

(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2005-538948

(P2005-538948A)

(43) 公表日 平成17年12月22日(2005.12.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/29	C07K 14/29 ZNA	4B024
A61K 39/00	A61K 39/00 Z	4C085
A61K 39/02	A61K 39/02	4H045
A61K 39/395	A61K 39/395 N	
A61P 31/04	A61P 31/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-504973 (P2004-504973)	(71) 出願人	504238563
(86) (22) 出願日	平成15年5月15日 (2003.5.15)		ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメ リカ アズ レプレゼンティッド バイ ザ セクレタリー オブ ザ ネイビー アメリカ合衆国 バージニア州 2221 7 アーリントン ノーズ クインシー ストリート 800
(85) 翻訳文提出日	平成17年1月11日 (2005.1.11)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/015072	(74) 代理人	100083806
(87) 国際公開番号	W02003/096974		弁理士 三好 秀和
(87) 国際公開日	平成15年11月27日 (2003.11.27)	(74) 代理人	100095500
(31) 優先権主張番号	60/380, 301		弁理士 伊藤 正和
(32) 優先日	平成14年5月15日 (2002.5.15)	(72) 発明者	チン、 ウェイ メイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 メリーランド州 208 17 ベゼスダ ウィットティアー プール バード 8014
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ツツガムシ病およびHIV感染に対するオリエンチア・ツツガムシトランケートされた組換え体の外膜タンパク質 (r47) および (r56) ワクチンの診断学及び治療学

(57) 【要約】

トランケートされた r47 タンパク質およびトランケートされた r56 タンパク質を含むツツガムシ病ワクチンを開示する。 r56 タンパク質の変異体を含むワクチンも開示する。 r47 および r56 タンパク質を用いた HIV ウィルス負荷の軽減方法および r47 および r56 に対して作成された抗体も開示する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

r 4 7 トランケートされたタンパク質；
r 5 6 トランケートされたタンパク質；および
薬学的に許容される担体、
を含むツツガムシ病免疫原性の組成物。

【請求項 2】

前記 r 4 7 トランケートされたタンパク質が配列番号 1 である請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記 r 5 6 トランケートされたタンパク質が配列番号 2 ~ 4 よりなる群から選択される請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 4】

前記 r 5 6 トランケートされたタンパク質が配列番号 2 ~ 4 よりなる群から選択されるいずれか 2 個のタンパク質である請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 r 5 6 トランケートされたタンパク質が配列番号 2 ~ 4 を含む請求項 1 に記載のワクチン。

【請求項 6】

トランケートされた r 4 7 タンパク質およびトランケートされた r 5 6 タンパク質の組み合わせに対して作られた抗体の薬学的有効量を投与することを包含する、ツツガムシ病に罹患した患者の治療方法。

20

【請求項 7】

前記用量が皮下投与される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 r 4 7 トランケートされたタンパク質が配列番号 1 である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 r 5 6 トランケートされたタンパク質が配列番号 2 ~ 4 よりなる群から選択される請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 r 5 6 トランケートされたタンパク質が配列番号 2 ~ 4 よりなる群から選択されるいずれか 2 個である請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 11】

前記 r 5 6 トランケートされたタンパク質が配列番号 2 ~ 4 を含む請求項 6 に記載の方法。

【請求項 12】

下記工程、

a . 対象から試料を得ること、
前記試料をトランケートされた r 4 7 タンパク質とトランケートされた r 5 6 タンパク質との組み合わせ、または、E L I S A プレート、ドットプロットマトリックス、およびハンドヘルドのクロマトグラフィーおよびフロースルー分析装置よりなる群から選択される分析機器において前記組み合わせに対する実験室で生成された抗体に曝露すること、
b . 前記試料中の前記タンパク質の組み合わせに対する抗体を検出すること、または、前記分析機器において前記試料中の前記実験室抗体に対する抗原を検出すること、
を含むツツガムシ病を検出するための分析方法。

40

【請求項 13】

前記試料が血液、尿または口腔液を含む請求項 12 に記載の分析方法。

【請求項 14】

配列番号 2 ~ 4 よりなる群から選択されるトランケートされた r 4 7 タンパク質およびトランケートされた r 5 6 タンパク質およびその組み合わせに対して作られた抗体、およ

50

び薬学的に許容される担体を含むHIV患者を治療するための医薬組成物であって、前記組成物の投与が前記患者のHIVウィルス負荷を軽減する上記組成物。

【請求項15】

前記トランケートされたr47タンパク質が配列番号1である請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

配列番号2～4よりなる群から選択されるトランケートされたr47タンパク質およびトランケートされたr56タンパク質およびその組み合わせの薬学的有効用量、および薬学的に許容される担体を含むHIV感染に対抗する免疫原性組成物。

【請求項17】

前記トランケートされたr47タンパク質が配列番号1である請求項16に記載の組成物。

【請求項18】

トランケートされたr56タンパク質および薬学的に許容される担体を含むHIV患者を治療するための医薬組成物であって、前記組成物の投与が前記患者のウィルス負荷を軽減する上記組成物。

【請求項19】

前記r56タンパク質が配列番号2～4よりなる群から選択される請求項18に記載の組成物。

【請求項20】

前記r56タンパク質が配列番号2～4よりなる群から選択されるいずれか2個である請求項18に記載の組成物。

【請求項21】

配列番号2～4を含む請求項18に記載の組成物。

【請求項22】

トランケートされたr47タンパク質およびトランケートされたr56タンパク質の薬学的有効用量、および薬学的に許容される担体を投与することを含むHIV患者の治療方法であって、前記タンパク質の投与が前記患者のウィルス負荷を軽減する上記方法。

【請求項23】

前記トランケートされたr56タンパク質が配列番号2～4よりなる群から選択される請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記トランケートされたr56タンパク質が配列番号2～4よりなる群から選択されるいずれか2個である請求項22に記載の方法。

【請求項25】

前記トランケートされたr56タンパク質が配列番号2～4を含む請求項22に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術の分野

本発明は、診断用抗原並びに免疫化剤として有用なオリエンチア・ツツガムシの47kDAおよび56kDAの表面タンパク質抗原に関する。さらに本発明は、患者におけるHIVウィルス負荷を軽減するための治療方法に関する。

先行技術の記述

ツツガムシ感染は、偏性細胞内グラム陰性細菌O. ツツガムシにより引き起こされる。それはツツガムシ病が地域特有であるアジア太平洋地域において全熱性発作の23%までを占めており、未処置のまま放置すると3分の1までが死に至る。症状には肺炎、髄膜炎、発疹および頭痛が含まれる。レプトスピラ症、発疹熱、マラリアなどの他の急性発熱性疾病からツツガムシ病を識別することは、兆候および症状の類似性のために困難である。ツ

10

20

30

40

50

ツガムシ病患者の95～99%の血清は、全リケッチア性細胞のタンパク質含量の10～15%を含むO. ツツガムシの56-kDaのタンパク質を認識する。この56-kDaのタンパク質は、種々の菌株の間で保存された配列および独特の配列の両方を有し、早期の診断および潜在的なワクチン候補として開発され、使用されている。

