

(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2005-512518  
(P2005-512518A)

(43) 公表日 平成17年5月12日(2005.5.12)

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

**C12N 15/09**  
**A61K 31/7088**  
**A61K 38/00**  
**A61K 39/00**  
**A61K 39/04**

F 1

C 12 N 15/00  
A 61 K 31/7088  
A 61 K 39/00  
A 61 K 39/04  
A 61 K 48/00

Z N A A

H

テーマコード(参考)

4 B 02 4  
4 B 06 5  
4 C 08 4  
4 C 08 5  
4 C 08 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-532534 (P2003-532534)  
(86) (22) 出願日 平成14年10月3日 (2002.10.3)  
(85) 翻訳文提出日 平成16年6月1日 (2004.6.1)  
(86) 國際出願番号 PCT/GB2002/004475  
(87) 國際公開番号 WO2003/029289  
(87) 國際公開日 平成15年4月10日 (2003.4.10)  
(31) 優先権主張番号 0123756.9  
(32) 優先日 平成13年10月3日 (2001.10.3)  
(33) 優先権主張国 英国(GB)

(71) 出願人 502355761  
キングス カレッジ ロンドン  
イギリス ロンドン ダブリュシー2アー  
ル 2エルエス アン インスティチュー  
ト インコーポレイテッド バイ ロイヤ  
ル チャーター オブ ストランド  
(74) 代理人 100100549  
弁理士 川口 嘉之  
(74) 代理人 100090516  
弁理士 松倉 秀実  
(74) 代理人 100098268  
弁理士 永田 豊  
(74) 代理人 100089244  
弁理士 遠山 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】熱ショックタンパク質の使用

## (57) 【要約】

本発明は、細胞によって產生される、1つまたは複数のサイトカインおよび/または1つまたは複数のCCケモカインおよび/またはNOのレベルを、対応する全長熱ショックタンパク質によってもたらされるレベルよりも増加させることができる熱ショックタンパク質断片に関する。また本発明は、疾患の治療または予防における該断片の使用に関する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

細胞によって産生される、1つまたは複数のサイトカインおよび/または1つまたは複数のCCケモカインおよび/またはNOのレベルを、対応する全長熱ショックタンパク質によってもたらされるレベルよりも増加させることができる、熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 2】**

ヒト熱ショックタンパク質断片である、請求項1に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 3】**

前記熱ショックタンパク質断片は、対応する全長熱ショックタンパク質の大きさの80%未満である、請求項1または2に記載の熱ショックタンパク質。

**【請求項 4】**

ヒトHSP70の断片である、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 5】**

前記断片がヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) HSP70のアミノ酸残基359~625または359~610に対して少なくとも40%の相同性を有する、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 6】**

前記断片がヒト型結核菌HSP70のアミノ酸残基359~459に対して少なくとも60%の相同性を有する、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 7】**

前記断片がヒト型結核菌HSP70のアミノ酸残基396~426に対して少なくとも80%の相同性を有する、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 8】**

ヒト型結核菌HSP70のアミノ酸残基359~625、359~610、359~459、または396~426からなる熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 9】**

前記1つまたは複数のサイトカインは、インターロイキンおよびTNF-からなる群から選択される、請求項1ないし8のいずれか1項に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 10】**

前記1つまたは複数のケモカインは、RANTES、MIP-、またはMIP-である、請求項10に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 11】**

前記サイトカインは、IL-12および/またはTNF-である、請求項9に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 12】**

CD40結合部位を含む、請求項1ないし11のいずれか1項に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 13】**

1つまたは複数の異種ペプチドをさらに含む、請求項1ないし12のいずれか1項に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 14】**

前記1つまたは複数の異種ペプチドは免疫原性ペプチドである、請求項14に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 15】**

請求項1ないし14のいずれか1項に記載の熱ショックタンパク質断片をコードする単離された核酸分子。

10

20

30

40

50

**【請求項 16】**

請求項 15 の核酸分子を含むベクター。

**【請求項 17】**

請求項 16 のベクターを含む宿主細胞。

**【請求項 18】**

請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項の熱ショックタンパク質断片または請求項 15 の核酸を、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、アジュバントまたは媒体と組み合わせて含む、医薬組成物。

**【請求項 19】**

請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項の熱ショックタンパク質断片の、治療における使用 10。

**【請求項 20】**

疾患の治療用または予防用医薬の製造における、請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項の熱ショックタンパク質断片の使用。

**【請求項 21】**

請求項 1 ないし 14 の熱ショックタンパク質断片の有効用量を、必要とする患者に投与することを含む、疾患の治療または予防方法。

**【請求項 22】**

前記疾患は、微生物感染、ウィルス感染、免疫系疾患または癌である、請求項 20 の使用または請求項 21 の方法。

**【請求項 23】**

請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項の熱ショックタンパク質断片と細胞を接触させることを含む、1つまたは複数のサイトカインおよび / または 1つまたは複数のCCケモカインおよび / または NO の産生を、対応する全長熱ショックタンパク質によってもたらされる産生レベルよりも増加させる方法。

**【請求項 24】**

1つまたは複数のサイトカインおよび / または 1つまたは複数のCCケモカインおよび / または NO の産生を、対応する全長熱ショックタンパク質によってもたらされるレベルよりも増加させるための、請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項の熱ショックタンパク質断片の使用。

**【請求項 25】**

免疫応答を Th1 応答に分極させるための、請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項の熱ショックタンパク質断片の使用。

**【請求項 26】**

ワクチンと組み合わせた、請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項に記載の熱ショックタンパク質断片。

**【請求項 27】**

前記熱ショックタンパク質をワクチンと組み合わせて用いる、請求項 25 または 26 のいずれか 1 項に記載の使用。

**【請求項 28】**

前記熱ショックタンパク質 HSP70 の C 末端領域のアミノ酸残基 359 ~ 625 を含むポリペプチド。

**【請求項 29】**

前記熱ショックタンパク質 HSP70 の C 末端領域のアミノ酸残基 359 ~ 610 を含むポリペプチド。

**【請求項 30】**

請求項 28 または 29 に記載のポリペプチドを含むアジュバント。

**【請求項 31】**

抗原と共有結合または非共有結合した、請求項 30 に記載のアジュバント。

**【請求項 32】**

10

20

30

40

50

請求項 3 1 に記載のアジュバントを含むワクチン。

【請求項 3 3】

請求項 3 1 に記載のアジュバントを含む抗 H I V ワクチン。

【請求項 3 4】

請求項 2 8 または 2 9 に記載のポリペプチドをコードする D N A 分子。

【請求項 3 5】

図 4 に記載の配列を有する、請求項 3 4 に記載の D N A 分子。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、サイトカインおよび / または C C ケモカインおよび / または一酸化窒素 ( N O ) の細胞による産生を増加させるための熱ショックタンパク質断片の使用に関する。また、本発明は、熱ショックタンパク質断片の、ワクチンアジュバントとしての、特に、 H I V や他の微生物感染に対する予防的または治療的ワクチンの構築における使用に関する。

【0 0 0 2】

熱ショックタンパク質 ( H S P ) は、微生物ならびに哺乳動物細胞において、高度に保存され、広く分布する。熱ショックタンパク質は、いくつかの重要な生物学的性質、特に、タンパク質の細胞内シャペロンとしての性質を有しており、細胞がストレスを受けた場合にタンパク質が凝集するのを防止する。 H S P は、合成ペプチドと結合した場合は、担体分子およびアジュバントとして用いられてきた。

【0 0 0 3】

H S P 7 0 および H S P 9 6 は、腫瘍またはウィルス特異的ペプチドと非共有結合し、特異的な腫瘍またはウィルスに対して保護的効果を有することが示された ( Udon et al. , J. Exp. Med. , 178 , 139-1396 , 1993 ; Nieland et al. , PNAS USA , 93 , 6135-6139 , 1996 ; および Ciupitu et al. , J. Exp. Med. , 187 , 685-691 , 1998 ) 。 H S P のアジュバント活性のメカニズムは、全長 H S P 7 0 による C C ケモカインの刺激を実証することによって解明された。 C C ケモカインは、 T 細胞、 B 細胞、樹状細胞およびマクロファージを次々に誘引する。

【0 0 0 4】

サイトカインは、免疫系の誘導および調節を媒介するタンパク質である。サイトカインは、炎症応答の開始や炎症細胞の活性化等の様々な作用を有している。また、サイトカインは、成長、活性化および分化を刺激することによってリンパ球に作用する。サイトカインは、活性化リンパ球や活性化マクロファージ等の様々な ( a range of ) 細胞によって分泌される。また、サイトカインは幅広い標的細胞を有する。例えば、インターロイキン 1 2 は、 B 細胞およびマクロファージによって分泌され、活性化 T 細胞、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞およびリンフォカイン活性化キラー ( L A K ) 細胞に作用する。サイトカインは、リンフォカインおよびモノカイン等の群にさらに分類され得る。

【0 0 0 5】

「 C C ケモカイン」という用語は、化学誘引物質および炎症誘発性の性質を有する任意のタンパク質を指す。すなわち、 C C ケモカインは免疫応答に必要な細胞を補充する。一般に、 C C ケモカインは比較的低分子量 ( 一般に、 1 0 , 0 0 0 未満 ) である。 C C ケモカインは、内皮細胞、ケラチノサイト、線維芽細胞、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞およびマクロファージや樹状細胞等の抗原提示細胞等の、様々な細胞型によって産生される。 C C ケモカインは、貪食細胞およびリンパ球を誘引する。好ましくは、 C C ケモカインは

