

(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2010-539901

(P2010-539901A)

(43) 公表日 平成22年12月24日(2010.12.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12N 15/09 (2006.01)</b>	C12N 15/00 ZNAA	4B024
<b>C07K 14/47 (2006.01)</b>	C07K 14/47	4B063
<b>C12N 5/0783 (2010.01)</b>	C12N 5/00 2O2L	4B065
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	4C085
<b>C12Q 1/68 (2006.01)</b>	C12Q 1/68 A	4C086
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 125 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-525831 (P2010-525831)  
 (86) (22) 出願日 平成20年9月19日 (2008. 9. 19)  
 (85) 翻訳文提出日 平成22年5月24日 (2010. 5. 24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/010883  
 (87) 国際公開番号 W02009/038756  
 (87) 国際公開日 平成21年3月26日 (2009. 3. 26)  
 (31) 優先権主張番号 60/973, 993  
 (32) 優先日 平成19年9月20日 (2007. 9. 20)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 505458304  
 ザ ジェイ. ディヴィッド グラッドスト  
 ン インスティテューツ  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン  
 フランシスコ オーエンズ ストリート  
 1650

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 長鎖散在反復配列ポリペプチド組成物およびその使用方法

## (57) 【要約】

本発明は、LINEポリペプチド、および対象LINEポリペプチドを含む免疫原性組成物を含めた組成物を提供する。本発明は、対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え核酸を提供する。対象組成物は、LINEペプチドに対するT細胞免疫応答を刺激するために有用である。本発明は、さらに、個体において、レトロウイルスまたはレンチウイルスに感染した細胞に対する免疫応答を刺激する方法を提供する。本発明は、さらに、LINEポリペプチドが異常に発現されている組織に関連する癌を治療する方法を提供する。また、LINEポリペプチドに対する免疫応答を減少させることを含む、障害を治療する方法も提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

単離した長鎖散在反復配列 ( L I N E ) ポリペプチドと製薬上許容される担体とを含む免疫原性組成物。

## 【請求項 2】

単離 L I N E ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 2 2 のうちの任意の 1 つと少なくとも約 7 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 3】

単離 L I N E ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 2 2 のうちの任意の 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

10

## 【請求項 4】

非経口投与用に製剤する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 5】

粘膜組織への投与用に製剤する、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 6】

アジュバントをさらに含む、請求項 1 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 7】

アジュバントが、水酸化アルミニウム、 M F 5 9 、またはモノホスホリル脂質 A を含む、請求項 6 に記載の免疫原性組成物。

20

## 【請求項 8】

長鎖散在反復配列 ( L I N E ) ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む免疫原性組成物。

## 【請求項 9】

L I N E ポリペプチドが、配列番号 1 ~ 2 2 のうちの任意の 1 つに記載のアミノ酸配列を含む、請求項 8 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 10】

非経口投与用に製剤する、請求項 8 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 11】

粘膜組織への投与用に製剤する、請求項 8 に記載の免疫原性組成物。

30

## 【請求項 12】

核酸が組換えベクターである、請求項 8 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 13】

組換えベクターが組換えウイルスベクターである、請求項 12 に記載の免疫原性組成物。

## 【請求項 14】

合成長鎖散在反復配列 ( L I N E ) ポリペプチド。

## 【請求項 15】

配列番号 1 ~ 2 2 のうちの 1 つに記載のアミノ酸配列と少なくとも約 7 5 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の合成 L I N E ポリペプチド。

40

## 【請求項 16】

多量体である、請求項 14 に記載の合成 L I N E ポリペプチド。

## 【請求項 17】

担体と連結している、請求項 14 に記載の合成 L I N E ポリペプチド。

## 【請求項 18】

アミノ酸 6 個 ~ 約 2 0 0 個の長さを有する、請求項 14 に記載の合成 L I N E ポリペプチド。

## 【請求項 19】

請求項 14 に記載の長鎖散在反復配列 ( L I N E ) ポリペプチドを含む組成物。

50

- 【請求項 20】  
免疫原性組成物であり、アジュバントをさらに含む、請求項 19 に記載の組成物。
- 【請求項 21】  
製薬上許容される賦形剤をさらに含む、請求項 19 に記載の組成物。
- 【請求項 22】  
請求項 14 に記載の合成 LINE ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸。
- 【請求項 23】  
請求項 22 に記載の核酸を含む組成物。
- 【請求項 24】 10  
個体に、請求項 1、8、19、および 23 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、個体において、病原性ウイルスに感染したまたは感染する危険性のある宿主細胞に対する T リンパ球応答を誘導する方法。
- 【請求項 25】  
T リンパ球応答が CD8<sup>+</sup> T 細胞応答または CD4<sup>+</sup> T 細胞応答を含む、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 26】  
T リンパ球応答が粘膜 T リンパ球応答を含む、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 27】 20  
病原性ウイルスがヒト免疫不全ウイルスである、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 28】  
個体が病原性ウイルスに感染していない、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 29】  
個体が病原性ウイルスに感染している、請求項 24 に記載の方法。
- 【請求項 30】  
個体に、請求項 1、8、19、および 23 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、個体において、LINE 発現を有し、癌細胞の表面上に LINE エピトープを提示している癌細胞に対する T リンパ球応答を誘導する方法。
- 【請求項 31】 30  
未刺激の CD8<sup>+</sup> T 細胞の集団を、*in vitro* で、抗原提示プラットフォームと会合している単離 LINE ポリペプチドと接触させることを含み、前記接触により、LINE ペプチド特異的 CD8<sup>+</sup> T 細胞の集団の産生がもたらされる、長鎖散在反復配列 (LINE) ポリペプチドに特異的な CD8<sup>+</sup> T 細胞の集団を作製する方法。
- 【請求項 32】  
個体に、有効量の、請求項 1、8、19、および 23 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含む、個体においてレトロウイルス感染症を治療する方法。
- 【請求項 33】  
前記投与が、個体におけるウイルス量を少なくとも約 10% 減少させるのに有効である、請求項 32 に記載の方法。
- 【請求項 34】 40  
レトロウイルスがヒト免疫不全ウイルス (HIV) である、請求項 32 に記載の方法。
- 【請求項 35】  
個体に、有効量の、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、非ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤、HIV プロテアーゼ阻害剤、HIV インテグラーゼ阻害剤、および HIV 侵入 / 融合阻害剤のうちの 1 つまたは複数投与することをさらに含む、請求項 34 に記載の方法。
- 【請求項 36】 50  
個体に、有効量の、請求項 1、8、19、および 23 のいずれか一項に記載の組成物を投与することを含み、癌が異常なレベルの長鎖散在反復配列 (LINE) ポリペプチドを発現している癌細胞を含む、個体において癌を治療する方法。

## 【請求項 37】

癌が黒色腫、卵巣癌、乳癌、または精巣癌である、請求項 36 に記載の方法。

## 【請求項 38】

個体に、有効量の、請求項 19 に記載の組成物を投与することを含む、個体において自己免疫障害を治療する方法。

## 【請求項 39】

a) 白血球 (WBC) を、*in vitro* で合成長鎖散在反復配列 (LINE) ポリペプチドと接触させることと (WBC は、患者から、治療の開始後の第 1 の時点に得る) ;

b) LINE ポリペプチドとの接触に応答して WBC によって分泌されたサイトカインを検出することを含み、

LINE ポリペプチドとの接触に応答した対照 WBC によるサイトカイン産生のレベルと比較した、LINE ポリペプチドとの接触に応答した WBC によるサイトカイン産生の減少は、治療がレトロウイルス感染症の治療に有効であることを示し、対照 WBC は、患者から、治療開始前、または第 1 の時点よりも前の治療中の時点に得る、レトロウイルス感染症の治療に対する患者の応答を監視する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 相互参照

本出願は、その全体が本明細書中に参考として組み込まれている、2007年9月20日出願の米国仮特許出願第60/973,993号の優先権を主張するものである。

## 連邦支援の研究に関する記述

本発明は、国立衛生研究所により授与された連邦補助金第AI68498号および第AI41531号の政府支援の下で行われた。政府は本発明の特定の権利を有する。

## 【背景技術】

## 【0002】

レトロエレメントは、少なくとも3つのクラス：外因性レトロウイルス、末端反復配列 (LTR) を含有するレトロトランスポゾンおよびLTRを欠くレトロトランスポゾンに分類することができる。非LTRレトロトランスポゾンは、長鎖散在反復配列 (LINE) および短鎖散在反復配列 (SINE) にさらに分類することができる。LINE-1 (「L1」) とは、すべての哺乳動物ゲノム中に見つかる非LTRレトロトランスポゾンであり、最も一般的なヒトLINEである。約500,000個のLINE-1要素がヒトゲノム中に存在し、これは、その全配列の約17%を占める。全LINE-1ゲノム集団のうち、約100個の完全長の要素が存在し、残りは様々な度合いで切断されている。LINE-1は転写されて、2つのタンパク質、すなわちORF1p (またはp40) およびORF2p (またはp150) をコードする約6kbのmRNAを生じる。ORF1pは、核酸シャペロン活性を有するRNA結合タンパク質をコードし、ORF2pは、レトロ転位に必要な酵素であるエンドヌクレアーゼおよび逆転写酵素をコードする。LINE-1のレトロ転位は、逆転写が組み込みと協調して起こる標的に刺激される逆転写 (TPRT) 機構によって引き起こされる。

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0003】

【特許文献1】米国特許第5,280,108号明細書

## 【非特許文献】

## 【0004】

【非特許文献1】Bogerd等(2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103(23): 8780~5

【非特許文献2】Hohjoh等(1997) *EMBO J.*, 16(19): 6034

10

20

30

40

50

~ 6 0 4 3

【非特許文献3】Boissinot等(2000)Mol.Biol.Evol., 18(12):2186~2194

【非特許文献4】Ergun等(2004)J.Biol.Chem., 279(26):27753~27763

【発明の概要】

【0005】

本発明は、LINEポリペプチド、および対象LINEポリペプチドを含む免疫原性組成物を含めた組成物を提供する。本発明は、対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え核酸を提供する。対象組成物は、ウイルスに感染した細胞上に存在するLINEペプチドがLINE特異的T細胞によって認識されるように、LINEペプチドに対するT細胞免疫応答を刺激するために有用である。本発明は、さらに、個体において、レトロウイルスまたはレンチウイルスに感染した細胞に対する免疫応答を刺激する方法を提供する。本発明は、さらに、LINEポリペプチドが異常に発現している組織に関連する癌を治療する方法を提供する。また、LINEポリペプチドに対する免疫応答を減少させることを含む、障害を治療する方法も提供する。

10

【0006】

本発明は、LINEポリペプチドを含む免疫原性組成物を提供する。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は、対象LINEポリペプチドと製薬上許容される担体とを含む。対象LINEポリペプチドは、配列番号1~22のうちの任意の1つと少なくとも約75%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。さらなる実施形態では、対象LINEポリペプチドは、配列番号1~101のうちの任意の1つに記載のアミノ酸配列を含む。対象免疫原性組成物は、非経口投与用または粘膜組織への投与用を含めた、様々な方法で製剤することができる。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は、アジュバントをさらに含む。一部の実施形態では、アジュバントは、水酸化アルミニウム、MF59、またはモノホスホリル脂質Aである。

20

【0007】

本発明は、LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む免疫原性組成物を提供する。コードされるLINEポリペプチドは、配列番号1~22のうちの任意の1つと少なくとも約75%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含むことができる。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は、非経口投与用または粘膜組織への投与用に製剤する。一部の実施形態では、LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸は、組換えベクター、たとえばウイルスベクターである。

30

【0008】

個体において、病原性ウイルスに感染したまたは感染する危険性のある宿主細胞に対するTリンパ球応答を誘導する方法であって、それを必要としている個体に、対象LINEポリペプチドと製薬上許容される担体とを含む免疫原性組成物または対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を投与することを含む方法も提供する。一部の実施形態では、Tリンパ球応答は、CD8<sup>+</sup>T細胞応答またはCD4<sup>+</sup>T細胞応答を含む。さらなる実施形態では、Tリンパ球応答は、粘膜Tリンパ球応答を含む。対象方法を用いた治療に適した個体には、たとえば、ヒトレトロウイルスなどの病原性ウイルス、たとえばヒト免疫不全ウイルスに感染している、または感染する危険性のある個体が含まれる。

40

個体において、病原性ウイルスに感染したまたは感染する危険性のある宿主細胞に対するTリンパ球応答を誘導する対象方法は、病原性ウイルスに感染していない個体で実施することができる。これらの実施形態では、対象方法は、LINEポリペプチドと製薬上許容される担体とを含む免疫原性組成物またはLINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を、病原性ウイルスに感染していない個体に投与することを含むことができる。他の実施形態では、対象方法は、病原性ウイルスに感染した個体においてTリンパ球応答を誘導する。