【0002】

全生物ワクチンは、以前より開発されており、それらの防護は短命であり、交差菌株の防護が欠けている。抗原性変異の原因となる変異性の56kDaのタンパク質である主要な表面タンパク質抗原は、相同性菌株に対して防護的な免疫性を誘発し、非相同性菌株に対しては誘発しないことが証明されている。110、47および22kDaのような他の抗原は、又、高い血清反応性に関係しているという事実は、これらの抗原の数種の組み合わせが、O. ツツガムシ感染の種々の菌株に対して良好な防護を与えると示唆する。近年、HIV感染患者にツツガムシ病感染患者の血漿を注入したところ、初回注入の2ヵ月後にはHIVウイルス負荷が減少し、ツツガムシ病患者の血漿の薬学的作用が示唆されることが証明されている。

10

【0003】

発明の概要

本報告書においては、我々は47-kDaのタンパク質遺伝子、NCBI受託番号L31934.1のクローニング、および、より広範な防護特性を与えるワクチンの候補として、r56タンパク質と組み合わせて使用するための十分な量でかつ高純粋な組換え体47-kDaのタンパク質の生産を目標とした研究における、純粋なr47を得るための試みを説明する。更に、この外膜タンパク質の配列検索により、セリンプロテアーゼとの類似性が示され、r47タンパク質そのものがプロテアーゼとして機能する可能性があることが示唆された。

20

【0004】

ウエスタンブロットの結果によれば、ツツガムシ病患者からの血漿はr47タンパク質に対し強力な抗原性の応答を示し、HIV感染に対してr47の潜在的な防護的役割が示唆された。この抑制効果はr47タンパク質に対する抗体応答によるものであった可能性がある。あるいは、潜在的なプロテアーゼ活性を示しているセリンプロテアーゼとr47タンパク質との間の相同性は、HIVのプロセッシングへの干渉に帰するr47に関連していた。

30

【0005】

要約すると、NCBIのタンパク質データベースの検索を行ったところ、O. ツツガムシKarp菌株の47kDaの抗原(受託番号gi/1220501)47kDaおよびHIVエンベロープタンパク質(受託番号gi/2250974)HIVgp120との間には、10-アミノ酸マッチ(8同一および2保存)に適合することが分かった。

【0006】

パターン: TLR + IVTN + K

従って、本発明の要件は、配列番号1のr47トランケートされたタンパク質、配列番号2、配列番号3および配列番号4よりなる群から選択されるr56トランケートされたタンパク質および薬学的に許容される担体を含むツツガムシ病免疫原性の組成物に指向する。

40

【0007】

本発明の要件は、さらにまた、配列番号1のトランケートされたr47タンパク質および配列番号2、配列番号3および配列番号4よりなる群から選択されるトランケートされたr56タンパク質の組み合わせに対して作られた抗体の薬学的有効量および薬学的に許容される担体を投与することを含む、ツツガムシ病に罹患した患者の治療方法に指向する。あるいは、前記方法はトランケートされたr47またはトランケートされたr56タンパク質のいずれかに対して作られた抗体の投与を含む。

【0008】

本発明の要件はまた、ツツガムシ病のワクチンの薬学的有効量を投与することを含む、

50

ツツガムシ病に対して対象を免疫化するための方法を意図する。

【0009】

本発明の要件はまた、対象から試料を得ること、E L I S Aプレート、ドットプロットマトリックスおよびハンドヘルドのクロマトグラフィーおよびフロースルー分析装置よりなる群から選択される分析装置において、r 5 6試験の補体としてのr 4 7タンパク質に試料を曝露することを含む、ツツガムシ病に対する抗体を検出するための分析を意図する。

【0010】

本発明の要件はまた、配列番号1のトランケートされたr 4 7タンパク質および薬学的に許容される担体を含むH I V患者の治療を意図しており、これはH I V患者のH I Vウイルス負荷を結果として軽減する。

10

【0011】

本発明の要件はまた、配列番号2、配列番号3および配列番号4の群から選択されるr 5 6タンパク質を含むH I V患者の治療を意図する。

【0012】

本発明の要件はさらに、潜在的なH I Vワクチンおよびトランケートされたr 4 7またはr 5 6タンパク質またはこれらのタンパク質の組み合わせを含むH I Vワクチンを意図する。

【0013】

上記した特徴および他の特徴および利点は、実施例および図面を参照にしながら以下に記載する詳細な説明を検討することにより明らかになる。詳細な説明および実施例は例示であって限定的なものではなく、本発明の範囲は添付する請求項およびその等価物により定義される。

20

【0014】

好ましい形態の詳細な記述

ツツガムシ病は、オリエンチア ツツガムシによる感染によって引き起こされる急性の発熱性疾患である。O . ツツガムシはグラム陰性細菌であるが、リポ多糖類もペプチドグリカン層も有さない。オリエンチアの単離株はその抗原性の特性に関して非常に変異性である。O . ツツガムシの主要な表面タンパク質は変異性の5 6 - k D Aのタンパク質である。オリエンチアの血清型 - 特異的モノクローナル抗体は、5 6 - k D Aのタンパク質と反応する。大部分のツツガムシ病患者の血清は、このタンパク質を認識するが、他の4 7 - k D Aタンパク質もまた認識され、5 6 - k D Aおよび4 7 - k D Aのタンパク質の両方が診断用抗原として使用するための良好な候補であり、そして、これら2種のタンパク質の組み合わせは、免疫原性の組成物としての潜在的用途を有することが示唆される。

30

【0015】

本発明によれば、配列番号1のr 4 7トランケートされたタンパク質、r 5 6トランケートされたタンパク質、および薬学的に許容される担体を含むツツガムシ病免疫原性の組成物が、一般的に提供される。

【0016】

4 7 k D aの抗原は膜タンパク質である。水溶液中に正しく折りたたまれたr 4 7タンパク質を生産するために、疎水性ドメインを含むそのN末端をトランケートした。フォワードプライマー配列番号5およびリバースプライマー配列番号6を設計して、ヌクレオチド1 7 4 ~ 1 4 8 1、配列番号7の遺伝子セグメントを増幅した。増幅された遺伝子セグメントをp E T 2 4 aベクターにクローニングした。発現したタンパク質の配列は配列番号1である。

40

【0017】

本発明の要件の実施形態において、ツツガムシ病免疫原性の組成物は、以下のr 5 6トランケートされたタンパク質、即ち、配列番号2、配列番号3または配列番号4の1つと組み合わせたr 4 7トランケートされたタンパク質および薬学的に許容される担体を含む。

50

【0018】

用量および投与

免疫原性の組成物の最適の用量は、ヒトに対しては0.5~20mg、霊長類に対しては0.5~2.5mgが意図される。免疫原性の組成物の投与は皮下で行う。

【0019】

本発明の要件はまた、対象から試料を得ること、分析機器において前記試料を配列番号1で示されるトランケートされたr47タンパク質に曝露することを含む、ツツガムシ病に対する抗体を検出するための分析を提供する。このような分析機器は、ELISAプレート、ドットプロットマトリックスおよびハンドヘルドのクロマトグラフィーおよびフロースルー分析装置よりなる群から選択される。このような分析法に適する試料は、それから抗体が検出でき、実験室生成された抗体を用いてそれから抗原が検出できる、血液、口腔液および尿を包含する。