ケモカインである。 C C ケモカインは、 R A N T E S ( 活性化時に調節される、発現・分泌された正常 T 細胞 ) 、 M I P - 1 ( マクロファージ炎症性タンパク質 1 ) および M I P - 1 ( マクロファージ炎症性タンパク質 1 ) であることがさらに好ましい。 C C ケモカインは、様々な T 細胞やマクロファージ、および H I V および / または S I V 複製を抑制することができる T 細胞サプレッサー因子を誘引する。したがって、 C C ケモカ

10

20

30

40

50

インの産生増加は、微生物感染（ウィルス感染等）や悪性疾患等の感染性疾患の治療または予防をもたらし得る。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

国際特許出願WO01/45738号には、1つまたは複数のCCケモカインの細胞による産生を増加させるための全長HSPの使用が記載されている。驚くべきことに発明者らは、HSP断片が、細胞によるサイトカイン（特に、ケモカイン）産生を、対応する全長HSPよりも増加させることを見出した。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の第一の態様によると、本発明は、細胞によって産生される、1つまたは複数のサイトカインおよび/または1つまたは複数のCCケモカインおよび/または一酸化窒素（NO）のレベルを、対応する全長熱ショックタンパク質（HSP）によってもたらされるレベルよりも増加させることができる熱ショックタンパク質（HSP）断片を提供する。

【0008】

本明細書において用いられる場合、「熱ショックタンパク質」という用語は、細胞がストレスに付された場合に細胞において発現の増加を示す、任意のタンパク質を指す。HSPは、好ましくは哺乳動物細胞、より好ましくはヒト細胞由来である。HSPは、HSP70、HSP65、HSP40、HSP27、BiP、GP96、HSP60、HSP90またはHSP96であることがさらに好ましい。好ましくは、熱ショックタンパク質はヒトHSP70である。HSPは修飾HSPであってもよい。この場合、HSPは、分解耐性の増加等の有利な特性を提供するために修飾されている。

【0009】

「全長熱ショックタンパク質」という用語は、実質的に完全なHSPアミノ酸配列を含むタンパク質を指す。「全長熱ショックタンパク質」は、わずかなアミノ酸の欠失、付加または置換によって変更されていてもよい。例えば、変更がサイトカイン、CCケモカインまたはNOの細胞による産生をもたらすHSPの能力に影響を与えないならば、全長HSPは、1~10のアミノ酸の欠失、付加または置換によって変更されてもよい。

【0010】

HSPは市販されている。例えば、HSP70はStressGen, Inc.およびLionex Diagnostics and Therapeutics, Braunschweig, Germanyから得られ、HSP65はStressGen, Inc.から得られ、HSP40はStressGen Biotechnologies, Victoria, British Columbiaから得られる。様々なHSPをコードする遺伝子は、クローニングされて配列決定されている。例えば、ヒトHSP70配列はGenbankアクセション番号M24743であり、マウスHSP70はGenbankアクセション番号M35021であり、ヒトHSP65はGenbankアクセション番号P42384であり、ヒトHSP40はGenbankアクセション番号D49547である。HSPの既知の配列に基づき所望のHSPを得ることは、当業者にとって通常のことである。多数のHSP70タンパク質の配列は、表1に記載されている。

【0011】

さらに、HSPの調製および精製は、Young et al., Mol. Microbial., 6, 133-145, 1992; Mehlert et al., Mol. Microbial., 3, 125-130, 1989; およびThole et al., Infect & Immune., 55, 1466-1475, 1987に記載されている。

【0012】

本明細書で用いられる場合、「熱ショックタンパク質断片」という用語は、1つまたは複数のサイトカインおよび/または1つまたは複数のCCケモカインおよび/またはNOのレベルを、対応する全長HSPによって増加したレベルよりも増加させることができるHSPの任意の断片を指す。HSP断片は、対応する全長HSPの、好ましくは80%未

10

20

30

40

50

満、より好ましくは70%未満、最も好ましくは50%未満の大きさである。HSP断片は、10~300アミノ酸の大きさ、より好ましくは10~200アミノ酸の大きさ、最も好ましくは10~100アミノ酸の大きさであることが特に好ましい。

【0013】

好ましくは、HSP断片は、微生物（例えば、ヒト型結核菌）のHSPまたは哺乳動物（例えば、ヒト）のHSPの断片である。

【0014】

好ましくは、HSP断片は、ヒト型結核菌HSP70のアミノ酸残基359~625または359~610に対して、少なくとも40%、より好ましくは少なくとも60%、最も好ましくは少なくとも80%の相同性を有する。より好ましくは、断片は、ヒト型結核菌HSP70のアミノ酸残基359~459に対して、少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、最も好ましくは少なくとも90%の相同性を有する。HSP断片は、ヒト型結核菌HSP70のアミノ酸残基396~426に対して、少なくとも80%、より好ましくは少なくとも90%、最も好ましくは少なくとも95%の相同性を有することが特に好ましい。ヒト型結核菌HSP70の配列は、表1に記載されている。相同性は、アミノ酸置換の%を計算し、相同性を算出する、Pileupプログラムを用いて測定され得る。好ましくは、相同性のレベルは、ギャップウェイト(gapweight)8、およびギャップレンジスウェイト(gaplengthweight)2を有する、Pileupプログラムを用いて測定される。

【0015】

HSP断片は、ヒト型結核菌HSP70のアミノ酸残基359~625、359~610、359~459または396~426からなることが特に好ましい。また、HSP断片が、断片はヒト型結核菌HSP70のアミノ酸残基359~625、359~610、359~459または396~426に対応するヒトHSP70の断片からなることが好ましい。

【0016】

ヒトHSP70および他のHSP70ヒト型結核菌HSP70のアラインメントを表1に示す。このアラインメントに基づき、当業者は、HSP70のどの断片が上記ヒト型結核菌HSP70の特異的断片に対応するかを容易に確定することができる。

【0017】

好ましくは、HSP断片はCD40結合部位を含む。CD40結合部位の位置は、当業者が容易に確定することができる。

【0018】

また、HSP断片は、ATPアーゼ領域を含まないことが好ましい。ATPアーゼ領域の位置は、当業者には既知である。

【0019】

また、HSP断片は、哺乳動物に送達された場合、抗HSP免疫応答を起こさないことが好ましい。これを達成するために、HSP断片は、HSPの主な抗原性エピトープを含むべきではない。

【0020】

また、好ましくは、本発明のHSP断片は1つまたは複数の異種ペプチドを含んでもよい。結合または非結合ペプチドあるいは抗体等の他の構成成分と組み合わせて本発明のHSPを用いることができることは、当業者には明らかである。異種ペプチドを付着させる方法は、当業者には既知である。

【0021】

「異種ペプチド」という用語は、天然状態においてHSPの一部を自然に形成せず、熱ショックタンパク質由来でない、任意のペプチドを指す。ペプチドとは、本明細書においてはアミノ酸のポリマーとして定義され、産物の具体的な長さを指さない。したがって、ペプチド、オリゴペプチドおよびタンパク質は、ペプチドという用語に含まれる。また、この用語は、タンパク質の発現後の修飾、例えば、グリコシル化、アセチル化およびリン

10

20

30

40

50

酸化、を指さない、すなわち除外する。この定義に含まれるのは、天然および合成の、1つまたは複数の、非天然アミノ酸等のアミノ酸の類似体を含むペプチド、置換された結合ならびに当該技術分野で既知の他の修飾を有するタンパク質を含むペプチドである。ペプチドは、好ましくは1000アミノ酸残基未満の長さ、より好ましくは100アミノ酸未満の長さ、最も好ましくは50アミノ酸未満の長さである。

## 【0022】

好ましくは、異種タンパク質は免疫原性ペプチドである。

## 【0023】

「免疫原性ペプチド」という用語は、哺乳動物（例えば、ヒト）の体内で免疫応答を起こすことができる任意のペプチドを指す。免疫応答は、抗体または細胞性応答を誘導する、あるいはリンパ球、好中球および単球等の白血球によって媒介される動物での一連の免疫反応を刺激する、ペプチドの能力であり得る。

10

## 【0024】

好ましい免疫原性ペプチドとしては、ウィルス、細菌、原生動物および腫瘍由来のものが挙げられる。免疫原性ペプチドは、HIVまたはSIV由来であることが特に好ましい。好ましくは、免疫原性ペプチドは、HIV由来のgp120またはp24である。

## 【0025】

「サイトカイン」という用語は、任意のサイトカイン、特に、インターロイキンやモノカイン等のリンフォカインを含む。特に好ましいサイトカインとしては、IL-12およびTNF-αが挙げられる。

20

## 【0026】

好ましくは、本発明のHSP断片は、1つまたは複数のCCケモカインおよび/または1つまたは複数のサイトカインおよび/またはNOの産生を増加させる。

## 【0027】

好ましいCCケモカインとしては、RANTES、MIP-1αおよびMIP-1βが挙げられる。

## 【0028】

「産生の増加」という用語は、HSP断片と接触させた場合の、1つまたは複数のサイトカイン、1つまたは複数のCCケモカインまたはNOの、細胞による産生の増加を指す。1つまたは複数のサイトカインおよび/または1つまたは複数のCCケモカインの産生の増加は、1つまたは複数のサイトカインおよび1つまたは複数のCCケモカインをコードする遺伝子発現の増加の結果、あるいはサイトカインまたはCCケモカインの細胞からの放出の結果であり得る。1つまたは複数のサイトカイン、1つまたは複数のCCケモカインまたはNOの産生は、対応する全長HSPと接触する細胞によって産生されたレベルよりも、少なくとも20%、より好ましくは少なくとも50%、最も好ましくは少なくとも80%上回るレベルだけ増加することが好ましい。

