRは、マクロファージおよび樹状細胞上で発現され、ここではそれらは、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌を含む病原性微生物、細胞内細菌およびウイルスのRNAの結合および取り込みを媒介するファゴサイトレセプターとして作用する。SRはまた、Toll様レセプター(TLR)に対する共レセプターとして作用し、TLRアゴニストに対する炎症応答を調節する。SRは、一般に、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌の表面にそれぞれ存在するリポポリサッカリド(LPS)およびリポタイコ酸(LTA)を結合することが報告されている。近年のデータから、細菌表面タンパク質はまた、SRにとっての重要な標的分子として作用することが示されている。さらに、細胞内病原体(ウイルスおよび*Plasmodium falciparum*が挙げられる)は、SRを使用して、宿主細胞への進入を獲得し、従って、細胞内病原体にとってSR結合が必須となる。ヘパリン硫酸などの非特異的細菌リガンドとは異なって、SRは、複数の病原性リガンドのそれらの認識に加えて標的病原体への強い結合を示し、このことは、血液から体外へ細菌を除去するにあたって使用するための良好な候補にする可能性がある。

10

20

30

40

50

#### 【0062】

本開示は、病原性因子の治療および診断として、進化的に保存されたSR系を使用する。関連する天然の哺乳動物SRおよびキメラSRの例を発現する多くの組換え細胞系が、樹立される。これらのSRを固相(例えば、ビーズマトリクス、平らな表面もしくは機械)に末端結合させる(end-point attach)技術もまた、開発されてきた。従って、体外血液処置などの治療のために使用され得るアフィニティー媒体を作り出すことは、実現可能である。

#### 【0063】

本明細書で開示されるのは、病原体に結合するために使用され得る組換えキメラタンパク質である。簡潔には、各タンパク質は、スカベンジャーレセプターに由来する病原体認識モジュール(PRM)を含む。各タンパク質はまた、上記キメラタンパク質を支持体の適所に固定するためのアンカードメインを含む。これらのタンパク質は、キメラスカベンジャーレセプター(cSR)といわれ得る。

#### 【0064】

上記病原体認識モジュールは、哺乳動物スカベンジャーレセプターの結合ドメインに由来し得、これにより、病原体もしくは病原体由来分子の特定の群に適合するように調整され得る。例えば、上記結合ドメインは、クラスAスカベンジャーレセプターメンバー2(SCARA2)(*Clostridium sordelli*を結合することが公知)のもの、またはクラスBスカベンジャーレセプターメンバーLOX-1(*S. aureus*を結合することが公知)のものであり得る。上記の結合ドメインは、特定の原子もしくは分子に結合する。図1Aおよび図1Bに図示されるスカベンジャーレセプターの一部を参照すると、上記の結合ドメインのうちのいずれも、病原体認識モジュールとみなされ得る。特定の実施形態において、上記病原体認識モジュールは、上記キメラレセプタータンパク質のC末端に位置する。

#### 【0065】

上記アンカードメインは、直接的もしくは間接的のいずれかで上記病原体認識モジュールに結合し、固相もしくは支持体に上記タンパク質を末端固定化するために使用される。上記アンカードメインはまた、上記病原体認識モジュールの限られた特異的再配置(reconfiguration)を可能にし得るか、または複数のPRMが単一の標的分子に結合することを可能にし得る。上記アンカードメインは、いくつかの実施形態において、免疫グロブリンのFc領域であり得る。他の特定の実施形態において、上記アンカードメインは、哺乳動物SR由来のコイルドコイルドメイン(図1Aでは文字D)である。あるいは、上記アンカードメインは、アフィニティータグ(これは、本明細書でさらに記載される)であり得る。上記アンカードメインは、代表的には、上記キメラタンパク質の一方の末端にある。

#### 【0066】

具体的な企図される実施形態において、上記病原体認識モジュールおよび上記アンカードメインは、種々のクラスAスカベンジャーレセプタータンパク質から得られる。

【0067】

所望であれば、上記病原体認識モジュールと上記アンカードメインとの間にリンカーが存在し得る。このリンカーは、上記cSRの上記PRMと上記アンカードメインとの間の距離を増加させ、これにより、種々の病原体特異性および結合強度を可能にする。上記リンカーはまた、製造の間の正確なタンパク質折りたたみおよび分泌を可能にする。いくらかの実施形態において、上記リンカーは、約2～約15アミノ酸の長さを有する配列であり得る。上記リンカーは、少なくとも2つの異なるアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態において、上記リンカーは、アラニン(A)、ヒスチジン(H)、およびグリシン(G)からなる群より選択される少なくとも2つの異なるアミノ酸を含む。有用なリンカー配列のうちの5つの非限定的例は、SVEA(配列番号1)、DMDF(配列番号2)、GAAGG(配列番号11)、AAGG(配列番号12)、およびHHK(配列番号14)である。

10

【0068】

さらに、上記cSRは、1個以上のアフィニティータグを、上記タンパク質と協力して(in tandem with)(すなわち、その一方の末端に)、もしくは上記タンパク質内の位置に(例えば、上記PRMと上記アンカードメインとの間に)、のいずれかで含み得る。アフィニティータグは、上記キメラタンパク質がアフィニティー技術を使用して精製される、および/または既知の配向でアフィニティー表面に結合させることを一般に可能にする配列である。いくつかの異なる種類のアフィニティータグが、当該分野で公知である。特定の実施形態において、上記アフィニティータグは、ヘマグルチニン、Avitag<sup>TM</sup>、V5、Myc、T7、FLAG、HSV、VSV-G、His、ピオチン、もしくはSTREPからなる群より選択される。上記ヘマグルチニータグの配列は、配列番号22として提供される。上記Avitag<sup>TM</sup>の配列は、配列番号32として提供される。上記V5タグの配列は、配列番号23として提供される。上記Mycタグの配列は、配列番号24として提供される。上記FLAGタグの配列は、配列番号25として提供される。上記HSVタグの配列は、配列番号26として提供される。上記VSV-Gタグの配列は、配列番号27として提供される。上記Hisタグの配列は、配列番号28として提供される。上記T7タグの配列は、配列番号29として提供される。上記ピオチンタグの配列は、配列番号30として提供される。上記STREPTAGの配列は、配列番号31として提供される。1種より多くのアフィニティータグが縦に並んで使用される場合、リンカー配列は、上記アフィニティータグを上記病原体認識モジュールおよびアンカードメインに結合させるように存在し得る。例として、上記アフィニティータグHis(配列番号28)とピオチン(配列番号30)との間の上記リンカーは、配列番号13である。上記アンカードメインがアフィニティータグであり得ることに注意すべきである。

20

30

【0069】

上記キメラタンパク質はまた、合成している細胞において、上記タンパク質の分泌および/もしくは輸送を誘導するために使用されるシグナルペプチドを含み得る。上記シグナルペプチドは、上記キメラタンパク質の一方の末端に位置し得る。このようなシグナルペプチドの2つの例は、TIMP2由来のペプチドおよびBM-40タンパク質(それぞれ、配列番号15および配列番号16)である。

40

【0070】

本明細書で開示されるcSRの上記病原体認識モジュールおよび上記アンカードメインは、各々異なる哺乳動物SRに由来しているので、本開示は、天然のSRを包含するとは意図しないことに注意すべきである。これは、用語「組換え」および「キメラ」の使用によって示され、上記タンパク質が人工的に作りだされ、種々のタンパク質の機能的ユニットおよびフラグメントを含み得るという事実に言及する。図1Aおよび図1Bに示されるとおりのSRは、本開示の範囲から具体的に排除される。

【0071】

50

本明細書で開示されるのはまた、上記のキメラタンパク質をコードする核酸配列である。上記核酸配列は、DNAもしくはRNAであり得る。当該分野で公知であるように、タンパク質中のアミノ酸の配列は、上記タンパク質を生成するために転写および/もしくは翻訳される上記核酸配列によって規定される。上記核酸配列中のヌクレオチドの各トリプレットは、公知であるように特定のアミノ酸を示すので、適切な核酸配列は、上記タンパク質が公知であれば公知であり、その逆もまた同様である。

#### 【0072】

本開示のキメラタンパク質は、上記cSRヌクレオチド配列を発現ベクター（これは、その後、宿主細胞へとトランスフェクトされる）へと挿入することによって生成され得る。例示的なベクターとしては、プラスミドおよびウイルスが挙げられる。上記キメラタンパク質は、次いで、上記宿主細胞によって生成され、その後、単離され得る。これらの方法は、当業者に周知である。

10

#### 【0073】

上記キメラタンパク質は、キメラタンパク質および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物を作製するために使用され得る。上記キャリアは、注射用キャリア、局所キャリア、経皮キャリアなどであり得る。上記調製物は、有利なことには、局所投与のための形態（例えば、軟膏、ゲル、クリーム、スプレー、分散物、懸濁物もしくはペースト）であってよい。上記調製物は、さらに有利なことには、保存剤、抗菌剤、抗真菌剤、抗酸化剤、浸透圧剤（osmotic agent）、ならびに従来どおり組成および量が類似の材料を含み得る。本開示に従う使用に適した溶液は、無菌であり、提唱される適用に有害ではなく、滅菌などの従来製の製薬操作に供され得る、および/または従来製の補助物質（例えば、防腐剤、保存剤、湿潤剤、乳化剤、緩衝剤など）を含み得る。本開示の組成物を製剤化する補助に関しては、Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. (1975)が参照され得る。

20

#### 【0074】

上記キメラタンパク質は、アフィニティー媒体（これは、抗病原体イムノアドヘシン（API）と本明細書でいわれ得る）を作製するために支持体もしくは固相に固定化され得る。上記キメラタンパク質のアンカードメインを、上記固相に結合し、上記病原体認識モジュールがその特定の病原体もしくは病原体由来分子と相互作用することを可能にする。上記固相は、例えば、ビーズ、シートもしくはストリップ、ひだ付きのシートなどの形態であってよい。

30

#### 【0075】

上記キメラタンパク質を使用するための方法もまた、企図される。病原体もしくは病原体由来分子と関連する疾患を予防もしくは処置するための1方法は、上記に記載されるとおりのアフィニティー媒体を要する。それは、固相および上記固相に結合した1種もしくは複数のcSRを構成する。各キメラタンパク質（cSR）は、病原体認識モジュールおよびアンカードメイン、ならびに必要なに応じて、1つまたは複数のリンカーを含む。生物学的サンプル（例えば、血液）を、罹患した個体から取り出し、上記アフィニティー媒体と接触させて、上記サンプル中に含まれる任意の病原体もしくは病原体由来分子を結合する。この後、上記サンプルは、結合した粒子を除いて上記罹患した個体に戻される。このことは、上記キメラタンパク質が標的とする上記病原体/病原体由来分子を上記生物学的サンプルから除去することを可能にする。必要なに応じて、上記アフィニティー媒体は、次いで、本明細書で開示されるとおりに結合した分子を溶離することによって再生することができ、その後、同じ目的もしくは異なる目的で上記媒体を再使用し得る。

40

#### 【0076】

上記キメラタンパク質はまた、病原体もしくは病原体由来分子と関連する疾患の予防もしくは処置のための医薬として使用され得る。このような実施形態において、1種もしくは複数のcSRは、先に記載されるとおりの薬学的組成物にアフィニティー媒体を有してまたは有さずに使用される。上記アフィニティー媒体は、さらにそれ自体が上記標的病原

50

体に対して直接的もしくは間接的な効果を有し得、その結果、上記 c S R は、上記固相を特定の生物もしくは分子にもたらず。上記薬学的組成物は、局所に適用されるか、または上記病原体もしくは病原体由来分子の局在によって規定される ( d i c t a t e d ) とおりに適用される。例えば、本開示の一実施形態において、ヒト免疫不全ウイルス ( H I V ) に対して高い親和性を有する選択された c S R を含むクリーム剤は、H I V を不活性化するために、および/もしくは宿主細胞へのその進入を妨げるために、生殖器領域に適用され得る。本開示の別の実施形態において、細菌に結合することが公知の 1 種もしくは複数の c S R を含むゲル剤は、創傷治癒に干渉する細菌を固定化および/もしくは破壊するために、創傷包帯に組み込むことができる。上記薬学的組成物は、予防適用もしくは治療適用のために使用され得る。