10

【0020】

本発明の要件は更に、ツツガムシ病に罹患した患者の治療方法を含み、その方法は、配列番号1のトランケートされたタンパク質および配列番号2、配列番号3および配列番号4よりなる群から選択されるトランケートされたr56タンパク質の組み合わせに対して作られた抗体の薬学的有効量、および、薬学的に許容される担体を投与することを包含する。

【0021】

本発明の要件はまた、トランケートされたr56タンパク質に対して作られた抗体および薬学的に許容される担体を含むHIV患者の治療のための医薬組成物を意図しており、ここで、前記組成物の投与により患者のウィルス負荷が軽減する。そのようなトランケートされたタンパク質は、配列番号2~4よりなる群から選択されるか、これらの組み合わせである。用量および投与は、免疫原性の組成物に関して上記したものと同様である。

20

【0022】

本発明の要件はさらに、HIV患者におけるHIVウィルス負荷の軽減をもたらす、配列番号1の群から選択されるトランケートされたr47タンパク質に対して作られた抗体および薬学的に許容される担体を含むHIV患者の治療を意図する。用量および投与は、本実施形態に関して上記したものと同様である。

【0023】

本発明の要件はまた、患者のHIVウィルス負荷を軽減するために、r47トランケートされたタンパク質およびトランケートされたr56タンパク質の組み合わせに対して作られた抗体および薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を投与することを含む、HIV患者の治療を意図する。用量および投与は、本実施形態に関して上記したものと同様である。

30

【0024】

本発明の要件はまた、トランケートされたr47タンパク質および配列番号2~4のトランケートされたr56タンパク質およびその組み合わせに対して作られた抗体の薬学的有効量を含むHIV感染に対する免疫原性の組成物を意図する。用量および投与は、本実施形態に関して上記したものと同様である。

40

【0025】

以下の実施例は、本発明の好ましい実施形態を説明するためのものであり、本発明をこれらに限定ものとして解釈されるものではない。

【実施例】

【0026】

実施例1

47-kDa(受託番号L31934.1)に特異的なフォワードおよびリバーシブDNAプライマー(それぞれ配列番号5-6)をBamH1およびNcoI(共にNEB由来)制限部位を用いて設計し、karp菌株のO₁ツツガムシより精製したDNAを用いて、トランケートされた47-kDaのタンパク質をコードする遺伝子を増幅するためのP

50

CRに使用した。PCR産物(インサート)をBamH1およびNcoIで消化したプラスミドpET24d(Novagen)にライゲートした。インサートの配列を確認し、ライゲートされたプラスミドをBL21(DE3)細胞(Invitrogen)に形質転換した。ライゲートされたプラスミドを含むコロニーを、2YT培地上に生育させ、タンパク質の発現を3時間37でIPTGの1mMを用いて誘導した。この発現されたタンパク質を精製するために、600mlのBL21(DE3)細胞を成育させ、誘導、遠心分離し、細胞ペレットを、Chingら, Clin. Diag. Lab. Immunol. 5, 519-526, 1988により開発された方法に従って、5mM EDTAおよび1mM PMSFを含有する20mMトリス塩酸(pH8.0)で溶解した。超音波破壊および遠心分離の後、発現されたタンパク質は細胞封入体ではなくむしろ上澄みに主に会合していた。この分画を更に、30,000MWカットオフのメンブレン、次いで、20mM トリスpH8.0および2M NaCl塩勾配(Agilent 1100 HPLC)を用いたDEAE陰イオン交換により精製した。あるいは、タンパク質は20mM トリスpH7.0および2M NaCl塩勾配を用いてDEAE陰イオン交換により分離した。塩勾配と共に溶離するタンパク質を収集し、SDS-PAGEで分析し、クマシーブルーで染色して各分画の純度を調べた。場合により、種々の分画を合わせてSDS-PAGE分析に付した。

【0027】

47k-Daのタンパク質と他の既知タンパク質との配列の相同性は、標準的なBLAST法により検索し、47-kDaのタンパク質の保存されたドメインの分析をNCBIのCDDアルゴリズムを用いて行った。(図5~6)更に、47-kDaのタンパク質と同様のドメインを有するタンパク質を、共にアラインしてファミリー内の保存されたアミノ酸配列を分析した。

【0028】

結果

47-kDaのタンパク質をコードするDNAは、鋳型としてのO.ツツガムシkarp菌株から精製したDNAおよびこの遺伝子に特異的に設計されたプライマーを用いて良好にPCR増幅できた(図1)。このPCR産物のPet24d(+)プラスミドへのクローニングは、BamH1およびNcoIによる消化後に確認し(図1)、そしてDNA配列をDNAシーケンサーで照合した。

【0029】

47-kDaのタンパク質の発現は、37における1mMのIPTG誘導の3時間後に観察された(図2)。この発現されたタンパク質の配列を、タンパク質シーケンサーで確認した。超音波処理および遠心分離の後、発現されたタンパク質は、Chingらの報告したr56タンパク質として封入体に会合しているよりはむしろ、主に初回遠心分離後の上澄みと会合していた(図2)。発現されたタンパク質は、膜分画と会合しており、界面活性剤(NP40の1%)を添加することにより、精製操作中の収率が向上すると考えられる(データ示さず)。r47を含有する上澄みの一部を、まずpH8.0のトリス緩衝液を用いたHPLC上のDEAE陰イオン交換により精製し、タンパク質をNaCl勾配(0.8mMまで)で溶離し、分画を収集し、SDS-PAGEで分析した(図3)。上澄みの他の部分はpH7.0のトリス緩衝液を用いたHPLC上で精製し、NaCl勾配(2Mまで)で溶離した。得られた分画をあわせ、r47について分析した(図4)。

【0030】

標準的なBLASTを用いたr47の同様の検索によれば、種々のセリンプロテアーゼと相同であった(図5)。r47をNCBIにより保持されたタンパク質保存ドメインデータベースに対して検索したところ、トリプシン様(保存されたドメイン領域(217残基)の77.7%をアラインした)およびPDZドメイン(保存されたドメイン領域(86残基)の73.3%をアラインした)が確認された。これらの2種のドメインもまた、異なるセリンプロテアーゼと会合していた(図6)。

【0031】

10

20

30

40

50

実施例 2

47kDa ツツガムシ病抗原と組み合わせたオリエンチア・ツツガムシ由来の組換え体 56kDa タンパク質により誘導される相同防護の評価

感染に対する r56 および r47 タンパク質の防護効果を評価するために、マウスに Karp 菌株由来の種々の用量の r56 および r47 タンパク質成分を投与する。マウスにおいて r56 の 25 μ g または 2 μ g による免疫化が本発明者等の以前の実験（年次報告書 J2__00__NMRC）において防護的な役割を示したため、本発明者等は本研究においても r56 を試験するために同じ用量を用いる。r47 タンパク質については、本発明者等は最適用量を知らないが、今回は 5 μ g および 25 μ g の 2 種の用量から開始する。ミョウバンおよび CpG をタンパク質：Al + 3：CpG = 1：25：10 の比率でアジュバントとして使用する。ミョウバンは、長期にわたりヒトにおける使用が許可されている。アルヒドロゲル上に吸着させた抗原により調製されたワクチンには、いくつかの利点がある。抗原含量が容易に標準化でき、ワクチンは良好な安定性を示す。アルヒドロゲル吸着抗原は、使用が簡素でより簡便である。更に、免疫化後の局所反応の程度が軽減される。CpG は IL-12 および IFN- γ により占有されるサイトカインの生産の Th1 様パターンを誘導するが、Th2 サイトカインの分泌は殆ど無い。