30

## 【0029】

細胞は、HSP断片と2回以上接触させ得る。細胞をHSP断片と2回以上接触させることによって、より高いレベルの1つまたは複数のサイトカイン、1つまたは複数のCCケモカインおよびNOを得ることが可能であることが見出された。したがって、本発明は、1つまたは複数のサイトカインおよび/または1つまたは複数のCCケモカインおよび/またはNOの細胞による産生を増加させるために、細胞をHSP断片と1回あるいは複数回接触させることを包含する。「複数回」という用語は、細胞をHSP断片と2回以上、好ましくは3~50回、より好ましくは3~6回接触させ得ることを意味する。繰り返される接触の間隔は、どれだけ免疫記憶が存続するかによって、1日~長年であり得る。好ましくは、繰り返される接触の間隔は1ヶ月である。

40

## 【0030】

また、本発明は、本発明のHSP断片をコードする単離された核酸分子を提供する。また、この核酸分子に相補的な核酸も提供される。核酸は、一本鎖であっても二本鎖であっても、DNAであってもRNAであっても、天然であっても非天然であってもよい。また

50

、本発明による単離された核酸を含むベクターも提供される。ベクターとは、目的の核酸を細胞へ転移させる働きをする分子である。

【0031】

適切なベクターとしては、プラスミドやコスミド等の細菌ベクターまたは真核生物ベクター、ファージ等のファージベクター、アデノウィルスベクター、バキュロウィルスベクター等のウィルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。これらのベクターは、当該技術分野で既知である。

【0032】

好ましくは、ベクターは、適切な宿主細胞で発現される本発明の核酸分子が核酸分子によってコードされるタンパク質を产生するのを可能にする、適切な調節配列を含む。ベクターは通常、核酸分子に動作可能に結合する適切なプロモーター配列および終止配列、またはポリA配列等の他の配列を含む。この調節配列は、当該技術分野で既知である。また、ベクターを含む宿主細胞が提供される。細胞は、細菌、酵母または真核生物であり得る。

【0033】

さらに、本発明は、本発明によるHSP断片またはHSP断片をコードする核酸を、薬学的に許容可能な賦形剤、担体、アジュバントまたは媒体と組み合わせて含む医薬組成物を提供する。

【0034】

また、本発明は、療法における使用のための本発明によるHSP断片を提供する。

【0035】

また、本発明は、疾患の治療または予防用医薬の製造における、本発明によるHSP断片の使用を提供する。疾患は、微生物感染、特に、ウィルス感染、免疫系疾患、癌であり得る。

【0036】

さらに、必要とする患者に有効用量のHSP断片を投与することを含む、疾患の治療または予防方法を提供する。この方法により治療されることが可能な疾患は、上に定義された通りである。

【0037】

また、本発明は、本発明によるHSP断片と細胞を接触させることを含み、1つまたは複数のサイトカインおよび/または1つまたは複数のCCケモカインおよび/またはNOの产生を、対応する全長HSPによってもたらされる产生レベルよりも増加させる方法を提供する。

【0038】

また、本発明は、1つまたは複数のサイトカインおよび/または1つまたは複数のCCケモカインおよび/またはNOの产生を、対応する全長HSPによってもたらされるレベルよりも増加させるための、本発明によるHSP断片の使用を提供する。

【0039】

また、疾患の治療のために、1つまたは複数のサイトカインおよび/または1つまたは複数のCCケモカインおよび/またはNOの产生を、対応する全長HSPによってもたらされるレベルよりも増加させる薬剤の調製における本発明によるHSP断片の使用を提供する。疾患は上に定義された通りである。

【0040】

また、本発明は、免疫応答をTh1応答に分極させるための、本発明によるHSP質断片の使用を提供する。

【0041】

また、ワクチンと組み合わせた本発明によるHSP断片を提供する。

【0042】

ワクチンは、当業者には既知であり、哺乳動物に送達された場合に防御免疫応答を提供する任意の薬剤を含む。

10

20

30

40

50

## 【0043】

さらに、本発明は、免疫応答を Th 1 応答に分極させるための薬剤の調製における、本発明による HSP 断片の使用を提供する。

## 【0044】

細胞は、免疫応答の間に活性化される。活性化後、Th 細胞は分裂してエフェクター細胞のクローンを產生することにより、サイトカインを分泌する。サイトカインは、B 細胞、Tc 細胞および他の免疫細胞の活性化において中心的役割を有する。Th 細胞によって產生されるサイトカインのパターンにより、產生される免疫応答型が決定される。Th 1 応答は、主に T 細胞毒性細胞およびマクロファージを活性化するサイトカインプロファイルを有する。Th 2 応答は、主に B 細胞を活性化する。

10

## 【0045】

したがって、HSP 断片は、Th 1 アジュバントとして作用し、Th 1 応答を促進するワクチンと共に用いられることが可能である。

## 【0046】

通常、先行技術のアジュバントは Th 2 分極アジュバントである。Th 1 分極アジュバントが必要である。Th 1 応答は、ある微生物による感染および免疫系の疾患により適している。特に、ウィルス感染を処理する場合、Th 1 応答が好ましい。

## 【0047】

本発明において定義される HSP 断片の使用は、1つまたは複数のサイトカインまたはケモカインの細胞による產生を増加させることができる。1つまたは複数のサイトカインの產生は、様々な T 細胞およびマクロファージ、ならびにウィルス等の病原菌や腫瘍から細胞を保護することができる T 細胞サプレッサー因子を誘引することができる。

20

## 【0048】

また、本発明の HSP 断片は、樹状細胞（特に、ヒト樹状細胞）の成熟レベルを増加させる。樹状細胞の成熟は、CD83、CCR7、HLADR、CD40、CD80 および CD86 等の細胞表面分子のアップレギュレーションによって実証される。樹状細胞は、抗原提示において非常に有効であるため、免疫応答において重要である。

## 【0049】

本発明によると、HSP 断片は、1つまたは複数のサイトカインおよび / または 1つまたは複数の CC ケモカインおよび / または NO の細胞による產生を増加させるために細胞に送達される。細胞は、in vitro でも in vivo でも存在し得る。好ましくは、細胞は in vivo で存在し、HSP 断片（異種ペプチドを含んでもよい）は個体に送達されて、1つまたは複数のサイトカインおよび / または 1つまたは複数の CC ケモカインおよび / または NO の產生の増加をもたらす。1つまたは複数のサイトカインおよび / または 1つまたは複数の CC ケモカインおよび / または NO の產生の増加は、微生物感染およびウィルス感染、ならびに腫瘍発生を防止することができる免疫応答をもたらす。HSP 断片は、ワクチンと同時に、ワクチンの後に、または別々に投与され得る。

30

## 【0050】

本発明の HSP 断片は、任意の薬学的に許容可能な担体、アジュバントまたは媒体と組み合わせて個体に送達されることが可能である。用いられ得る薬学的に許容可能な担体、アジュバントまたは媒体としては、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミン等の血清タンパク質、バッファー物質（リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または硫酸ブロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩等の電解質等）、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンブロックポリマー、ポリオキシエチレンブロックポリマー、および羊毛脂が挙げられるが、これらに限定されない。

40

## 【0051】

本発明の HSP 断片は、経口、非経口、吸入、スプレー、局所、直腸、鼻、頬、膣、ま

50

たは埋め込みリザーバによって投与され得る。好ましくは、本発明のHSP断片は注射によって投与される。本明細書において用いられる場合、「非経口」という用語は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、滑液内、胸骨内、外皮内、病変内および頭蓋内注射、または輸液技法を含む。

【0052】

HSP断片は、無菌注射用調製物の形態で、例えば、無菌注射用水性または油性の懸濁液として送達され得る。この懸濁液は、適切な分散剤または潤滑剤（例えば、Tween 80等）および懸濁剤を用いて、当該技術分野で既知の技法によって製剤化され得る。また、無菌注射用調製物は、無毒性の非経口的に許容可能な希釈剤または溶媒中で無菌注射用溶液または懸濁液（例えば、1,3-ブタンジオール中の溶液として）であり得る。使用され得る許容可能な媒体および溶媒には、マンニトール、水、リンガー溶液および生理食塩液がある。さらに、溶媒または懸濁媒体として、無菌固定油が従来使用されている。このために、合成モノグリセリドまたはジグリセリド等の任意の無菌固定油が用いられ得る。オレイン酸等の脂肪酸およびそのグリセリド誘導体は、オリーブ油やヒマシ油等の天然の薬学的に許容可能な油であるため、特に、そのポリオキシエチレン化型で注射剤の調製において有用である。また、これらの油溶液または懸濁液は、Ph. He1vや類似のアルコール等の長鎖アルコール希釈剤または分散剤を含み得る。

【0053】

また、本発明のHSP断片は、流体としてまたは直腸投与用座剤の形態で投与され得る。座剤は、室温では固体であるが直腸温度では液体であるために直腸で溶解してHSPまたはペプチドを放出する適切な非刺激性賦形剤と、本発明のHSP断片またはペプチドを混合することによって調製され得る。この物質としては、カカオバター、蜜ろうおよびポリエチレングリコールが挙げられるがこれらに限定されない。