10

#### 【 0 0 7 7 】

病原性因子に対する試験アフィニティー媒体の効力を決定するための方法もまた、企図される。上記病原性因子を含む生物学的サンプルが受容される。上記生物学的サンプルを、次いで、病原体認識モジュールを含む試験アフィニティー媒体と接触させる。上記病原性因子と上記病原体認識モジュールとの間の結合の量は、例えば、比色計、連結した二次抗体、表面プラズモン共鳴画像化、もしくは高圧液体クロマトグラフィー ( H P L C ) などの免疫組織化学的手段を使用することによって、検出/測定される。上記病原性因子と上記試験アフィニティー媒体の病原体認識モジュールとの間の結合の量は、参照と比較され得る。上記アフィニティー媒体へのリガンドの結合は、上記アフィニティー媒体が、上記病原性因子を固定化/標的化するにあたって有用である可能性があることを示す。あるいは、サンプル中に残っている、生きている病原体の量もしくは上記サンプルがエキソピボで (例えば、単離された P B M C ) 組織において反応を誘導する能力は、上記アフィニティー媒体の上に上記サンプルを通過させた後に決定され得る。生きている病原体の量が少ないこともしくは反応がより良好であることは、上記アフィニティー媒体が、上記病原体もしくは病原性因子の量の低減に有効であり得ることを示す。このタイプの試験はまた、上記病原体認識モジュールを発現する試験細胞を使用して行うことができる。上記試験細胞はまた、上記病原体認識モジュールを通じて機能するシグナル伝達手段を含む。次いで、シグナル伝達のレベルは、結合の程度を示す。シグナル伝達の低下は、上記試験細胞によって発現される特定の c S R が上記病原性因子を固定化するための良好な候補であることを示す。

20

30

#### 【 0 0 7 8 】

上記キメラタンパク質の例示的な使用は、図 2 に示される。ここで上記キメラタンパク質を、固相に結合させ、S R A 1 および S R A 2 と表示されたカラム中のフィルタとして使用する。血漿分離デバイス (例えば、サイズ排除フィルタ) は、患者から採血し、その血液を分離して、上記病原体を含む血漿を得る。次いで、上記血漿を、体外循環ポンプを介して上記 S R A 1 のフィルタもしくは上記 S R A 2 のフィルタのいずれかへと通過させ、ここで上記病原体は、上記血漿から除去される。次いで、上記血漿は、上記血漿分離デバイスに戻され、上記患者に戻される。カラムスイッチ切り替えデバイスが存在する。これは、上記フィルタのうち的一方が再生されるその一方で、他方のフィルタが上記血漿を清浄にすることを可能にする。フィルタは、例えば、低 p H グリシン - H C l 混合物での溶離、続いて、P B S での洗浄によって清浄にすることができる。各フィルタへの投入物は、( i ) 血漿もしくは ( i i ) クリーニング溶液のいずれかである。各フィルタからの産出物は、( a ) 清浄にした血漿もしくは ( i i ) 廃棄溶液のいずれかである。抗凝固剤は、任意選択であるが、ここでは示されている。分画ヘパリン、クエン酸塩および/もしくは他のこのような抗凝固剤および方法は、当業者に周知である。

40

#### 【 0 0 7 9 】

本開示の局面は、以下の実施例を参照することによってさらに理解され得る。実施例は例示であって、その実施形態を限定することは意図されない。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 8 0 】

50

## (実施例 1)

実施例 1 . 部分的 M A R C O アンカーを有する M A R C O P R M

## 【0081】

c S R 短縮型可溶性 M A R C O (配列番号 7) をコードする構築物を、確立された分子生物学的方法によって生成した。上記構築物は、p c D N A 3 . 1 / Z e o ( - ) 哺乳動物発現ベクター ( I n v i t r o g e n ) の中に以下のエレメントを含んでいた：

## 【0082】

1) B M - 4 0 タンパク質由来の分泌シグナルペプチド (配列番号 1 6) ；

## 【0083】

2) タンパク質精製のための 8 ヒスチジン長タグおよびリンカー (配列番号 2 8 および配列番号 1 4) ；

## 【0084】

3) 残基 3 0 0 ~ 4 1 9 (ヌクレオチド 8 9 7 ~ 1 2 5 7) (配列番号 2 1) が欠失したマウス M A R C O 残基 7 5 ~ 5 1 8 の細胞外部分 (ヌクレオチド 2 2 3 ~ 1 5 5 7 に対応する)。M A R C O のこの形態は、マウス M A R C O の 8 9 反復長のコラーゲン様ドメインのうちの最後の 4 0 個の G l y - X - Y 反復を欠いており、膜貫通タンパク質として、プロトタイプスカベンジャーレセプターリガンド、熱殺菌した ( h e a t - k i l l e d ) E . c o l i およびアセチル化 L D L (低比重リポタンパク質) の強力な結合因子であることが示された。

## 【0085】

類似の c S R 短縮型可溶性ヒト M A R C O 配列を配列番号 8 として示す。この類似配列のヒト M A R C O 部分を配列番号 3 2 として示す。

## 【0086】

## (実施例 2)

実施例 2 . S C A R A 5 アンカーを有する S R - A P R M

## 【0087】

マウス S R - A 1 S R C R (スカベンジャーレセプターシステインリッチ) ドメイン (配列番号 9) を有する c S R 可溶性マウス S C A R A 5 をコードする構築物をまた、p c D N A 3 . 1 / Z e o ( - ) ベクターへとクローニングした。上記構築物は、以下のエレメントを含む：

## 【0088】

1) T I M P 2 タンパク質由来の分泌シグナルペプチド (配列番号 1 5) ；

## 【0089】

2) タンパク質精製のための 6 ヒスチジン長タグおよびリンカー (配列番号 2 8 および配列番号 1 3) ；

## 【0090】

3) マウス S C A R A 5 の細胞外部分 (上記タンパク質の S R C R ドメインが、マウス S R - A 由来の S R C R ドメインで置き換えられていることを除く)。言い換えると、このキメラバージョンは、S C A R A 5 由来の残基 8 3 ~ 3 8 0 (ヌクレオチド 2 4 7 ~ 1 1 4 0)、続いて、S R - A 由来の S R C R ドメイン (ヌクレオチド 1 0 3 5 ~ 1 3 6 2 に対応する残基 3 4 5 ~ 4 5 4) (配列番号 3 3) を含んだ。膜貫通タンパク質として、S C A R A 5 のこの形態は、図 1 1 を参照しながら本明細書でさらに考察されるように、熱殺菌した E . c o l i およびアセチル化 L D L を強力に結合する (インタクトな S C A R A 5 より強い)。

類似の c S R 短縮型可溶性ヒト S C A R A 5 配列を、配列番号 1 0 として示す。この類似配列のヒト S C A R A 5 部分を、配列番号 3 4 として示す。

## 【0091】

## (実施例 3)

実施例 3 . S C A R A 5 の細胞外部分を有する S C A R A 5 P R M

## 【0092】

10

20

30

40

50



上記 c S R 可溶性マウス S C A R A 5 ( 配列番号 5 ) をコードする構築物を、確立された分子生物学的方法によって生成した。上記構築物は、p c D N A 3 . 1 / Z e o ( - ) 哺乳動物発現ベクター ( I n v i t r o g e n ) に以下のエレメントを含んでいた：

【 0 0 9 3 】

1 ) T I M P 2 タンパク質由来の分泌シグナルペプチド ( 配列番号 1 5 ) ；

【 0 0 9 4 】

2 ) タンパク質精製のための 6 ヒスチジン長タグおよびリンカー ( 配列番号 2 8 および配列番号 1 3 ) ；

【 0 0 9 5 】

3 ) マウス S C A R A 5 残基 8 3 ~ 4 9 1 ( ヌクレオチド 2 4 7 ~ 1 4 7 6 に対応する ) の細胞外部分 ( 配列番号 1 9 ) 。 図 1 1 および 図 1 2 に示されるように、膜貫通タンパク質として、S C A R A 5 は、熱殺菌した E . c o l i を結合して L P S をインターナライズし得る。

10

【 0 0 9 6 】

類似の c S R 可溶性ヒト S C A R A 5 配列を、配列番号 3 として示す。ヒト S C A R A 5 配列を、配列番号 1 7 として示す。

【 0 0 9 7 】

( 実施例 4 )

実施例 4 . S C A R A 5 の短縮型細胞外部分を有する S C A R A 5 P R M

【 0 0 9 8 】

20

c S R 可溶性短縮型マウス S C A R A 5 ( 配列番号 6 ) をコードする構築物を、確立された分子生物学的方法によって生成した。上記構築物は、p c D N A 3 . 1 / Z e o ( - ) 哺乳動物発現ベクター ( I n v i t r o g e n ) の中に以下のエレメントを含んでいた：

【 0 0 9 9 】

1 ) T I M P 2 タンパク質由来の分泌シグナルペプチド ( 配列番号 1 5 ) ；

【 0 1 0 0 】

2 ) タンパク質精製のための 6 ヒスチジン長タグおよびリンカー ( 配列番号 2 8 および配列番号 1 3 ) ；

【 0 1 0 1 】

30

3 ) マウス S C A R A 5 残基 3 4 1 ~ 4 9 1 ( ヌクレオチド 1 0 2 1 ~ 1 4 7 6 に対応する ) の短縮型細胞外部分 ( 配列番号 2 0 ) 。 図 1 1 および 図 1 2 に示されるように、膜貫通タンパク質として、S C A R A 5 は、熱殺菌した E . c o l i を結合して L P S をインターナライズし得る。

【 0 1 0 2 】

類似の c S R 可溶性ヒト S C A R A 5 配列を、配列番号 4 として示す。ヒト S C A R A 5 配列を、配列番号 1 8 として示す。

【 0 1 0 3 】

( 実施例 5 )

実施例 5 . 使用される c S R の発現

40

【 0 1 0 4 】

プラスミドを、リン酸 C a トランスフェクション法で 2 9 3 / E B N A 細胞 ( I n v i t r o g e n ) へとトランスフェクトした。トランスフェクションの 1 日後、細胞を、種々の密度で 1 0 c m 組織培養プレートに播種し、ゼオシン ( 5 0 0 μ g / m l ) での選択を翌日に開始した。2 週間後、クローンを、クローニングシリンダーで拾い上げ、増殖させた。上記クローンを、免疫蛍光染色および E L I S A で組換えタンパク質発現についてスクリーニングした。第 1 の方法は、発現のレベルが高いほど、より多くのタンパク質が細胞内分泌経路に蓄積して存在するという仮定に依拠した。E L I S A に関しては、9 6 ウェルプレートを、細胞培養上清で被覆し、E L I S A を、M A R C O ( 短縮型 M A R C O クローンについて ) の S R C R ドメインに対するモノクローナル抗体を用いて、または

50

S C A R A 5 の C 末端に対するポリクローナル抗体を用いて行った。最高に発現したものを増殖させ、タンパク質生成に使用した。ゼオシン選択を、最初の選択後に  $250 \mu\text{g}/\text{ml}$  へと低下させた。

【0105】

(実施例6)

実施例6．HEK-293 EBNA細胞における使用されるHISタグ化cSRの生成

【0106】

上記Hisタグ化タンパク質を細胞培養培地へ放出する、選択された細胞系を、10%ウシ胎仔血清(FCS)、ペニシリン-ストレプトマイシン(PS)およびビルビン酸ナトリウムを補充したGlutamax-1を含むDMEM(これは、本明細書で通常培地といわれる)中で単層として成長させた。上記細胞培養培地はまた、適切な選択用抗生物質(EBNA細胞の維持のために $250 \mu\text{g}/\text{ml}$  G418、 $125 \mu\text{g}/\text{ml}$  ゼオシン、または $3 \mu\text{g}/\text{ml}$  ビューロマイシン)を含み、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアスコルビン酸(コラーゲン様配列を含むタンパク質に関してのみ)を毎日添加した。コンフルエントになったら、上記培地を採取し、細胞碎片を遠心分離した( $1000 \text{rpm}$ , 5分間)。透明になった培地を、+4 もしくは-20 で、精製するまで貯蔵した。細胞プレートのうちの1枚を、1:4~1:6にさらに分け、DMEM中でコンフルエントになるまで成長させた。