10

【0032】

4～5週齢、体重13～15グラムの雌性CD1マウスをCharles River Laboratories (Wilmington, MA) から購入する。各試験はマウス5～7群を用いる。信頼水準80～85%において防護的効力の20%差を選択するためには最低15～20匹のマウスが必要である。20匹のマウスの各群を56kDa 抗原のみ、または、r47抗原と組み合わせて、陰性対照群を除き、筋肉内で免疫化する。マウス15匹を4週間後に免疫性のテストをし、5匹を屠殺して免疫性のテスト直前のT細胞免疫応答を測定する。

20

【0033】

詳細な実験の設計：

試験1（5群）：

1. 陰性対照：PBSのみ
2. r56のみ25 μ g
3. 47kDaのみ25 μ g

30

試験2（7群）：

1. 陰性対照：試験1の群1と同様
2. r56を25 μ g + 47kDaを5 μ g
3. r56を25 μ g + 47kDaを25 μ g

試験3（5群）：

1. 陰性対照：PBSのみ
2. r56のみ2 μ g
4. 3. 47kDaのみ4.2 μ g

試験4（7群）：

1. 陰性対照：試験1の群1と同様
2. r56を2 μ g + 47kDaを5 μ g
3. r56を2 μ g + 47kDaを2 μ g

40

【0034】

3) 免疫応答のモニタリング：

(a) 抗体の検出：マウス血清は免疫化の直前および免疫性のテストの前に採取する。各血清試料は、各抗原に対する抗体について酵素結合免疫吸着試験(ELISA)により二連で分析する。抗マウスIgGおよびIgMパーオキシダーゼで標識された抱合体(Boehringer-Mannheim, indianapolis, IN)を試験する。

【0035】

(b) 血清中のサイトカインの検出：サイトカインは、炎症の間の免疫調節における役割

50

に着目して生理学および病理学的に検討されている。IFNガンマおよびIL-4は、それぞれTh1およびTh2細胞に対するサイトカインである。多くの細胞内感染について、IL-12は、Th1応答、即ち、IFN-ガンマ生産を誘導する。IFNガンマおよびIL-2のレベルは、56kDa免疫化マウス由来の脾臓単核細胞において上昇した。上昇したIFNはまた、オリエンチアで慢性的に感染されたマウスの脾臓細胞およびリンパ節細胞においても検出された。オリエンチアは、培養マウス細胞中のINFガンマに感受性であるとされている。ツツガムシ病感染患者の血清においては、G-CSF、M-CSF、IFNガンマ、および、TNFアルファのレベルが上向き調節（アップレギュレート）された。マウス血液は、免疫化前、免疫化後2、4、6、8、10、15および30日にヘパリンリン中に採取する。血清試料は、IFNガンマ、TNFアルファ、IL-4、IL-12、G-CSFおよびM-CSFのサイトカイン濃度について二連で分析する。

10

【0036】

(c) 抗原特異的T細胞によるサイトカインの生産：組換え体抗原で刺激した脾臓単核細胞(SMNC)を、刺激後第1日、第2日および第3日にIFNガンマおよびIL-2の生産についてモニタリングする。細胞をFicoll-Hypaque(Pharmacia, Uppsala, Sweden)密度勾配遠心分離により単離する。洗浄後、細胞を温RPMI-10中ml当たり 5×10^6 個の濃度で再懸濁し、上記したとおり96穴プレートの各ウェル内に100ulを分注する。対応する組換え体抗原と共にインキュベートした後、培養上澄みを収集し、サイトカイン分析に用いる。三連のSMNC培養物から得た上澄みをあわせ、全試料を三連で分析する。抗原刺激SMNC由来の上澄みのIL-2活性は、抗IL-4抗体(11B11:10 μ g/ml)の存在下のIL-2依存性CTL-2細胞の生育を支援するその能力について試験する。INF-ガンマおよびIL-4に関し、レベルは酵素結合免疫吸着試験キット(Genzyme, Boston, Mass)により、製造元の取扱説明書に従って測定する。MACS直接マイクロビーズ(Miltenyi Biotec, Auburn CA)を用いて、どの細胞がサイトカインを生産するかを調べるためにCD4およびCD8細胞を選択する。

20

【0037】

(d) 脾臓細胞の増殖応答：SMNCを上記したとおり調製する。種々の量の組換え体タンパク質またはオリエンチアKarpによる刺激の後、培養物を5%CO₂の湿潤雰囲気下で72時間37℃でインキュベートする。合計1uCiの[3H]チミジンを、別の18時間の培養中、各ウェルに添加する。細胞をガラス繊維フィルターストリップ上に採集し、[3H]チミジンの取り込みを液体シンチレーションカウンターで計数する。

30

【0038】

予測的実施例3

免疫原性の組成物により免疫化された対象の免疫グロブリンを用いたウィルス負荷を軽減するためのHIV患者の治療に関する予測的実施例

現時点でHIV感染の動物モデルは存在しない。しかしながら、ヒトCD-4遺伝子を保有するトランスジェニックマウスをHIVに感染させることができる。この型のマウスを以下の実験において使用する。

40

【0039】

マウスをHIVに感染させる。2ヵ月後、マウスの1群は、前記免疫原性の組成物で免疫化した同型のマウスより得た超免疫血漿で治療する(群1)。もう1群のマウスは、正常血漿で治療して対照群とする(群2)。血液を両群より1週間間隔で4回採取する。血中のHIV負荷をリアルタイムPCRにより定量する。群1の結果を群2の結果と比較することにより、超免疫血漿によって低下したウィルス負荷が示される。

【0040】

結論

トランケートされた47-kDaタンパク質は、BL21細胞において良好にクローニングされ過剰発現された。この過剰発現タンパク質は細胞封入体内には存在せず、精製操

50

作を複雑化した。界面活性剤の添加により r 47 の量が増大し、タンパク質が膜分画と会合していることが示唆された。25,000 MW カットオフの粗製抽出物の透析により、ある程度の精製が可能となり、陰イオン交換カラム上の pH 8.0 または pH 7.0 の緩衝液と塩勾配を用いたその後の精製により、更に精製が可能となったが、タンパク質はなお完全には精製されなかった。r 47 の pI は 8.2 であると推定され、陽イオン交換が精製にはより適当であることが示唆された。実験を継続して陽イオン交換による r 47 の精製と、その後のゲル濾過を行うことにより所望の純度を達成する。

【 0 0 4 1 】

【 化 1 】

SEQUENCE LISTING

10

SEQ ID No. 1: Truncated Protein Sequence of r47 Protein

Expressed, truncated protein sequence (translated from 184-1458 of DNA sequence, bolded sequence was confirmed by N-terminal protein sequencing)

