

(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. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 5
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/00	4 C O 8 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/04	4 C O 8 5
A 6 1 K 39/04	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 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)	(71) 出願人	502355761
(86) (22) 出願日	平成14年10月3日 (2002. 10. 3)		キングス カレッジ ロンドン
(85) 翻訳文提出日	平成16年6月1日 (2004. 6. 1)		イギリス ロンドン ダブリュシー2アー
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/004475		ル 2エルエス アン インスティテュー
(87) 国際公開番号	W02003/029289		ト インコーポレイテッド バイ ロイヤ
(87) 国際公開日	平成15年4月10日 (2003. 4. 10)		ル チャーター オブ ストランド
(31) 優先権主張番号	0123756. 9	(74) 代理人	100100549
(32) 優先日	平成13年10月3日 (2001. 10. 3)		弁理士 川口 嘉之
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(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。 10

【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。 20

【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。 30

【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。 40

【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。

【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。 20

【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 C C ケモカインおよび / または N O 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 C C ケモカインおよび / または N O 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。 30

【請求項 25】

免疫応答を T h 1 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 H S P 70 の C 末端領域のアミノ酸残基 359 ~ 625 を含むポリペプチド。 40

【請求項 29】

前記熱ショックタンパク質 H S P 70 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】

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】

10

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

20

【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效果を有することが示された (Udono 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】

30

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

40

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

50

インの産生増加は、微生物感染（ウイルス感染等）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W O 0 1 / 4 5 7 3 8号には、1つまたは複数のC Cケモカインの細胞による産生を増加させるための全長H S Pの使用が記載されている。驚くべきことに発明者らは、H S P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H S P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C C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（H S P）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（H S P）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。H S P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。H S Pは、H S P 7 0、H S P 6 5、H S P 4 0、H S P 2 7、B i P、G P 9 6、H S P 6 0、H S P 9 0またはH S P 9 6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H S P 7 0である。H S Pは修飾H S Pであってもよい。この場合、H S P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H S P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、C CケモカインまたはNOの細胞による産生をもたらすH S Pの能力に影響を与えないならば、全長H S P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】

H S Pは市販されている。例えば、H S P 7 0はStressGen, Inc.およびLionex Diagnostics and Therapeutics, Braunschweig, Germanyから得られ、H S P 6 5はStressGen, Inc.から得られ、H S P 4 0はStressGen Biotechnologies, Victoria, British Columbiaから得られる。様々なH S Pをコードする遺伝子は、クローン化されて配列決定されている。例えば、ヒトH S P 7 0配列はGenbankアクセッション番号M 2 4 7 4 3であり、マウスH S P 7 0はGenbankアクセッション番号M 3 5 0 2 1であり、ヒトH S P 6 5はGenbankアクセッション番号P 4 2 3 8 4であり、ヒトH S P 4 0はGenbankアクセッション番号D 4 9 5 4 7である。H S Pの既知の配列に基づき所望のH S Pを得ることは、当業者にとって通常のことである。多数のH S P 7 0タンパク質の配列は、表1に記載されている。

【0011】

さらに、H S P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C Cケモカインおよび/またはNOのレベルを、対応する全長H S P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H S Pの任意の断片を指す。H S P断片は、対応する全長H S P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グスウェイト（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とヒト型結核菌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-1 α およびMIP-1 β 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。

【 0 0 3 1 】

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や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。

【 0 0 3 2 】

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産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。

10

【 0 0 3 3 】

さらに、本発明は、本発明による H S P 断片または H S P 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。

【 0 0 3 4 】

また、本発明は、療法における使用のための本発明による H S P 断片を提供する。

20

【 0 0 3 5 】

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 H S P 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。

【 0 0 3 6 】

さらに、必要とする患者に有効用量の H S P 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。

【 0 0 3 7 】

また、本発明は、本発明による H S P 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 C C ケモカインおよび/または N O の産生を、対応する全長 H S P 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を提供する。

30

【 0 0 3 8 】

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 C C ケモカインおよび/または N O の産生を、対応する全長 H S P 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 H S P 断片の使用を提供する。

【 0 0 3 9 】

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 C C ケモカインおよび/または N O の産生を、対応する全長 H S P 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 H S P 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。

40

【 0 0 4 0 】

また、本発明は、免疫応答を T h 1 応答に分極させるための、本発明による H S P 質断片の使用を提供する。

【 0 0 4 1 】

また、ワクチンと組み合わせた本発明による H S P 断片を提供する。

【 0 0 4 2 】

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。

50

【 0 0 4 3 】

さらに、本発明は、免疫応答を T h 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 H S P 質断片の使用を提供する。