【0054】

HSP断片の局所投与は、所望の治療が局所塗布で容易に到達可能な領域または器官を含む場合に望ましい。皮膚への局所塗布に対しては、HSP断片は、局所投与用の担体、これらに限定されないが、鉛物油、液体石油、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックスおよび水等と共に製剤化されるべきである。あるいは、HSP断片は、適切なローションまたはクリームと共に製剤化され、あるいは担体に溶解されることが可能である。適切な担体としては、鉛物油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリソルベート60、セチルエステル、ワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコールおよび水が挙げられるが、これらに限定されない。HSP断片は、直腸座薬製剤によってまたは適切な浣腸製剤として、下部腸管に局所的に使用されることが可能である。

【0055】

本発明のHSP断片は、鼻アロゾルまたは吸入によって投与され得る。この投与に適した組成物は、薬学的製剤の技術分野の当業者に既知の技法により調製でき、ベンジルアルコールや他の防腐剤、バイオアベイラビリティを高めるための吸収促進剤、フルオロカーボン、および/または当該技術分野で既知の可溶化剤や分散剤を使用して、生理食塩水中的溶液として調製できる。

【0056】

以下の実施例は、図面を参照して例証として提供され、いかなる方法によっても本発明を限定することを意図しない。

実施例

【0057】

組み換えDNA技法による機能性断片の製造を以下に記載する。

【実施例1】

【0058】

ヒト型結核菌由来HSP70<sub>359-610</sub>に対する発現プラスミドおよび产生株の構築  
HSP70<sub>359-610</sub>をコードするDNA断片の増幅

10

20

30

40

50

ポリメラーゼ連鎖反応によってヒト型結核菌HSP70遺伝子の領域を増幅するために、プライマー（各20pmol）5'-GCCGGCATA TGGAGG TGAAGA ACGTTCTGC-3'および5'-GCGGGATCCTTAGTGGT GATGGT GATGTCAGC CGAGGCCGGG GTGGGG C-3'を、テンプレートとしてのプラスミドpKASM2101と共に用いた。これは、ヒト型結核菌HSP70遺伝子を含むプラスミドであり、Gesellschaft fur Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig, GermanyのM. Singh教授が保持する、WHO抗原バンクから入手可能である。Taqポリメラーゼ(Qiagen)を用いて反応を行い、条件は製造業者の使用説明書に従った。

## 【0059】

10

## 発現ベクターpLEXWO27-2の構築

PCR産物を、QIA Extractationキット(Qiagen)を用いて精製し、BamHIで2時間消化した。制限エンドヌクレアーゼの失活のためにフェノールで抽出後、消化DNAをエタノール沈殿で回収した。その後、標準的条件を用いて、消化DNAをでさらに切断し、その後熱処理によってNdeIを失活させた。同様の手順を用いてベクターpJLA603を調製した。消化PCR産物は、T4リガーゼ(Roche)を用いて製造業者の使用説明書に従って、pJLA603に結合させた(Schuster B. et al 1987 Gene, vol 52 p279-283参照)。

## 【0060】

20

ライゲーション混合物を、CacI<sub>2</sub>コンピメント大腸菌DH5細胞に直接形質転換し、選択培地上に播種した。プラスミドは、クローンから再単離され、NdeIおよびBamHIでの制限により解析した。ペプチド結合ドメインのコード領域を含む2つのプラスミドを、エレクトロポレーションにより発現株大腸菌CAG629に導入した。このCAG株は、Singh. Mらによって記載されている(ヒト型結核菌38kDA抗原:大腸菌における過剰产生、精製およびキャラクタリゼーション(The Mycobacterium tuberculosis 38-kDA antigen: overproduction in Escherichia coli, purification and characterisation)、Gene 117:53-60, 1992)。他の株(例えば、大腸菌BL21)は、代替物として使用できる。

## 【0061】

30

形質転換体を、再単離プラスミドの制限によって再び解析した。HSP70<sub>359-610</sub>の発現レベルは、SDS-PAGEによって熱誘導後に解析した。

## 【0062】

pLEXWO27-2の複製した挿入物は、DNA配列解析によって確認された。配列を図1に示す。用いたクローニング手順の結果として、C末端における追加の10残基(ITTITTKDPK、図1に示さず)および追加の单一残基(M、これも図1に示さず)を有する構築HSP70<sub>359-610</sub>を発現させた。これらの残基は、ヒト型結核菌HSP70の配列の一部ではなく、特定の断片の活性に影響を与えない。

## 【実施例2】

## 【0063】

40

組み換えHSP70<sub>359-610</sub>の調製

## 細菌培養

HSP70<sub>359-610</sub>の产生のために、大腸菌株CAG629/pWO27-2(すなわち、pLEXWO27-2で形質転換された大腸菌株CAG629)を、1mL当たり100μgのアンピシリンを含むLB培地1L中で生育させた。培養は、約0.15のOD<sub>600</sub>で接種して、30、180rpmでインキュベートした。OD<sub>600</sub>=0.3に到達した後、温度を42にシフトさせることによってタンパク質発現を誘導した。3.5時間後、OD<sub>600</sub>=1.2で細胞を回収した。細胞ペレットを-20で保存、またはHSP70<sub>359-610</sub>の精製のために直接使用した。

## 【0064】

50

HSP70<sub>359-610</sub>の精製

Hi s Bind Quick Column (Novagen) を、 H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 の精製のために製造業者の使用説明書に従って用いた。上記のように回収された細胞ペレット (2 g) を、 10 mL のイミダゾール非含有結合バッファーに再懸濁し、 超音波処理によって破壊した。粗抽出物を 10 分間 4 0 0 0 × g で遠心分離した。その後、 上清を Hi s Bind Quick Column にかけた。30 mL のイミダゾール非含有結合バッファーでカラムを洗浄後、 イミダゾール 1 5 0 mM 含有バッファー 1 5 mL で H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 を溶出した。精製ポリペプチドを SDS - PAGE によって解析した。

### 【実施例 3】

#### 【0065】

RANTES、IL-12、TNF- および一酸化窒素の刺激

THP1 細胞 (2 × 10<sup>5</sup> 個 / mL) を 24 ウエルプレートで培養し、 様々な濃度の H S P 7 0 、 H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 または H S P 7 0 1 - 3 5 8 (N 末端ドメイン) と共にインキュベートした。H S P 7 0 調製物中の LPS によるいかなる残存汚染効果も除外するために、 50 μg / mL のポリミキシン B を、 H S P 7 0 または LPS のいずれかで刺激された単球の培養物に添加した。3 ~ 5 日後、 上清を用いて RANTES、IL-12、TNF- および一酸化窒素をアッセイした。インタクト H S P 7 0 または H S P 7 0 1 - 3 5 8 とは対照的に、 H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 は IL-12 産生を刺激した (図 2)。また、 H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 は、 インタクト H S P 7 0 と比較して、 TNF- 、 RANTES および NO の増産を刺激した (図 2 および図 3)。

#### 【0066】

##### H S P 3 5 9 - 6 1 0 の性質

H S P 3 5 9 - 6 1 0 の性質をインタクト H S P 7 0 の性質と比較するために、 H S P 3 5 9 - 6 1 0 またはインタクト H S P 7 0 に非共有結合したサイトカインレセプター CCR5 の細胞外領域に対応する合成ペプチドで、 マウスを免疫した。4 匹の C57BL / 6 J マウス群を腹腔内免疫して 4 週間後に追加免疫し、 血清の抗体応答を ELISA で確定した。N 末端の配列、 CCR5 の第 1 ループ配列および CCR5 の第 2 ループ配列に対応する合成ペプチドの混合物と非共有結合する H S P 7 0 での免疫後、 血清の抗体応答は、 主として第 1 ループ (1 / 2, 0 0 0) 、 ならびに H S P 7 0 (1 / 3 2, 0 0 0) および H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 (1 / 1 6, 0 0 0) に対して誘導された (図 1)。N 末端およびループ 2 ペプチドに対する血清の抗体価は、 免疫前血清よりも有意に大きくなかった (図 1)。H S P 3 5 9 - 6 1 0 と非共有結合するペプチドでマウスを免疫した場合、 この場合はインタクト H S P 7 0 (1 / 5 0 0 未満) または H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 (1 / 1, 0 0 0) に対する応答は非常に低いものの、 類似の応答が誘導された。また、 最も免疫原性のある第 1 ループペプチドのみと非共有結合する H S P 7 0 または H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 で、 マウスを免疫した。前述と同様に、 H S P 7 0 と複合したペプチドでの免疫は、 第 1 ループペプチド (1 / 8, 0 0 0) 、 H S P 7 0 (1 / 3 2, 0 0 0) および H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 (1 / 8, 0 0 0) に対する応答を誘導した。H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 での免疫は、 第 1 ループペプチド (1 / 3 2, 0 0 0) に対する血清の抗体応答の増加をもたらしたが、 H S P 7 0 および H S P 7 0 3 5 9 - 6 1 0 双方にに対する応答は、 著しく低減した。

#### 【0067】

要約すると、 H S P 断片は、 以下の長所を有する。

- a ) H S P 断片は、 全身投与および粘膜投与双方で有効である。
- b ) H S P 断片は、 免疫応答の Th-1 分極を誘導するため、 CD8<sup>+</sup> T 細胞、 CD4<sup>+</sup> T 細胞および抗体応答を導く。
- c ) H S P 断片は、 ペプチドに対する所望のコンホメーションを付与し得るシャペロン機能を有する。
- d ) H S P 断片は、 CCR5 レセプターを遮断およびダウンレギュレートする CCR5 カインの産生を刺激するため、 特異的抗 H I V 効果を有する。