MVNSLSDIVEPLISTVVSIIYAVDTNIGISFNNKVSKEYQQEVFLGSGVIIDSSGYIVTNENVIA
 GAENIKVKLHDGSELIAELVGSNDKINIALKINSPAALS YATFGDSNQSRVGDQVIAIGSPF
 GLRGTVTNGIIS SKGPD MGNIVTDFIQTNAAIHMGSFSGGPMFNLEGKIIGINSIHVSYSGISF
 AIPSNTVLEAVECLKKG EKIRRGMLNVMLNELTPELNENLGLKQDQNGVLITEVIKEGSAA
 QCGIAPGDVITK FHDKEIKTGRDLQVAVSSTMLNSEREVELLRNGKSMTLKCKIIANKGEDS
 EQQSNDQSLVVNGVKFVDLTPDLVKKYNITSANNGLFVLEVSPNSSWGRYGLKMGLRPR
 DIILSVKRDDNKKDISVKTREIVTNIKHNEIFFTVQRGDRMLYIALPNINK

20

Protein sequence data output (only N-terminal):

MVNSLSDIVEPLISTVV

30

【 0 0 4 2 】

【 化 2 】

SEQ ID No. 2: r56 Protein Karp (Ching)

The confirmed sequence for r56 by Ching (amino acid 80-456). The corrected sequence is highlighted and underlined

MTIAPGFR AEIGVMYL TNITAQVEEGKVKADSVGETKADSVGGK
 DAPIRKRFKLT PPQPTIMPISIAVRDFGIDIPN IPQQQAQAAQPQLNDE
 QRAAARIAWLKNCAGIDYRVKNPNDPNGPMVINPILLNIPQGNP
 NPVGNPPQRANPPAGFAIHNHEQWRHLVVGLAALS NANKPSASP
 VKVLSDKITQIYSDIKHLADIAGIDVPDTSLPNSASVEQIQNKMQ
 ELNDLLEELRESFDGYLGGNAFANQIQLN FVMPQQAQQQGQQQ
 QQQAQATAQEAVAAA AVRLN GNDQIAQLYKDLVKLQRHAGIK
 KAMEKLA AQQEEDA KNQGE GDC KQQQGTSEKSKKKGKDKEAEFD
 LSMIVGQVKLYADVMITESVSI

40

PI = 5.8,

MW 40903, 377 a.a.

Extinction coefficient $A_{280}=0.754$ (1 mg/ml)

50

【 0 0 4 3 】

【 化 3 】

SEQ ID No. 3: r56 Protein Sequence (Kato)

>Kato sequence number 21 529 aa
 MKKIMLIASA MSALSLPFSA SAIELGDEGG LECGPYAKVG VVGGMITGVE STRLDPADAG
 GKKQLPLTTS
 MPFGGTLAAG **MTIAPGFRAE LGVMYLANVK AEVESGKTGS DADIRSGADS PMPQRYKLTP**
PQPTIMPISI
 ADRDLGVDIP **NVPQGGANHL GDNLGANDIR RADDRITWLK NYAGVDYMPV DPNNPQARIV**
NPVLLNIPQG
 PPNANPRQAM **QPCSILNHDH WRHLVVGITA MSNANKPSVS PIKVLSEKIV QIYRDVKPFA**
RVAGIEVPSD
 PLPNSASVEQ **IQNKMQELND ILDEIRDSFD GCIGGNAFAN QIQLNFRIPQ AQQQGQGGQQ**
QQAQATAQE
 AAAA AVRVLN **NNDQIIKLYK DLVKLKRHAG IKKAMEELAA QDGGCNGGGD NKKKRGASED**
SDAGGASKGG
KGKETKETEF DLSMIVGQVK LYADLFTTES FSIYAGLGAG LAYTSGKIDG VDIKANTGMV
 ASGALGVAIN
 AAEGVYVDIE GSYMHSFSKI EEKYSINPLM ASFGVRYNF

10

20

【 0 0 4 4 】

【 化 4 】

SEQ ID No. 4: r56 Protein (Gilliam)

>Gilliam sequence number 25 524 aa
 MKKIMLIASA MSALSLPFSA SAIELGEEGG LECGPYKVG IVGGMITGAE STRLDSTDSE
 GKKHLSLTG
 LPFGGTLAAG **MTIAPGFRAE LGVMYLRNIS AEVEVGKGV DSKGEIKADS GGGTDTPIRK**
RFKLTPPQPT
 IMPISIADR **VGVDTDILAQ AAAGQPQLTV EQRAADRIAW LKNYAGIDYM VPDPQNPANAR**
VINPVLLNIT
 QGPPNVQPRP **RQNLDILDHG QWRHLVVGVT ALSHANKPSV TPVKVLSDKI TKIYSDIKPF**
ADIAGIDVPD
 TGLPNSASVE **QIQSKMQELN DVLEDLRDSF DGYMGNAFAN QIQLNFVMPQ QAAQQQGGQQ**
QQAQATAQE
 AVAAA VRLL **NGNDQIAQLY KDLVKLQRHA GVKKAMEKLA AQQEEDAKNQ GEGDCKQQQG**
ASEKSKEGKG
KETEFDLSMI VGQVKLYADL FTTESFSIYA GVGAGLAHTY GKIDDKDIKG HTGMVASGAL
 GVAINAAEGV
 YVDLEGSYMH SFSKIEEKYS INPLMASVGV RYNF

30

40

【 0 0 4 5 】

【 化 5 】

Primer sets

a. Forward primers:

Gene (125-174 as target gene sequence)

5'-tatgcat aCCATGGtaa atagttatc tgat-3' (SEQ ID No. 5)
Nco I site

10

b. Reverse Primers:

Gene sequence of 1443-1477 as target, 35 bp

5'-cgcctGGATCC tagattacttattaatattaggt-3'
BamH1 site

(SEQ ID No. 6)

20

【 0 0 4 6 】

【化 6】

SEQ ID NO. 7: PCR amplified sequence: 174-1481 nt. Expressed DNA sequence: 184-1458 nt, aa 42-466. the coding region is bold.

174 tatgcat
 181 att atg gtaa atagttatc tgatatagtt gagccattaa tatctacagt agtaagtatt
 241 tatgctgtag atactaacat tggattagtt ttaataata aggtatctaa gtatcagcaa
 301 gaagtgttct taggttctgg ggtatcatt gatagttctg ggtatattgt tactaatgag
 361 aatggtatag caggagctga aaatataaaa gtaaagttgc atgatggttc agaactcata 10
 421 gcagaattag ttggtagtga caataaaatt aatatagctt tattaanaat taattctcca
 481 gcagcattat cttatgcgac tttggcgac tcaaatcagt ctgagtagg agatcaggtt
 541 attgcaatag gaagtccttt tggtttaaga ggaacagtaa caaatggcat tatttctct
 601 aaaggaccag atatgggtaa cgcatagta actgatttta tcaaaactaa tgctgctatt
 661 catatgggta gctttgggg accgatgttt aatcttgaag gaaaaattat tggaattaat
 721 tccattcacg tatcttactc aggcataagt tttgctatte catctaatac tgtacttgaa
 781 gcagttgaat gcttaaaaaa aggagaaaaa atctgctgtg gtatgttaaa tgttatgctt
 841 aatgaattaa ctccagaatt aatgagaat ttaggactta aacaagatca aatggagtt
 901 ctaataactg aagtataaaa agaaggatct gcagcacaat gtggaattgc tctggagat 20
 961 gtaactacta aatttcatga taaagagatc aaaacaggga gagatttaca ggtagctgta
 1021 tcttcaacta tgcttaattc tgaagagaaa gttgagcttt tacgtaattg taagtcatg
 1081 actctaaaat gtaaaattat tgccaacaaa ggtgaggata gtgagcaaca aagtaatgat
 1141 caaagccttg tggtaattgg tgtaaaattt gttgatctta cacctgattt agtgaagaaa
 1201 tataatatta ctccagctaa taataatggg ttattgttcc ttgaagtttc gcttaactc
 1261 tcttggggga gatatggttt aaaaatgggg ctaagaccta gagatataat tttatcagtt
 1321 aaacgtgatg ataataaaaa agatatttct gtaaaaacte taagagaaat agtgacaat
 1381 ataaagcata atgaaatttt cttacagtg caaagaggag atagaatgct ttacattgct
 1441 ttacctaata ttaataag ta aatctagttt aaaggcgatt t 30