【 0 0 4 4 】

細胞は、免疫応答の間に活性化される。活性化後、T h 細胞は分裂してエフェクター細胞のクローンを産生することにより、サイトカインを分泌する。サイトカインは、B 細胞、T c 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。T h 細胞によって産生されるサイトカインのパターンにより、産生される免疫応答型が決定される。T h 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。T h 2 応答は、主に B 細胞を活性化する。

10

【 0 0 4 5 】

したがって、H S P 断片は、T h 1 アジュバントとして作用し、T h 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。

【 0 0 4 6 】

通常、先行技術のアジュバントは T h 2 分極アジュバントである。T h 1 分極アジュバントが必要である。T h 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、T h 1 応答が好ましい。

【 0 0 4 7 】

本発明において定義される H S P 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産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産生は、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

【 0 0 4 8 】

また、本発明の H S P 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、C D 8 3、C C R 7、H L A D R、C D 4 0、C D 8 0 および C D 8 6 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。

【 0 0 4 9 】

本発明によると、H S P 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 C C ケモカインおよび / または N O の細胞による産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、H S P 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 C C ケモカインおよび / または N O の産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 C C ケモカインおよび / または N O の産生の増加は、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。H S P 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

【 0 0 5 0 】

本発明の H S P 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、塩または硫酸プロタミン、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

【 0 0 5 1 】

本発明の H S P 断片は、経口、非経口、吸入、スプレー、局所、直腸、鼻、頬、膺、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H S P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】

H S P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湿潤剤（例えば、T w e e n 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、P h . H e l v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。

10

【0053】

また、本発明のH S P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H S P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H S P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。

20

【0054】

H S P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、H S P断片は、局所投与用の担体、これらに限定されないが、鉱物油、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、H S P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、鉱物油、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。H S P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。

30

【0055】

本発明のH S P断片は、鼻エ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、生理食塩水中の溶液として調製できる。

40

【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H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0}に対する発現プラスミドおよび産生株の構築
H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0}をコードするDNA断片の増幅

50

ポリメラーゼ連鎖反応によってヒト型結核菌 H S P 7 0 遺伝子の領域を増幅するために、プライマー（各 2 0 p m o l ） 5 ' - G C C G G C A T A T G G A G G T G A A A G A C G T T C T G C - 3 ' および 5 ' - G C G G G G A T C C T T A G T G G T G A T G G T G G T G A T G T C A G C C G A G C C G G G G T G G G C - 3 ' を、テンプレートとしてのプラスミド p K A S M 2 1 0 1 と共に用いた。これは、ヒト型結核菌 H S P 7 0 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、W H O 抗原バンクから入手可能である。T a q 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。

【 0 0 5 9 】

10

発現ベクター p L E X W O 2 7 - 2 の構築

P C R 産物を、Q I A E x t r a c t i o n キット (Qiagen) を用いて精製し、B a m H I 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 D N A 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 D N A をさらに切断し、その後熱処理によって N d e I を失活させた。同様の手順を用いてベクター p J L A 6 0 3 を調製した。消化 P C R 産物は、T 4 リガーゼ (Roche) を用いて製造業者の使用説明書に従って、p J L A 6 0 3 に結合させた (Schauder B. et al 1987 Gen e, vol 52 p279-283 参照)。

【 0 0 6 0 】

ライゲーション混合物を、C a C l₂ コンピテント大腸菌 D H 5 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、N d e I および B a m H I 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 C A G 6 2 9 に導入した。この C A G 株は、Singh. M らによって記載されている (ヒト型結核菌 3 8 k D A 抗原: 大腸菌における過剰産生、精製およびキャラクタリゼーション (The Mycobacterium tuberculosis 38-kDA antigen: overproduction in Escherischia coli, purification and characterisation), Gene 117:53-60, 1992)。他の株 (例えば、大腸菌 B L 2 1) は、代替物として使用できる。

20

【 0 0 6 1 】

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。H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0} の発現レベルは、S D S - P A G E によって熱誘導後に解析した。

30

【 0 0 6 2 】

p L E X W O 2 7 - 2 の複製した挿入物は、D N A 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 1 0 残基 (I T T I T T K D P K、図 1 に示さず) および追加の単一残基 (M、これも図 1 に示さず) を有する構築 H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0} を発現させた。これらの残基は、ヒト型結核菌 H S P 7 0 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 】