【0107】

他のプレートでは、採取した培地を、Glutamax-1、PS、ビルビン酸ナトリウム、およびアスコルビン酸を補充した無血清DMEM/F-12(1:1)で置き換えた。この無血清細胞培養培地を培養の3日後に採取した。可能であれば、その細胞を、さらなるタンパク質生成のために、新鮮な無血清培地を重層した。

【0108】

(実施例7)

実施例7．使用されるHISタグ化cSRの精製

【0109】

上記細胞培養培地を濾過し、1xリン酸緩衝液( $50 \text{mM}$  リン酸ナトリウム、 $150 \text{mM}$  NaCl、 $\text{pH} 7.0$ )で平衡化したTalonマトリクスを詰めたカラムに注入した。注入後、結合しなかったタンパク質を、 $10 \sim 15 \text{mM}$  イミダゾールを含む2xリン酸緩衝液で洗浄した。上記Hisタグ化タンパク質の溶離のために、イミダゾール濃度を $200 \text{mM}$ へと上げた。溶離後、目的のタンパク質を含む画分を、SDS-PAGEで同定し、プールし、PBSに対して透析して、イミダゾールを除去した( $3 \times 2$ 時間、緩衝液の $1000 \times$ 容)。別個の精製を、血清ありおよび血清なしのサンプルに関して行った。

【0110】

(実施例8)

実施例8．実施例1のcSRを使用するアフィニティー媒体(API)の生成

【0111】

この組の実験では、Talon Superflow金属アフィニティー樹脂(Clontech)を固相として使用して、アフィニティー媒体を作製した。そのビーズの能力は、 $5 \sim 20 \text{mg}$  タンパク質/ $\text{ml}$  樹脂の間であった。

【0112】

細菌除去実験のために、 $1 \text{ml}$ の樹脂に、2リットルの細胞培養培地から(通常培地(NM)もしくは無血清培地(SF)のいずれかから)精製した実施例1のキメラタンパク質をカップリングさせた。2セットのビーズを作った(一方は、NM中で生成したタンパク質を使用し、他方は、SF中で生成したタンパク質を使用した)。

【0113】

PBSに対して透析した上記精製キメラタンパク質を、上記ビーズと混合し、+4 で

10

20

30

40

50

一晚回転させた。結合の後、上記ビーズを、上記懸濁物を重力でカラムを通して流すこと  
によって集めた。上記ビーズをすすぎ、1 : 1 容の P B S で懸濁した。サンプルを、上記  
懸濁物から採取し、2 つの異なる方法 : S D S - P A G E 上の染色したタンパク質バンド  
に関してはデンシトメトリーおよび溶離したタンパク質に関しては B r a d f o r d アッ  
セイを使用して、上記ビーズに結合したタンパク質の量を分析した。10  $\mu$  l のビーズを  
、S D S ローディング緩衝液と混合し、一定量をゲルにロードした。この例では、0 . 1  
25  $\mu$  l のビーズをゲルにロードした。上記デンシトメトリーの推定 ( 図 3 ) に基づけば  
、結合したタンパク質の濃度は、約 8  $\mu$  g タンパク質 /  $\mu$  l ビーズであった。B r a  
d f o r d アッセイの標準曲線 ( 図 4 ) に基づけば、上記溶離したタンパク質の濃度は、  
2 . 1  $\mu$  g /  $\mu$  l ビーズ ( 無血清 ) および 2 . 8  $\mu$  g /  $\mu$  l ビーズ ( 通常培地 ) であ  
った。上記溶離したタンパク質の O D 5 9 5 は、それぞれ、0 . 1 7 8 および 0 . 2 3 9  
であった。

10

## 【 0 1 1 4 】

図 3 は、上記デンシトメトリー推定に使用した S D S - P A G E を示す。レーン 1 ~ 7  
( 左から ) は、記された濃度でのタンパク質 ( B S A ) を、 $\mu$  g / レーンの単位で含んだ  
。S F と記されたレーンは、無血清培地からのキメラタンパク質を使用した。N M と記さ  
れたレーンは、通常培地からのキメラタンパク質を使用した。S t d と記されたレーンは  
、分子量標準を示す。

## 【 0 1 1 5 】

図 4 は、B r a d f o r d アッセイ標準曲線を示す。上記標準曲線を、三連の種々の B  
S A 濃度で作製し、その平均に基づいて式を得た。O D 5 9 5 とは、5 9 5 n m で測定さ  
れる吸光度をいう。

20

## 【 0 1 1 6 】

( 実施例 9 )

実施例 9 . 実施例 8 から得られるアフィニティー媒体 ( A P I ) の細菌除去能力

## 【 0 1 1 7 】

カップリングしたビーズ ( N M および S F ) および空のコントロールビーズを、P B S  
ですすぎ、ヒト血清 ( これは、不活性化されていない ) 中でインキュベートして上記ビー  
ズを平衡化した。上記ビーズを、+ 4 で一晚回転させた。翌日、4 種の細菌 ( E S B L  
E . c o l i 、S . p n e u m o n i a e 、多剤耐性 S . a u r e u s ( M R S A ) 、  
および N . m e n i n g i t i d i s ) を、O D = 0 . 5 ( 約  $3 \times 10^8$  C F U / m l )  
( ) になるまで成長させた。上記細菌を、約  $10^3$  C F U / m l になるまでヒト血清中で  
希釈し、氷上で維持した ( 注 : 「  $10^n$  」は、10 の n 乗をいうために本明細書で使用さ  
れている ) 。

30

## 【 0 1 1 8 】

各細菌懸濁物に関して、コントロール量 5 0 0  $\mu$  l を、振盪機上で + 3 7 において  
1 0 分間にわたってインキュベートした。生細胞数計測を、このコントロールに対して行  
った。

## 【 0 1 1 9 】

次いで、5 0 0  $\mu$  l の上記細菌懸濁物を、5 m l カラム中の 1 0 0  $\mu$  l の被覆ビーズに  
添加し、振盪機上で + 3 7 において 1 0 分間にわたってインキュベートした。上記ビー  
ズを遠心分離し ( 1 0 0 0 r p m , 1 分間 ) 、上記細菌懸濁物を、上記ビーズから押し  
出した ( 画分 1 ) 。次いで、上記ビーズを、2 0 0  $\mu$  l の P B S で 5 回、5 0 0  $\mu$  l P  
B S で 1 回、および P B S 中の 2 0 0 m M イミダゾール ( p H 8 ) 5 0 0  $\mu$  l で 2 回  
洗浄した ( 画分 2 ~ 9 ) 。最後に、上記ビーズを 5 0 0  $\mu$  l の P B S に再懸濁した ( 画分  
1 0 ) 。各画分に対して生細胞数計測を行い、曲線上にプロットした。これは、上記 3 種  
のビーズ ( N M 、 S F 、およびコントロール ) の各々に対して行った。

40

## 【 0 1 2 0 】

その結果を、各細菌およびビーズの各組に関して別個に図 5 に示す。4 つの並び ( r o  
w ) があり、上記細菌に対応する。左の縦列 ( c o l u m n ) は、各画分中の生細胞数を

50

提供する。これらのグラフの y 軸は、適用に対する % であり、100% は、上記コントロール中の生細胞数に対応する。x 軸は、画分である。y 軸は各グラフで異なることに注意のこと。青色の線は、上記コントロールビーズである。赤色の線は、上記 NM ビーズである。緑色の線は、上記 SF ビーズである。左の縦列におけるこれらのグラフは、上記細菌が上記ビーズからどの程度迅速に洗い出され得るか（これは、上記キメラタンパク質が上記細菌にどの程度強く結合しているかの尺度である）を本質的に示す。線がゼロに向かって傾いていく程度によって示されるように、上記 *E. coli*、MRSA、および *N. meningitidis* は、上記ビーズから類似の速度で洗浄される一方で、上記 *S. pneumoniae* は、上記 SF ビーズもしくは NM ビーズからよりゆっくりと除去されている。このことから、上記キメラタンパク質は、*S. pneumoniae* に対して非常に強く結合していると解釈され得る。y 軸によって示されるように、上記適用に対する % は、*E. coli*、MRSA、および *N. meningitidis* のコントロールビーズに関してより高く、このことは、上記コントロールビーズによって死滅させられた細菌がより少ないことを示す。

10

#### 【0121】

右の縦列は、500  $\mu$ l 懸濁物中で生き残っている細菌の数を提供する。これらのグラフ中の y 軸は、生存 % であり、100% は、上記懸濁物を、ビーズを通して押し出す前に、上記懸濁物中で生きていた細菌の全てに対応する。バーは、上記ビーズが除去された後にもなお存在する細菌の量 (%) を表す（上記コントロールに関する生細胞数もまた、これらの懸濁物に適用されると推測する）。y 軸は各グラフで異なることに注意のこと。*E. coli* に関しては、上記キメラタンパク質は、上記コントロールよりも上記懸濁物から生きていた細菌のはるかに高い割合を除去し、上記 SF 培養タンパク質は、上記 NM 培養タンパク質よりほぼ 50% 高く除去した。MRSA に関しては、上記キメラタンパク質は、上記コントロールより多くの細菌を除去した。*S. pneumoniae* に関しては、上記 3 種のビーズ間の差は、それほど有意ではなかった。*N. meningitidis* に関しては、上記キメラタンパク質は、上記コントロールと比較して、細菌の大きな割合を除去した。

20

#### 【0122】

(実施例 10)

実施例 10 . 実施例 2 の cSR を使用するアフィニティー媒体 (API) の細菌除去能力

30

#### 【0123】

キメラタンパク質を生成し、精製し、実施例 6 ~ 8 に記載されるとおりに上記ビーズにカップリングした。このキメラタンパク質は、SCARA5 アンカードメインを有する SR - A PRM を含んだ。結合した上記タンパク質の濃度は、デンストメトリーに基づいて 4.2  $\mu$ g /  $\mu$ l ビーズ、Bradford 分析に基づいて 1.5  $\mu$ g /  $\mu$ l ビーズであると測定された。細菌除去アッセイを、実施例 9 に記載されるとおりに行った。しかしこの実験では、200  $\mu$ l の被覆ビーズを使用した。コントロールビーズを、ヒト血清とともに予備インキュベートした。

40

#### 【0124】

その結果を、各細菌およびビーズの各組について別個に、図 6 に示す。繰り返すと、上記細菌に対応する 4 つの並びがある。左の縦列は、各画分中の生細胞数を提供する。これらのグラフ中の y 軸は、適用に対する % であり、100% は、上記コントロール中の生細胞数に対応する。x 軸は、画分である。y 軸は各グラフで異なることに注意のこと。青色の線は、上記コントロールビーズである。赤色の線は、上記キメラタンパク質を有するビーズである。繰り返すと、上記 *S. pneumoniae* は、非常にゆっくりと除去された。このことから、上記キメラタンパク質は、*S. pneumoniae* に非常に強く結合すると解釈され得る。y 軸によって示されるように、適用に対する % は、MRSA および *N. meningitidis* に対するコントロールビーズに関してはより高く（除去される細菌を示す）上記コントロールビーズによって死滅させられる MRSA および *N. m*