本発明の要件を記載したが、これは多様な変更が可能であることは明らかである。このような変更は本発明の要件の精神と範囲を外れるものではなく、このような改変の全ては添付する請求項の範囲に入るものとする。

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】図1は、トランケートされた47kDaのタンパク質をコードするDNAのPCR産物および消化されたプラスミドを示すSDS-PAGEである。 40

【図2】図2は、IPTGによるr47タンパク質の誘導および粗製抽出物からのr47の分画を示すSDS-PAGEである。

【図3】図3は、DEAE陰イオン交換カラム(pH8.0)上のr47タンパク質の分画を示すSDS-PAGEである。

【図4】図4は、DEAE陰イオン交換カラム(pH7.0)上のr47タンパク質の分画を示すSDS-PAGEである。

【図5】図5は、r47タンパク質配列のブラスト検索である。

【図6】図6は、r47およびセリンプロテアーゼの間で保存されたドメインを比較するチャートである。

【配列表】

5

SEQUENCE LISTING**10 SEQ ID No. 1: Truncated Protein Sequence of r47 Protein**

Expressed, truncated protein sequence (translated from 184-1458 of DNA sequence, bolded sequence was confirmed by N-terminal protein sequencing)

MVNSLSDIVEPLISTVVSIYAVDTNIGISFNKVKSKYQQEVFLGSGVIIDSSGYIVTNENVIA
 15 GAENIKVKLHDGSELIAELVGSDNKINIALLKINSPAALS YATFGDSNQSRVGDQVIAIGSPF
 GLRGTVTNGI~~SSK~~GPD~~M~~GN~~G~~IVTDFIQTNAAIH~~M~~GSFG~~G~~PMFNLE~~G~~KI~~I~~GIN~~S~~IHV~~S~~YS~~G~~ISF
 AIP~~S~~NTVLEAVE~~C~~LK~~K~~GEKIR~~R~~GMLN~~V~~MLN~~E~~LTP~~E~~LNENLGLKQDQNGVLITEVIKESAA
 QCGIAPGDVITKFHDKEIKTGRDLQVA~~V~~SSTMLNSEREVELLRNGKSMTLKCKKIANKGEDS
 20 EQQSNDQSLV~~V~~NGVKFVDLTPDLVKKYNITSAN~~N~~GLFVLEVSPNSSWGRYGLKMGLRPR
 DIILSVKRDDNKKDISVKT~~L~~REIVTNIKHNEIFFTV QRGDRMLYIALPNINK

10

Protein sequence data output (only N-terminal):

25 MVNSLSDIVEPLISTVV

5 SEQ ID No. 2: r56 Protein Karp (Ching)

The confirmed sequence for r56 by Ching (amino acid 80-456). The corrected sequence is highlighted and underlined

10 MTIAPGFRAEIGVMYLTNITAQVEEGKVKADSVGETKADSVGGK
 DAPIRKRFKLT~~PP~~QPTIMPISIAVRDFGIDIPNIPQQQAQAAQPQLNDE
 QRAAARIAWLKNCAGIDYRVKNPNDPNGPMVINPILLNIPQGNP
 NPVGNPPQRANPPAGFAIH~~N~~HEQWRHLVVGLAALS~~N~~ANKPSASP
 VKVLSDKITQIYSDIKHLADIAGIDVPDTS~~L~~PNSASVEQIQNKM~~Q~~
 15 ELNDLLEELRESFDGYLGGNAFANQIQLN~~F~~VMPQQAQQQGGQQ
 QQQAQATAQEAVAAAVRLLNGNDQIAQLYKDLV~~K~~LQRHAGIK
 KAMEKLA~~A~~QQEEDAKNQGEGDCKQQQGTSEKSKKGGKDKEAEFD
 LSMIVGQVKLYADVMITESVSI

20

30

20 PI = 5.8,
 MW 40903, 377 a.a.
 Extinction coefficient $A_{280}=0.754$ (1 mg/ml)

5 **SEQ ID No. 3: r56 Protein Sequence (Kato)**
 >Kato sequence number 21 529 aa
 MKKIMLIASA MSALSLPFS AIELGDEGG LECGPYAKVG VVGGMITGVE STRLDPADAG
 GKKQLPLTTS
 MPFGGTLAAG **MTIAPGFRAE LGVMYLANVK AEVESGKTGS DADIRSGADS PMPQRYKLTP**
 10 **PQPTIMPISI**
ADRD LGVDIP NVPQGGANHL GDNLGANDIR RADDRITWLK NYAGVDYMVP DPNNPQARIV
NPVLLNIPQG
PPNANPROAM QPCSILNHDH WRHLVVGITA MSNANKPSVS PIKVLSEKIV QIYRDVKPFA
RVAGIEVPSD
 15 **PLPNSASVEQ IQNKMQLND ILDEIRDSFD GCIGGNAFAN QIQLNFRIPQ AQQQGGQQQ**
QQAQATAQEA
AAAAAVRVLN NNDQIIKLYK DLVKLKRHAG IKKAMEELAA QDGGCNGGGD NKKKRGASED
SDAGGASKGG
KGKETKETEF DLSMIVGQVK LYADLFTTES FSIYAGLGAG LAYTSGKIDG VDIKANTGMV
 20 **ASGALGVAIN**
AAEGVYVDIE GSYMHSFSKI EEKYSINPLM ASFGVRYNF

10

5 **SEQ ID No. 4: r56 Protein (Gilliam)**
 >Gilliam sequence number 25 524 aa
 MKKIMLIASA MSALSLPFS AIELGEEGG LECGPYKVG IVGGMITGAE STRLDSTDSE
 GKKHLSLTG
 10 **LFPFGTLAAG MTIAPGFRAE LGVMYLRNIS AEEVVGKGV DSKGEIKADS GGGTDTPIRK**
RFKLTTPPQPT
IMPISIADRD VGVDTDILAQ AAAGQPQLTV EQRAADRIAW LKNYAGIDYM VPDPQPNAR
VINPVLLNIT
QGPPNVQPRP RQNL DILDHG QWRHLVVGVT ALSHANKPSV TPVKVLSDKI TKIYSDIKPF
 15 **ADIAGIDVPD**
TGLPNSASVE QIQSKMQLN DVLEDLRDSF DGYMGNAFAN QIQLNFVMPQ QAQQQGGQQ
QQAQATAQEA
AVAAAARLL NGNDQIAQLY KDLVKLQRHA GVKKAMEKLA AQQEEDAKNQ GEGDCKQQQG
ASEKSKEGKG
 20 **KETEFDLSMI VGQVKLYADL FTTESFSIYA GVGAGLAHTY GKIDDKDIKG HTGMVASGAL**
GVAINAAEGV
YVDLEGSYMH SFSKIEEKYS INPLMASVGV RYNF

20

30

Primer sets

a. Forward primers:

Gene (125-174 as target gene sequence)

5'-tatgcat aCCATGGtaa atagtttacc tgat-3' (SEQ ID No. 5)
 Nco I site

40

b. Reverse Primers:

Gene sequence of 1443-1477 as target. 35 bp

5'-cgctGGATCC tagatttacttattaatattagg-3'
 BamH1 site

(SEQ ID No. 6)

SEQ ID NO. 7: PCR amplified sequence: 174-1481 nt. Expressed DNA sequence: 184-1458 nt, aa 42-466. the coding region is bold.