10

20

30

40

50

e ) 断片は樹状細胞の成熟を誘導し、これがT細胞に対する抗原提示を促進する。

【0068】

上で引用された全ての文献は、参考により本明細書に援用される。

【0069】

【表1-1】

!!AA\_MULTIPLE\_ALIGNMENT 1.0  
PileUp of: @hsp70-listfile.txt

シンボル比較表 : GenRunData:blosum62.cmp CompCheck: 1102

ギャップウェイト : 8  
ギャップレンジスウェイト : 2

10

Hsp70-proteins.msf MSF: 686 Type: P September 27, 2002 14:33 Check: 81

名前: マウス	Len: 686	Check: 5051	Weight: 1.00
名前: ラット	Len: 686	Check: 9373	Weight: 1.00
名前: ウシ	Len: 686	Check: 4580	Weight: 1.00
名前: ヒト	Len: 686	Check: 5101	Weight: 1.00
名前: アフリカツメガエル	Len: 686	Check: 1574	Weight: 1.00
名前: シロイヌナズナ	Len: 686	Check: 3665	Weight: 1.00
名前: ショウジョウバエ	Len: 686	Check: 9083	Weight: 1.00
名前: 酵母	Len: 686	Check: 9781	Weight: 1.00
名前: ヒト型結核菌 H37Rv	Len: 686	Check: 6358	Weight: 1.00
名前: ライ菌	Len: 686	Check: 1476	Weight: 1.00
名前: 黄色ブドウ球菌	Len: 686	Check: 9782	Weight: 1.00
名前: 大腸菌 DnaK	Len: 686	Check: 4257	Weight: 1.00

20

//

マウス	---	MAKNTAI GIDLGTTYS C VGVFQHKGKVE IIANDQGNRT TPSYVAFT.D	50
ラット	---	MAKKTAI GIDLGTTYS C VGVFQHKGKVE IIANDQGNRT TPSYVAFT.D	
ウシ	---	MAKNMAI GIDLGTTYS C VGVFQHKGKVE IIANDQGNRT TPSYVAFT.D	
ヒト	---	MAKAAAI GIDLGTTYS C VGVFQHKGKVE IIANDQGNRT TPSYVAFT.D	
アフリカツメガエル	--	MATKGVAV GIDLGTTYS C VGVFQHKGKVE IIANDQGNRT TPSYVAFT.D	
シロイヌナズナ	MAGKGE	GPAI GIDLGTTYS C VGVWQHDRV E IIANDQGNRT TPSYVAFT.D	
ショウジョウバエ	-----	MPAI GIDLGTTYS C VGVYQHKGKVE IIANDQGNRT TPSYVAFT.D	
酵母	-----	MSRAV GIDLGTTYS C VAHFSNDRVE IIANDQGNRT TPSYVAFT.D	
ヒト型結核菌 H37Rv	-----	MARAV GIDLGTTNSV VSVLEGGDPV VVANSEGSRT TPSIVAFARN	
ライ菌	-----	MARAV GIDLGTTNSV VSVLEGGDPV VVANSEGSRT TPSTVAFARN	
黄色ブドウ球菌	-----	MSKII GIDLGTTNSC VTVLEGDEPK VIQNPEGSRT TPSVVAF.KN	
大腸菌 DnaK	-----	GKII GIDLGTTNSC VAIMDGTTPR VLENAEGDRT TPSIIAYTQD	

30

マウス	51	TERLIGDAAK NQVALNPQNT VFDAKRLIGR KFGDAVVQSD MKHWPPQVN	100
ラット	TERLIGDAAK NQVALNPQNT VFDAKRLIGR KFGDPVVQSD MKHWPPQVN		
ウシ	TERLIGDAAK NQVALNPQNT VFDAKRLIGR KFGDPVVQSD MKEWPFRVIN		
ヒト	TERLIGDAAK NQVALNPQNT VFDAKRLIGR KFGDPVVQSD MKHWPPQVIN		
アフリカツメガエル	TERLIGDAAK NQVAMNPQNT VFDAKRLIGR KFNDPVVQCD LKHWPPQVVS		
シロイヌナズナ	SERLIGDAAK NQVAMNPNT VFDAKRLIGR RYSDPSVQAD KSHWPFKVVS		
ショウジョウバエ	SERLIGDPAK NQVAMNPRT VFDAKRLIGR KYDDPKIAED MKHWPPFKVVS		
酵母	TERLIGDAAK NQAAINPHNT VFDAKRLIGR KFDDPEVTTD AKEPPFKVIS		
ヒト型結核菌 H37Rv	GEVLVGQPAK NQAVTNVDRT VRSVKRHM G. ....		
ライ菌	GEVLVGQPAK NQAVTNVDRT IRSVKRHM G. ....		
黄色ブドウ球菌	GETQVGEVAK RQAINTN.PNT VQSIKRHM G. ....		
大腸菌 DnaK	GETLVGQPAK RQAVTNPQNT LFAIKRLIGR RFQDEEVQRD VSIMPFKIIA		

40

【表1-2】

マウス	.DGDKPKVQV NYKGESRSFF PEEISSMVLT KMKEIAEAYL GHPVTNAVIT	101	150
ラット	.DGDKPKVQV NYKGENRSFY PEEISSMVLT KMKEIAEAYL GHPVTNAVIT		
ウシ	.DGDKPKVQV SYKGETKAFY PEEISSMVLT KMKEIAEAYL GHPVTNAVIT		
ヒト	.DGDKPKVQV SYKGETKAFY PEEISSMVLT KMKEIAEAYL GYPVTNAVIT		
アフリカツメガエル	.DEGKPKVKV EYKGEeksff PEEISSMVLT KMKEIAEAYL GHPVTNAVIT		
シロイヌナズナ	GPGEKPMIVV NHKGEEKQFS AEEISSIVLI KMREIAEAFL GSPVKNAVVI	10	
ショウジョウバエ	.DGGKPKIGV EFKGEAKRFA PEEISSMVLV KMREIAEAYL GETVTDavit		
酵母	RDG.KPVVQV EYKGETKTFT PEEISSMVLs KMKETAENYL GTTVNDAVVT		
ヒト型結核菌 H37Rv	...SDWSIEI ...DGKKYT APEISARILM KLKRDAEAYL GEDITDAVIT		
ライ菌	...SDWSIEI ...DGKKYT AQEISARVLM KLKRDAEAYL GEDITDAVIT		
黄色ブドウ球菌	...TDYKVDI ...EGKSYT PQEISAMILQ NLKNTAESYL GEKVDKAVIT		
大腸菌 DnaK	ADNGDANVEV ...KGQKMA PPQISAEVLK KMKKTAEDYL GEPVTEAVIT		
マウス	VPAYFNDsQR QATKDAGVIA GLNVLRRIINE PTAAAAIAYGL DRTGK..GER	151	200
ラット	VPAYFNDsQR QATKDAGVIA GLNVLRRIINE PTAAAAIAYGL DRTGK..GER		
ウシ	VPAYFNDsQR QATKDAGVIA GLNVLRRIINE PTAAAAIAYGL DRTGK..GER		
ヒト	VPAYFNDsQR QATKDAGVIA GLNVLRRIINE PTAAAAIAYGL DRTGK..GER		
アフリカツメガエル	VPAYFNDsQR QATKDAGVIA GLNVLRRIINE PTAAAAIAYGL DKGAR..GEQ		
シロイヌナズナ	VPAYFNDsQR QGTDAGVIS GLNVMRRIINE PTAAAAIAYGL DKKASSVGEK	20	
ショウジョウバエ	VPAYFNDsQR QATKDAGRIA GLNVLRRIINE PTAAAALAYGL DK..NLQGER		
酵母	VPAYFNDsQR QATKDAGTIA GMNVLRRIINE PTAAAAIAYGL DKKGR..AEH		
ヒト型結核菌 H37Rv	TPAYFNDsQR QATKDAGQIA GLNVLRIVNE PTAAAALAYGL DKGEK...EQ		
ライ菌	TPAYFNDsQR QATKEAGQIA GLNVLRIVNE PTAAAALAYGL DKGER...EQ		
黄色ブドウ球菌	VPAYFNDsQR QATKDAGKIA GLEVERIINE PTAAAALAYGL DKTDK...DE		
大腸菌 DnaK	VPAYFNDsQR QATKDAGRIA GLEVKRRIINE PTAAAALAYGL DKGTR...NR		
マウス	NVLIFDLGGG TFDVSLTID DG....IFEV KATAGDTHLG GEDFDNRLVS	201	250
ラット	NVLIFDLGGG TFDVSLTID DG....IFEV KATAGDTDLG GEDFDNRLVS		
ウシ	NVLIFDLGGG TFDVSLTID DG....IFEV KATAGDTHLG GEDFDNRLVN		
ヒト	NVLIFDLGGG TFDVSLTID DG....IFEV KATAGDTHLG GEDFDNRLVN		
アフリカツメガエル	NVLIFDLGGG TFDVSLTID DG....IFEV KATAGDTHLG GEDFDNRMVN		
シロイヌナズナ	NVLIFDLGGG TFDVSLLTIE EG....IFEV KATAGDTHLG GEDFDNRMVN	30	
ショウジョウバエ	NVLIFDLGGG TFDVSLTID EG...SLFEV RATAGDTHLG GEDFDNRLVT		
酵母	NVLIFDLGGG TFDVSLLSID EG....VFEV KATAGDTHLG GEDFDNRLVN		
ヒト型結核菌 H37Rv	RILVFDLGGG TFDVSLLEI. ...GEGVVEV RATSGDNHLG GDDWDQRVVD		
ライ菌	TILVFDLGGG TFDVSLLEI. ...GEGVVEV RATSGDNHLG GDDWDDRIVN		
黄色ブドウ球菌	KVLVFDLGGG TFDVSLLEL. ...GDGVFEV LSTAGDNKLG GDDFDQVIIID		
大腸菌 DnaK	TIAVYDLGGG TFDISIIIEID EVDGEKTFEV LATNGDTHLG GEDFDSRLIN		
マウス	HFVEEFKRKH KKDISQNKRA VRRLRTACER AKRTLSSSTQ ASLEIDSLFE	251	300
ラット	HFVEEFKRKH KKDISQNKRA VRRLRTACER AKRTLSSSTQ ASLEIDSLFE		
ウシ	HFVEEFKRKH KKDISQNKRA VRRLRTACER AKRTLSSSTQ ASLEIDSLFE		
ヒト	HFVEEFKRKH KKDISQNKRA VRRLRTACER AKRTLSSSTQ ASLEIDSLFE		
アフリカツメガエル	HFVEEFKRKH KKDISQNKRA LRRRLRTACDR AKRTLSSSSQ ASIEIDSLFE		
シロイヌナズナ	HFVQEFKRKN KKDISQNKRA LRRRLRTACER AKRTLSSSTAQ TTIEIDSLFE	40	
ショウジョウバエ	HLADEFKRKF RKDLRSNPRA LRRRLRTAAER AKRTLSSSTE ATIEIDALFE		
酵母	HLATEFKRKT KKDISNNQRS LRRRLRTAAER AKRALSSSSQ TSIEIDSLFE		
ヒト型結核菌 H37Rv	WLVDKFKGTS GIDLTKDKMA MQRLREAAEK AKIELSSSQS TSINLPYITV		
ライ菌	WLVDKFKGTS GIDLTKDKMA MQRLREAAEK AKIELSSSQS TSVNLPYITV		
黄色ブドウ球菌	YLVAEFPKRN GVDSLQDKMA LQRLKDAAEK AKKDLGVSQ TOISLPFISA		
大腸菌 DnaK	YLVEEFKKDQ GIDLRLNDPLA MQRLKEAAEK AKIELSSAQO TDVNLPYITA		