50

*meningitides* はより少なかった。

【0125】

右の縦列は、500  $\mu$ l 懸濁物中で生き残っていた細菌の数を提供する。これらのグラフ中の y 軸は、生存%であり、100%は、上記懸濁物を、上記ビーズを通して押し出す前に、上記懸濁物中で生きていた細菌の全てに対応する。バーは、ビーズが除去された後にもなお存在する細菌の量(%)を表す(上記コントロールに関する生細胞数もまた、これらの懸濁物に適用されると推測する)。y 軸は各グラフで異なることに注意のこと。MRSA および *N. meningitidis* に関しては、上記キメラタンパク質は、上記コントロールより遙かに高い割合の細菌を除去した。除去された細菌の量は、*E. coli* および *S. pneumoniae* に関してはおよそ同じであった。

10

【0126】

(実施例11)

実施例11・実施例3のCSRを使用するアフィニティー媒体(API)の細菌除去能力

【0127】

キメラタンパク質を生成し、精製し、実施例6~8に記載されるとおりに上記ビーズにカップリングした。このキメラタンパク質は、SCARA5 アンカードメインを含んだ。上記ビーズにおけるタンパク質濃度は、0.9  $\mu$ g/ $\mu$ l ビーズであると見積もった。

【0128】

上記カップリングしたビーズおよび空のコントロールビーズを、マトリクスの2ml ベッド容積を有するカラムに詰め、PBSでリンスした。翌日、ESBL *E. coli* をOD=0.5(=3 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU/ml)へと成長させた。上記細菌をPBS中で10<sup>4</sup> CFU/mlへと希釈し、氷上で維持した。

20

【0129】

生細胞計数をこの懸濁物に対して行い、1mlを上記カラムに入れた(画分1)。溶離を2 $\times$ 1mlのPBSで開始して(画分2および画分3)、上記カラムにおいてボイド緩衝液容積を除去した。次いで、上記ビーズを300  $\mu$ lのPBSで3回洗浄した(画分4~6)。これらは、結合していない細菌の大部分を含んだ。その後、上記洗浄を100  $\mu$ l PBSで10回続けた(画分7~16)。これらは、CSR被覆カラムにおける細菌の結合および/もしくは致死(killing)を示す。最後に、上記カラムを、300  $\mu$ lのPBSで20回洗浄した(画分17~36)。最後に、上記ビーズを1mlのPBSに再懸濁して、上記カラムに残留している、生きていた細菌の量を調べた(画分37)。生細胞計測を各画分に対して行い、曲線上にプロットした。これを、上記コントロールビーズおよびCSR被覆ビーズに対しても行った。

30

【0130】

その結果を、ビーズの各組に関して図7に示す。左の縦列は、各画分中の生細胞数を提供する。これらのグラフ中のy軸は、コロニー形成単位(CFU)/mlである。x軸は、画分である。赤色の線は、上記コントロールビーズである。緑色の線は、上記キメラタンパク質を有するビーズである。上記細菌は、上記キメラタンパク質を有するカラムから先に溶離を終える。このことは、より多くの細菌が、上記実験の間に結合しているかもしくは死滅していることを示す。

40

【0131】

右の縦列は、上記ビーズ懸濁物中の生き残っている細菌の数を提供する。これらのグラフ中のy軸は、生存%であり、100%は、上記懸濁物を、上記ビーズを通して押し出す前に、上記懸濁物中で生きていた細菌の全てに対応する。上記キメラタンパク質を有するカラムに残留する*E. coli*の量は、僅かに高い。

【0132】

(実施例12)

実施例12・実施例4のCSRを使用するアフィニティー媒体(API)の細菌除去能力

50

## 【0133】

キメラタンパク質を生成し、精製し、実施例6～8に記載されるように上記ビーズにカップリングした。このキメラタンパク質は、短縮型SCARA5アンカードメインを含んだ。上記ビーズにおけるタンパク質濃度を、 $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$  ビーズと見積もった。

## 【0134】

そのカップリングしたビーズおよび空のコントロールビーズを、マトリクスの1 ml ベッド容積を有するカラムに詰め、PBSですすいだ。翌日、ESBL *E. coli* を、 $OD = 0.5 (= 3 \times 10^8 \text{ CFU} / \text{ml})$  まで成長させた。上記細菌を、非活性化ヒト血清中  $10^3 \text{ CFU} / \text{ml}$  へと希釈し、氷上で維持した。

## 【0135】

上記細菌懸濁物を、2分間にわたって+37 でインキュベートした。次の工程の前にこの材料で生細胞数計測を行った。

## 【0136】

上記細菌懸濁物を上記カラムに適用する前に、上記カラムをヒト血清ですすいだ。その後、 $500 \mu\text{l}$  の上記細菌懸濁物を2分間にわたって+37 でインキュベートし、上記カラムに入れた。溶離を  $2 \times 300 \mu\text{l}$  のPBSで開始して(画分1～2)、上記カラムのポイド緩衝液容積を除いた。次いで、上記ビーズを  $100 \mu\text{l}$  のPBSで12回洗浄した(画分3～14)(上記被覆カラムにおける細菌の結合を示す)。最後に、上記ビーズを1 ml のPBSで再懸濁して、上記カラムに残った生きている細菌の量を調べた。生細胞数計数を、各画分に対して行い、曲線上にプロットした。これを上記コントロールビーズおよびキメラタンパク質被覆ビーズに対して行った。

## 【0137】

その結果を、ビーズの各組に関して図8に示す。左の縦列は、各画分における生細胞数を提供する。これらのグラフのy軸は、適用される濃度の%であり、100%は、上記コントロールにおける生細胞数に対応する。x軸は、画分である。赤色の線は、コントロールビーズの平均である。紫の線は、キメラタンパク質を有するビーズの平均である。組換えタンパク質を有するカラムから溶離した細菌数は、僅かに高い。このことは、実験の間に、上記試験カラムにおいて、上記コントロールよりも結合した細菌が少ないか、または上記コントロールよりも死滅したことを示す。

## 【0138】

右の縦列は、ビーズ懸濁物中に生き残っている細菌の数を提供する。これらのグラフのy軸は、生存%であり、100%は、上記細菌を上記ビーズに添加する前に、上記懸濁物中で生きていた全細菌に対応する。左の縦列に示されるデータとは対照的に、キメラタンパク質を有するカラムの中に残っている *E. coli* の量は、僅かに高い。

## 【0139】

(実施例13)

実施例13．実施例1および実施例2のフロースルー画分に曝されたPBMCの免疫応答性(Immunocompetence)

## 【0140】

実施例9および実施例10で得られた画分を使用して、末梢血単核細胞(PBMC)を処理した。単離されたPBMCをプレートにまき( $10^5$  細胞/ウェル)、翌日、4時間にわたって上記溶離した画分およびゲンタマイシンで処理して、細菌成長を防止した。その細胞培養培地を集め、生成したTNF- $\alpha$ の量を、陽性コントロールとしてリボポリサッカリド(LPS)を使用して、ELISAによって測定した。この実験は、上記カラムを通過した画分がPBMCの免疫応答性をもたらすかどうかを示した。

## 【0141】

実施例1のキメラタンパク質(MARCO由来のPRM+MARCOアンカー)の結果を、図9に示す。y軸は、TNF- $\alpha$ の量( $\text{pg} / \text{ml}$ 単位)である。緑色の線は、コントロールである。紫色の線は、NMビーズである。青色の線は、SFビーズである。ここでの画分10は、上記洗浄全ての後にカラムに残っている細菌懸濁物であった。コントロ

10

20

30

40

50

ールビーズと比較すると、上記 c S R を有するビーズは、画分 10 中の (すなわち、上記ビーズに結合している)、同様に第 1 の画分 (遊離細菌を含む) 中の細菌の全てに対するより高い活性化を示した。上記保存された免疫応答 ( i m m u n o r e s p o n s e ) は、より多くの量の免疫活性化分子が c S R カラム由来の画分中に見いだされたことを示唆し、これは、より低い生細菌数 ( 図 5 および図 6 ) と合わせると、より多くの細菌がこれらの中で破壊されたことを示唆する。

#### 【 0 1 4 2 】

実施例 2 の c S R ( S R - A 由来の P R M + S C A R A 5 アンカー) についての結果を図 10 に示す。緑色の線は、上記コントロールである。紫色の線は、上記キメラタンパク質を有するビーズである。繰り返すと、ここでの画分 10 は、全ての洗浄後に上記カラムに残留している細菌懸濁物であった。上記コントロールビーズと比較すると、上記キメラタンパク質を有するビーズは、画分 10 中の細菌の全て (すなわち、上記ビーズへの結合) および第 1 の画分中の E . c o l i を除く全て (遊離細菌を含む) についてのより高い活性化を示した。

10

#### 【 0 1 4 3 】

( 実施例 1 4 )

実施例 1 4 : S C A R A 5 の膜貫通形態、実施例 2 の c S R ( S C A R A 5 アンカーと P R M としての S C A R A 1 S R C R ドメイン)、および S C A R A 5 アンカーと P R M としての S C A R A 2 S R C R ドメインとを組み合わせることによって作製された c S R による E . c o l i および a c L D L の結合

20

#### 【 0 1 4 4 】

3 種全てのタンパク質を C H O 細胞へとトランスフェクトし、発現させた。比較のために、コントロール細胞は、発現タンパク質を有しなかった。次いで、各細胞タイプを、熱殺菌した E . c o l i およびアセチル化 L D L に曝露し、結合を決定した。抗 S C A R A 5 抗体を使用して、発現タンパク質の存在を実証した。

#### 【 0 1 4 5 】

結果を図 1 1 に示す。上記コントロール細胞は、3 種全ての物質に弱く結合した。インタクトな S C A R A 5 を有する細胞は、E . c o l i に結合し、A c L D L に弱く結合した。上記 S C A R A 5 / S C A R A 2 c S R は、E . c o l i および A c L D L の両方に強く結合した。上記 S C A R A 5 / S C A R A 1 c S R もまた、E . c o l i および A c L D L に強く結合した。上記レセプターを比較すると、上記 2 種の c S R は、インタクトな S C A R A 5 よりも上記リガンドのより高い結合を示した。このことは、S R 結合親和性が本開示によってどの程度改善され得るかを実証する。

30

#### 【 0 1 4 6 】

( 実施例 1 5 )

実施例 1 5 : S C A R A 5 による細菌 L P S のインターナリゼーション

#### 【 0 1 4 7 】

マウス S C A R A 5 トランスフェクト C H O 細胞を、L P S のインターナリゼーションについて試験した。C r u m b s 2 ( C r b 2 ) 発現 C H O 細胞を、陰性コントロールとして使用した。アクチン染色 ( 赤色 ) を使用して、細胞の存在を示した。結果を図 1 2 に示す。「 A b 染色」と記された並びは、成功裏のトランスフェクションおよび発現を示す ( 緑色の染色は、S C A R A 5 および C r b 2 を認識する抗体で得られた )。「L P S インターナリゼーション」と記された並びは、エンドサイトーシス後の細胞内 L P S ( 緑色 ) を示す。これらの結果は、S C A R A 5 が L P S に結合し、これをインターナライズし得ることを初めて実証する。

40

#### 【 0 1 4 8 】

( 実施例 1 6 )

実施例 1 6 : キメラレセプター間での細菌に対する親和性の差

#### 【 0 1 4 9 】

配列番号 4 1、配列番号 4 3、および配列番号 35 のキメラレセプタータンパク質 ( A

50

PI)を、発現および精製し、次いで、実施例8に記載されるようにビーズ(Tal on (登録商標), Clontech, U.S.A.)にカップリングさせた。コントロールとして、タンパク質なしの空のビーズを使用した。

【0150】

上記キメラレセプターとカップリングさせたビーズおよび上記空のコントロールビーズとともに、PBSですすぎ、次いで、ヒト血清(不活性化していない)中で、4で一晚インキュベートした。翌日、4種の細菌(ESBL E.coli、S.pneumoniae、多剤耐性S.aureus(MRSA)、およびビオチン化/熱殺菌したMRSA)を、OD=0.5(約 $3 \times 10^8$  CFU/ml)になるまで成長させた。上記細菌を、ヒト血清中で約 $10^3$  CFU/mlに希釈し、氷上で維持した。

10

【0151】

上記コントロールに関しては、100 $\mu$ lの空のビーズを、500 $\mu$ lのヒト血清とともに10分間にわたって振盪機上で+37においてインキュベートした。生細胞数計数をこのコントロールに対して行った。

【0152】

次いで、500 $\mu$ lの細菌懸濁物を、5mlカラム中の100 $\mu$ lの被覆ビーズに添加し、10分間にわたって振盪機上で+37においてインキュベートした。上記ビーズを、遠心分離し(1000rpm, 1分間)、上記細菌懸濁物を押し出した(画分1)。次いで、上記ビーズを、200 $\mu$ lのPBSで5回洗浄し、次いで、500 $\mu$ l PBSで1回洗浄した(画分2~7)。最後に、上記ビーズを、500 $\mu$ lのPBS中に再懸濁した(画分8)。

20

【0153】

配列番号35のキメラタンパク質をまたビオチン化し、ストレプトアビジン被覆ビーズマトリクス(Pierce Chemical Corp., U.S.A.)に結合させた。このビオチン化タンパク質を、MRSAに対してのみ試験した。

【0154】

生細胞数計数を各画分に対して行い、曲線上にプロットし、各画分のサンプルを、PBM C刺激アッセイ(上記)においても使用した。上記の工程は全て、上記試験されたAPIの各々に対して別個に行った。

【0155】

表1は、示されるとおりの種々のキメラレセプタータンパク質にカップリングさせたビーズを含むカラムを通過させた後の、選択された病原体についての生存率の相対的低下を示す。上記カラムフロースルーから得られたコロニー数を、上記カラムを通過する前の同じストックから得られたコロニー数のパーセンテージとして表す。ビオチン化した、死滅多剤耐性S.aureus(MRSA)を、全体を通じて陰性コントロールとして供した。

30

【表1】

表1.