50

## 【 0 0 0 9 】

また、一般に、個体に、対象 L I N E ポリペプチドと製薬上許容される担体とを含む対象免疫原性組成物を投与すること、または、個体に、対象 L I N E ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を含む対象免疫原性組成物を投与することを含む、個体において、L I N E 発現を示し、その表面上に L I N E エピトープを提示する癌細胞に対する T リンパ球応答を誘導する方法も提供する。

また、一般に、未刺激の C D 8 + T 細胞の集団を、*in vitro* で、抗原提示プラットフォームと会合している対象の単離 L I N E ポリペプチドと接触させることを含み、接触により、L I N E ペプチド特異的 C D 8 + T 細胞の集団の産生がもたらされる、L I N E ポリペプチドに特異的な C D 8 + T 細胞の集団を作製する方法も提供する。

10

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 1 0 】

【 図 1 A - B 】 H I V - 1 に感染した初代 C D 4 + T 細胞中における L 1 - P 1 5 0 の発現を示す図である。

【 図 2 】 H I V - 1 に感染した個体の末梢血中において L 1 に対する免疫応答が存在するが、感染していない個体では存在しないことを示す図である。

【 図 3 A - B 】 L 1 特異的 C D 8 + T 細胞による H I V - 1 に感染した細胞の特異的認識を示す図である。

【 図 3 C 】 L 1 特異的 C D 8 + T 細胞による H I V - 1 に感染した細胞の特異的認識を示す図である。

20

【 図 3 D 】 L 1 特異的 C D 8 + T 細胞による H I V - 1 に感染した細胞の特異的認識を示す図である。

【 図 3 E 】 L 1 特異的 C D 8 + T 細胞による H I V - 1 に感染した細胞の特異的認識を示す図である。

【 図 4 A - 4 B 】 H I V - 1 に感染した細胞の排除および L 1 特異的 C D 8 + T 細胞クローンのウイルス産生の抑制を示す図である。

【 図 5 A 】 多様な H I V - 1 パネルおよび H I V - 2 を用いた L 1 特異的 T 細胞クローン認識アッセイを示す図である（実験「T O 1」）。

【 図 5 B 】 多様な H I V - 1 パネルおよび H I V - 2 を用いた L 1 特異的 T 細胞クローン認識アッセイを示す図である（実験「T O 1」）。

30

【 図 5 C 】 多様な H I V - 1 パネルおよび H I V - 2 を用いた L 1 特異的 T 細胞クローン認識アッセイを示す図である（実験「T O 1」）。

【 図 5 D 】 多様な H I V - 1 パネルおよび H I V - 2 を用いた L 1 特異的 T 細胞クローン認識アッセイを示す図である（実験「T O 1」）。

【 図 5 E 】 多様な H I V - 1 パネルおよび H I V - 2 を用いた L 1 特異的 T 細胞クローン認識アッセイを示す図である（実験「T O 1」）。

【 図 6 A 】 L 1 特異的 T 細胞クローンの多様な H I V - 1 パネル認識アッセイを示す図である「S F 1」。

【 図 6 B 】 L 1 特異的 T 細胞クローンの多様な H I V - 1 パネル認識アッセイを示す図である「S F 1」。

40

【 図 6 C - 1 】 L 1 特異的 T 細胞クローンの多様な H I V - 1 パネル認識アッセイを示す図である「S F 1」。

【 図 6 C - 2 】 L 1 特異的 T 細胞クローンの多様な H I V - 1 パネル認識アッセイを示す図である「S F 1」。

【 図 6 D 】 L 1 特異的 T 細胞クローンの多様な H I V - 1 パネル認識アッセイを示す図である「S F 1」。

【 図 7 - 1 】 L 1 特異的 T 細胞クローンの多様な H I V - 1 パネル認識アッセイを示す図である「T O 2」。

【 図 7 - 2 】 L 1 特異的 T 細胞クローンの多様な H I V - 1 パネル認識アッセイを示す図である「T O 2」。

50

【図 8】多様な HIV-1 単離体に感染した自己細胞に対するクローン L1-30 の応答性の度合いと感染のレベルとの相関を示す図である。

【図 9】抗 HLA-A、B、C 抗体とのプレインキュベーションによる感染細胞の認識の遮断を示す図である。

【図 10】HIV-1 タンパク質に対する LINE アミノ酸配列の BLAST 検索を用いて同定した候補 LINE ポリペプチドを提供する表である。

【図 11-1】HIV-1 タンパク質に対する LINE アミノ酸配列の BLAST 検索から生じる、対象 LINE ポリペプチドと HIV タンパク質配列との間の例示的な配列アラインメントを提供する表である。

【図 11-2】HIV-1 タンパク質に対する LINE アミノ酸配列の BLAST 検索から生じる、対象 LINE ポリペプチドと HIV タンパク質配列との間の例示的な配列アラインメントを提供する表である。

【図 11-3】HIV-1 タンパク質に対する LINE アミノ酸配列の BLAST 検索から生じる、対象 LINE ポリペプチドと HIV タンパク質配列との間の例示的な配列アラインメントを提供する表である。

【図 11-4】HIV-1 タンパク質に対する LINE アミノ酸配列の BLAST 検索から生じる、対象 LINE ポリペプチドと HIV タンパク質配列との間の例示的な配列アラインメントを提供する表である。

【図 12】*in silico* エピトープ予測を用いて同定した LINE-1 ペプチドを示す表である。

【図 13-1】単離 LINE ポリペプチド LiD9R、LiE13E、LiK10I、LiI9C、Lim12T、LiN13V および LiQ9E の ELISPOT アッセイ結果を提供する表である。

【図 13-2】単離 LINE ポリペプチド LiD9R、LiE13E、LiK10I、LiI9C、Lim12T、LiN13V および LiQ9E の ELISPOT アッセイ結果を提供する表である。

【図 13-3】単離 LINE ポリペプチド LiD9R、LiE13E、LiK10I、LiI9C、Lim12T、LiN13V および LiQ9E の ELISPOT アッセイ結果を提供する表である。

【図 14-1】単離 LINE ポリペプチド LiIV9、LiKI9、LiRV9、LiTV9 の ELISPOT アッセイ結果を提供する表である。

【図 14-2】単離 LINE ポリペプチド LiIV9、LiKI9、LiRV9、LiTV9 の ELISPOT アッセイ結果を提供する表である。

【図 15】図 2 で言及するペプチドのペプチド配列および特徴を示す表である。

【図 16-1】HIV-1 に感染した対象に関する情報を提供する表である。

【図 16-2】HIV-1 に感染した対象に関する情報を提供する表である。

【図 16-3】HIV-1 に感染した対象に関する情報を提供する表である。

【図 16-4】HIV-1 に感染した対象に関する情報を提供する表である。

【図 16-5】HIV-1 に感染した対象に関する情報を提供する表である。

【図 17】HIV-1 に感染した対象に関する情報を提供する表である。

【図 18-1】ウイルス単離体に関する情報を提供する表である。

【図 18-2】ウイルス単離体に関する情報を提供する表である。

【図 18-3】ウイルス単離体に関する情報を提供する表である。

【図 18-4】ウイルス単離体に関する情報を提供する表である。

【図 19】多様な HIV-1 パネルを用いた LINE-1 (L1) 特異的 T 細胞クローン死滅アッセイの結果を示す図である。

【図 20】15 量体 LINE ポリペプチドのアミノ酸配列を示す図である。

【図 21A】15 量体 LINE ポリペプチドのアミノ酸配列を示す図である。

【図 21B】15 量体 LINE ポリペプチドのアミノ酸配列を示す図である。

【図 21C】15 量体 LINE ポリペプチドのアミノ酸配列を示す図である。

10

20

30

40

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0011】

## 定義

本明細書中で使用する「生体試料」には、個体から得た様々な試料種が包含され、診断または監視アッセイで使用することができる。用語「生体試料」には、血液および生物由来の他の液体試料、生検標本またはそれに由来する組織培養物もしくは細胞およびその子孫などの固体組織試料が包含される。また、用語「生体試料」には、試薬を用いた処理；洗浄；またはCD4<sup>+</sup>Tリンパ球、CD8<sup>+</sup>Tリンパ球、グリア細胞、マクロファージ、腫瘍細胞、末梢血単核球(PBMC)などの特定の細胞集団の濃縮などによって、その獲得後に任意の方法で操作された試料も含まれる。用語「生体試料」には臨床試料が包含され、また、培養中の細胞、細胞上清、組織試料、臓器、骨髄、血液、血漿、血清、脳脊髄液なども含まれる。

用語「レトロウイルス」は当分野で十分に理解されており、たとえば、ガンマレトロウイルス属(たとえばネズミ乳癌ウイルス)；イプシロンレトロウイルス属；アルファレトロウイルス属(たとえばトリ白血症ウイルス)；ベータレトロウイルス属；デルタレトロウイルス属(たとえば、ウシ白血病ウイルス；ヒトTリンパ球向性ウイルス(HTLV))；レンチウイルス属；およびスプマウイルス属を含めた、一本鎖プラスセンスのエンベロープRNAウイルスが含まれる。本明細書中で使用する用語「レンチウイルス」とは、レトロウイルス科のウイルスの属をいい、ヒト免疫不全ウイルス-1(HIV-1)；ヒト免疫不全ウイルス-2(HIV-2)；サル免疫不全ウイルス(SIV)；およびネコ免疫不全ウイルス(FIV)が含まれる。

## 【0012】

本明細書中で使用する「遺伝子送達ビヒクル」とは、1つまたは複数の目的の遺伝子またはヌクレオチド配列を宿主細胞内へと送達することができ、一部の実施形態では、発現させることができる構築体をいう。そのようなビヒクルの代表的な例には、ウイルスベクター、核酸発現ベクター、裸DNA、および特定の真核細胞(たとえば産生細胞)が含まれる。

本明細書中で使用する「作動可能に連結した」とは、記載した構成要素がその通常の機能が行われるように構成されている要素の配置をいう。したがって、コード配列に作動可能に連結した制御要素は、コード配列の発現に影響を与えることができる。制御要素は、その発現を指示するように機能する限りは、必ずしもコード配列と連続的である必要はない。したがって、たとえば、介在する未翻訳であるが転写された配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在することができ、それでも、プロモーター配列はコード配列に「作動可能に連結している」とみなすことができる。

本明細書中で互換性があるように使用される用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」とは、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態をいい、コードおよび非コードアミノ酸、化学もしくは生物化学修飾または誘導体化したアミノ酸、ならびに修飾されたペプチド主鎖を有するポリペプチドを含むことができる。この用語には、それだけには限定されないが、N末端メチオニン残基を有するまたは有さない、異種アミノ酸配列との融合タンパク質、異種および相同リーダー配列との融合体；免疫学的にタグ付けしたタンパク質などを含めた、融合タンパク質が含まれる。NH<sub>2</sub>とは、ポリペプチドのアミノ末端に存在する遊離アミノ基をいう。COOHとは、ポリペプチドのカルボキシル末端に存在する遊離カルボキシル基をいう。標準のポリペプチド命名法に沿うために、J. Biol. Chem.、243(1969)、3552~59を使用する。

## 【0013】

本明細書中で使用する用語「単離した」とは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または細胞が天然に存在する環境とは異なる環境中にある、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、または細胞を説明することを意味する。単離した遺伝子改変した宿主細胞は、遺伝子改変した宿主細胞の混合集団中に存在し得る。一部の実施形態では、単離したポリペプチドは合成である。「合成ポリペプチド」はアミノ酸からアセンブルし、in vitroで

、たとえば当業者に知られている手順を用いた無細胞化学合成を用いて化学合成する。一部の実施形態では、単離したポリペプチドは精製する。

「精製した」とは、目的化合物（たとえばポリペプチド）が、天然ではそれに付随する構成要素から分離されていることを意味する。また、「精製した」とは、製造中（たとえば化学合成中）にそれに付随する場合がある構成要素から分離された、目的化合物（たとえばポリペプチド）をいうためにも使用することができる。一部の実施形態では、化合物（たとえばポリペプチド）は、天然で会合しているまたは製造中に会合している有機分子が、少なくとも50重量%～60重量%除かれた場合に、実質的に純粋である。一部の実施形態では、調製物は、目的化合物の少なくとも75重量%、少なくとも90重量%、少なくとも95重量%、または少なくとも99重量%である。したがって、たとえば、「精製した」対象ポリペプチドは、ポリペプチドが組成物の少なくとも75重量%、少なくとも90重量%、少なくとも95重量%、または少なくとも99重量%の量で組成物中に存在する。実質的に純粋な化合物は、たとえば、天然源（たとえば細菌）から抽出することによって、化合物を化学合成することによって、または精製および化学修飾の組合せによって、得ることができる。また、実質的に純粋な化合物は、たとえば、目的抗体と結合する化合物を有する試料を濃縮することによっても得ることができる。純度は、任意の適切な方法、たとえば、クロマトグラフィー、質量分析、高速液体クロマトグラフィー分析などによって測定することができる。