【表1-3】

		301	350	
マウス	GID.....FY TSITRARFEE	LCSDLFRGTL	EPVEKALRDA	KMDKAQIHDL
ラット	GID.....FY TSITRARFEE	LCSDLFRGTL	EPVEKALRDA	KLDKAQIHDL
ウシ	GID.....FY TSITRARFEE	LCSDLFRSTL	EPVEKALRDA	KLDKAQIHDL
ヒト	GID.....FY TSITRARFEE	LCSDLFRSTL	EPVEKALRDA	KLDKAQIHDL
アフリカツメガエル	GID.....FY TAITRARFEE	LCSDLFRGTL	EPVEKALRDA	KLDKSQIHEI
シロイヌナズナ	GID.....FY TTITRARFEE	LNMDLFRKCM	EPVEKCLRDA	KMDKSSVHDV
ショウジョウバエ	GHD.....FY TKVSRARFEE	LCADLFRNTL	OPVEKALTDA	KMDKGQIHDI
酵母	GMD.....FY TSLTRARFEE	LCADLFRSTL	EPVEKVLKDS	KLDKSQIDEI
ヒト型結核菌 H37Rv	DADKNPLFLD EQLTRAEFQR	ITQDLLDRTR	KPFQSVIADT	GISVSEIDHV
ライ菌	DSDKNPLFLD EQLRAEFQR	ITQDLLDRTR	QPFQSVVKDA	GISVSEIDHV
黄色ブドウ球菌	.GENGPLHLE VNLTTRSKFEE	LSDSLIRRTM	EPTRQAMKDA	GLTNSDIDEV
大腸菌 DnaK	DA.TGPKHMN IKVTRAKLES	LVEDLVNRSI	EPLKVALQDA	GLSVSDIDDV
		351	400	
マウス	VLVGGSTRIP KVQKLLQDFF	NGRDLNKSIN	PDEAVAYGAA	VQAAILMGDK
ラット	VLVGGSTRIP KVQKLLQDFF	NGRDLNKSIN	PDEAVAYGAA	VQAAILMGDK
ウシ	VLVGGSTRIP KVQKLLQDFF	NGRDLNKSIN	PDEAVAYGAA	VQAAILMGDK
ヒト	VLVGGSTRIP KVQKLLQDFF	NGRDLNKSIN	PDEAVAYGAA	VQAAILMGDK
アフリカツメガエル	VLVGGSTRIP KVQKLLQDFF	NGRELNKSIN	PDEAVAYGAA	VQAAILMGDK
シロイヌナズナ	VVVGGSSTRIP KVQQQLVQDFF	NGKELCKSIN	PDEAVAYGAA	VQAAILSGEG
ショウジョウバエ	VLVGGSTRIP KVEALLQEYF	HGKSLNLSIN	PDEAVAYGAA	VQAAILSGDQ
酵母	VLVGGSTRIP KIQKLVSDFF	NGKEPNRSIN	PDEAVAYGAA	VQAAILTGQ
ヒト型結核菌 H37Rv	VLVGGSTRMP AVTDLVKELT	GGKEPNKGVN	PDEVVAVGAA	LQAGVLKGE.
ライ菌	VLVGGSTRMP AVTDLVKELT	GGKEPNKGVN	PDEVVAVGAA	LQAGVLKGE.
黄色ブドウ球菌	ILVGGSTRIP AVQEAVKKEI	.GKEPNKGVN	PDEVVAMGAA	IQGGVITGD.
大腸菌 DnaK	ILVGGQTRMP MVQKKVAEFF	.GKEPRKDVN	PDEAVAIGAA	VQGGVLTGD.
		401	450	
マウス	SENVQDLLLL DVA.PLSLGL	ETAGGVMTAL	IKRNSTIPTK	QTQTFITTYSD
ラット	SENVQDLLLL DVA.PLSLGL	ETAGGVMTAL	IKRNSTIPTK	QTQTFITTYSD
ウシ	SENVQDLLLL DVA.PLSLGL	ETAGGVMTAL	IKRNSTIPTK	QTQIFITTYSD
ヒト	SENVQDLLLL DVA.PLSLGL	ETAGGVMTAL	IKRNSTIPTK	QTQIFITTYSD
アフリカツメガエル	SENVQDLLLL DVA.PLSLGL	ETAGGVMTVL	IKRNTTIPRK	QTQSFTTYSD
シロイヌナズナ	NEKVQDLLLL DVT.PLSLGL	ETAGGVMTVL	IPRNNTIPTK	KEQIFSTYSD
ショウジョウバエ	TGKIQDVLV DVA.PLSLGI	ETAGRVMKTL	IERNCRIPCK	QTKTFSTYSD
酵母	STKTQDLLLL DVA.PLSLGI	ETAGGIMKTL	IPRNSTIPTK	KSETFSTYAD
ヒト型結核菌 H37Rv	...VKDVLLL DVT.PLSLGI	ETKGGVMTRL	IERNNTIPTK	RSETFTIADD
ライ菌	...VKDVLLL DVTPLSLGI	ETKGGVMTKL	IERNNTIPTK	RSETFTIADD
黄色ブドウ球菌	...VKDVLLL DVT.PLSLGI	EILGGRMNTL	IERNNTIPTS	KSQIYSTAVD
大腸菌 DnaK	...VKDVLLL DVT.PLSLGI	ETMGGVMTTL	IAKNTTIPRK	HSQVFSTAED
		451	500	
マウス	NQPGVLIQVY EGERAMTRDN	NLLGRFELSG	IPPAPRGVPQ	IEVTFDIDAN
ラット	NQPGVLIQVY EGERAMTRDN	NLLGRFELSG	IPPAPRGVPQ	IEVTFDIDAN
ウシ	NQPGVLIQVY EGERAMTRDN	NLLGRFELSG	IPPAPRGVPQ	IEVTFDIDAN
ヒト	NQPGVLIQVY EGERAMTKDN	NLLGRFELSG	IPPAPRGVPQ	IEVTFDIDAN
アフリカツメガエル	NQPGVLIQVF EGERAMTKDN	NLLGKFELSG	IPPAPRGVPQ	IEVTFDIDAN
シロイヌナズナ	NQPGVLIQVY EGERARTKDN	NLLGKFELSG	IPPAPRGVPQ	ITVCFDIDAN
ショウジョウバエ	NQPGVSIQVY EGERAMTKDN	NALGTFDLSG	IPPAPRGVPQ	IEVTFDMDAN
酵母	NQPGVLIQVF EGERRTKDN	NLLGKFELSG	IPPAPRGVPQ	IDVTFDIDAN
ヒト型結核菌 H37Rv	NQPSVQIQVY QGEREIAAHN	KLLGSFELTG	IPPAPRGIPQ	IEVTFDIDAN
ライ菌	NQPSVQIQVY QGEREIAASHN	KLLGSFELTG	IPPAPRGVPQ	IEVTFDIDAN
黄色ブドウ球菌	NQPSVDVHVL QGERPMAADN	KTLGRFQLTD	IPPAERGKPQ	IEVTFDIDAN
大腸菌 DnaK	NQSAVTIHVL QGERKRAADN	KSLGQFNLDG	INPAPRGMPQ	IEVTFDIDAD