【 0 0 6 3 】

組み換え H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0} の調製

40

細菌培養

H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0} の産生のために、大腸菌株 C A G 6 2 9 / p W O 2 7 - 2 (すなわち、p L E X W O 2 7 - 2 で形質転換された大腸菌株 C A G 6 2 9) を、1 m L 当たり 1 0 0 μ g のアンピシリンを含む L B 培地 1 L 中で生育させた。培養は、約 0 . 1 5 の O D_{6 0 0} で接種して、3 0 、1 8 0 r p m でインキュベートした。O D_{6 0 0} = 0 . 3 に到達した後、温度を 4 2 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、O D_{6 0 0} = 1 . 2 で細胞を回収した。細胞ペレットを - 2 0 で保存、または H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0} の精製のために直接使用した。

【 0 0 6 4 】

H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0} の精製

50

H i s B i n d Q u i c k C o l u m n (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4000 × g で遠心分離した。その後、上清を H i s B i n d Q u i c k C o l u m n 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150 mM 含有バッファー15 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 S D S - P A G E によって解析した。

【実施例3】

【0065】

10

R A N T E S、I L - 1 2、T N F - および一酸化窒素の刺激

T H P 1 細胞 (2 × 10⁵ 個 / m l) を24ウェ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 L P S によるいかなる残存汚染効果も除外するために、50 μg / m l のポリミキシンBを、H S P 7 0 または L P S 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 R A N T E S、I L - 1 2、T N F - 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 I L - 1 2 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、T N F - 、R A N T E S および N O の増産を刺激した (図2および図3)。

20

【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 C C R 5 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 C 5 7 B L / 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 E L I S A で確定した。N末端の配列、C C R 5 の第1ループ配列および C C R 5 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, 000)、ならびに H S P 7 0 (1 / 32, 000) および H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0} (1 / 16, 000) 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 / 500未満) または H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0} (1 / 1, 000) 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, 000)、H S P 7 0 (1 / 32, 000) および H S P 7 0_{3 5 9 - 6 1 0} (1 / 8, 000) 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 / 32, 000) 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} 双方に対する応答は、著しく低減した。

30

40

【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 T h - 1 分極を誘導するため、C D 8⁺ T 細胞、C D 4⁺ 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、C C R 5 レセプターを遮断およびダウンレギュレートする C C ケモ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。

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、参照により本明細書に援用される。

【0069】

【表1-1】

!!AA_MULTIPLE_ALIGNMENT 1.0
FileUp of: @hsp70-listfile.txt

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

ギャップウエイト : 8

ギャップレングスウエイト : 2

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

//

	1	50
マウス	---MAKNTAI	GIDLGTITYSC VGVFQHGKVE I IANDQGNRT TPSYVAFT.D
ラット	---MAKKTAI	GIDLGTITYSC VGVFQHGKVE I IANDQGNRT TPSYVAFT.D
ウシ	---MAKNMAI	GIDLGTITYSC VGVFQHGKVE I IANDQGNRT TPSYVAFT.D
ヒト	---MAKAAAI	GIDLGTITYSC VGVFQHGKVE I IANDQGNRT TPSYVAFT.D
アフリカツメガエル	--MATKGVAV	GIDLGTITYSC VGVFQHGKVE I IANDQGNRT TPSYVAFT.D
シロイヌナズナ	MAGKGEGPAI	GIDLGTITYSC VGVWQHDRV E I IANDQGNRT TPSYVAFT.D
ショウジョウバエ	-----MPAI	GIDLGTITYSC VGVYQHGKVE I IANDQGNRT TPSYVAFT.D
酵母	-----MSRAV	GIDLGTITYSC VAHFSNDRV E I IANDQGNRT TPSYVAFT.D
ヒト型結核菌 H37Rv	-----MARAV	GIDLGTINSV VSVLEGGDPV VVANSEGSRT TPSIVAFARN
ライ菌	-----MARAV	GIDLGTINSV VSVLEGGDPV VVANSEGSRT TPSTVAFARN
黄色ブドウ球菌	-----MSKII	GIDLGTINSV VTVLEGDEPK VIQNPEGSRT TPSVVAFT.KN
大腸菌 DnaK	-----GKII	GIDLGTINSV VAIMDGTTPR VLENAEGDRT TPSIIAYTQD