174 tatgcat

181 att atg gtaa atagtttate **tgatatagtt gagccattaa tatctacagt agtaagtatt**

241 **tatgctgtag** atactaacat **tggtattagt ttaataata aggtatctaa gtatcagcaa**

301 **gaagtgttct taggttctgg ggttatcatt gatagttctg ggtatattgt tactaatgag**

361 **aatgttatag caggagctga aatatataaa gtaaagttgc atgatggttc agaactcata**

421 **gcagaattag ttgtagtga caataaaatt aatatagctt tattaanaat taattctcca**

481 **gcagcattat ctatgctgac ttttggcgac tcaaatcagt ctagagtagg agatcagggt**

541 **attgcaatag gaagtccttt tggtttaaga ggaacagtaa caaatggcat tatttctct**

601 **aaaggaccag atatgggtaa cggcatagta actgatttta tcaaacata tgctgctatt**

661 **catatgggta gctttgggtg accgatgttt aatcttgaag gaaaaattat tggaattaat**

721 **tcattcagc tatcttactc aggcataagt tttgctatc catctaatac tgfacttgaa**

781 **gcagtgaat gcttaaaaaa aggagaaaaa attcgtcgtg gtatgttaaa tgttatgctt**

841 **aatgaattaa ctccagaatt aatgagaat ttaggactta aacaagatca aatggagtt**

901 **ctaataactg aagtataaa agaaggatct gcagcacaat gtggaattgc tctggagat**

961 **gtaattacta aatttcatga taaagagatc aaaacagga gagatttaca ggtagctgta**

1021 **tcttcaacta tgettaattc tgaagagaaa gttgagcttt tacgtaatgg taagtcgatg**

1081 **actctaaaat gtaaaattat tgccaacaaa ggtgaggata gtgagcaaca aagtaatgat**

1141 **caaagccttg tggtaatgg tgtaaaattt gttgatctta cacctgattt agtgaagaaa**

1201 **tataatatta ctcagctaa taataatggg ttatttctc ttgaagttc gctaactct**

1261 **tcttggggga gatatggttt aaaaatgggg ctaagaccta gagatataat tttatcagtt**

1321 **aaecgtgatg ataataaaaa agatatttct gttaaaactc taagagaaat agtgacaaat**

1381 **ataaagcata atgaaatttt ctttacagtg caaagaggag atagaatgct ttacattgct**

1441 **ttaccttaata ttaataag ta aatctagttt aaagcgatt t**

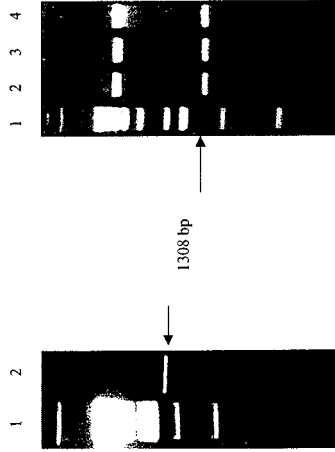
10

20

【 図 1 】

Figure 1

47-kDaの蛋白をコードするDNAのPCR産物および消化されたプラスミド

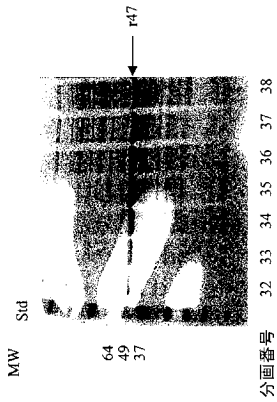


レーン1:1kbDNAマーカー
 レーン2:PCR産物
 レーン1:1kbDNAマーカー
 レーン2~4:正確なインサートを含む個々のコロニー

【 図 3 】

Figure 3

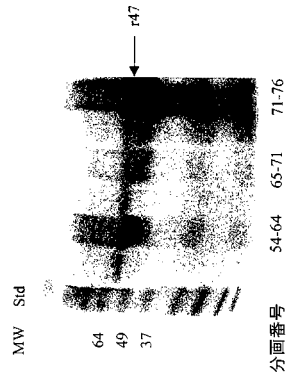
DEAE陰イオン交換カラム(pH8.0)上のr47蛋白の分画化



【 図 4 】

Figure 4

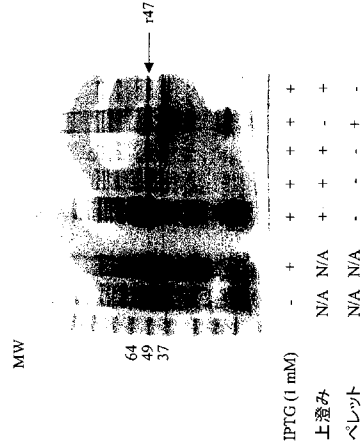
DEAE陰イオン交換カラム(pH7.0)上のr47蛋白の分画化



【 図 2 】

Figure 2

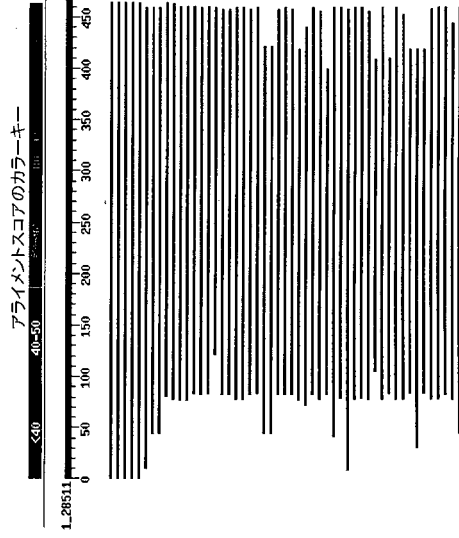
IPTGによるr47蛋白の誘導および粗製抽出液からのr47の分画化



【 図 5 】

Figure 5

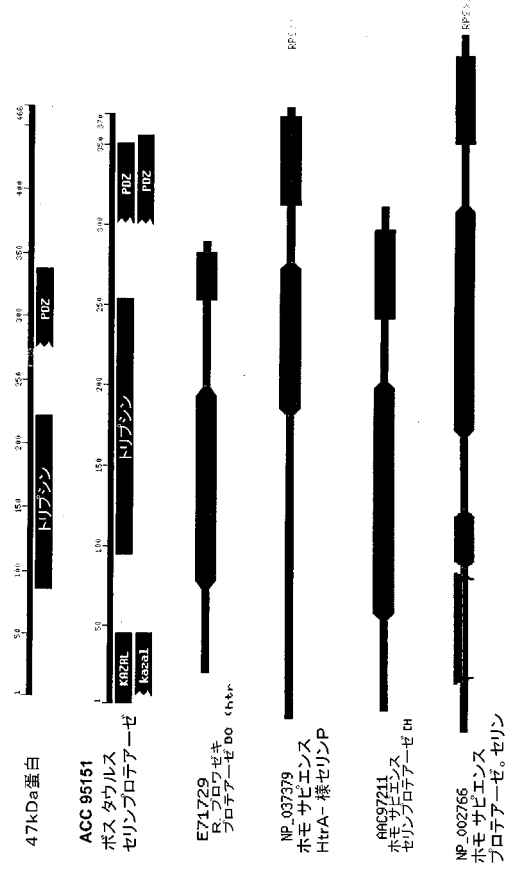
r47 蛋白配列のBLAST検索



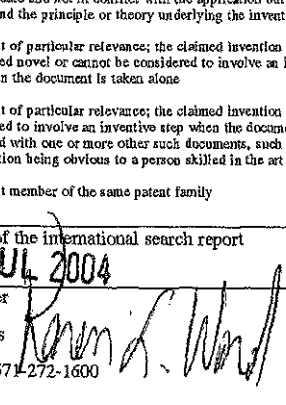
【 図 6 】

Figure 6

r47およびセリンプロテアーゼの間の保存されたドメインの比較



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/15072		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : A61K 39/00, 39/02, 39/40; C07K 16/12 US CL : 424/ 184.1, 234.1; 530/388.2, 388.4 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) U.S. : 424/ 184.1, 234.1; 530, 300, 350; 530/388.2, 388.4; 435/4, 7.1, 7.2, 7.32, 7.22, 7.9, 7.92, 7.93,				
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) WEST, PubMed, Medline, CAPLUS, CABA, PASCAL, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y	CHING et al., Identification of Human Antibody Epitopes on the 47 kDa, 56 kDa, and 22 kDa Protein Antigens of Orientia tsutsugamushi with Synthetic Peptides, American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1996, Volume 55, page 300, abstract 608.	1, 6, 7, 12, 13		
Y --- A	CHING et al., Expression and Refolding of Truncated Recombinant Major Outer Membrane Protein Antigen (r56) of Orientia tsutsugamushi and Its Use in Enzyme-Liked Immunosorbent Assays, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 1998, Vol 5 No 4, pages 519-26.	1, 6, 7, 12, 13, 18 ----- 22		
Y	HICKMAN et al., Murine T-cell Response to Native and Recombinant Protein Antigens of Rickettsia tsutsugamushi, Infection and Immunity, May 1993, Vol 61, No 5, pages	1, 6, 7		
Y	CHING et al. Early Diagnosis of Scrub Typhus with a Rapid Flow Assay Using Recombinant Major Outer Membrane Protein Antigen (r56) of orientia tsutugamushi, Clinical and Laboratory Immunology, Mar 2001, Vol 8, No 2, pages 409-14.	1, 6, 7, 12, 13, 18		