10

#### 【0014】

LINEポリペプチド融合タンパク質がLINEポリペプチドおよび「異種」ポリペプチドを含むLINEポリペプチドのコンテキストにおいて、本明細書中で使用する用語「異種」とは、LINEポリペプチド以外のポリペプチド、たとえば、LINEポリペプチドと通常は天然で会合していないポリペプチドをいう。たとえば、異種ポリペプチドは、LINEポリペプチドと有意なアミノ酸配列同一性を保有せず、たとえば、異種ポリペプチドは、LINEポリペプチドと、約50%未満、約40%未満、約30%未満、または約20%未満のアミノ酸配列同一性を有する。

20

「抗原」とは、抗体分子またはT細胞受容体によって特異的結合され得る任意の物質が含まれるように、本明細書中で定義される。「免疫原」とは、リンパ球活性化を開始させて、抗原特異的免疫応答をもたらすことができる抗原である。

#### 【0015】

「エピトープ」とは、特定のB細胞および/またはT細胞が応答する抗原上の部位を意味する。また、この用語は、「抗原決定基」または「抗原決定基部位」と互換性があるように使用される。タンパク質、多糖類、または他のバイオポリマー上のB細胞エピトープ部位は、折り畳みによってまとめられた巨大分子の様々な部位からの部分で構成される。この種のエピトープは、この部位が、直鎖配列中では不連続であるが折り畳まれたコンホメーションでは連続的であるポリマーセグメントから構成されているため、コンホメーションまたは不連続エピトープと呼ばれる。バイオポリマーまたは他の分子の単一セグメントから構成されるエピトープは、連続または直鎖エピトープと呼ばれる。T細胞エピトープは、一般に直鎖ペプチドである。同じエピトープを認識する抗体は、1つの抗体が別の抗体の標的抗原との結合を遮断する能力を示す、単純な免疫アッセイで同定することができる。

30

40

本明細書中で互換性があるように使用される用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」とは、リボヌクレオチドまたはデオキシヌクレオチドのどちらかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態をいう。したがって、この用語には、それだけには限定されないが、一本鎖、二本鎖、または多重鎖のDNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、あるいはプリンおよびピリミジン塩基または他の天然、化学修飾、生物化学修飾、非天然、もしくは誘導体化したヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。

#### 【0016】

核酸の説明において本明細書中で使用する「組換え」とは、特定の核酸（DNAまたは

50

R N A ) が、天然系中で見つかる内在核酸とは識別可能な構造的コードまたは非コード配列を有する構築体をもたらす、クローニング、制限、および/またはライゲーションステップの様々な組合せの産物であることを意味する。一般に、構造的コード配列をコードするDNA配列は、cDNA断片および短いオリゴヌクレオチドリンカーから、または一連の合成オリゴヌクレオチドからアセンブルすることができ、これにより、細胞または無細胞転写および翻訳系中に含有される組換え転写単位から発現できる合成核酸が提供される。したがって、たとえば、用語「組換え」ポリヌクレオチドまたは核酸とは、天然に存在せず、たとえば、人の介入によって、他の場合では分離されている2つの配列セグメントの人工的な組合せによって作製されるものをいう。

「作動可能に連結した」とは、そのように記載した構成要素が、その意図される様式で機能することが可能な関係性にある、近位をいう。たとえば、プロモーターがその転写または発現に影響を与える場合に、プロモーターはコード配列に作動可能に連結している。

#### 【0017】

用語「癌」、「新生物」、および「腫瘍」とは、本明細書中で互換性があるように使用され、細胞増殖の制御の有意な損失によって特徴づけられる異常な成長表現型を示すように、比較的自律的な成長を示す細胞をいう。本出願における治療の目的細胞には、前癌性、悪性、転移前、転移性、および非転移性の細胞、ならびに*in situ*癌腫が含まれる。

「癌表現型」とは、一般に、癌細胞の特徴である様々な生物学的現象のうちの任意のものをいい、現象は、癌の種類に応じて変動する場合がある。癌表現型は、一般に、たとえば、細胞の成長または増殖（たとえば、非制御の成長または増殖）、細胞周期の調節、細胞可動性、細胞間相互作用、または転移などの異常によって同定する。

用語「対象」、「個体」、「宿主」、および「患者」とは、本明細書中で互換性があるように使用され、それだけには限定されないが、ネズミ（ラット、マウス）、ネコ科動物、非ヒト霊長類（たとえばサル）、ヒト、イヌ科動物、有蹄動物などを含めた哺乳動物をいう。

#### 【0018】

本明細書中で使用する用語「治療」、「治療すること」、「治療する」などとは、一般に、所望の薬理学的および/または生理的な効果を得ることをいう。効果は、疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に予防することに関して予防的であり得るか、かつ/または、疾患および/もしくは疾患に起因し得る有害作用の部分的もしくは完全な安定化もしくは治癒に関して治療的であり得る。本明細書中で使用する「治療」とは、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を含み、(a)疾患もしくは症状に罹りやすい可能性があるが、未だ罹患していると診断されていない対象において、疾患もしくは症状の発生を予防すること；(b)疾患の症状を阻害すること、すなわち、その発達を停止させること；または(c)疾患の症状を緩和させること、すなわち、疾患もしくは症状の回帰をもたらすことが含まれる。

#### 【0019】

本発明をさらに説明する前に、記載した特定の実施形態はもちろん変動し得るため、本発明はそれに限定されないことを理解されたい。また、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書中で使用する用語は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、限定することを意図しないことも理解されたい。

値の範囲を提供する場合、その範囲の上限と下限との間のそれぞれの間の値（コンテキストにより明らかにそうでないと指示される場合以外は下限の単位の十分の一まで）、およびその記述した範囲内の任意の他の記述した値または間の値が、本発明内に包含されることを理解されたい。これらのより狭い範囲の上限および下限は、より狭い範囲内に独立して含められてもよく、やはり本発明内に包含され、記述した範囲中の任意の具体的に排除した限界に従う。記述した範囲に一方または両方の限界が含まれる場合は、これらの含まれる限界の一方または両方を排除する範囲も、本発明に含まれる。

#### 【0020】

10

20

30

40

50

別段に定義しない限りは、本明細書中で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の技術者によって一般的に理解されるものと同じ意味を持つ。本明細書中に記載するものと類似または均等の任意の方法および材料も本発明の実施または試験に使用することができるが、好ましい方法および材料を以下に記載する。本明細書中で引用するすべての出版物は、出版物の引用に関連する方法および/または材料を開示および記載するために、本明細書中に参考として組み込まれている。

コンテキストにより明らかにそうでないと指示される場合以外は、本明細書および添付の特許請求の範囲中で使用する単数形「a」、「an」、および「the」には、複数の指示対象が含まれることに注意されたい。したがって、たとえば、「(a)長鎖散在反復配列(LINE)ポリペプチド」への言及には複数のそのようなポリペプチドが含まれ、「(the)免疫原性組成物」への言及には、1つまたは複数の免疫原性組成物および当業者に知られているその均等への言及が含まれる。特許請求の範囲は、任意の選択的要素を排除するように作成されている場合があることにさらに注意されたい。したがって、本記述は、特許請求の範囲の要素の記述と関連した「だけ」、「のみ」などの排他的用語の使用、または「負」の限定の使用の先行詞として役割を果たすことを意図する。

本明細書中に記述する出版物は、本出願の出願日より前のその開示についてのみ提示する。本明細書中のいかなる記載も、本発明が、先行発明の利点により、そのような出版物に先行する権利を有さないという承認として解釈されるべきでない。さらに、提供する出版日は、実際の出版日とは異なる場合があり、個別に確認する必要がある。

詳細な説明

#### 【0021】

本発明は、LINEポリペプチド(たとえば、単離LINEポリペプチド;合成LINEポリペプチド)、および対象LINEポリペプチドを含む免疫原性組成物を含めた組成物を提供する。本発明は、対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸を提供する。本発明は、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む組成物を提供する。免疫原性組成物は、LINEポリペプチド、たとえばウイルスに感染した細胞上のものに対するT細胞免疫応答を刺激するために有用である。たとえば、対象免疫原性組成物は、HTLVまたはHIVに感染した細胞上のLINEポリペプチド(またはその断片)を認識することができるT細胞免疫応答を刺激するために有用である。以下により詳細に記述するように、HTLVまたはHIVに感染した細胞上のLINEポリペプチドまたはその断片に対するT細胞免疫応答を刺激することにより、ウイルス感染症(たとえば、HTLV感染症、HIV感染症)の治療を提供することができる。本発明は、さらに、個体において、レトロウイルスまたはレンチウイルスに感染した細胞に対する免疫応答を刺激する方法を提供する。本発明は、さらに、癌細胞によってLINEポリペプチドが異常に発現されている癌を治療する方法を提供する。たとえば、対象免疫原性組成物は、癌性または前癌細胞上のLINEポリペプチド(またはその断片)を認識できるT細胞免疫応答を刺激するために有用である。また、LINEポリペプチドに対する免疫応答を減少させることを含む、障害を治療する方法も提供する。

#### 【0022】

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は、レトロウイルスに感染した細胞、たとえばヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染した細胞に特異的なT細胞免疫応答を誘導する。対象LINEポリペプチドによって提示されたエピトープは、エピトープに対するT細胞免疫応答を刺激または増強する。LINEエピトープもレトロウイルスに感染した細胞の表面上に存在する場合は、レトロウイルスに感染した細胞に対するT細胞応答も起こる。「T細胞免疫応答」には、以下のうちの1つまたは複数が含まれる:1)LINEエピトープに特異的なCD4<sup>+</sup>T細胞の数および/または活性の増加;2)LINEエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数および/または活性(たとえば細胞毒性)の増加;ならびに3)Th1型免疫応答を誘導するまたはその指標であるサイトカインの分泌。Th1免疫応答を誘導するまたはその指標であるサイトカインには、それだけには限定されないが、インターフェロン-ガンマ(IFN- )およびIL-2が含まれる。対象免疫原性

10

20

30

40

50

組成物で刺激されるT細胞免疫応答には、粘膜T細胞免疫応答および全身性T細胞免疫応答が含まれる。

対象免疫原性組成物は、静脈内投与、皮下投与、または他の非経口投与経路に適した製剤物；粘膜組織への投与に適した製剤物などを含めた、様々な方法のうちの任意のもので製剤することができる。本発明は、対象免疫原性組成物を含む医薬製剤を提供する。

#### 【0023】

本発明は、さらに、レトロウイルス感染症（たとえばHTLV感染症）の治療に対する患者の応答の監視に使用するために適したLINEポリペプチド組成物を提供する。したがって、本発明は、さらに、レトロウイルス感染症（たとえばHTLV感染症）の治療に対する患者の応答の監視する方法を提供する。

本発明は、さらに、レンチウイルス感染症（たとえばHIV感染症）の治療に対する患者の応答の監視に使用するために適したLINEポリペプチド組成物を提供する。したがって、本発明は、さらに、レンチウイルス感染症（たとえばHIV感染症）の治療に対する患者の応答の監視する方法を提供する。

#### 単離LINEポリペプチド

本発明は、LINEポリペプチド、および対象LINEポリペプチドを含む組成物を提供する。対象LINEポリペプチドは、たとえば、免疫原性組成物を作製すること（たとえば、個体においてLINEポリペプチドに対する免疫応答を増強するため、または個体においてHIVエピトープもしくはポリペプチドに対する免疫応答を増強するため）；免疫調節組成物を作製すること（たとえば、個体においてLINEポリペプチドに対する免疫応答を減少させるため；治療、たとえばレトロウイルス感染症の治療に対する患者の応答を監視すること；疾患の段階を決定すること；疾患を検出すること；および養子移植方法のためにCD8<sup>+</sup>T細胞を作製するにおいて、使用が見つかる。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチドは単離されている。一部の実施形態では、対象の単離LINEポリペプチドは合成である（たとえば化学合成）。したがって、本発明は、合成LINEポリペプチドを提供する。以下の記述では、用語「対象の単離LINEポリペプチド」、または単に「対象LINEポリペプチド」を使用する。しかし、以下の記述は「対象の合成LINEポリペプチド」にも均等に適用されることを理解されたい。

#### 【0024】

#### LINEポリペプチド

LINEポリペプチドには、任意のLINEのクレード、ファミリー、サブファミリー、クラスまたはグループによってコードされるポリペプチド、たとえば、CRE、R2、R4、L1、L2、RTE、Tad1、R1、LOA、Jockey、CR1、およびI、ならびにその任意のサブグループが含まれる。LINEのクレード、ファミリー、サブファミリー、クラス、グループ、およびサブグループは、当分野で知られている。たとえば、Malik他、Molecular Biology and Evolution、16(6):793.(1999)；Lovsin他、Molecular Biology and Evolution、18:2213~2224を参照されたい。

#### 【0025】

一部の実施形態では、対象の単離LINEポリペプチド（または対象の合成LINEポリペプチド）は、LINEでコードされるポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約6、7、8、9、10、11、12、13~15、15~17、17~20、20~25、25~50、50~75、75~100、100~150、150~200、200~250、250~300、300~350、もしくは350~400個、またはそれより多くの連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。LINEでコードされるポリペプチドには、LINEのORF1p(p40)およびORF2p(p150)によってコードされるポリペプチドが含まれる。