細菌	生き残っている細菌の相対的数 (%)				
	コントロール	配列番号 NO: 35	配列番号 NO: 43	配列番号 NO: 41	ビオチン化配列番号 NO: 35
<i>E. coli</i>	100	76	95	90	-
<i>S. pneumoniae</i>	100	86	90	77	-
MRSA	100	76	95	90	86
ビオチン化MRSA	0	0	0	0	-

40

【0156】

50



図13および図14は、TNFの単位として表され、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  LPSならびに上記コントロールと比較した、PBMCアッセイの結果を示すグラフである。各グラフは、上記細菌が上記ビーズからどの程度迅速に洗い出され得るか（これは、所定のキメラタンパク質が上記細菌にどの程度強く結合するかの尺度である）を本質的に示す。上記PBMCがどのようにして最後の画分（8）中の増大したTNF生成に応答するかによって示されるように、E. coli、MRSA（生きているおよびビオチン化/熱殺菌したもの）、およびS. pneumoniaeのかなりの数が、洗浄後にもキメラタンパク質を含むビーズ上に残っている。このことは、比較的強い結合を示唆する。

【0157】

このことから、上記キメラタンパク質はS. pneumoniaeに対して非常に強く結合すると解釈され得る。さらに、S. pneumoniaeに関しては、上記コントロールマトリクスへの小さな非特異的結合もまた、洗浄後に観察される。

10

【0158】

種々のAPIに関するTNF応答のパターンによって示されるように、結合親和性は、各細菌種および各APIに関して異なる。

【0159】

図15は、配列番号41、配列番号43、もしくは配列番号35のビオチン化キメラタンパク質とカップリングしたストレプトアビジン被覆ビーズ、または空のコントロールビーズの100マイクロリットル（ $\mu\text{l}$ ）を含むカラムを種々の溶液で洗浄した後の流体に対して抗ビオチン抗体を使用して行ったドットプロットの結果を示す。各場合において、上記ビーズをPBSですすぎ、次いで、ヒト血清（不活性化していない）中で一晩+4においてインキュベートした。多剤耐性S. aureus（MRSA）を、 $\text{OD} = 0.5$ （約 $3 \times 10^8$  CFU/ml）になるまで成長させ、ヒト血清中で約 $10^3$  CFU/mlへと希釈し、氷上で維持した。上記細菌を、製造業者のプロトコルに従ってビオチン化した。ビオチン化の後、細菌を沸騰させることによって死滅させ、実験を、実施例13の生きている細菌に関して記載されたプロトコルを使用して行った。次に、およびPBSでの洗浄に加えて、3種の異なる洗浄溶液を試験した。上記ビーズを、3回、1回目は $1 \times 500 \mu\text{l}$ の500 mM NaClで（洗浄1）、次に、 $1 \times 500 \mu\text{l}$ のpH 5 MES、500 mM NaClで（洗浄2）、および最後に $1 \times 500 \mu\text{l}$ のpH 3 グリシンで（洗浄3）洗浄した。各カラムおよび洗浄について、 $4 \mu\text{l}$ の溶離液をプロッティング膜にピペットで移し、一次抗体（HRP結合体化ストレプトアビジン）とともにインキュベートした。左パネルは、各カラムにロードした合計を示すのに対して、右パネルは、結合したリガンドが溶離され得る場合を示す。

20

30

【0160】

（実施例17）

実施例17：細胞トランスフェクションの結果

【0161】

HEK-EbNA培養物を、先に記載されるようにトランスフェクトした。上記培養物を、5種の異なるキメラスカベンジャーレセプタータンパク質でトランスフェクトした。各キメラタンパク質について、異なるアフィニティタグ（ペンタHisタグ（配列番号28）に加えて、上記AviTag<sup>TM</sup>（配列番号45）もしくはSTREP（配列番号31）のいずれか）を使用した2種の異なる配列を調製した。48時間後、上記培養物を、ペンタHis抗体（Qiagen）染色を使用して染色し、免疫組織化学写真を取得した。それらの写真を図16および図17に示す。これらは、行列形式で並べられている。

40

【0162】

図16は、上記AviTag<sup>TM</sup>を使用した配列の写真を示す。左から右に、配列番号37、配列番号39、配列番号41、配列番号43、および配列番号35で上記培養物をトランスフェクトした。図17は、上記STREPタグを使用した配列の写真を示す。左から右に、配列番号38、配列番号40、配列番号42、配列番号44、および配列番号36で上記培養物をトランスフェクトした。これらの結果は、2つの図面の間で列ごとに

50

比較されるべきである。すなわち、配列番号 37 の結果と、配列番号 38 の結果を比較し、配列番号 39 の結果と配列番号 40 の結果を比較するなど。

【0163】

染色における差は、タンパク質生成レベルのバリエーションを示す。一般に、上記 AviTag<sup>TM</sup> を組みこむ配列を発現する細胞（図 16 中）は、STREP を含む配列を発現する細胞（図 17 中）より高い生成を得た。上記リンカー、アフィニティータグ、および/もしくはアンカードメインの選択は、上記組換えキメラタンパク質を十分な量で成功裏に発現する能力に影響を及ぼすと認められる。

【0164】

（実施例 18）

実施例 18：リガンド結合は、固相上の固定化に影響を及ぼさない

【0165】

上記 AviTag<sup>TM</sup>（配列番号 45）とともに、配列番号 41 もしくは配列番号 43 を使用して発現する、方向性をもって結合させたタンパク質を含むビーズを、裸の Talon ビーズもしくはストレプトアビジン被覆アガロースビーズとともに、上記の実施例 8 に記載されるとおりに調製した。図 18 において、「リガンド前」と表示された区画は、両 cSR のアリコードがどの程度、抗ビオチン抗体を使用するウェスタンブロッティングのためのゲルに直接適用されたか、または 2 つのマトリクス（His タグ化タンパク質には Talon マトリクス、または Avi タグ化、ビオチン化タンパク質にはストレプトアビジン被覆ビーズ）のうちの 1 つとインキュベートし、排出し、次にそのフロースルーを同じゲルに適用することを可能にしたかのいずれかであることを示す。コントロールレーン

10

20

【0166】

図 18 ではまた、「処理後（post-treatment）」と表示される区画は、ビーズへのカップリング前のプレカップリング工程の追加、および遊離 cSR と、実施例 16 に記載されるとおりに調製された、それぞれ、E. coli、MRSA、および S. pneumoniae とを混合することを必然的に伴って、上記と類似の手順を受けているビーズおよびタンパク質の同じバッチを示す。同じコントロールを使用した。

【0167】

これらのデータは、リガンドおよび固相の両方への結合が特異的であり、互いに無関係に起こり得ることを実証する。

30

【0168】

本開示は、例示的实施形態を参照しながら記載されてきた。明白に、前述の詳細な記載を読んで理解すれば、改変および変更が想起される。本開示は、全てのこのような改変および変更が、添付の特許請求の範囲もしくはその等価物の範囲内にある限りにおいて、該改変および変更を含むものと解釈されることが意図される。