	51	100
マウス	TERLIGDAAK	NQVALNPQNT VFDAKRLIGR KFGDAVVQSD MKHWPFQVNV
ラット	TERLIGDAAK	NQVALNPQNT VFDAKRLIGR KFGDPVVQSD MKHWPFQVNV
ウシ	TERLIGDAAK	NQVALNPQNT VFDAKRLIGR KFGDPVVQSD MKEWPFQVIN
ヒト	TERLIGDAAK	NQVALNPQNT VFDAKRLIGR KFGDPVVQSD MKHWPFQVIN
アフリカツメガエル	TERLIGDAAK	NQVAMNPQNT VFDAKRLIGR KFNDPVVQCD LKHWPFFQVVS
シロイヌナズナ	SERLIGDAAK	NQVAMNPQNT VFDAKRLIGR RYSDPSVQAD KSHWPFQVVS
ショウジョウバエ	SERLIGDPAK	NQVAMNPQNT VFDAKRLIGR KYDDPKIAED MKHWPFQVVS
酵母	TERLIGDAAK	NQAAINPHNT VFDAKRLIGR KFDDPEVTIT AKHFPPFKVIS
ヒト型結核菌 H37Rv	GEVLVGQPAK	NQAVTNVDRT VRSVKRHMG.
ライ菌	GEVLVGQPAK	NQAVTNVDRT IRSVKRHMG.
黄色ブドウ球菌	GETQVGPAK	RQAITN.PNT VQSIKRHMG.
大腸菌 DnaK	GETLVGQPAK	RQAVTNPQNT LFAIKRLIGR RFQDEEVQRD VSIMPFKIIA

【表 1 - 2】

	101				150
マウス	.DGDKPKVQV	NYKGESRSFF	PEEISSMVL	KMKEIAEAYL	GHPVTNAVIT
ラット	.DGDKPKVQV	NYKGENRSFY	PEEISSMVL	KMKEIAEAYL	GHPVTNAVIT
ウシ	.DGDKPKVQV	SYKGETKAFY	PEEISSMVL	KMKEIAEAYL	GHPVTNAVIT
ヒト	.DGDKPKVQV	SYKGETKAFY	PEEISSMVL	KMKEIAEAYL	GYPVTNAVIT
アフリカツメガエル	.DEGKPKVKV	EYKGEEKSFF	PEEISSMVL	KMKETAAYL	GHPVTNAVIT
シロイヌナズナ	GPGEKPMIVV	NHKGEKQFS	AEISSIVLI	KMREIAEAYL	GSPVKNVAVI
ショウジョウバエ	.DGGKPKIGV	EFGGEAKRFA	PEEISSMVL	KMRETAAYL	GETVTDVAVIT
酵母	RDG.KPVVQV	EYKGETKTFT	PEEISSMVL	KMKETAAYL	GTTVNDVAVIT
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	NLKNATAESYL	GEKVDKAVIT
大腸菌 DnaK	ADNGDAWVEV	...KGQKMA	PPQISAEVLK	KMKKTAEDYL	GEPVTEAVIT
	151				200
マウス	VPAYFNDSQR	QATKDAGVIA	GLNVLRIINE	PTAAAIAYGL	DRTGK...GER
ラット	VPAYFNDSQR	QATKDAGVIA	GLNVLRIINE	PTAAAIAYGL	DRTGK...GER
ウシ	VPAYFNDSQR	QATKDAGVIA	GLNVLRIINE	PTAAAIAYGL	DRTGK...GER
ヒト	VPAYFNDSQR	QATKDAGVIA	GLNVLRIINE	PTAAAIAYGL	DRTGK...GER
アフリカツメガエル	VPAYFNDSQR	QATKDAGVLA	GLNVLRIINE	PTAAAIAYGL	DKGAR...GEQ
シロイヌナズナ	VPAYFNDSQR	QGTKDAGVIS	GLNVMRIINE	PTAAAIAYGL	DKKASSVGEK
ショウジョウバエ	VPAYFNDSQR	QATKDAGRIA	GLNVLRIINE	PTAAALAYGL	DK...NLQGER
酵母	VPAYFNDSQR	QATKDAGTIA	GMNVLRIINE	PTAAAIAYGL	DKKGR...AEH
ヒト型結核菌 H37Rv	TPAYFNDAQR	QATKDAGQIA	GLNVLRIINE	PTAAALAYGL	DKGEK...EQ
ライ菌	TPAYFNDAQR	QATKEAGQIA	GLNVLRIINE	PTAAALAYGL	DKGER...EQ
黄色ブドウ球菌	VPAYFNDAER	QATKDAGKIA	GLEVERIINE	PTAAALAYGL	DKTDK...DE
大腸菌 DnaK	VPAYFNDAQR	QATKDAGRIA	GLEVKRIINE	PTAAALAYGL	DKGTG...NR
	201				250
マウス	NVLIFDLGGG	TFDVSILTID	DG...IFEV	KATAGDTHLG	GEDFDNRLVS
ラット	NVLIFDLGGG	TFDVSILTID	DG...IFEV	KATAGDTHLG	GEDFDNRLVS
ウシ	NVLIFDLGGG	TFDVSILTID	DG...IFEV	KATAGDTHLG	GEDFDNRLVN
ヒト	NVLIFDLGGG	TFDVSILTID	DG...IFEV	KATAGDTHLG	GEDFDNRLVN
アフリカツメガエル	NVLIFDLGGG	TFDVSILTID	DG...IFEV	KATAGDTHLG	GEDFDNRMVN
シロイヌナズナ	NVLIFDLGGG	TFDVSILLTIE	EG...IFEV	KATAGDTHLG	GEDFDNRMVN
ショウジョウバエ	NVLIFDLGGG	TFDVSILTID	EG...SLFEV	RATAGDTHLG	GEDFDNRLVT
酵母	NVLIFDLGGG	TFDVSLLSID	EG...VFEV	KATAGDTHLG	GEDFDNRLVN
ヒト型結核菌 H37Rv	RILVFDLGGG	TFDVSLLLEI	...GEGVFEV	RATSGDNHLG	GDDWDQRVVD
ライ菌	TILVFDLGGG	TFDVSLLLEI	...GEGVFEV	RATSGDNHLG	GDDWDDRIVN
黄色ブドウ球菌	KVLVFDLGGG	TFDVSILEL	...GDGVFEV	LSTAGDNKLG	GDDFDQVIID
大腸菌 DnaK	TIAYVDLGGG	TFDISIIEID	EVDGEKTFEV	LATNGDTHLG	GEDFDSRLIN
	251				300
マウス	HFVEEFKRKH	KKDISQNKRA	VRRLRTACER	AKRTLSSSTQ	ASLEIDSLFE
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	LRRLRTACDR	AKRTLSSSSQ	ASIEIDSLFE
シロイヌナズナ	HFVQEFKRKH	KKDISQNKRA	LRRLRTACER	AKRTLSSSTQ	TTIEIDSLFE
ショウジョウバエ	HLADEFKRKF	RKDLRSNPRA	LRRLRTAAER	AKRTLSSSTE	ATIEIDALFE
酵母	HLATEFKRKT	KKDISNNQRS	LRRLRTAAER	AKRALSSSSQ	TSIEIDSLFE
ヒト型結核菌 H37Rv	WLVDKFKGTS	GIDLTQDKMA	MQRLREAAEK	AKIELSSSSQ	TSINLPYITV
ライ菌	WLVDKFKGTS	GIDLTQDKMA	MQRLREAAEK	AKIELSSSSQ	TSINLPYITV
黄色ブドウ球菌	YLVAEFKKEN	GVDLSQDKMA	LQRLKDAAEK	AKKOLSGVSQ	TQISLPFISA
大腸菌 DnaK	YLVEEFKKDQ	GIDLRNDPLA	MQRLKEAAEK	AKIELSSAQQ	TDVNLPHYTA