10

20

30

40

50

他の実施形態では、対象の単離LINEポリペプチドは、LINEでコードされるポリペプチドのアミノ酸配列と少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約6、7、8、9、10、11、12、13~15、15~17、17~20、20~25、25~50、50~75、75~100、100~150、150~200、200~250、250~300、300~350、もしくは350~400個、またはそれより多くの連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含むが、ただし、LINEでコードされるポリペプチドは、LINE-1のORF1p(p40)またはORF2p(p150)のどちらかによってコードされるポリペプチドよりも短いアミノ酸配列を有する。

10

#### 【0026】

一部の実施形態では、対象の単離LINEポリペプチドは、HIVにコードされるタンパク質、ポリペプチド、またはエピトープ中の同じ長さのアミノ酸ストレッチと少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、約6、7、8、9、10、11、12、13~15、15~17、17~20、もしくは20~25個、またはそれより多くの連続的なアミノ酸のストレッチを含む。

他の実施形態では、対象の単離LINEポリペプチドは、HIVにコードされるタンパク質、ポリペプチド、またはエピトープ中の同じ長さのアミノ酸ストレッチと少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する、約6、7、8、9、10、11、12、13~15、15~17、17~20、もしくは20~25個、またはそれより多くの連続的なアミノ酸のストレッチからなる、またはそのストレッチから本質的になる。

20

さらなる実施形態では、対象の単離LINEポリペプチドは、同定および単離したLINEポリペプチドであり、LINEポリペプチドは、レトロウイルスタンパク質データベース、たとえばHIVタンパク質データベースを、短いほぼ完全一致について、LINEポリペプチド配列を用いて検索することによって同定する。そのような検索は、たとえば、HIVタンパク質に対するLINEアミノ酸配列のBLAST検索(Altschul他、1997)を利用して、アルゴリズムの短いほぼ完全一致(e値=200000、PAM30マトリックス、SEGフィルターOFF、ワードサイズ=2)パラメータを使用することによって実施し得る。BLASTアルゴリズムの短いほぼ完全一致のパラメータは、通常はタンパク質の多様性によって圧倒されているペプチド配列間の短い一致の検出を容易にする。これらの類似または同一の領域は系統学的分析において有意性を有さない場合があるが、これらは、T細胞認識の潜在的な交差反応性のタンパク質および/または領域の高度に保存された機能的ドメインを表すことができる。

30

#### 【0027】

また、対象LINEポリペプチドは、エピトープ予測ソフトウェアを用いて、LINE-1のORF1およびORF2から予測したタンパク質配列を分析することによって同定することができる。たとえば、LINE-1のエピトープペプチドは、LINE-1のORF1およびORF2からNETCTL(商標)エピトープ予測プログラムを用いて予測したタンパク質配列を分析することによって、同定することができる。NETCTL(商標)は、タンパク質全体を分析して、プロテオソーム切断部位、生じる分解産物の抗原プロセッシング(TAP)機構と関連するトランスポーターと結合する最良の潜在性を有するサブセット、およびこれら分解産物のうち、様々なヒト白血球抗原(HLA)分子に対して最良の結合親和性を有するペプチドを同定する(Larsen他、European Journal of Immunology、35(8):2295~303、200

40

50

5)。

対象の単離 LINE ポリペプチドは、アミノ酸 6 個の長さから天然に存在する LINE ポリペプチドの長さであることができ、たとえば、LINE ポリペプチドは、6 個のアミノ酸 (aa)、7 aa、8 aa、9 aa、10 aa、11 aa、12 ~ 15 aa、15 ~ 20 aa、20 ~ 25 aa、25 ~ 30 aa、30 ~ 40 aa、40 ~ 50 aa、50 ~ 100 aa、または 100 個より長いアミノ酸、たとえば、100 aa ~ 150 aa、150 aa ~ 200 aa であることができる。一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、約 6 aa ~ 約 150 aa、約 6 aa ~ 約 10 aa、約 10 aa ~ 約 15 aa、約 15 aa ~ 約 20 aa、約 20 aa ~ 約 25 aa、約 25 aa ~ 約 30 aa、約 30 aa ~ 約 40 aa、約 40 aa ~ 約 50 aa、約 50 aa ~ 約 75 aa、約 75 aa ~ 約 100 aa、約 100 aa ~ 約 125 aa、または約 125 aa ~ 約 150 aa の長さを有する。

10

#### 【0028】

LINE でコードされるポリペプチドの例示的な非限定的な例は、GenBank 受託番号 AAC51261 (配列番号 23)、AAC51262 (配列番号 24)、AAC51263 (配列番号 25)、AAC51264 (配列番号 26)、AAC51265 (配列番号 27)、AAC51266 (配列番号 28)、AAC51267 (配列番号 29)、AAC51268 (配列番号 30)、AAC51269 (配列番号 31)、AAC51270 (配列番号 32)、AAC51271 (配列番号 33)、AAC51272 (配列番号 34)、AAC51273 (配列番号 35)、AAC51274 (配列番号 36)、AAC51275 (配列番号 37)、AAC51276 (配列番号 38)、AAC51277 (配列番号 39)、AAC51278 (配列番号 40)、AAC51279 (配列番号 41) 号などに見つかる。

20

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 1 :

M N E M K R E G K F R E (配列番号 1) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、9、10、11、または 12 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

30

#### 【0029】

一部の実施形態では、対象 LINE ポリペプチドは、配列番号 2 :

S Q L K E L E K Q E (配列番号 2) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、9 または 10 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 3 :

M L R A A R E K G W V T (配列番号 3) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 98 %、少なくとも約 99 %、または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、9、10、11 または 12 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

40

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 M L R A A R E K G R V T ; またはアミノ酸配列 M L R A A R E E G R V T を含むことができる。

#### 【0030】

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 4 :

K I D R L L A R L I (配列番号 4) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少

50

なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、9 または 10 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 K I D R P L A R L I ; またはアミノ酸配列 K I D R P L S R L I を含むことができる。

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 5 :

L R A A R E K G C (配列番号 5) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

10

#### 【0031】

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 6 :

N G K Q K K A G F A I L V (配列番号 6) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、9、10、11、12 または 13 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 N G K Q K K A G V A I L V を含むことができる。

20

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 7 :

D E L R E E G V R (配列番号 7) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

#### 【0032】

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 8 :

T M R Y H L T P V (配列番号 8) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

30

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 9 :

R P N L R L I G V (配列番号 9) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

40

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 R P N L H L I G V を含むことができる。

#### 【0033】

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 10 :

K V I Y R F N A I (配列番号 10) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 50%、少なくとも約 60%、少なくとも約 70%、少なくとも約 75%、少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、または 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 K V I Y R F S A I ; または K

50

V T Y R F N T I を含むことができる。

一部の実施形態では、対象の単離 L I N E ポリペプチドは、配列番号 1 1 :

I V Y L E N P I V (配列番号 1 1) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

たとえば、対象 L I N E ポリペプチドは、アミノ酸配列 I V Y L E N P M V ; またはアミノ酸配列 I V C L K N P I V を含むことができる。

【 0 0 3 4 】

一部の実施形態では、対象の単離 L I N E ポリペプチドは、配列番号 1 2 :

S L Q E I W D Y V (配列番号 1 2) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

一部の実施形態では、対象の単離 L I N E ポリペプチドは、配列番号 1 3 :

N L E E C I T R I (配列番号 1 3) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

一部の実施形態では、対象の単離 L I N E ポリペプチドは、配列番号 1 4 :

T P R H I I V R F (配列番号 1 4) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

【 0 0 3 5 】

たとえば、対象 L I N E ポリペプチドは、アミノ酸配列 T P R H V I V R F ; またはアミノ酸配列 T P R H I L V R F ; またはアミノ酸配列 T P R H I L V K F を含むことができる。

一部の実施形態では、対象の単離 L I N E ポリペプチドは、配列番号 1 5 :

L L F N I V L E V (配列番号 1 5) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

一部の実施形態では、対象の単離 L I N E ポリペプチドは、配列番号 1 6 :

Y T M E Y Y A A I (配列番号 1 6) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、7、8、または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

【 0 0 3 6 】

一部の実施形態では、対象の単離 L I N E ポリペプチドは、配列番号 1 7 :

R A R I A K S I L (配列番号 1 7) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6

10

20

30

40

50

、 7、 8、 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 R A R M A K S I L ; またはアミノ酸配列 R A C I A K S I L ; またはアミノ酸配列 R A H I A K S T L を含むことができる。

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 1 8 :

A P R F I K Q V L ( 配列番号 1 8 ) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、 7、 8、 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

10

#### 【 0 0 3 7 】

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 1 9 :

I S Y P A K L S F ( 配列番号 1 9 ) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、 7、 8、 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 I S F P A K L S F ; またはアミノ酸配列 I S Y P A T L G F を含むことができる。

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 2 0 :

S S P A T E Q S W ( 配列番号 2 0 ) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、 7、 8、 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

20

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 S S P A T D Q S W ; またはアミノ酸配列 S S L A T E Q S W を含むことができる。

#### 【 0 0 3 8 】

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 2 1 :

K A T V T K T A W ( 配列番号 2 1 ) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、 7、 8、 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

30

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 K A T V T K T V W ; またはアミノ酸配列 K A T V T K T A C を含むことができる。

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、配列番号 2 2 :

R V N R Q P T T W ( 配列番号 2 2 ) に記載のアミノ酸配列と少なくとも約 5 0 %、少なくとも約 6 0 %、少なくとも約 7 0 %、少なくとも約 7 5 %、少なくとも約 8 0 %、少なくとも約 8 5 %、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %、または 1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列の、約 6、 7、 8、 または 9 個の連続的なアミノ酸を含むポリペプチドを含む。

40

たとえば、対象 LINE ポリペプチドは、アミノ酸配列 R A N R Q P T T W ; またはアミノ酸配列 R V N R Q P T E W ; またはアミノ酸配列 R V N R Q A T E W を含むことができる。

#### 【 0 0 3 9 】

一部の実施形態では、対象の単離 LINE ポリペプチドは、以下のアミノ酸配列のうちの 1 つまたは複数を含む :

M N E M K R E G K F R E ( 配列番号 1 ) ;

S Q L K E L E K Q E ( 配列番号 2 ) ;

50

M L R A A R E K G W V T ( 配列番号 3 ) ;  
 K I D R L L A R L I ( 配列番号 4 ) ;  
 L R A A R E K G C ( 配列番号 5 ) ;  
 N G K Q K K A G F A I L V ( 配列番号 6 ) ;  
 D E L R E E G V R ( 配列番号 7 ) ;  
 T M R Y H L T P V ( 配列番号 8 ) ;  
 R P N L R L I G V ( 配列番号 9 ) ;  
 K V I Y R F N A I ( 配列番号 10 ) ;  
 I V Y L E N P I V ( 配列番号 11 ) ;  
 S L Q E I W D Y V ( 配列番号 12 ) ; 10  
 N L E E C I T R I ( 配列番号 13 ) ;  
 T P R H I I V R F ( 配列番号 14 ) ;  
 L L F N I V L E V ( 配列番号 15 ) ;  
 Y T M E Y Y A A I ( 配列番号 16 ) ;  
 R A R I A K S I L ( 配列番号 17 ) ;  
 A P R F I K Q V L ( 配列番号 18 ) ;  
 I S Y P A K L S F ( 配列番号 19 ) ;  
 S S P A T E Q S W ( 配列番号 20 ) ;  
 K A T V T K T A W ( 配列番号 21 ) ;  
 R V N R Q P T T W ( 配列番号 22 ) ; 20  
 M L R A A R E K G R V T ( 配列番号 77 ) ;  
 M L R A A R E E G R V T ( 配列番号 78 ) ;  
 K I D R P L A R L I ( 配列番号 79 ) ;  
 K I D R P L S R L I ( 配列番号 80 ) ;  
 N G K Q K K A G V A I L V ( 配列番号 81 ) ;  
 R P N L H L I G V ( 配列番号 82 ) ;  
 K V I Y R F S A I ( 配列番号 83 ) ;  
 K V T Y R F N T I ( 配列番号 84 ) ;  
 I V Y L E N P M V ( 配列番号 85 ) ;  
 I V C L K N P I V ( 配列番号 86 ) ; 30  
 T P R H V I V R F ( 配列番号 87 ) ;  
 T P R H I L V R F ( 配列番号 88 ) ;  
 T P R H I L V K F ( 配列番号 89 ) ;  
 R A R M A K S I L ( 配列番号 90 ) ;  
 R A C I A K S I L ( 配列番号 91 ) ;  
 R A H I A K S T L ( 配列番号 92 ) ;  
 I S F P A K L S F ( 配列番号 93 ) ;  
 I S Y P A T L G F ( 配列番号 94 ) ;  
 S S P A T D Q S W ( 配列番号 95 ) ;  
 S S L A T E Q S W ( 配列番号 96 ) ; 40  
 K A T V T K T V W ( 配列番号 97 ) ;  
 K A T V T K T A C ( 配列番号 98 ) ;  
 R A N R Q P T T W ( 配列番号 99 ) ;  
 R V N R Q P T E W ( 配列番号 100 ) ; および  
 R V N R Q A T E W ( 配列番号 101 )