10

20

30

40

【表1-4】

		501	550	
マウス	GILNVTATDK STGKANKITI	TNDKGRLSKE EIERNVQEAE RYKADEVQR		
ラット	GILNVTATDK STGKANKITI	TNDKGRLSKE EIERNVQEAK RYKADEVQR		
ウシ	GILNVTATDK STGKANKITI	TNDKGRLSKE EIERNVQEAE KYKADEVQR		
ヒト	GILNVTATDK STGKASKITI	TNDKGRLSKE EIERNVQEAE KYKADEVQR		
アフリカツメガエル	GILNVSAVEK SSGQNKITI	TNDKGRLSKE DIEKMVQEAE KYKADDDAQR		
シロイヌナズナ	GILNVSAEDK TTGQKNKITI	TNDKGRLSKE EIEKMVQEAE KYKADEEHK		
ショウジョウバエ	GILNVSAKEM STGKAKNITI	KNDKGRLSQA EIDRMVNEAE KYADEDEKHR		
酵母	GILNVSALEK GTGKSNKITI	TNDKGRLSKD DIDRMVSEAE KYRADDEREA		
ヒト型結核菌 H37Rv	GIVHVTAKDK GTGKENTIRI	QEGSG.LSKE DIDRMKDAE AHAEEDRKRR		10
ライ菌	GIVHVTAKDK GTGKENTIKI	QEGSG.LSKE EIDRMVKDAE AHAEEDRKRR		
黄色ブドウ球菌	GIVNVTAKDL GTNKEQRITI	QSSSS.LSDE EIDRMVKDAE VNAEADKKRR		
大腸菌 DnaK	GILHVSAKDK NSGKEQKITI	KASSG.LNED EIQQMVRDAE ANAEADRKFE		
	551	600		
マウス	DRVAAKNALE SYAFNMKSAV	EDEGLK...G KLSEADKKKV LDKCQEVISW		
ラット	ERVAAKNALE SYAFNMKSAV	EDEGLK...G KISEADKKKV LDKCQEVISW		
ウシ	ERVSAKNALE SYAFNMKSAV	EDEGLK...G KISEADKKKV LDKCQEVISW		
ヒト	ERVSAKNALE SYAFNMKSAV	EDEGLK...G KISEADKKKV LDKCQEVISW		
アフリカツメガエル	ERVDAKNALE SYAFNLKSMV	EDENVK...G KISDEDKRTI SEKCTQVISW		
シロイヌナズナ	KKVDAKNALE NYAYNMRNTI	KDEKIA...S KLDAADKKKI EDAIDQAIIEW		
ショウジョウバエ	QRIASRNALE SYVFNVKQAV	EQAG.A...G KLDEADKNSV LEKCNETISW		
酵母	ERVQAKNQLE SYAFTLKNTI	NEASFK...E KVGEDDAKRL ETASQETIDW		
ヒト型結核菌 H37Rv	EEADVRNQAE TLVYQTEKFV	KEQREAEIGGS KVPEDTLNKV DAAVAEAKAA		
ライ菌	EEADVRNQAE TLVYQTEKFV	KEQRETENGS RVPEDTLNKV EAAVAEAKTA		
黄色ブドウ球菌	EEVDLRNEAD SLVFQVEKTL	.....TDLGE NIGEEDKSA EKKDALKTA		
大腸菌 DnaK	ELVQTRNQGD HLLHSTRKQV	E.....EAGD KLPADDKTAI ESALTAETA		
	601	650		
マウス	LDSNTLADKE EFVHKREELE	RVCSPPIISGL Y.QGAGA.PG ...AGGF...		
ラット	LDSNTLAEKE EFVHKREELE	RVCNPPIISGL Y.QGAGA.PG ...AGGF...		
ウシ	LDANTLAEKD EFEHKRKELE	QVCNPPIISRL Y.QGAGG.PG ...AGGF...		
ヒト	LDANTLAEKD EFEHKRKELE	QVCNPPIISGL Y.QGAGG.PG ...PGGF...		
アフリカツメガエル	LENNQLAEGE SYAFQQKDLE	KVCQPIITKL Y.QG.GV.PG .GVPGGMPGS		
シロイヌナズナ	LDGNQLAEGE EFEHKRKELE	SLCNPIIARM Y.QGAGP.DM .GGAGGMDDD		
ショウジョウバエ	LDSNTTAEKE EFDHRLEELT	RHCSPIMTKM HQQGAGA... .QAGGGPGA		
酵母	LDASQAASLD EYKDRQKELE	GIANPIMTKF YGAGAGAGPG AGESGGFPGS		
ヒト型結核菌 H37Rv	LGGS...DIS AIKSAMEKLG	QESQALGQAI YEAAQAAS... . . . . .Q		
ライ菌	LGTT...DIS AIKSAMEKLG	QDSQALGQAI YEATQAAS... . . . . .K		
黄色ブドウ球菌	LEGO...DIE DIKSKEELE	KVIQELSAKV YE..QAAQ... . . . . .Q		
大腸菌 DnaK	LKG...DKA AIEAKMQELA	QVSQKL.MEI AQQQHAQQ... . . . . .Q		
	651	686		
マウス	..GAQAPKGA S.G.SGPTIE	EVD*----- -----		
ラット	..GAQAPKGG S.G.SGPTIE	EVD----- -----		
ウシ	..GAQGPKGG S.G.SGPTIE	EVD*----- -----		
ヒト	..GAQGPKGG S.G.SGPTIE	EVD*----- -----		
アフリカツメガエル	SCGAQARQGG N...SGPTIE	EVD----- -----		
シロイヌナズナ	T.....PAGG SGG.AGPKIE	EVD*----- -----		
ショウジョウバエ	NCGQQA..GG FGGYSGPTVE	EVD*----- -----		
酵母	MPNSGATGGG ED..TGPTVE	EVD*----- -----		
ヒト型結核菌 H37Rv	ATGAAHPGGE PGGAHPGSAD	DVVDAEVVDD GREAK*		
ライ菌	VGGEA...SA PGGSN..STD	DVLTRRWSTT NGSPK*		
黄色ブドウ球菌	Q..QQAQGAN AGQNNNDSTVE	DAEFKEVKDD DKK*--		
大腸菌 DnaK	TAGA...DAS ANNAKDDVV	DAEFEEVKDK K-----		40

【表1-5】

HPS-70 タンパク質におけるタンパク質配列間の距離 msf [\*]

補正方法：単純距離（補正なし）

距離：100 アミノ酸当たりの置換数を観察

Symmatrix バージョン 1

マトリックス数：1

マトリックス 1、ディメンジョン：12

列および行インデックスに対するキー：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.00	1.72	4.52	4.83	14.55	24.45	22.78	27.27	50.92	50.85	50.77	50.74
2	0.00	3.59	3.74	13.93	24.33	22.98	26.69	51.01	51.10	50.34	50.82	
3	0.00	1.40	14.24	23.35	24.05	25.71	51.09	51.02	50.94	50.08		
4	0.00	13.93	23.51	23.89	25.55	51.09	51.02	50.94	50.94	50.08		
5	0.00	25.08	26.14	25.66	52.10	52.03	50.69	50.69	50.69	50.08		
6	0.00	30.50	29.91	29.78	52.19	52.03	53.86	53.86	53.86	51.39		
7	0.00	29.78	51.01	50.59	51.54	51.54	51.22					
8	0.00	50.08	49.83	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00	51.14		
9	0.00	0.00	8.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	41.08	43.02	
10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	41.42	43.40	
11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	41.43		
12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図1】図1は、HSP70またはHSP70<sub>359-610</sub>と非共有結合的に複合した  
合成ペプチドでの免疫後のC57BL/6Jマウスにおける血清の抗体応答を示す。

【図2】図2は、THP1細胞によるIL-12およびTHF-の産生における、HSP70、HSP70<sub>1-358</sub>、およびHSP70<sub>359-610</sub>の効果を示す。

【図3】図3は、単球性THP1細胞によるRANTES、IL-12およびTHF-の産生における、HSP70<sub>359-610</sub>の効果を示す。

【図4】図4は、ヒト型結核菌HSP70の核酸配列およびアミノ酸配列を示す。

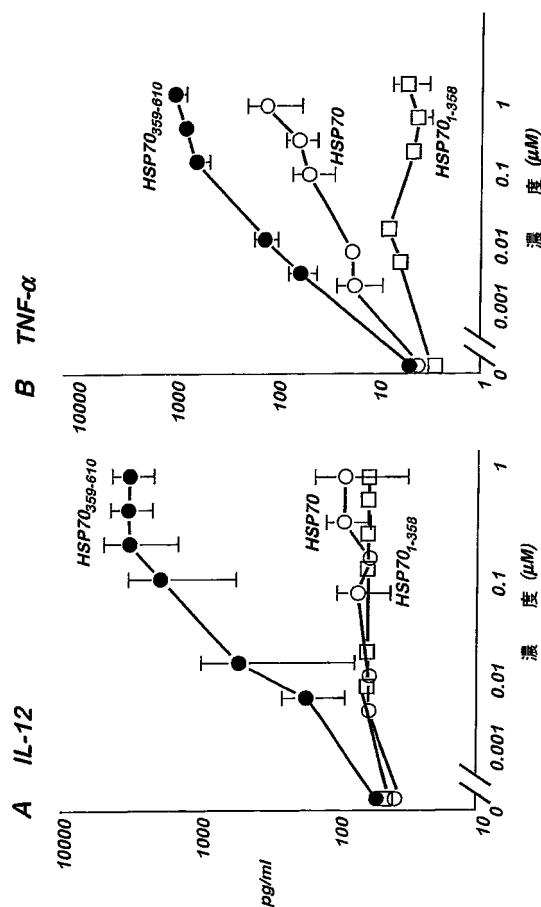
【図1】

抗原					
免 疫 原	N-末端	第1ループ	第2ループ	HSP70	HSP70 <sub>359-610</sub>
(1-20)*	(88-102)*	(177-197)*			
HSP70/					
3ペプチド	160	$2 \times 10^3$	80	$32 \times 10^3$	$16 \times 10^3$
HSP70 <sub>359-610</sub> /					
3ペプチド	160	$2 \times 10^3$	80	400	$10^3$
HSP70/					
第1ループ	160	$8 \times 10^3$	160	$32 \times 10^3$	$8 \times 10^3$
HSP70 <sub>359-610</sub> /					
第1ループ	200	$32 \times 10^3$	200	<500	$10^3$
免疫前血清	200	<100	100	<100	<100