【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 KLDKSSQIHEI		
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 QPVEKALTA 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 EQLIRAEFQR ITQDLLDRTR QPFQSVVKDA GISVSEIDHV		
黄色ブドウ球菌	.GENGPLHLE VNLTRSKFEE 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	VVVGGSTRIP KVQQLVQDFF NGKELCKSIN PDEAVAYGAA VQAAILSGEG		
ショウジョウバエ	VLVGGSTRIP KVEALLQEFY HGKSLNLSIN PDEAVAYGAA VQAAILSGDQ		
酵母	VLVGGSTRIP KIQKLVSDFY NGKEPNRSIN PDEAVAYGAA VQAAILTGDQ		
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 QTQTFTTYS		
ラット	SENVQDLLLL DVA.PLSLGL ETAGGVMTAL IKRNSTIPTK QTQTFTTYS		
ウシ	SENVQDLLLL DVA.PLSLGL ETAGGVMTAL IKRNSTIPTK QTQIFTTYS		
ヒト	SENVQDLLLL DVA.PLSLGL ETAGGVMTAL IKRNSTIPTK QTQIFTTYS		
アフリカツメガエル	SENVQDLLLL DVA.PLSLGL ETAGGVMTVL IKRNTTIPTK QTQSFTTYS		
シロイヌナズナ	NEKVQDLLLL DVT.PLSLGL ETAGGVMTVL IPRNTTIPTK KEQIFSTYS		
ショウジョウバエ	TGKIQDVLLV DVA.PLSLGI ETAGRVMTKL IERNCRIPCK QTKTFSTYS		
酵母	STKTQDLLLL DVA.PLSLGI ETAGGIMTKL IPRNSTIPTK KSETFTSYAD		
ヒト型結核菌 H37Rv	...VKDVLLL DVT.PLSLGI ETKGGVMTRL IERNTTIPTK RSETFTTADD		
ライ菌	...VKDVLLL DVT.PLSLGI ETKGGVMTRL IERNTTIPTK RSETFTTADD		
黄色ブドウ球菌	...VKDVLLL DVT.PLSLGI EILGGRMNTL IERNTTIPTK KSQIYSTAVD		
大腸菌 DnaK	...VKDVLLL DVT.PLSLGI ETMGGVMTTL IAKNTTIPTK 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 NALGTFDLG IPPAPRGVPQ IEVTFDMDAN		
酵母	NQPGVLIQVF EGERTRTKDN NLLGKFELSG IPPAPRGVPQ IDVTFDIDAN		
ヒト型結核菌 H37Rv	NQPSVQIQVY QGEREIAAHN KLLGSFELTG IPPAPRGIPQ IEVTFDIDAN		
ライ菌	NQPSVQIQVY QGEREIAAHN KLLGSFELTG IPPAPRGVPQ IEVTFDIDAN		
黄色ブドウ球菌	NQPSVDVHVL QGERPMAADN KTLGRFQLTD IPPAERGKPO IEVTFDIDKN		
大腸菌 DnaK	NQSAVTIHVL QGERKRAADN KSLGQFNLDG INPAPRGMPQ IEVTFDIDAN		