【 0 0 4 0 】

上述の実施形態のうちの任意のものにおいて、対象 L I N E ポリペプチドは、アミノ酸  
 6 個の長さから天然に存在する L I N E ポリペプチドの長さであることができ、たとえば  
 、 L I N E ポリペプチドは、 6 個のアミノ酸 ( a a ) 、 7 a a 、 8 a a 、 9 a a 、 1 0 a  
 a 、 1 1 a a 、 1 2 ~ 1 5 a a 、 1 5 ~ 2 0 a a 、 2 0 ~ 2 5 a a 、 2 5 ~ 3 0 a a 、 3 50

0 ~ 40 aa、40 ~ 50 aa、50 ~ 100 aa、または100個より長いアミノ酸、たとえば、100 aa ~ 150 aa、150 aa ~ 200 aaであることができる。上述の実施形態のうちの任意のものにおいて、対象LINEポリペプチドは、約6 aa ~ 約150 aa、たとえば、約6 aa ~ 約10 aa、約10 aa ~ 約15 aa、約15 aa ~ 約20 aa、約20 aa ~ 約25 aa、約25 aa ~ 約30 aa、約30 aa ~ 約40 aa、約40 aa ~ 約50 aa、約50 aa ~ 約75 aa、約75 aa ~ 約100 aa、約100 aa ~ 約125 aa、または約125 aa ~ 約150 aaの長さを有する。

一部の実施形態では、対象の単離LINEポリペプチドは、図20、および図21A~Cに示す15量体のアミノ酸配列のうちの1つまたは複数を含む。

#### 【0041】

一部の実施形態では、LINEポリペプチドは融合タンパク質であり、たとえば、LINE融合タンパク質は、異種タンパク質と共有結合したLINEポリペプチドを含み、異種タンパク質は「融合パートナー」とも呼ばれる。一部の実施形態では、融合パートナーはLINEタンパク質のN末端に付着しており、たとえば、NH<sub>2</sub>-融合パートナー-LINE-COOHである。他の実施形態では、融合パートナーはLINEタンパク質のC末端に付着しており、たとえば、NH<sub>2</sub>-LINE-融合パートナー-COOHである。他の実施形態では、融合パートナーはLINEタンパク質の内部にあり、たとえば、NH<sub>2</sub>-(LINE<sub>1</sub>-FP-(LINE<sub>2</sub>-COOH))<sub>2</sub>であり、FPは融合パートナーであり、LINE<sub>1</sub>およびLINE<sub>2</sub>はそれぞれLINEのN末端およびC末端領域である。

適切な融合パートナーには、それだけには限定されないが、赤血球凝集素、FLAG、mycなどを含めた、エピトプタグなどの免疫学的タグ；それだけには限定されないが、蛍光タンパク質、酵素（たとえば、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）等を含めた、検出可能なシグナルをもたらすタンパク質；融合タンパク質の精製または単離を容易にするポリペプチド、たとえば、6Hisタグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの金属イオン結合ポリペプチド；細胞内局在化をもたらすポリペプチド；および細胞からの分泌をもたらすポリペプチドが含まれる。検出可能なシグナルをもたらす融合パートナーは、「レポーター」とも呼ばれる。一部の実施形態では、融合パートナーは、LINEポリペプチド以外の免疫調節性ポリペプチド、たとえば、抗原、サイトカインなどである。

多量体LINEポリペプチド

#### 【0042】

一部の実施形態では、対象の単離LINEポリペプチドは多量体化しており、たとえば、2つ以上のLINEポリペプチドがタンデムで連結されている。多量体には、二量体、三量体、四量体、五量体などが含まれる。単量体LINEポリペプチド、直接またはリンカーを介して互いに連結している。したがって、一部の実施形態では、対象LINEポリペプチドは、式(X<sub>1</sub>-(Y)<sub>0-40</sub>-X<sub>2</sub>-(Y)<sub>0-40</sub>)<sub>n</sub>を有し、X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>はLINEポリペプチドであり、Yはリンカーであり、nは1~約10の整数である（たとえば、n=1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10）。リンカーを使用する場合、Yは、1つもしくは複数のアミノ酸、または他の連結基である。X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>は同一または異なることができ、たとえば、同じアミノ酸配列を有するか、またはアミノ酸配列が互いに異なることができる。したがって、たとえば、対象LINEポリペプチドは、たとえばLINEポリペプチドが二量体である場合に式X<sub>1</sub>-(Y)<sub>0-40</sub>-X<sub>2</sub>を有することができる。1つの非限定的な例として、対象LINEポリペプチドが式(X<sub>1</sub>-(Y)<sub>0-40</sub>-X<sub>2</sub>-(Y)<sub>0-40</sub>)<sub>n</sub>を有する場合、X<sub>1</sub>はMNEMKREGKFRE（配列番号1）であることができ、X<sub>2</sub>はSQLKELEKQE（配列番号2）であることができる。別の非限定的な例として、対象LINEポリペプチドが式(X<sub>1</sub>-(Y)<sub>0-40</sub>-X<sub>2</sub>-(Y)<sub>0-40</sub>)<sub>n</sub>を有する場合、X<sub>1</sub>およびX<sub>2</sub>はどちらもMNEMKREGKFRE（配列番号1）であることができる。

#### 【0043】

別の例として、対象LINEポリペプチドは、たとえばLINEポリペプチドが三量体である場合に式  $X_1 - (Y)_{0-40} - X_2 - (Y)_{0-40} - X_3$  を有することができる。1つの非限定的な例として、対象LINEポリペプチドが式  $X_1 - (Y)_{0-40} - X_2 - (Y)_{0-40} - X_3$  を有する場合、 $X_1$  はMNEMKREGKFRE（配列番号1）であることができ、 $X_2$  はSQLKELEKQE（配列番号2）であることができ、 $X_3$  はMLRAAREKGWVT（配列番号3）であることができる。1つの非限定的な例として、対象LINEポリペプチドが式  $X_1 - (Y)_{0-40} - X_2 - (Y)_{0-40} - X_3$  を有する場合、 $X_1$ 、 $X_2$ 、および $X_3$  はすべてMNEMKREGKFRE（配列番号1）であることができる。

Yがスペーサーペプチドである場合、これは一般に柔軟な性質のものであるが、他の化学結合が排除されるわけではない。現在、最も有用なリンカー配列は、一般に、アミノ酸約2～約40個の長さ、たとえば、アミノ酸約2個～約10個、アミノ酸約10個～約20個、またはアミノ酸約6個～約25個の長さのペプチドであることが企図される。これらのリンカーは、一般に、合成の、オリゴヌクレオチドをコードするリンカーを用いて生成して、タンパク質をカップリングする。一般に、一定の度合いの柔軟性を有するペプチドリンカーを使用する。連結ペプチドは事実上任意のアミノ酸配列を有してよく、ただし、好ましいリンカーは一般に柔軟なペプチドをもたらす配列を念頭に置かれたい。グリシンおよびアラニンなどの小さいアミノ酸の使用が、柔軟なペプチドの作製に有用である。例示的なペプチドリンカーには、(Gly)<sub>2-40</sub>（配列番号74）、(Ser)<sub>2-40</sub>（配列番号75）、および(Ala)<sub>2-40</sub>（配列番号76）が含まれる。そのような配列の作製は、当業者によって日常的であろう。多くの異なるリンカーが市販されており、開示した実施形態に従った使用に適しているとみなされる。しかし、任意の柔軟なリンカーは、一般に、アミノ酸約2個～約40個であり、たとえば、アミノ酸約6個～約10個の長さを使用し得る。リンカーは、一般に柔軟なペプチドをもたらす事実上任意の配列を有し得る。

#### 【0044】

ホモもしくはヘテロポリマーのための連結または担体とのカップリングのための連結は、様々な方法で提供することができる。たとえば、システイン残基をアミノおよびカルボキシル末端の両方に付加することができ、ここではペプチドはシステイン残基の制御された酸化を介して共有結合されている。また、一方の官能基末端にジスルフィド結合を生じ、他方にペプチド結合を生じる、N-スクシジミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロプリオネート(SPPD)を含めた、数々のヘテロ二官能性剤も有用である。この試薬は、自身と一方のタンパク質中のシステイン残基との間のジスルフィド結合、および他方中のリシンまたは他の遊離アミノ基上のアミノを介したアミド結合を生じる。様々なそのようなジスルフィド/アミド形成剤が知られている。たとえば、Immun.Rev., 62:185(1982)を参照されたい。他の二官能性カップリング剤は、ジスルフィド結合の代わりにチオエーテルを形成する。これらのチオエーテル形成剤の多くは市販されており、6-マレイミドカプロン酸、2プロモ酢酸、2-ヨード酢酸、4-(N-マレイミド-メチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸などの反応性エステルが含まれる。カルボキシル基は、それらをスクシンイミドまたは1-ヒドロキシ-2-ニトロ-4-スルホン酸、ナトリウム塩と組み合わせることによって活性化することができる。例示的なカップリング剤は、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)である。もちろん、連結は、どちらの連結された基も、その意図された使用のため、たとえば免疫原としての機能を実質的に妨害すべきでないことが、理解されよう。

#### 【0045】

##### 担体

一部の実施形態では、対象の単離LINEポリペプチドは担体と連結している。本明細書中で用語「カップリングした」と互換性があるように使用する用語「連結した」とは、近位で会合していることをいい、たとえば、LINEポリペプチドおよび担体は近い空間

10

20

30

40

50

的近位にある。一部の実施形態では、連結は共有結合。他の実施形態では、連結は非共有結合。一部の実施形態では、LINEポリペプチドは担体と直接連結している。他の実施形態では、LINEポリペプチドは、間接的に、たとえばリンカー分子を介して連結している。

適切な担体の例には、大きな、ゆっくりと代謝される巨大分子、たとえば、タンパク質；セファロース、アガロース、セルロース、セルロースビーズなどの多糖類；ポリグルタミン酸、ポリリシンなどの高分子アミノ酸；アミノ酸コポリマー；不活性化ウイルス粒子；ジフテリア、破傷風、コレラ、ロイコトキシン分子からのトキソイドなどの不活性化細菌毒素；リポソーム；不活性化細菌；樹状細胞等が含まれる。担体を以下にさらに詳述する。

適切な担体は当分野で周知であり、たとえば、サイログロブリン、ヒト血清アルブミンなどのアルブミン、破傷風トキソイド；ジフテリアトキソイド；ポリ(D-リシン；D-グルタミン酸)などのポリアミノ酸；ロタウイルスのVP6ポリペプチド；インフルエンザウイルス赤血球凝集素、インフルエンザウイルス核タンパク質；B型肝炎ウイルスコアタンパク質、B型肝炎ウイルス表面抗原；結核菌からのツベルクリンの精製タンパク質誘導体(PPD)；不活性化緑膿菌外毒素A(毒素A)；キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)；百日咳菌の繊維状赤血球凝集素(FHA)；破傷風トキソイド(TT)のTヘルパー細胞(Th)エpitepおよびパチルスカルメット-ゲラン(BCG)細胞壁；ライ菌もしくは結核菌からの組換え10kDa、19kDaおよび30~32kDaタンパク質、またはこれらのタンパク質の任意の組合せ等が含まれる。担体、およびペプチドを担体とコンジュゲートさせる方法の記述には、たとえば、米国特許第6,447,778号を参照されたい。

#### 【0046】

緑膿菌外毒素A(毒素A)は、ワクチンのコンジュゲートにおいて担体として有効に使用されている。緑膿菌外毒素Aは、発酵器で成長させた緑膿菌PA103の培養物の上清から精製し得る。毒素Aは、動物における結果に基づいてスーパー抗原として分類されている。毒素Aは、4個の炭素のスペーサー分子であるアジピン酸ジヒドラジド(ADH)との共有カップリングによって、完全かつ不可逆的に解毒することができる。このステップにより、毒素分子のADPR-トランスフェラーゼ活性が破壊され、したがって無毒性となる。未反応のヒドラジド基は、ポリペプチドを毒素Aと共有カップリングするために使用することができる。また、毒素Aは、カルボジイミド試薬を用いてポリペプチドとカップリングさせ得る。

PPD-ペプチドコンジュゲートは、グルタルアルデヒドをカップリング剤として用いて好都合に調製される。たとえば、Rubinstein他(1995)AIDS、9:243~51を参照されたい。

対象ポリペプチドを担体とコンジュゲートさせる方法には、C末端ペプチドシステイン結合を介したジスルフィド結合、グルタルアルデヒド溶液と2時間カップリングさせること、チロシンのカップリング、または水溶性カルボジイミドとのカップリングが含まれる。