【 図 1 A 】

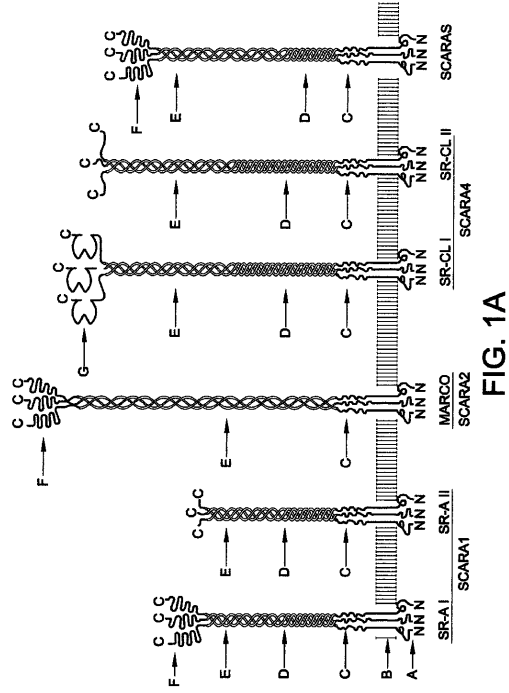


FIG. 1A

【 図 1 B 】

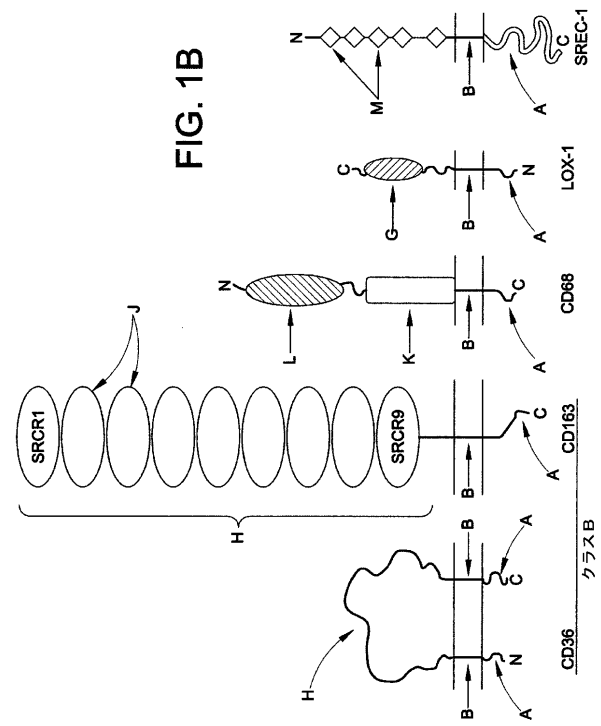


FIG. 1B

【 図 2 】

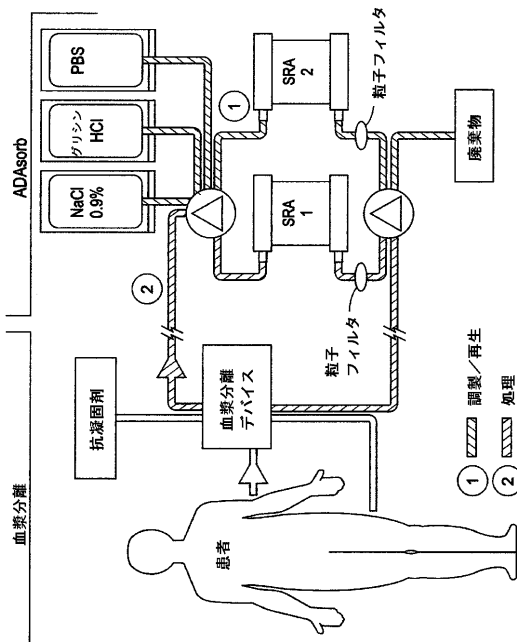


FIG. 2

【 図 3 】

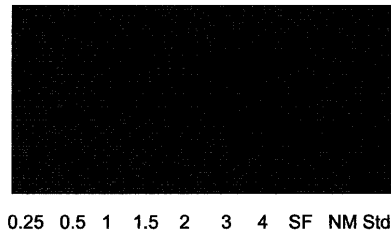
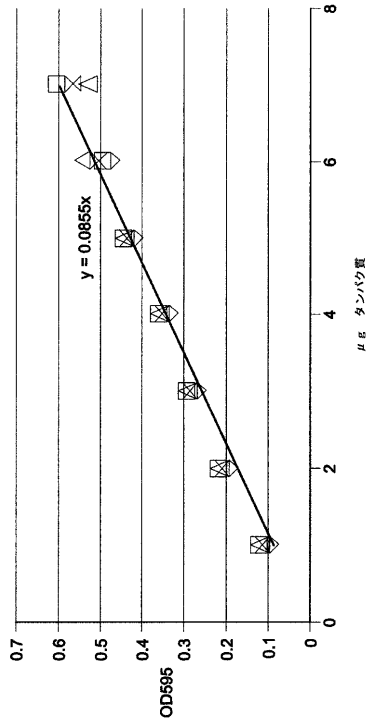
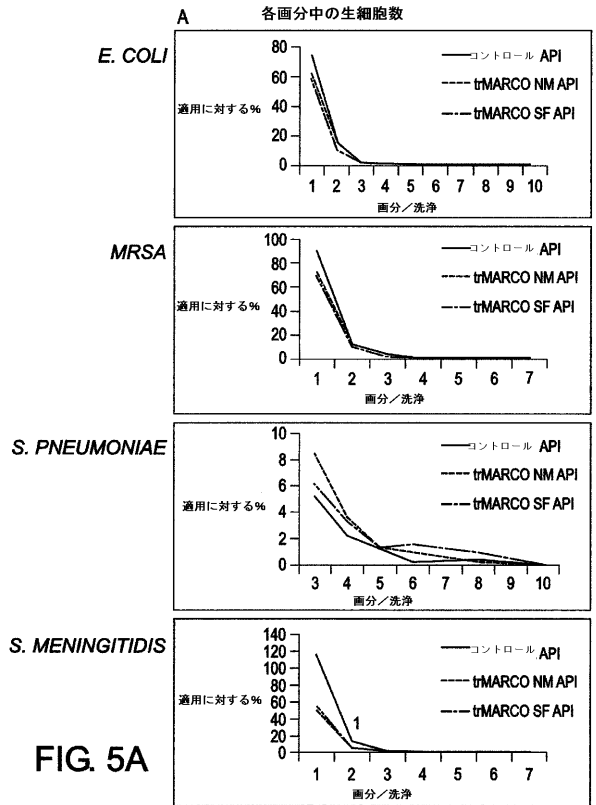