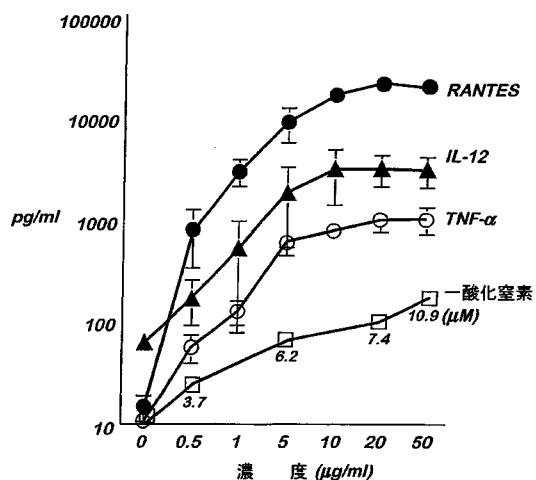
抗体価は OD<sub>405nm</sub>>0.2 となる最高希釈として表す

\* 合成ペプチドに相当するCCR5配列

【図2】



【図3】



【図4】

1075 gaggtg  
359 E V 360  
1081 aaagacgttctgtctgtatgttaccccgctgagcctgggtatc  
K D V L L L D V T P L S L G I 375  
1126 gagacccaaggccgggtgtatgaccaggctatcgagcacaacc  
E T K G G V M T R L I E R N T 390  
1171 acgttcccccaccaaggcggtcgagactttacaccgcggcggc  
T I P T K R S E T F T T A D D 405  
1216 aacccaaaggctcggtgacatccaggctatcgggggagcgtqag  
N Q P S V Q I Q V Y Q G E R E 420  
1261 atcgccgcgcacaacaaggctgtcgggtcttcgagctgaccggc  
I A A H N K L L G S F E L T G 435  
1306 atccgcgcgcgcgcggggattccgcagatcgaggtaacttc  
I P P A P R G I P Q I E V T F 450  
1351 gacatcgacgcacaaggcgatgtgcacgttacccgcggacaag  
D I D A N G I V H V T A K D K 465  
1396 ggacccgcggcaaggaaacacgatccgaatccaggaaaggctcgcc  
G T G K E N T I R I Q E G S G 480  
1441 ctgtccaaaggaaacatgtaccgcatgtacaaaggacgcggc  
L S K E D I D R M I K D A E A 495  
1486 cagccgcaggaggatcgccaaaggctcgogaggaggccatgttc  
H A E E D R K R R E E A D V R 510  
1531 aatcaaggccgacatgtctaccagacggaaaggatccgtcaaa  
N Q A E T L V Y Q T E K F V K 525  
1576 gaaacagctgtggccggagggtggttcggaggatccgtggacacag  
E Q R E A E G G S K V P E D 540  
1621 ctgaaacagggtgtatggccgggtggggaaaggccatggccgc  
L N K V D A A V A E A K A A L 555  
1666 ggccggatcgatattccgcgcatacgatcgccatggaggaaac  
G G S D I S A I K S A M E K L 570  
1711 ggccaggaggatcgaggctctggggcaagcgatctacgaaagg  
G Q E S Q A L G Q A I Y E A A 585  
1756 cagggtcgatcgaggccactggcgctgcccacccggggcgg  
Q A A S Q A T G A A H P G G E 600  
1801 cccggccgtgtccaccccccggctcgctgtatgacgttgtgaccc  
P G G A H P G S A D D V V D A 615  
1846 gaggtggatcgacgcggccggggaggccaaag 1875  
E V V D D G R E A K 625

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/04475

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 7 C07K14/47 C07K14/35 C12N15/12 C12N15/31 A61K38/17 A61K38/16 A61P35/00 A61P37/00 A61P31/18 A61K39/385				
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) IPC 7 C07K 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, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	WO 01 45738 A (KING'S COLLEGE LONDON ) 28 June 2001 (2001-06-28) page 2, line 25 -page 3, line 2 page 4, line 25 -page 9, line 29; examples 1-3,6,7	28-33		
Y	page 3, line 20 - line 22 ---	1-27,34, 35		
X	WO 01 29233 A (UNIV JOHNS HOPKINS MED (US)) 26 April 2001 (2001-04-26) page 1, line 12 -page 2, line 22; claim 21 page 4, line 20 -page 7, line 27 example 1 ---	1-7, 13-22, 25-34		
Y	--- -/-	1-27,34, 35		
<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		*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		
*E* earlier document but published on or after the international filing date		*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		
*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)		*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		
*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*&* document member of the same patent family		
*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed				
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report			
24 June 2003	10/07/2003			
Name and mailing address of the ISA	Authorized officer			
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	De Kok, A			

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/04475

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WANG YUFEI ET AL: "CD40 mediates HSP70 stimulation of beta-chemokines." <i>IMMUNOLOGY</i>, vol. 101, no. Supplement 1, December 2000 (2000-12), page 41 XP002245259</p> <p>Annual Congress of the British Society for Immunology; Harrogate, UK; December 05-08, 2000</p> <p>ISSN: 0019-2805</p> <p>abstract</p> <p>---</p>	1,12
P,X	<p>WANG Y ET AL: "Stimulation of Th1-polarizing cytokines, C-C chemokines, maturation of dendritic cells, and adjuvant function by the peptide binding fragment of heat shock protein 70" <i>JOURNAL OF IMMUNOLOGY</i> 01 SEP 2002 UNITED STATES, vol. 169, no. 5, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 2422-2429, XP002245260</p> <p>ISSN: 0022-1767</p> <p>the whole document</p> <p>---</p>	1-35
T	<p>BECKER THALIA ET AL: "CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes." <i>JOURNAL OF CELL BIOLOGY</i>, vol. 158, no. 7, 30 September 2002 (2002-09-30), pages 1277-1285, XP002245261</p> <p>September 30, 2002</p> <p>ISSN: 0021-9525</p> <p>abstract</p> <p>page 1282, column 1, paragraph 1 -column 2, paragraph 2</p> <p>-----</p>	1,2,4,12

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/04475

## 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.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 21 and 23 are directed at least in part to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the fragments.
2.  Claims Nos.: 1-4, 9-27, all partially 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:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
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 04475

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-4, 9-27, all partially

Present claims 1-4 and 9-27 relate to a heat shock protein fragment defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the ability to increase the level of cytokines and/or CC chemokines and/or NO produced by a cell, above that of the full length protein. The claims cover all fragments having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only ONE such fragment. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the fragment by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to fragments defined by the subject-matter of claims 5-8.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/GB 02/04475

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0145738	A 28-06-2001	AU CA EP WO	2207301 A 2393586 A1 1244470 A2 0145738 A2	03-07-2001 28-06-2001 02-10-2002 28-06-2001
WO 0129233	A 26-04-2001	AU CA CN EP WO	2299401 A 2388045 A1 1411512 T 1222289 A2 0129233 A2	30-04-2001 26-04-2001 16-04-2003 17-07-2002 26-04-2001

## 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 K 48/00	A 6 1 P 31/04	4 H 0 4 5
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/02	C 0 7 K 14/35	
C 0 7 K 14/35	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/47	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 5/00	A
C 1 2 N 5/10	A 6 1 K 37/02	

(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,N0,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZW

(72)発明者 レナー,トーマス

イギリス エスイー1 9アールティー ロンドン 3ド フロア ニュー ガイズ ハウス  
ガイズ ホスピタル ガイズ キングス アンド セント トーマス ホスピタル メディカル  
スクールズ デパートメント オブ イミュノバイオロジー

(72)発明者 ケリー,チャールズ ジョージ

イギリス エスイー1 9アールティー ロンドン 3ド フロア ニュー ガイズ ハウス  
ガイズ ホスピタル ガイズ キングス アンド セント トーマス ホスピタル メディカル  
スクールズ デパートメント オブ イミュノバイオロジー

(72)発明者 シン,マハヴィア

ドイツ連邦共和国 ブラウンシュバイク 38124 バルトブリック 6

(72)発明者 ワン,イーフェイ

イギリス エイチエイ2 9キューエイチ ロンドン ハロウ レイナーズ レーン トーベイ  
ロード 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12 EA04 GA11  
4B065 AA01X AA32Y AA57X AA72X AA90X AA93Y AB01 BA02 CA24 CA44  
4C084 AA02 AA06 AA13 BA01 BA08 BA21 BA22 BA23 CA04 MA01  
NA14 ZB052 ZB072 ZB262 ZB332 ZB352 ZC552  
4C085 AA03 BA09 CC32 DD88 EE06 FF02 FF11 FF13 FF14 GG01  
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB05 ZB07  
ZB26 ZB33 ZB35 ZC55  
4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 CA40 EA22 EA29 FA74