#### 【0047】

一部の実施形態では、対象の単離LINEポリペプチドは脂質化されている。脂質化により、脂質と連結しているペプチドに対する細胞傷害性T細胞(CTL)の応答が増加する。パルミチン酸などの脂質残基はペプチドのアミノ末端に付着している。脂質は、ペプチドに直接、または、Ser-Ser、Gly、Gly-Gly、Ser結合などの連結を介して間接的に、付着していることができる。別の例として、トリパルミトイル-S-グリセリルシステニル-セリル-セリン(P<sub>3</sub>CSS)などの大腸菌リポタンパク質を用いて、ペプチドと共有結合している場合は特異的CTLを刺激することができる。Deres他、Nature、342:561~564(1989)を参照されたい。LINEポリペプチドは、酢酸からステアリン酸にわたる様々な鎖長および不飽和化度合いの無電荷の脂肪酸残基と、および適切なカルボン酸無水物を介して負荷電スクシニル残基とコ

10

20

30

40

50

ンジュゲートさせることができる。たとえば、米国特許第 6, 419, 931 号を参照されたい。

対象の単離 LINE ポリペプチドは、直接または間接的に、たとえばリンカー分子を介して、担体とコンジュゲートさせ得る。様々なリンカー分子が当分野で知られており、コンジュゲート中で使用することができる。ペプチドと担体との連結は、ペプチド反応性側鎖、またはペプチドの N もしくは C 末端を介したものであり得る。リンカーは有機、無機、または半有機分子であってよく、また、有機分子、無機分子のポリマー、または無機および有機分子の両方を含むコポリマーであってよい。

存在する場合は、リンカー分子は、一般に、LINE ポリペプチドおよび連結された担体が、LINE ポリペプチドと担体との間にある程度の柔軟な動きを可能にするのに十分な長さである。リンカー分子は、一般に原子約 6 ~ 50 個の長さである。また、リンカー分子は、たとえば、アリールアセチレン、2 ~ 10 個の単量体単位を含有するエチレングリコールオリゴマー、ジアミン、二価酸、アミノ酸、またはその組合せであってよい。本開示に鑑みて、ポリペプチドと結合することができる他のリンカー分子を使用し得る。

【0048】

#### 組成物

本発明は、対象の単離 LINE ポリペプチドを含む組成物を提供する。対象の単離 LINE ポリペプチドを含む組成物には、以下のうちの 1 つまたは複数が含まれることができる：塩、たとえば、NaCl、MgCl、KCl、MgSO<sub>4</sub> など；緩衝剤、たとえば、トリス緩衝液、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸ナトリウム塩(MES)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、N-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)など；可溶化剤；洗剤、たとえば、Tween-20 などの非イオン性洗剤；プロテアーゼ阻害剤等。一部の実施形態では、以下にさらに詳述するように、対象 LINE 組成物は免疫原性組成物である。他の実施形態では、以下にさらに詳述するように、対象 LINE 組成物は、医薬組成物、たとえば、対象の単離 LINE ポリペプチドと製薬上許容される賦形剤とを含む組成物である。

一部の実施形態では、対象組成物は、単一の種類（または「種」）の対象 LINE ポリペプチドを含み、たとえば、一部の実施形態では、対象組成物中の LINE ポリペプチドは、すべて実質的に同じアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、対象免疫原性組成物は 2 つ以上の異なる LINE ポリペプチドを含み、たとえば、組成物は対象 LINE ポリペプチドの集団を含み、その集団のメンバーはアミノ酸配列が異なることができる。対象組成物は 2 ~ 約 20 種の異なる LINE ポリペプチドを含むことができ、たとえば、対象組成物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11 ~ 15、または 15 ~ 20 種の異なる LINE ポリペプチドを含むことができ、そのそれぞれは、他の LINE ポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸を有する。たとえば、一部の実施形態では、対象組成物は、第 1 のアミノ酸配列を有する第 1 の LINE ポリペプチド；および第 2 のアミノ酸配列を有する少なくとも第 2 の LINE ポリペプチド（第 2 のアミノ酸配列は第 1 のアミノ酸配列とは異なる）を含む。別の例として、一部の実施形態では、対象組成物は、第 1 のアミノ酸配列を有する第 1 の LINE ポリペプチド；第 2 のアミノ酸配列を有する第 2 の LINE ポリペプチド（第 2 のアミノ酸配列は第 1 のアミノ酸配列とは異なる）；ならびに第 3 のアミノ酸配列を有する少なくとも第 3 の LINE ポリペプチド（第 3 のアミノ酸配列は第 1 および第 2 のアミノ酸配列のどちらとも異なる）を含む。他の実施形態では、対象組成物は上述の多量体 LINE ポリペプチドを含む。

【0049】

#### LINE ポリペプチドの産生

対象 LINE ポリペプチドは、たとえば、LINE ポリペプチドが「合成」ポリペプチドである化学合成によること；天然に存在する供給源からの単離および精製によること；および LINE ポリペプチドが「組換え」ポリペプチドである組換え手段によることを含

10

20

30

40

50

めた、いくつかの方法で産生することができる。対象LINEポリペプチドを産生するための組換え手段は当分野で周知であり、対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを用いて宿主細胞の遺伝子改変を行うこと、LINEポリペプチドが遺伝子改変した細胞によって産生されるような条件下で適切な時間の間、宿主細胞を *in vitro* で培養すること、および遺伝子改変した細胞によって産生されたLINEポリペプチドを単離することを含む。

#### 【0050】

##### 医薬組成物

本発明は、対象LINEポリペプチドと製薬上許容される賦形剤とを含む、対象LINEポリペプチドを含む医薬組成物を提供する。

様々な製薬上許容される賦形剤が当分野で知られており、本明細書中で詳述する必要はない。製薬上許容される賦形剤は、たとえば、A. Gennaro (2000) 「レミントン：製薬の科学および実施 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy)」、第20版、Lippincott, Williams, & Wilkins; 製薬財形および薬物送達系 (Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems) (1999) H. C. Ansel 他編、第7版、Lippincott, Williams, & Wilkins; および製薬賦形剤の手引き (Handbook of Pharmaceutical Excipients) (2000) A. H. Kibbe 他編、第3版、Amer. Pharmaceutical Assoc. を含めた様々な出版物中に十分に記載されている。

#### 【0051】

ビヒクル、アジュバント、担体または希釈剤などの製薬上許容される賦形剤は、容易に公的に入手可能である。さらに、pH調節剤および緩衝剤、等張性調節剤、安定化剤、湿潤剤などの製薬上許容される補助物質は、容易に公的に入手可能である。

適切な賦形剤ビヒクルは、たとえば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびその組合せである。さらに、所望する場合は、ビヒクルは、湿潤剤もしくは乳化剤またはpH緩衝剤などの少量の補助物質を含有し得る。

対象LINEポリペプチド医薬組成物は、対象LINEポリペプチドを、水性または非水性溶媒、たとえば、植物または他の同様の油、合成脂肪酸グリセリド、高級脂肪酸もしくはプロピレングリコールのエステル中に; 所望する場合は、可溶化剤、等張化剤、懸濁剤、乳化剤、安定化剤および保存料などの慣用の添加剤と共に、溶解、懸濁または乳化させることによって、調製することができる。

#### 【0052】

##### 対象LINEポリペプチドを含む免疫原性組成物

本発明は、対象LINEポリペプチドを含む免疫原性組成物を提供する。対象免疫原性組成物中に含めるために適したLINEポリペプチドおよび単離LINEポリペプチドは、上述のものである。

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は、レトロウイルスに感染した細胞の表面上に提示された場合に、レトロウイルスに感染した細胞、たとえば、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に感染した細胞またはHTLVに感染した細胞に特異的なT細胞免疫応答を誘導する、1つまたは複数のT細胞エピトープを含むLINEポリペプチドを含む。「T細胞免疫応答」には、以下のうちの1つまたは複数が含まれる: 1) LINEエピトープに特異的なCD4<sup>+</sup>T細胞の数および/または活性の増加; 2) LINEエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数および/または活性の増加; ならびに3) Th1型免疫応答を誘導するまたはその指標であるサイトカインの分泌。Th1免疫応答を誘導するまたはその指標であるサイトカインには、それだけには限定されないが、インターフェロン-ガンマ (IFN- ) およびIL-2が含まれる。

#### 【0053】

特定の実施形態では、対象免疫原性組成物の投与は、レトロウイルスに感染した細胞の

表面上のLINEポリペプチドまたはその断片の特異的T細胞認識による、レトロウイルスに感染した細胞たとえばHIV感染細胞の、T細胞に媒介される死滅をもたらす。他の実施形態では、対象免疫原性組成物の投与は、LINEポリペプチドまたはその断片に特異的なT細胞とレンチウイルスに感染した細胞の表面上に提示されるレトロウイルスエピトープとの交差反応性による、レトロウイルスに感染した細胞たとえばHIV感染細胞の、T細胞に媒介される死滅をもたらす。

対象LINEポリペプチドを含む対象免疫原性組成物は、以下にさらに詳述するように、いくつかの方法で製剤することができる。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は単一種のLINEポリペプチドを含み、たとえば、免疫原性組成物は、実質的にすべて同じアミノ酸配列を有するLINEポリペプチドの集団を含む。他の実施形態では、対象免疫原性組成物は2つ以上の異なるLINEポリペプチドを含み、たとえば、免疫原性組成物は、LINEポリペプチドの集団を含み、その集団のメンバーはアミノ酸配列が異なることができる。対象免疫原性組成物は2～約20種の異なるLINEポリペプチドを含むことができ、たとえば、対象免疫原性組成物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11～15、または15～20種の異なるLINEポリペプチドを含むことができ、そのそれぞれは、他のLINEポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸を有する。たとえば、一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は、第1のアミノ酸配列を有する第1のLINEポリペプチド；および第2のアミノ酸配列を有する少なくとも第2のLINEポリペプチド（第2のアミノ酸配列は第1のアミノ酸配列とは異なる）を含む。別の例として、一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は、第1のアミノ酸配列を有する第1のLINEポリペプチド；第2のアミノ酸配列を有する第2のLINEポリペプチド（第2のアミノ酸配列は第1のアミノ酸配列とは異なる）；ならびに第3のアミノ酸配列を有する少なくとも第3のLINEポリペプチド（第3のアミノ酸配列は第1および第2のアミノ酸配列のどちらとも異なる）を含む。他の実施形態では、対象免疫原性組成物は上述の多量体LINEポリペプチドを含む。

対象免疫原性組成物は、水溶液、たとえば生理食塩水などの製薬上許容される希釈剤、半固体形態（たとえばゲル）、または散剤形態で提供することができる。そのような希釈剤は不活性であることができる。

#### 【0054】

#### アジュバント

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は対象LINEポリペプチド（単離または合成）とアジュバントとを含む。適切なアジュバントには、ヒトでの使用に適したものが含まれる。ヒトで使用することができる既知の適切なアジュバントの例には、必ずしもそれだけには限定されないが、ミョウバン、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、MF59（4.3% w/vのスクワレン、0.5% w/vのポリソルベート80（Tween 80）、0.5% w/vのトリオレイン酸ソルビタン（Span 85））、CpG含有核酸（シトシンはメチル化されていない）、QS21（サポニンアジュバント）、MPL（モノホスホリル脂質A）、3DMPL（3-O-脱アシル化MPL）、Aquillia、ISCOMからの抽出物（たとえば、Sjolander他（1998）J. Leukocyte Biol.、64：713参照）、LT/CT突然変異体、ポリ（D,L-ラクチド-コ-グリコリド）（PLG）微粒子、Quil A、インターロイキンなどが含まれる。それだけには限定されないが動物実験を含めた獣医学的用途では、フロイント、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン（thr-MDP）、N-アセチル-ノル-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン（CGP11637、ノル-MDPと呼ぶ）、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-（1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ）-エチルアミン（CGP19835A、MTP-PEと呼ぶ）、ならびに2%のスクワレン/Tween 80の乳濁液中の、細菌から抽出した3つの構成要素、モノホスホリル脂質A、トレハロースジミコレートおよび細胞壁骨格（MPL+TDM+CWS）を含有するRIBIを使用することができる。