10

20

30

40

【表 1 - 4】

	501		550	
マウス	GILNVTATDK	STGKANKITI	TNDKGRLSKE	EIERMVQEAE RYKAEDDEVQR
ラット	GILNVTATDK	STGKANKITI	TNDKGRLSKE	EIERMVQEAE RYKAEDDEVQR
ウシ	GILNVTATDK	STGKANKITI	TNDKGRLSKE	EIERMVQEAE KYKAEDDEVQR
ヒト	GILNVTATDK	STGKASKITI	TNDKGRLSKE	EIERMVQEAE KYKAEDDEVQR
アフリカツメガエル	GILNVSAVEK	SSGKQNKITI	TNDKGRLSKE	DIEKMOVQAE KYKADDDAQR
シロイヌナズナ	GILNVSAEDK	TTGQKNKITI	TNDKGRLSKE	EIEKMOVQAE KYKAEDDEEHK
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	DIDRMIKDAE AHAEEDRKRR
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	GILHVSADK	NSGKEQKITI	KASSG.LNED	EIQKMVRDAE ANAEADRKFE
	551		600	
マウス	DRVAAKNALE	SYAFNMKSAV	EDEGLK...G	KLSEADKKKV LDKCQEVISW
ラット	ERVAAKNALE	SYAFNMKSAV	EDEGLK...G	KISEADKKKV LDKCQEVISW
ウシ	ERVSARKNALE	SYAFNMKSAV	EDEGLK...G	KISEADKKKV LDKCQEVISW
ヒト	ERVSARKNALE	SYAFNMKSAV	EDEGLK...G	KISEADKKKV LDKCQEVISW
アフリカツメガエル	ERVDAKNALE	SYAFNLKSMV	EDENVK...G	KISDEDKRTI SEKCTQVVISW
シロイヌナズナ	KKVDAKNALE	NYAYNMRTI	KDEKIA...S	KLDAADKKKI EDAIDQAIEW
ショウジョウバエ	QRIASRNALE	SYVFNVKQAV	EQAG.A...G	KLDEADKNSV LEKCNETISW
酵母	ERVQAKNQL	SYAFTLKNTI	NEASF...E	KVGEDDAKRL ETASQETIDW
ヒト型結核菌 H37Rv	EEADVNRQAE	TLVYQTEKFV	KEQREAEGBS	KVPEDTLNKV DAAVAEAKAA
ライ菌	EEADVNRQAE	TLVYQTEKFV	KEQRETEGBS	RVPEDTLNKV EAAVAEAKTA
黄色ブドウ球菌	EEVDLRNEAD	SLVFQVEKTLTDLGE	NIGEDDKKSA EEKKDALKTA
大腸菌 DnaK	ELVQTRNQGD	HLLHSTRKQV	E.....EAGD	KLPADDKTAI ESALTALETA
	601		650	
マウス	LDSNTLADKE	EFVHKREELE	RVCSPISGL	Y.QGAGA.PG ...AGGF...
ラット	LDSNTLAEKE	EFVHKREELE	RVCNPIISGL	Y.QGAGA.PG ...AGGF...
ウシ	LDANTLAEKD	EFVHKREELE	QVCNPIISRL	Y.QGAGG.PG ...AGGF...
ヒト	LDANTLAEKD	EFVHKREELE	QVCNPIISGL	Y.QGAGG.PG ...PGGF...
アフリカツメガエル	LENNQLAEKE	BYAFQOKDLE	KVCQPIITKL	Y.QG.GV.PG .GVPGGMFGS
シロイヌナズナ	LDGNQLAEAD	BFEDKMKELE	SLCNPIIARM	Y.QGAGP.DM .GGAGGMDDD
ショウジョウバエ	LDSNTTAEKE	EFVHRLLELT	RHCSPIMTKM	HQQGAGA... ..QAGGGPGA
酵母	LDASQAASD	BYKDRQKELE	GIANPIMTKF	YGAGAGAGPG AGESGGFPGS
ヒト型結核菌 H37Rv	LGGG...DIS	AIKSAMEKLG	QESQALGOAI	YEAAQAAS... ..Q
ライ菌	LGGT...DIS	AIKSAMEKLG	QDSQALGOAI	YEATQAAS... ..K
黄色ブドウ球菌	LEGQ...DIE	DIKSKKEELE	KVIQELSAKV	YE...QAAQ... ..Q
大腸菌 DnaK	LKGE...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	AGQNNDSSTVE	DAEFKEVKDD	DKK*---
大腸菌 DnaK	TAGA...DAS	ANNAKDDDVV	DAEFEEVKDK	K-----