FIG. 3

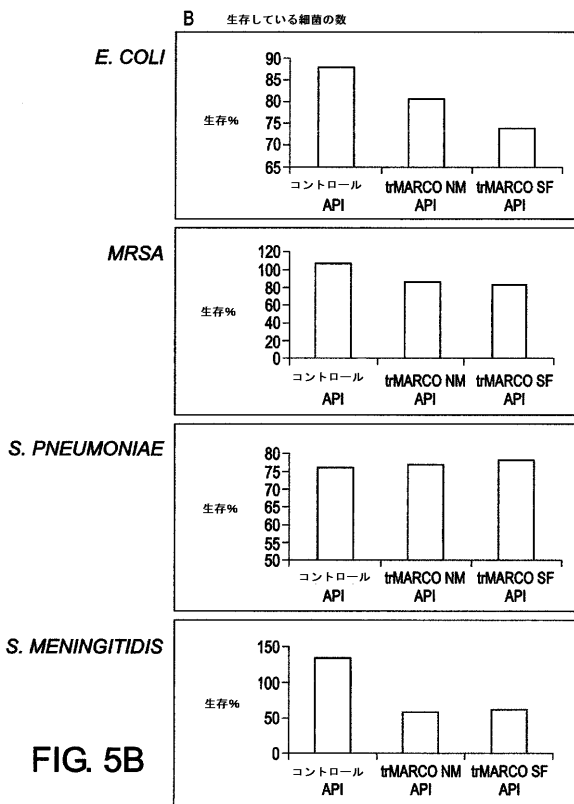
【 図 4 】



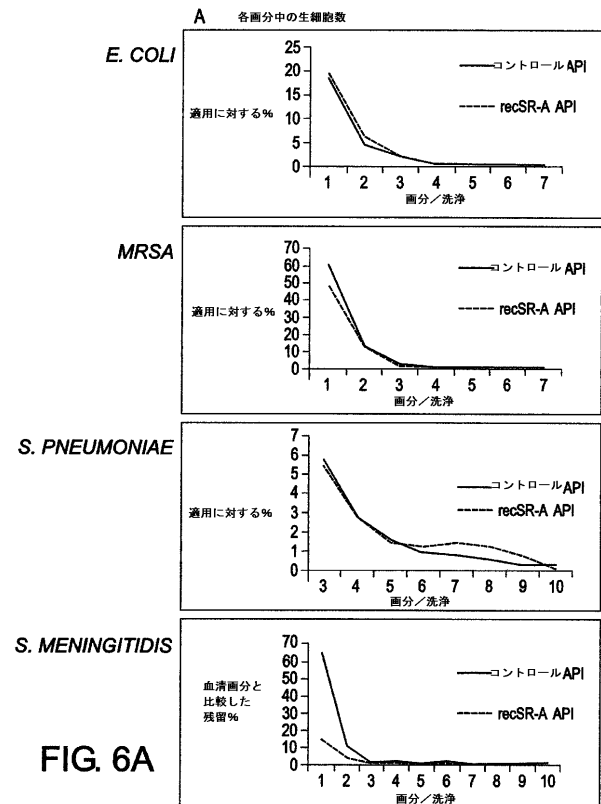
【 図 5 A 】



【 図 5 B 】



【 図 6 A 】



【 図 6 B 】

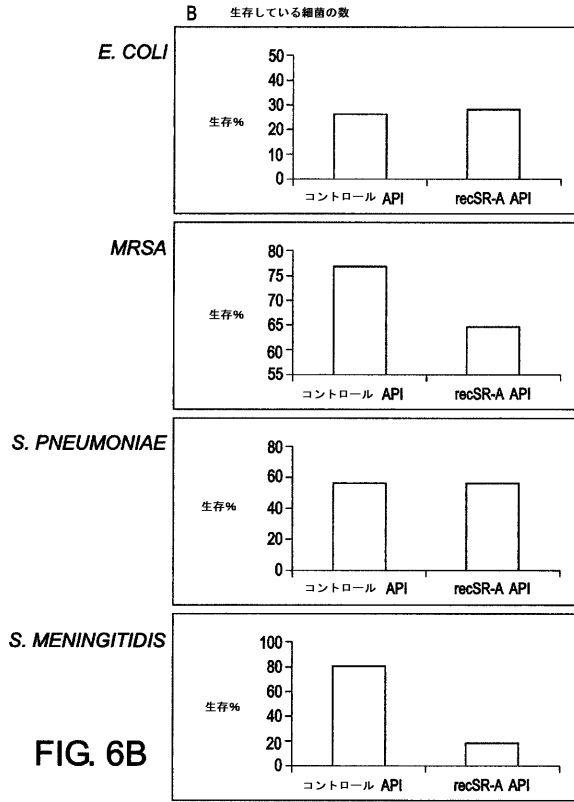


FIG. 6B

【 図 7 】

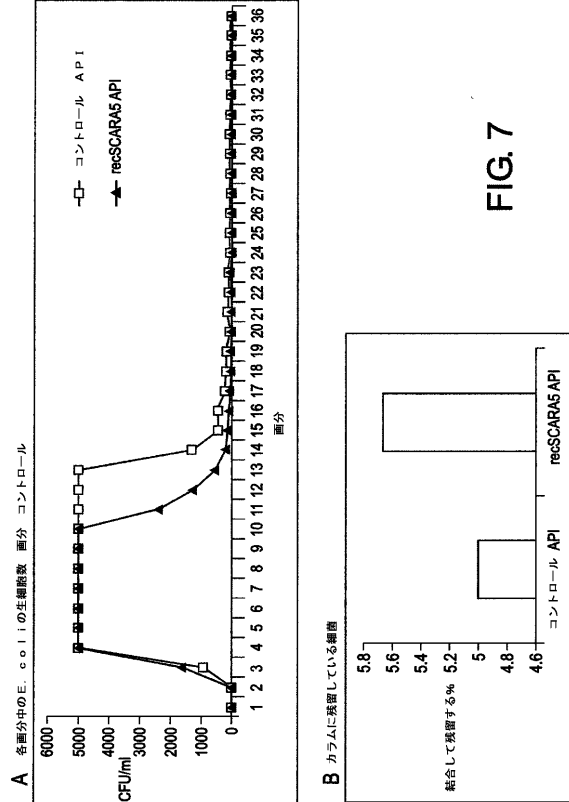


FIG. 7

【 図 8 】

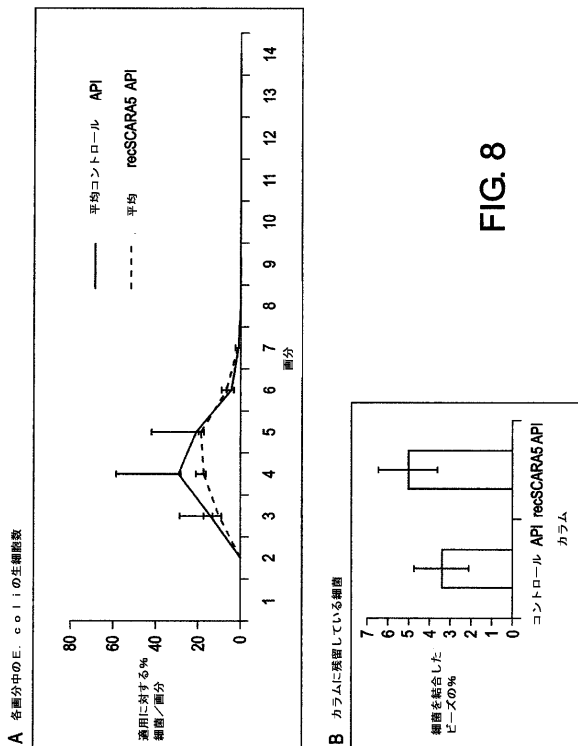


FIG. 8

【 図 9 A 】

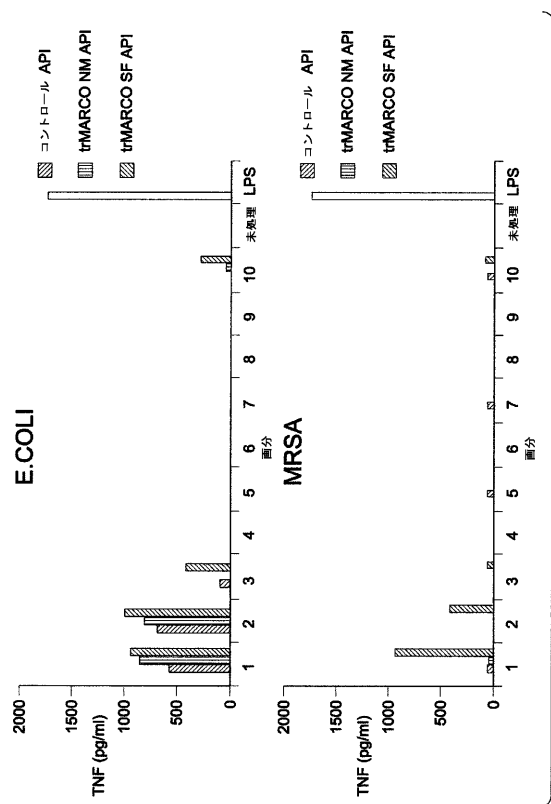


FIG. 9A

【 図 9 B 】

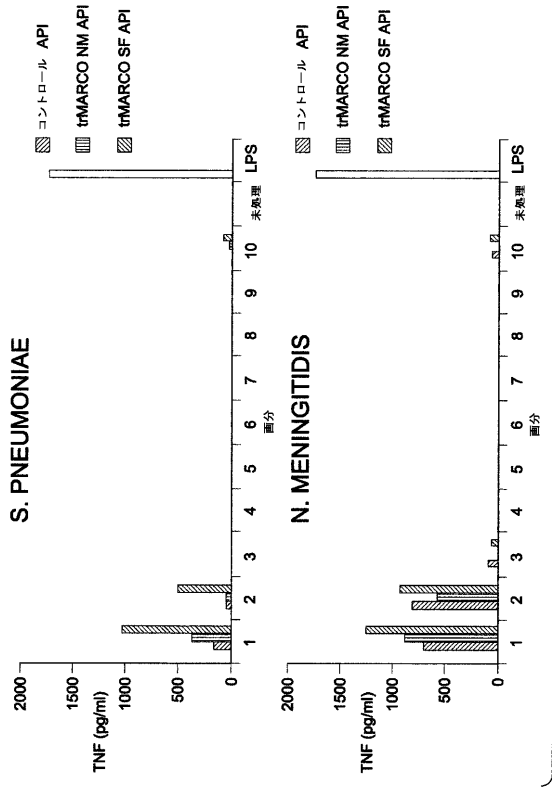


FIG. 9B

【 図 10 A 】

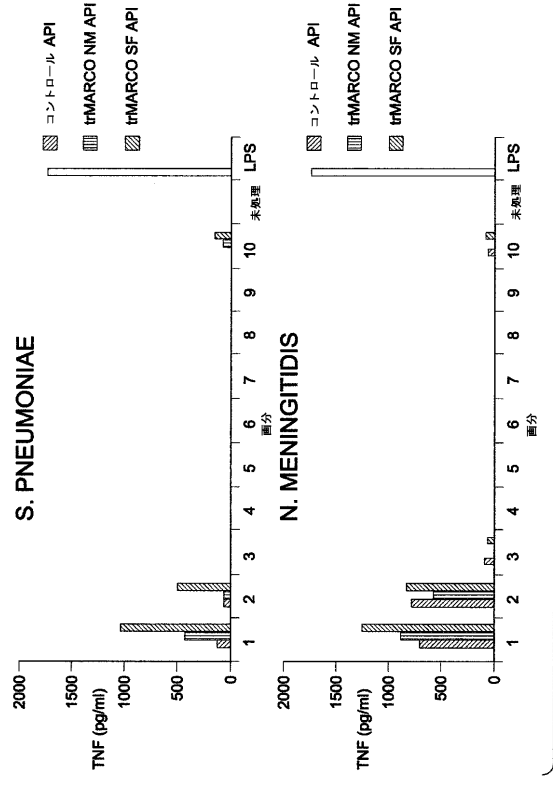


FIG. 10A

【 図 10 B 】

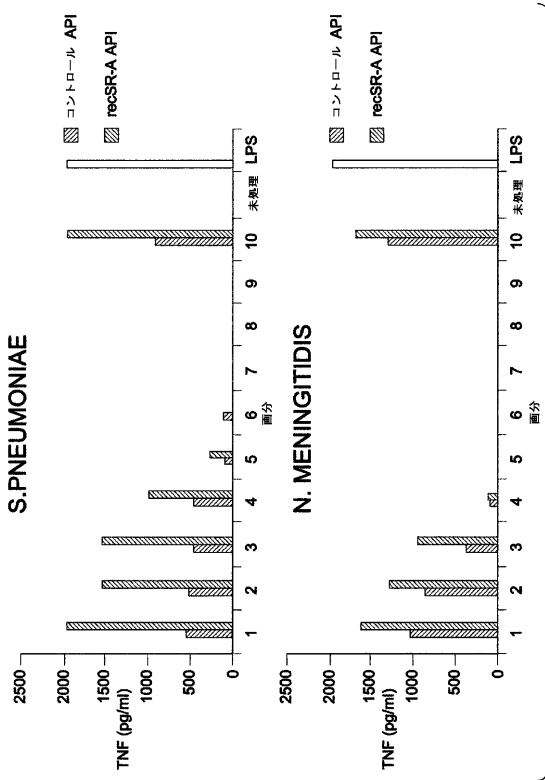


FIG. 10B

【 図 13 】

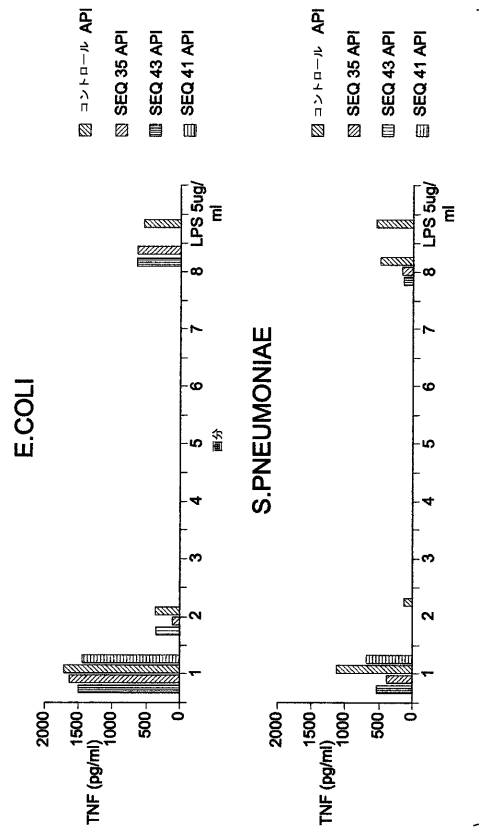


FIG. 13

【 14 】

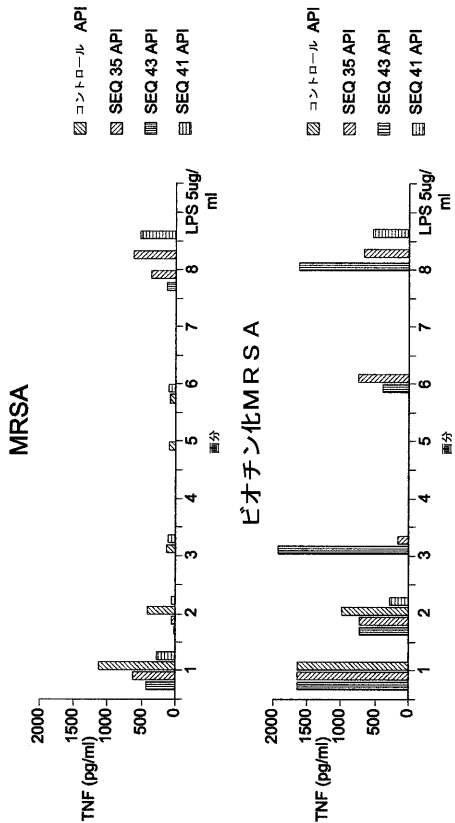


FIG. 14

【 15 】

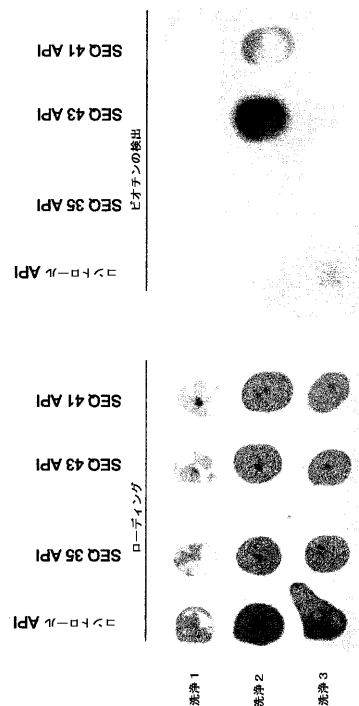


FIG. 15

【 16 】

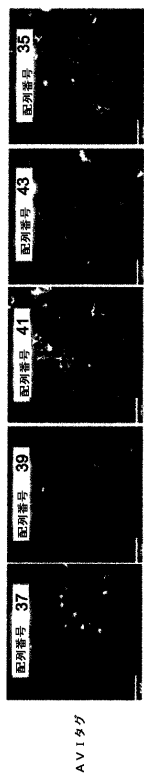


FIG. 16

【 18 】

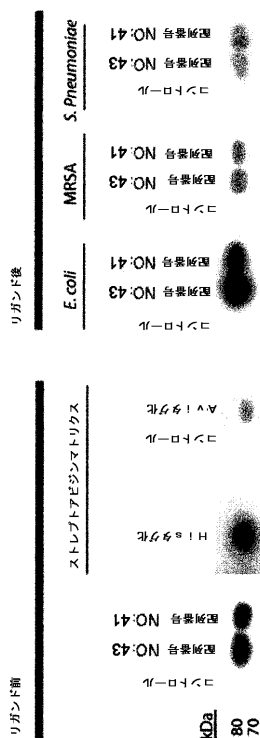


FIG. 18

【 図 1 1 】

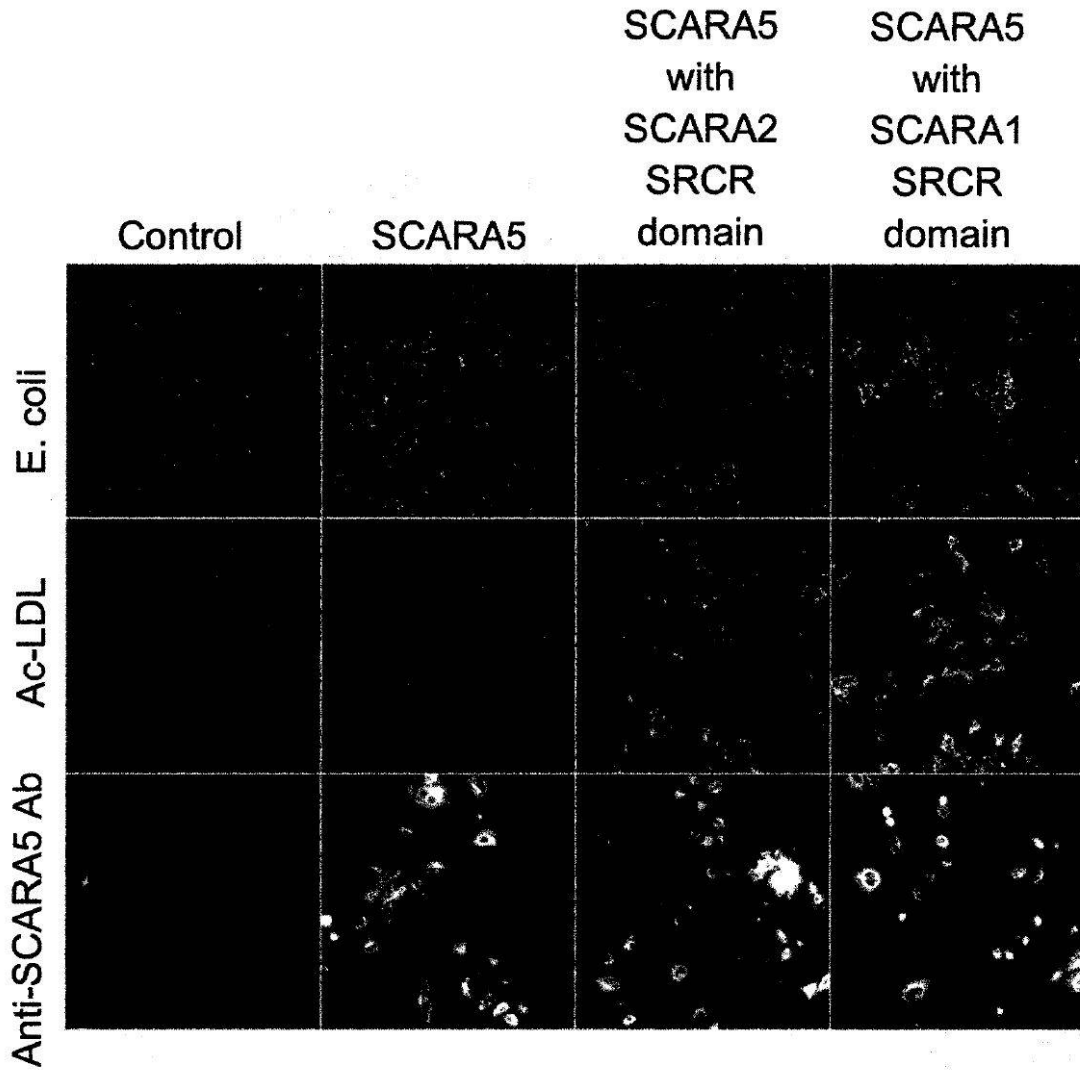


FIG. 11



【 図 1 2 】

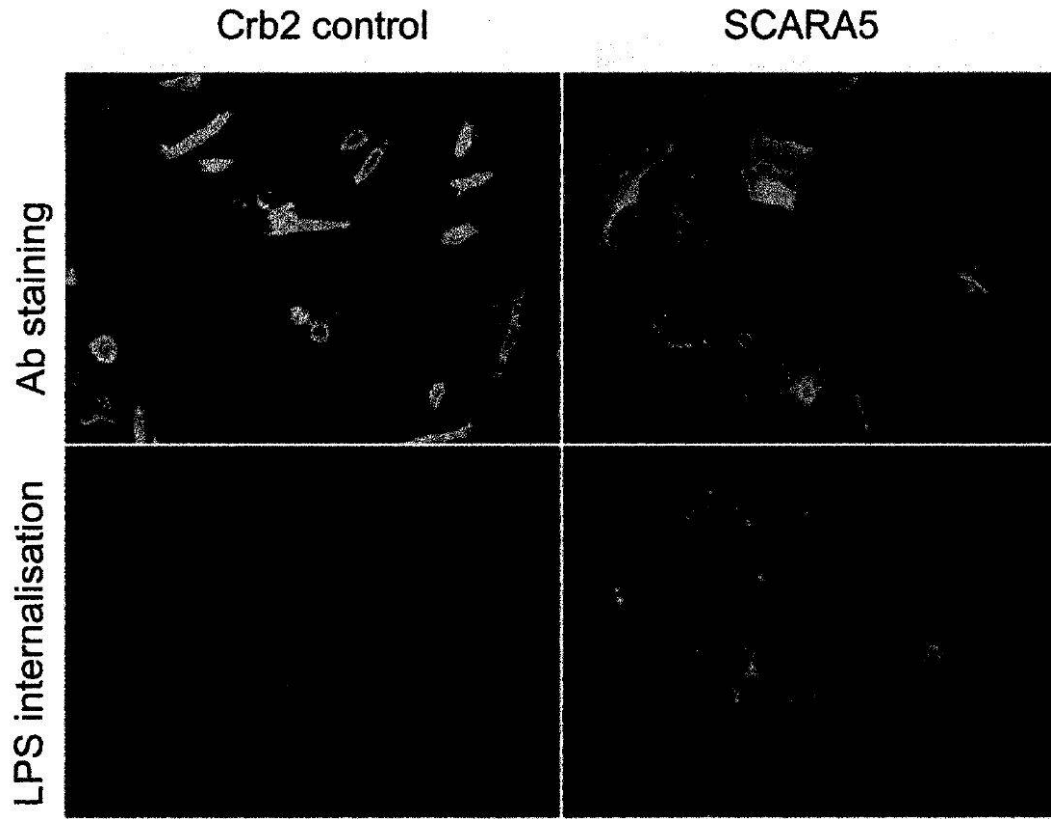


FIG. 12

【 図 17 】

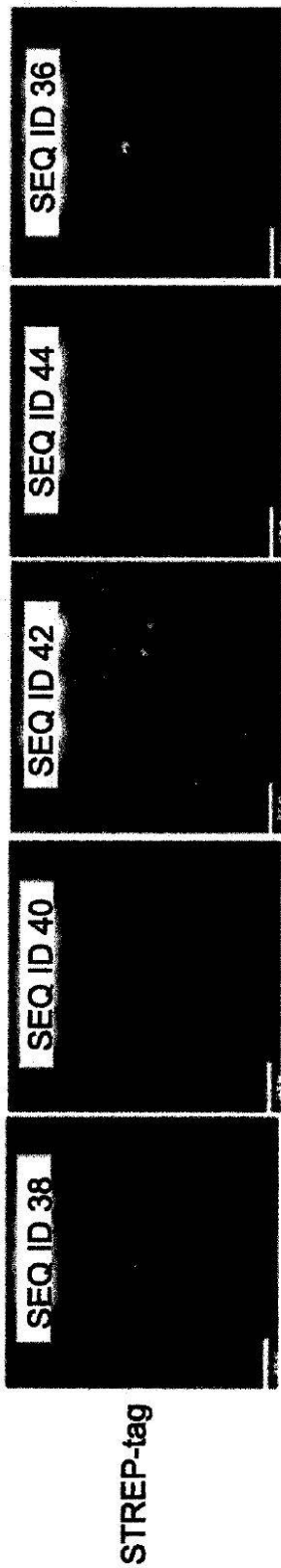


FIG. 17

【 配列表 】

2015515264000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成26年11月13日 (2014.11.13)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2015515264000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2013/000845

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 C12N15/62 G01N33/569 ADD.		
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) C07K C12N G01N		
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) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MUKHOPADHYAY S ET AL: "The role of scavenger receptors in pathogen recognition and innate immunity", IMMUNOBIOLOGY, URBAN UND FISCHER VERLAG, DE, vol. 209, no. 1-2, 23 August 2004 (2004-08-23), pages 39-49, XP004954235, ISSN: 0171-2985, DOI: 10.1016/J.IMBIO.2004.02.004 the whole document ----- -/--	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
Date of the actual completion of the international search 5 September 2013		Date of mailing of the international search report 16/09/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vix, Olivier

1

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/IB2013/000845

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ADACHI H ET AL: "FEEL-1, a novel scavenger receptor with in vitro bacteria-binding and angiogenesis-modulating activities", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, vol. 277, no. 37, 13 September 2002 (2002-09-13), pages 34264-34270, XP002231165, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M204277200 the whole document	1-27
Y	THOMAS ARESCHOUG ET AL: "Scavenger receptors: role in innate immunity and microbial pathogenesis", CELLULAR MICROBIOLOGY, vol. 11, no. 8, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 1160-1169, XP055077616, ISSN: 1462-5814, DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01326.x the whole document	1-27
Y	DUNNE D W ET AL: "The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 1 MAR 1994, vol. 91, no. 5, 1 March 1994 (1994-03-01), pages 1863-1867, XP002004772, ISSN: 0027-8424 the whole document	1-27
Y	ANNETTE PLÜDDEMANN ET AL: "The Macrophage Scavenger Receptor A Is Host-Protective in Experimental Meningococcal Septicaemia", PLOS PATHOGENS, vol. 5, no. 2, 1 February 2009 (2009-02-01), pages e1000297-e1000297, XP055077618, ISSN: 1553-7366, DOI: 10.1371/journal.ppat.1000297 the whole document	1-27

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/000845
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. SANKALA: "Characterization of Recombinant Soluble Macrophage Scavenger Receptor MARCO", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 36, 30 August 2002 (2002-08-30), pages 33378-33385, XP055077678, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M204494200 the whole document -----	1-27