## 【 0 0 5 5 】

組成物の有効性を増強するためのさらなる例示的なアジュバントには、それだけには限定されないが：(1) 水中油乳濁液製剤物（ムラミルペプチド（以下参照）または細菌細胞壁構成要素などの他の特異的免疫刺激剤を含むまたは含まない）、たとえば、(a) 微小流動化装を用いてサブミクロンの粒子へと製剤した5%のスクワレン、0.5%の Tween 80（モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン）、および0.5%の Span 85（トリオレイン酸ソルビタン）（ジバルミトイルホスファチジルエタノールアミンと共有結合したムラミルトリペプチド（MTP-PE）を任意選択で含有）を含有する、MF59（商標）（WO90/14837号；第10章、ワクチン設計：サブユニットおよびアジュバント手法（Vaccine design: the subunit and adjuvant approach）、PowellおよびNewman編、Plenum Press、1995）、(b) サブミクロンの乳濁液へと微小流動化した、または渦攪拌してより大きな粒子径の乳濁液を作製した、10%のスクアラン、0.4%の Tween 80、5%のプルロニックブロックポリマーL121、およびthr-MDPを含有するSAF、(c) 2%のスクワレン、0.2%の Tween 80、ならびにモノホスホリ脂質A（MPL）、トレハロースジミコレート（TDM）、および細胞壁骨格（CWS）などの1つまたは複数の細菌細胞壁構成要素、たとえば、MPL+CWS（DET-TOX（商標））を含有するRIBI（商標）アジュバント系（RAS）、（Ribi Immunochem、モンタナ州Hamilton）、(2) QS21またはSTIMULON（商標）（Cambridge Bioscience、マサチューセッツ州 Worcester）などのサポニンアジュバント、または追加の洗剤を欠くISCOM（免疫刺激複合体）などのそれから作製した粒子を使用し得る、たとえばWO00/07621号；(3) 完全フロイントアジュバント（CFA）および不完全フロイントアジュバント（IFA）；(4) サイトカイン、たとえば、インターロイキン（たとえば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12（WO99/44636号）など）、インターフェロン（たとえば インターフェロン）、マクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）、腫瘍壊死因子（TNF）、他のTNFスーパーファミリー分子（たとえば、CH40L、OX40Lなど）等；(5) モノホスホリル脂質A（MPL）または3-O-脱アシル化MPL（3dMPL）、たとえば、GB-2220221号、EP-A-0689454号、肺炎球菌の糖類と共に使用した場合は、任意選択でミョウバンが実質的に存在しない、たとえばWO00/56358号；(6) 3dMPLと、たとえばQS21および/または水中油乳濁液との組合せ、たとえば、EP-A-0835318号、EP-A-0735898号、EP-A-0761231号；(7) CpGモチーフを含むオリゴヌクレオチド [Krieg、Vaccine、2000、19、618~622；Krieg、Curr Opin Mol Ther、2001、3：15~24；Roman他、Nat. Med.、1997、3、849~854；Weiner他、PNAS USA、1997、94、10833~10837；Davis他、J. Immunol、1998、160、870~876；Chu他、J. Exp. Med、1997、186、1623~1631；Lipford他、Eur. J. Immunol.、1997、27、2340~2344；Moldoveanu他、Vaccine、1988、16、1216~1224、Krieg他、Nature、1995、374、546~549；Klinman他、PNAS USA、1996、93、2879~2883；Ballas他、J. Immunol、1996、157、1840~1845；Cowdery他、J. Immunol、1996、156、4570~4575；Halpern他、Cell Immunol、1996、167、72~78；Yamamoto他、Jpn. J. Cancer Res.、1988、79、866~873；Stacey他、J. Immunol.、1996、157、2116~2122；Messina他、J. Immunol、1991、147、1759~1764；Yi他、J. Immunol、1996、157、4918~4925；Yi他、J. Immunol、1996、157、5394~5402；Yi他、J. Immu

no1、1998、160、4755～4761；およびYi他、J. Immunol、1998、160、5898～5906；国際特許出願WO96/02555号、WO98/16247号、WO98/18810号、WO98/40100号、WO98/55495号、WO98/37919号およびWO98/52581号]、すなわち、シトシンがメチル化されていない少なくとも1つのCGジヌクレオチドを含有する；(8)ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル、たとえばWO99/52549号；(9)オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(WO01/21207号)またはオクトキシノールなどの少なくとも1つの追加の非イオン性界面活性剤と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルもしくはエステル界面活性剤(WO01/21152号)；(10)サポニンおよび免疫賦活性オリゴヌクレオチド(たとえばCpGオリゴヌクレオチド)(WO00/62800号)；(11)免疫賦活剤および金属塩粒子、たとえばWO00/23105号；(12)サポニンおよび水中油乳濁液、たとえばWO99/11241号；(13)サポニン(たとえばQS21)+3dMPL+IM2(任意選択で+ステロール)、たとえばWO98/57659号；(14)免疫刺激剤として作用して組成物の有効性を増強する他の物質が含まれる。ムラミルペプチドには、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-25アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(ノル-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミンMTP-PE)などが含まれる。

10

20

#### 【0056】

対象免疫原性組成物には、慣用の製薬上許容される賦形剤、たとえば、製薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、マグネシウム、カルボネートなどが含まれることができる。対象免疫原性組成物には、pH調節剤および緩衝剤、毒性調節剤などの、生理的条件に近似させるために必要な1つまたは複数の製薬上許容される補助物質、たとえば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどが含まれることができる。これらの製剤物中の抗原(たとえば対象LINEポリペプチド)の濃度は広く変動する場合があります、流体体積、粘度、体重などの様々な要素に基づいて、選択した特定の投与様式および患者の要求に従って選択することができる。生じる組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、散剤、ゲル、クリーム、ローション、軟膏、エアロゾルなどの形態であり得る。

30

医薬製剤中の対象免疫原性組成物のタンパク質濃度は広く変動する場合があります、たとえば、約0.1重量%未満、約0.1重量%～約2重量%、約2重量%～20重量%、もしくは約20重量%～約50重量%、またはそれより多く、流体体積、粘度などの様々な要素に基づいて、選択した特定の投与様式に従って選択される。

#### 【0057】

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチドは、1つまたは複数の脂質を用いて製剤する。たとえば、様々な大きさのリポソームを作製することができる。形成された小リポソームまたは小胞は単層であり、約20～400ナノメートルの範囲の大きさであり、多層小胞を超音波に供することによって、定義された大きさの孔を有する膜を通して圧力下で押し出すことによって、または高圧ホモジネーションによって生成することができる。直径が約0.1～1μmの範囲の大きさのより大きな単層リポソームは、脂質を有機溶媒または洗剤に溶かし、溶かした薬剤をそれぞれ蒸発または透析によって除去した場合に得ることができる。特定の脂質または厳密な脱水-水和条件を必要とする方法による、より小さな単層リポソームの融合により、細胞と同等またはそれよりも大きい単層胞を得ることができる。

40

リポソームは、1つまたは複数のカチオン性脂質、たとえば、DDAB、ジメチルジオクタデシルアンモニウムプロマイド；N-[1-(2,3-ジオロイロキシ)プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルスルフェート；1,2-ジアシル-3-ト

50

リメチルアンモニウム - プロパン (それだけには限定されないが、ジオレオイル (DOTAP)、ジミリストイル、ジパルミトイル、ジセアロイルを含む) ; 1, 2 - ジアシル - 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン (それだけには限定されないが、ジオレオイル、ジミリストイル、ジパルミトイル、ジセアロイルを含む) DOTMA、N - [ 1 - [ 2, 3 - ビス (オレオイルオキシ) ] プロピル ] - N, N, N - トリメチルアンモニウムクロライド ; DOGS、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン ; DC - コレステロール、3 - [ N - (N', N' - ジメチルアミノエタン) カルバモイル ] コレステロール ; DOSPA、2, 3 - ジオレオイルオキシ - N - ( 2 (スペルミンカルボキサミド) - エチル ) - N, N - ジメチル - 1 - プロパンアミニウムトリフルオロアセテート ; 1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン (それだけには限定されないが、ジオレオイル (DOEPC)、ジラウロイル、ジミリストイル、ジパルミトイル、ジステアロイル、パルミトイル - オレオイルを含む) ; - アラニルコレステロール ; CTAB、セチルトリメチルアンモニウムブロマイド ; ジ C 1 4 - アミジン、N - t - プチル - N' - テトラデシル - 3 - テトラデシルアミノプロピオンアミジン ; 1 4 De a 2、O, O' - ジテトラデカノールイル - N - (トリメチルアンモニオアセチル) ジエタノールアミンクロライド ; DOSPER、1, 3 - ジオレオイルオキシ - 2 - ( 6 - カルボキシ - スペルミル ) - プロピルアミド ; N, N, N', N' - テトラメチル - N, N' - ビス ( 2 - ヒドロキシエチル ) - 2, 3 - ジオレオイルオキシ - 1, 4 - ブタンジアンモニウムヨウ化物 ; 1 - [ 2 - アシルオキシ ) エチル ] 2 - アルキル (アルケニル) - 3 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) イミダゾリニウムクロライド誘導体、たとえば、1 - [ 2 - ( 9 ( Z ) - オクタデセノイルオキシ ) エチル ] - 2 - ( 8 ( Z ) - ヘプタデセニル - 3 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) イミダゾリニウムクロライド ( DOTIM )、1 - [ 2 - (ヘキサデカノイルオキシ) エチル ] - 2 - ペンタデシル - 3 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) イミダゾリニウムクロライド ( DPTIM ) ; 1 - [ 2 - テトラデカノイルオキシ ) エチル ] - 2 - トリデシル - 3 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) イミダゾリニウムクロライド ( DMTIM ) - Solodini 他 ( 1995 ) Biochem.、43 : 13537 ~ 13544 に記載 ; 第四級アミン上のヒドロキシャルキル部分を含む 2, 3 - ジアルキルオキシプロピル第四級アンモニウム化合物誘導体、たとえば、1, 2 - ジオレオイル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド ( DORI ) ; 1, 2 - ジオレイルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド ( DORIE ) ; 1, 2 - ジオレイルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシプロピルアンモニウムブロマイド ( DORIE - HP )、1, 2 - ジオレイルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシブチルアンモニウムブロマイド ( DORIE - HB ) ; 1, 2 - ジオレイルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシペンチルアンモニウムブロマイド ( DORIE - HPe ) ; 1, 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド ( DMRIE )、1, 2 - ジパルミチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド ( DPRIE ) ; 1, 2 - ジステリルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド ( DSRIE ) - たとえば、Felgner 他 ( 1994 ) J. Biol. Chem.、269 : 2550 ~ 2561 に記載を含むことができる。上述の脂質の多くは、たとえば、Avanti Polar Lipids, Inc. ; Sigma Chemical Co. ; Molecular Probes, Inc. ; Northern Lipids, Inc. ; Roche Molecular Biochemicals ; および Promega Corp. から市販されている。

#### 【 0 0 5 8 】

リポソームは、カチオン性脂質を、単独で、または他の脂質、特に、コレステロール ; 1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン (それだけには限定されないが、ジオレオイル (DOPE)、1, 2 - ジアシル - sn - グリセロ - 3 - ホスホコリン ; 天然卵黄ホスファチジルコリン (PC) など ; 合成モノおよびジアシルホスホコリン (たとえばモノアシルホスファチジルコリン (MOPC) を含む) ならびにホスホエ

タノールアミンなどの中性脂肪との混合物で含み得る。上記ジアシル誘導体の合成および天然の不斉脂肪酸ならびに混合製剤物も含まれ得る。

他の適切なリポソーム組成物には、ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)およびコレステロールが含まれる。そのようなリポソームは、たとえば米国特許第5,916,588号に記載されている。さらなる適切なリポソーム組成物、およびその調製方法は当分野で知られており、たとえば、米国特許第4,241,046号および第6,355,267号を含めた様々な出版物に記載されている。

LINEポリヌクレオチド

【0059】

本発明は、対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え(たとえば合成)核酸を提供する。対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む組換え(たとえば合成)核酸は、本明細書中で「対象LINE核酸」または「対象LINEポリヌクレオチド」と呼ぶ。本発明は、さらに、対象LINEポリヌクレオチドを含む、医薬組成物および免疫原性組成物を含めた組成物を提供する。

特定の実施形態では、対象LINEポリヌクレオチドは、対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、LINEポリペプチドは、配列番号1~22のうちの任意の1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0060】

一部の実施形態では、対象LINE核酸は、単一の種類(または「種」)のLINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、たとえば、一部の実施形態では、LINE核酸は、すべて実質的に同じアミノ酸配列のヌクレオチド配列を含む。他の実施形態では、対象LINE核酸組成物は2つ以上の異なるLINE核酸を含み、たとえば、組成物はLINEポリペプチドの集団をコードするLINE核酸の集団を含み、その集団のメンバーはアミノ酸配列が異なることができる。コードされるLINEポリペプチドの集団は、2~約20種の異なるLINEポリペプチドを含むことができ、たとえば、対象組成物は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11~15、または15~20種の異なるLINEポリペプチドを含むことができ、そのそれぞれは、他のLINEポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸を有する。たとえば、一部の実施形態では、コードされるLINEポリペプチドの集団は、第1のアミノ酸配列を有する第1のLINEポリペプチド;および第2のアミノ酸配列を有する少なくとも第2のLINEポリペプチド(第2のアミノ酸配列は第1のアミノ酸配列とは異なる)を含む。別の例として、一部の実施形態では、コードされるLINEポリペプチドの集団は、第1のアミノ酸配列を有する第1のLINEポリペプチド;第2のアミノ酸配列を有する第2のLINEポリペプチド(第2のアミノ酸配列は第1のアミノ酸配列とは異なる);ならびに第3のアミノ酸配列を有する少なくとも第3のLINEポリペプチド(第3のアミノ酸配列は第1および第2のアミノ酸配列のどちらとも異なる)を含む。他の実施形態では、コードされるLINEポリペプチドは上述の多量体LINEポリペプチドである。