【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 マウス
- 2 ラット
- 3 ウシ
- 4 ヒト
- 5 アフリカツメガエル
- 6 シロイヌナズナ
- 7 ショウジョウバエ
- 8 酵母
- 9 ヒト型結核菌 H37Rv
- 10 ライ菌
- 11 黄色ブドウ球菌
- 12 大腸菌 DnaK

マトリックス 1：パート 1

	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	50.08
5					0.00	25.08	26.14	25.66	52.10	52.03	50.69	50.08
6						0.00	30.50	29.91	52.19	52.03	53.86	51.39
7							0.00	29.78	51.01	50.59	51.54	51.22
8								0.00	50.08	49.83	50.00	51.14
9									0.00	8.37	41.08	43.02
10										0.00	41.42	43.40
11											0.00	41.43
12												0.00

10

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0070】

【図 1】図 1 は、HSP70 または HSP70₃₅₉₋₆₁₀ 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。

50

【図2】図2は、THP1細胞によるIL-12およびTNF- α の産生における、HSP70、HSP70₁₋₃₅₈、およびHSP70₃₅₉₋₆₁₀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TNF- α の産生における、HSP70₃₅₉₋₆₁₀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。

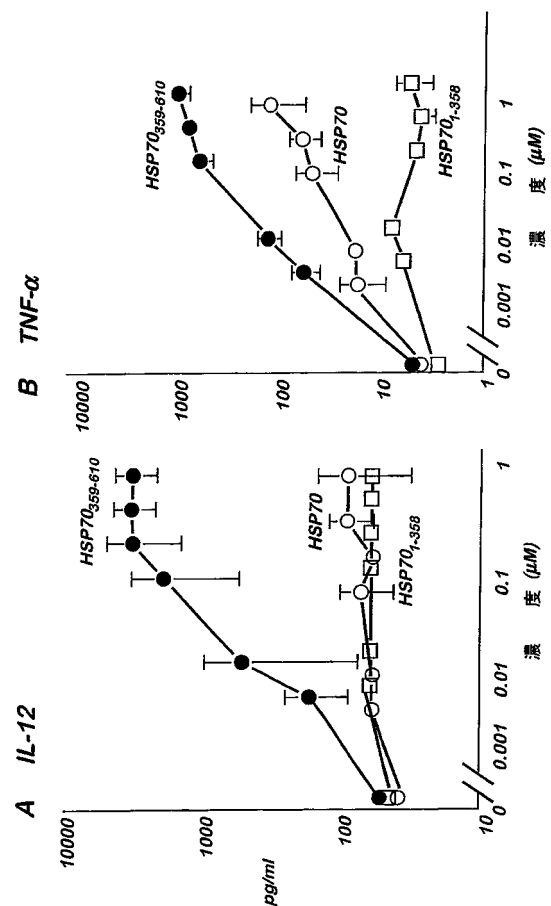
【図1】

免疫原	抗原				
	N-末端 (1-20)*	第1ループ (88-102)*	第2ループ (177-197)*	HSP70	HSP70 ₃₅₉₋₆₁₀
HSP70/ 3ペプチド	160	2 x 10 ³	80	32 x 10 ³	16 x 10 ³
HSP70 ₃₅₉₋₆₁₀ / 3ペプチド	160	2 x 10 ³	80	400	10 ³
HSP70/ 第1ループ	160	8 x 10 ³	160	32 x 10 ³	8 x 10 ³
HSP70 ₃₅₉₋₆₁₀ / 第1ループ	200	32 x 10 ³	200	<500	10 ³
免疫前血清	200	<100	100	<100	<100