Y	Y. CHEN: "A Phage Display Screen and Binding Studies with Acetylated Low Density Lipoprotein Provide Evidence for the Importance of the Scavenger Receptor Cysteine-rich (SRCR) Domain in the Ligand-binding Function of MARCO", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 281, no. 18, 23 February 2006 (2006-02-23), pages 12767-12775, XP055077649, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M513628200 the whole document -----	1-27
A	PLUDDMANN ET AL: "A sensitive solid-phase assay for identification of class A macrophage scavenger receptor ligands using cell lysate", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL, vol. 329, no. 1-2, 25 October 2007 (2007-10-25), pages 167-175, XP022389340, ISSN: 0022-1759 the whole document -----	1-27
Y	US 2006/057625 A1 (CARLSON ROBERT E [US]) 16 March 2006 (2006-03-16) the whole document -----	1-27
Y	WO 02/35236 A1 (PF MEDICAMENT [FR]; JEANNIN PASCALE [FR]; MAGISTRELLI GIOVANNI [FR]; H) 2 May 2002 (2002-05-02) the whole document -----	1-27
Y	EP 0 808 899 A2 (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 26 November 1997 (1997-11-26) the whole document -----	1-27
	----- -/--	

1

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IB2013/000845
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. R. M. OJALA ET AL: "Crystal Structure of the Cysteine-rich Domain of Scavenger Receptor MARCO Reveals the Presence of a Basic and an Acidic Cluster That Both Contribute to Ligand Recognition", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 282, no. 22, 1 June 2007 (2007-06-01), pages 16654-16666, XP055077748, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M701750200 the whole document	1-27
A	----- WO 98/47916 A1 (HARVARD COLLEGE [US]; YOUNG JOHN [US]; SNITKOVSKY SOPHIE [US]) 29 October 1998 (1998-10-29) the whole document -----	1-27

1

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2013/000845

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006057625	A1	16-03-2006	NONE
-----	-----	-----	-----
WO 0235236	A1	02-05-2002	AU 1507902 A 06-05-2002
			FR 2816059 A1 03-05-2002
			WO 0235236 A1 02-05-2002
-----	-----	-----	-----
EP 0808899	A2	26-11-1997	EP 0808899 A2 26-11-1997
			JP H1084977 A 07-04-1998
			US 5916766 A 29-06-1999
			US 6197931 B1 06-03-2001
-----	-----	-----	-----
WO 9847916	A1	29-10-1998	AU 7127798 A 13-11-1998
			WO 9847916 A1 29-10-1998
-----	-----	-----	-----



## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 2
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 0 1
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/06	
C 0 7 K 17/00 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K	17/00	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/06	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/00	
G 0 1 N 33/566 (2006.01)	A 6 1 P	31/04	
G 0 1 N 33/569 (2006.01)	G 0 1 N	33/566	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N	33/569	Z
C 0 7 K 1/22 (2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 2 5 E
	C 0 7 K	1/22	

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

(72) 発明者 トリグヴァソン, カルル

スウェーデン国 エス - 1 8 2 6 1 ジェルスホルム, ロケヴァゲン 8 アー

(72) 発明者 ピカライネン, ティモ

スウェーデン国 エス - 1 9 5 7 1 ロセルスベリ, ロセルベリスヴァーゲン 3 4

(72) 発明者 オヤラ, ユーハ

スウェーデン国 エス - 1 7 1 6 4 ソルナ, オロフ アフ アクレルス ヴァイ 3

(72) 発明者 アクセルソン, ヨナス

スウェーデン国 エス - 1 1 4 2 4 ストックホルム, オデンガタン 6

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA13 BA63 BA80 CA07 DA03 EA04 GA11 HA01 HA11

4B063 QA18 QA19 QQ03 QQ06 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR75 QR77

QR82 QS15 QS33 QS40 QX01

4B065 AA91Y AA93X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46

4C084 AA02 AA07 BA44 CA53 NA14 ZB321 ZB351

4H045 AA10 AA20 AA30 CA40 DA50 EA29 EA52 FA74 FA82 GA26