Y	SEONG et al., Neutralization Epitopes on the Antigenic Domain II of the Orientia tsutugamushi 56-kDa Protein Revealed by Monoclonal Antibodies, Vaccine, 2001, Vol 19, pages 2-9.	1, 6, 7, 12, 13, 18		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 </td> <td style="width: 50%;"> "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 </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 14 April 2004 (14.04.2004)		Date of mailing of the international search report 20 JUL 2004		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Zachariah Lucas Telephone No. 571-272-1600 		

PCT/US03/15072

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OAKS et al., Antigenic and Genetic Relatedness of Eight <i>Rickettsia tsutugamushi</i> Antigens, <i>Infection and Immunity</i> , October 1989, Vol 57, No 10, pages 3116-22.	1, 6, 7, 12, 13, 18
A	WATT et al., HIV-1 Suppression During Acute Scrub-Typhus Infection, <i>The Lancet</i> , August 2000, Volume 356, pages 475-79.	18, 22
A	WATT et al., Passive Transfer of Scrub Typhus Plasma to Patients with AIDS: a Descriptive Clinical Study, <i>Quarterly Journal of Medicine</i> , 2001, Vol 94, pages 599-607.	18, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/15072

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claim Nos.: 2-5,8-11,14-17,19-21 and 23-25
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:
Please See Continuation Sheet
3. Claim 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 SEARCH REPORT

PCT/US03/15072

Continuation of Box I Reason 2:

These claims read on inventions relating to specific protein sequences. However, no computer readable form of the indicated sequences was provided, such that no meaningful search could be made of the claimed inventions of these claims.

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 P 31/18	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 1 1
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, 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, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ゲ、 ホン

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 9 8 ゲイザーズバーグ グレイ コルト ドライブ
1 3 9 0 0

(72) 発明者 チャオ、 チエン - チュン

アメリカ合衆国 エム エヌ . ベゼスタ ストーンヘッジ プレイス 6 1 3 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA13 AA15 BA31 BA35 CA02 CA05 CA09 HA11

4C085 AA03 AA14 BA15 BA47 BB11 CC07 DD23 DD62 EE01 GG04

4H045 AA10 AA11 AA30 CA11 DA50 DA89 EA31 EA52 FA74

专利名称(译)	恙虫病东方体 (Orutsntia tsutsugamushi) 截短重组抗恙虫病和HIV感染的外膜蛋白 (r47) 和 (r56) 疫苗的 诊断和治疗研究		
公开(公告)号	JP2005538948A	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2004504973	申请日	2003-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	美国Azure的演讲团遮阳秘书海军的美国		
申请(专利权)人(译)	美利坚合众国为莱斯呈现由海军部长成立		
[标]发明人	チンウェイメイ ゲホン チャオチエンチュン		
发明人	チン、 ウエイ メイ ゲ、 ホン チャオ、 チエン-チュン		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/395 A61P31/04 A61P31/18 A61P43/00 C07K14/195 C07K14/29 C07K16/12 C12N15/09 G01N33/569		
CPC分类号	A61K39/00 A61K39/0233 A61P31/04 A61P31/18 A61P43/00 C07K14/195 C07K16/1246 G01N33/56911 G01N2333/29 G01N2469/10 G01N2469/20 Y02A50/403 Y02A50/59 Y10S530/825		
FI分类号	C07K14/29.ZNA A61K39/00.Z A61K39/02 A61K39/395.N A61P31/04 A61P31/18 A61P43/00.111 G01N33/53.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA13 4B024/AA15 4B024/BA31 4B024/BA35 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/HA11 4C085/AA03 4C085/AA14 4C085/BA15 4C085/BA47 4C085/BB11 4C085/CC07 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG04 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/CA11 4H045/DA50 4H045/DA89 4H045/EA31 4H045/EA52 4H045/FA74		
代理人(译)	三好秀 伊藤雅一		
优先权	60/380301 2002-05-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了包含截短的r47蛋白和截短的r56蛋白的恙虫病疫苗。还公开了由r56蛋白质变体组成的疫苗。还公开了使用r47和r56蛋白质以及针对r47和r56产生的抗体降低HIV病毒载量的方法。

47-kDaの蛋白をコードするDNAのPCR産物をより消化されたプラスミド