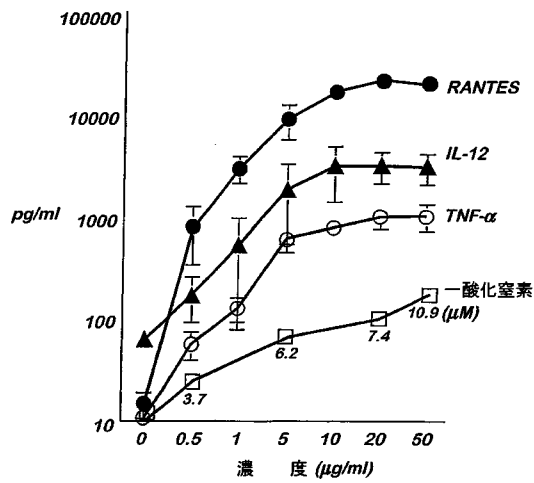
抗体価は OD_{405nm}>0.2 となる最高希釈として表す

*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 aaagacgttctgtggtgattaccccgctgagcctgggtatc
      K D V L L L D V T P L S L G I 375
1126 gagaccaaggcggtgatgaccaggtctatcgagcgcaacac
      E T K G G V M T R L I E R N T 390
1171 acgatccccaagcggtcgagactttcaccacgcccgcgac
      T I P T K R S E T F T T A D D 405
1216 aaccaacgtcggtgcagatccaggtctatcaggggagcgtgag
      N Q P S V Q I Q V Y Q G E R E 420
1261 atcgccgcgcacacaagttgctcggtctctcgagctgaccg
      I A A H N K L L G S F E L T G 435
1306 atcccgccgcccgcggggttcgcagatcgaggtcactttc
      I P P A P R G I P Q I E V T F 450
1351 gacatcgagccaacggttgctgcagtcacgccaaggacaag
      D I D A N G I V H V T A K D K 465
1396 ggcacggcgaaggagaacacgatccgaatccaggaaggtcg
      G T G K E N T I R I Q E G S G 480
1441 ctgtccaaggaagacattgaccgatgatcaaggacgcgaagcg
      L S K E D I D R M I K D A E A 495
1486 cagccgagggagatcgcaagcgtcgogagggcgaggttctgt
      H A E E D R K R R E E A D V R 510
1531 aatcaagcagacattggtctaccagacggaaggtctgtcaaa
      N Q A E T L V Y Q T E K F V K 525
1576 gaacagcgtgagccgaggggttcgaaggtacctgaagacacg
      E Q R E A E G G S K V P E D T 540
1621 ctgaacaaggttgatcccggtggcggaagcgaagcgccactt
      L N K V D A A V A E A K A A L 555
1666 ggccgatcggtatttcggccatcaagtcggcgatggagaagctg
      G G S D I S A I K S A M E K L 570
1711 ggccaggtcgaggtctggggcaagcgtctacgaagcagct
      G Q E S Q A L G Q A I Y E A A 585
1756 caggtggtcacaggccactggcgtgccaccccgcgcgag
      Q A A S Q A T G A A H P G G E 600
1801 ccggcggtgccaccccggtcggtgatgacgttggtggagcg
      P G G A H P G S A D D V V D A 615
1846 gaggtggtcgagcagcgccgggagccaag 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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search			Date of mailing of the international search report		
24 June 2003			10/07/2003		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			Authorized officer 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." IMMUNOLOGY, vol. 101, no. Supplement 1, December 2000 (2000-12), page 41 XP002245259 Annual Congress of the British Society for Immunology; Harrogate, UK; December 05-08, 2000 ISSN: 0019-2805 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" JOURNAL OF IMMUNOLOGY 01 SEP 2002 UNITED STATES, vol. 169, no. 5, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 2422-2429, XP002245260 ISSN: 0022-1767 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." JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 158, no. 7, 30 September 2002 (2002-09-30), pages 1277-1285, XP002245261 September 30, 2002 ISSN: 0021-9525 abstract 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	2207301 A	03-07-2001
			CA	2393586 A1	28-06-2001
			EP	1244470 A2	02-10-2002
			WO	0145738 A2	28-06-2001
<hr/>					
WO 0129233	A	26-04-2001	AU	2299401 A	30-04-2001
			CA	2388045 A1	26-04-2001
			CN	1411512 T	16-04-2003
			EP	1222289 A2	17-07-2002
			WO	0129233 A2	26-04-2001
<hr/>					

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	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,N O,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 フロアー 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 フロアー 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 3 8 1 2 4 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