【0061】

発現ベクターおよび送達ビヒクル

一部の実施形態では、対象LINEポリヌクレオチドは発現ベクターである。発現ベクターは、誘導可能または構成的であり得る転写および翻訳開始領域を提供し、コード領域は、転写開始領域ならびに転写および翻訳終結領域の転写制御下で作動可能に連結している。したがって、たとえば、対象LINEポリヌクレオチドは、転写制御要素(たとえばプロモーター)に作動可能に連結した、対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むことができ、転写制御要素は、誘導可能または構成的であることができる。

発現ベクターは、一般に、異種タンパク質をコードする核酸配列の挿入を提供するために(たとえば、対象LINEポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の挿入を提供す

10

20

30

40

50

るために)、プロモーター配列の近くに位置する好都合な制限部位を有する。発現宿主中で作動可能な選択マーカが存在し得る。適切な発現ベクターには、それだけには限定されないが、ウイルスベクター(たとえば、以下に基づくウイルスベクター: ワクシニアウイルス; ポリオウイルス; アデノウイルス(たとえば、Li 他、Invest Ophthalmol Vis Sci、35:2543-2549、1994; Borrás 他、Gene Ther、6:515-524、1999; Li および Davidson、PNAS、92:7700-7704、1995; Sakamoto 他、Hum Gene Ther、5:1088-1097、1999; WO94/12649号、WO93/03769号; WO93/19191号; WO94/28938号; WO95/11984号 および WO95/00655号参照)、アデノ関連ウイルス(たとえば、Ali 他、Hum Gene Ther、9:81-86、1998、Flannery 他、PNAS、94:6916-6921、1997; Bennett 他、Invest Ophthalmol Vis Sci、38:2857-2863、1997; Jomary 他、Gene Ther、4:683-690、1997、Rolling 他、Hum Gene Ther、10:641-648、1999; Ali 他、Hum Mol Genet、5:591-594、1996; Srivastava、WO93/09239号、Samulski 他、J. Vir.、(1989)63:3822~3828; Mendelson 他、Virology、(1988)166:154~165; および Flotte 他、PNAS、(1993)90:10613~10617参照); SV40; 単純ヘルペスウイルス; ヒト免疫不全ウイルス(たとえば、Miyoshi 他、PNAS、94:10319-23、1997; Takahashi 他、J. Virology、73:7812-7816、1999参照); レトロウイルスベクター(たとえば、ネズミ白血病ウイルス、脾臓壊死ウイルス、ならびに、ラウス肉腫ウイルス、ハーベイ肉腫ウイルス、トリ白血症ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、および乳癌ウイルスなどのレトロウイルスに由来するベクター); 等が含まれる。

#### 【0062】

数々の適切な発現ベクターが当業者に知られており、多くが市販されている。以下のベクターを例として提供する; 真核宿主細胞では、pXT1、pSG5 (Stratagene)、pSVK3、pBPV、pMSG、および pSVLSV40 (Pharmacia)。しかし、宿主細胞と適合性がある限りは、任意の他のベクターを使用し得る。

利用する宿主/ベクター系に応じて、構成的および誘導性プロモーター、転写エンハンサー要素、転写終結因子などを含めたいくつかの適切な転写および翻訳制御要素のうちの任意のものを、発現ベクター中で使用し得る(たとえば、Bitter 他(1987) Methods in Enzymology、153:516~544)。

適切な真核プロモーター(真核細胞内で機能的なプロモーター)の非限定的な例には、CMV前初期、HSVチミジンキナーゼ、初期および後期SV40、レトロウイルス由来のLTR、ならびにマウスメタロチオネイン-Iが含まれる。適切なベクターおよびプロモーターの選択は、当分野の通常の技術レベル範囲内に十分ある。また、発現ベクターは、翻訳開始のためのリボソーム結合部位および転写終結因子も含有し得る。また、発現ベクターには、発現を増幅するための適切な配列も含まれ得る。

#### 【0063】

一部の実施形態では、対象組換えベクターには1つまたは複数の選択マーカが含まれる。さらに、多くの実施形態では、発現ベクターは、真核細胞培養物ではジヒドロ葉酸還元酵素またはネオマイシン耐性などの、形質転換させた宿主細胞を選択するための表現型の形質を提供するために、1つまたは複数の選択マーカ遺伝子を含有する。

死滅させたアデノウイルス単独と連結したまたは連結していないポリカチオン凝縮DNA、たとえば Curie (1992) Hum. Gene Ther.、3:147~154; リガンドと連結したDNA、たとえば Wu (1989) J. Biol. Chem.、264:16985~16987参照; 真核細胞送達ビヒクル細胞; 光重合ヒドロゲル材料の沈着; 米国特許第5,149,655号に記載の手持ち遺伝子移入粒子銃; 米国特

許第5, 206, 152号およびWO92/11033号に記載の電離放射線；核電荷中和または細胞膜との融合を含めた、他の遺伝子送達ビヒクルおよび方法を用い得る。さらなる手法は、Philip (1994) Mol. Cell Biol.、14; 2411~2418、およびWoffending (1994) Proc. Natl. Acad. Sci.、91: 1581~1585に記載されている。

#### 【0064】

裸DNAも用い得る。例示的な裸DNA導入方法は、WO90/11092号および米国特許第5, 580, 859号に記載されている。取り込み効率は、生分解性ラテックスビーズを用いて改善し得る。DNAでコーティングしたラテックスビーズは、ビーズによるエンドサイトーシス開始後に細胞内に効率的に輸送される。この方法は、疎水性を増加させ、それによりエンドソームの破壊およびDNAの細胞質内への放出を促進するためにビーズを処理することによって、さらに改善し得る。遺伝子送達ビヒクルとして作用することができるリポソームは、米国特許第5, 422, 120号、PCT WO95/13796号、WO94/23697号、およびWO91/14445号、ならびにEP524 968号に記載されている。

リポソームまたは脂質の核酸送達ビヒクルも使用することができる。遺伝子送達用のリポソーム複合体は、たとえば米国特許第7, 001, 614号に記載されている。たとえば、2.0 mM ~ 10 mMのモル比範囲で存在するDOTAPと少なくとも1つのコレステロールおよび/またはコレステロール誘導体とを含むリポソームが有効な送達系をもたらす、たとえば、DOTAP対コレステロールのモル比は1:1 ~ 3:1である。カチオン性脂質N-[ (2, 3-ジオレオイルオキシ) プロピル ] - L - リシンアミド (LADOP) を、LINEポリヌクレオチドを送達するための組成物中で使用することができる。LADOP含有リポソームは、たとえば米国特許第7, 067, 697号に記載されている。形質移入を促進することができる極性の頭部基および脂肪族構成要素を有する両親媒性脂質を含むリポソーム製剤物が使用に適しており、たとえば米国特許第6, 433, 017号に記載されている。

#### 【0065】

使用に適したさらなる非ウイルス送達には、Woffending他、(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA、91: 11581~11585に記載の手法などの機械的送達系が含まれる。さらに、コード配列およびその発現産物は、光重合ヒドロゲル材料の沈着によって送達することができる。コード配列の送達に使用することができる遺伝子送達の他の慣用方法には、たとえば、米国特許第5, 149, 655号に記載の手持ち遺伝子移入粒子銃の使用；米国特許第5, 206, 152号およびPCT WO92/11033号に記載の、移入した遺伝子を活性化するための電離放射線の使用が含まれる。

#### 【0066】

##### 組成物

本発明は、対象LINE核酸を含む組成物を提供する。対象LINE核酸を含む組成物には、以下のうちの1つまたは複数が含まれることができる：塩、たとえば、NaCl、MgCl、KCl、MgSO<sub>4</sub>など；緩衝剤、たとえば、トリス緩衝液、N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(2-エタンスルホン酸)(HEPES)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸ナトリウム塩(MES)、3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸(MOPS)、N-トリス[ヒドロキシメチル]メチル-3-アミノプロパンスルホン酸(TAPS)など；可溶化剤；洗剤、たとえば、Tween-20などの非イオン性洗剤；ヌクレアーゼ阻害剤等。一部の実施形態では、以下にさらに詳述するように、対象LINE核酸組成物は免疫原性組成物である。

#### 【0067】

##### 医薬組成物

本発明は、対象LINE核酸と製薬上許容される賦形剤とを含む医薬組成物を提供する

。様々な製薬上許容される賦形剤が当分野で知られており、本明細書中で詳述する必要はない。製薬上許容される賦形剤は、たとえば、A. Gennaro (2000) 「レミントン：製薬の科学および実施 (Remington: The Science and Practice of Pharmacy)」、第20版、Lippincott, Williams, & Wilkins; 製薬財形および薬物送達系 (Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems) (1999) H. C. Ansel 他編、第7版、Lippincott, Williams, & Wilkins; および製薬賦形剤の手引き (Handbook of Pharmaceutical Excipients) (2000) A. H. Kibbe 他編、第3版、Amer. Pharmaceutical Assoc. を含めた様々な出版物中に十分に記載されている。

10

ビヒクル、アジュバント、担体または希釈剤などの製薬上許容される賦形剤は、容易に公的に入手可能である。さらに、pH調節剤および緩衝剤、等張性調節剤、安定化剤、湿潤剤などの製薬上許容される補助物質は、容易に公的に入手可能である。

#### 【0068】

適切な賦形剤ビヒクルは、たとえば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびその組合せである。さらに、所望する場合は、ビヒクルは、湿潤剤もしくは乳化剤またはpH緩衝剤などの少量の補助物質を含有し得る。

#### 免疫原性組成物

本発明は、対象LINEポリヌクレオチドを含む免疫原性組成物を提供する。それを必要としている個体に投与した場合、対象LINEポリヌクレオチドは、細胞、たとえば抗原提示細胞によって取り込まれ、コードされるLINEポリペプチドが細胞内で産生され、LINEポリペプチドはポリペプチド断片(「エピトープ断片」)へとプロセッシングされ、その後、これらはMHC分子と会合している細胞の表面上に提示される。コードされるLINEポリペプチドは、細胞表面上に提示されているエピトープ(複数可)に対するT細胞応答を刺激または増強する。LINEエピトープがレトロウイルスに感染した細胞上にも存在する場合は、レトロウイルスに感染した細胞に対するT細胞応答も起こる。

20

対象LINE核酸を含む対象免疫原性組成物には、対象LINE核酸に加えて、対象LINEポリペプチドを含む免疫原性組成物について上述した1つまたは複数の追加の構成要素が含まれる。

30

#### 【0069】

#### アジュバント

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物は対象LINEポリヌクレオチドとアジュバントとを含む。適切なアジュバントには、ヒトでの使用に適したものが含まれる。ヒトで使用することができる既知の適切なアジュバントの例には、必ずしもそれだけには限定されないが、ミョウバン、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、MF59(4.3% w/vのスクワレン、0.5% w/vのポリソルベート80(Tween 80)、0.5% w/vのトリオレイン酸ソルビタン(Span 85))、CpG含有核酸(シトシンはメチル化されていない)、QS21(サポニンアジュバント)、MPL(モノホスホリル脂質A)、3DMP(3-O-脱アシル化MPL)、Aquillia、ISCOMからの抽出物(たとえば、Sjolander他(1998) J. Leukocyte Biol.、64:713参照)、LT/CT突然変異体、ポリ(D, L-ラクチド-コ-グリコリド)(PLG)微粒子、Quil A、インターロイキンなどが含まれる。それだけには限定されないが動物実験を含めた獣医学的用途では、フロイント、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-アセチル-ノル-ムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(CGP11637、ノル-MDPと呼ぶ)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジパルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミン(CGP19835A、MTP-PEと呼ぶ)、ならびに2%のスクワレン/Tween 80の乳濁液中の、細菌から抽出した3つの構成要素、モノホスホリル

40

50

脂質 A、トレハロースジミコレートおよび細胞壁骨格 (MPL + TDM + CWS) を含有する RIBI を使用することができる。

【0070】

組成物の有効性を増強するためのさらなる例示的なアジュバントには、それだけには限定されないが：(1) 水中油乳濁液製剤物 (ムラミルペプチド (以下参照) または細菌細胞壁構成要素などの他の特異的免疫刺激剤を含むまたは含まない)、たとえば、(a) 微小流動化装を用いてサブミクロンの粒子へと製剤した 5% のスクワレン、0.5% の Tween 80 (モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン)、および 0.5% の Span 85 (トリオレイン酸ソルビタン) (ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミンと共有結合したムラミルトリペプチド (MTP-PE) を任意選択で含有) を含有する、MF59 (商標) (WO90/14837 号; 第 10 章、ワクチン設計: サブユニットおよびアジュバント手法 (Vaccine design: the subunit and adjuvant approach)、Powell および Newman 編、Plenum Press、1995)、(b) サブミクロンの乳濁液へと微小流動化した、または渦攪拌してより大きな粒子径の乳濁液を作製した、10% のスクアラン、0.4% の Tween 80、5% のプルロニックブロックポリマー L121、および thr-MDP を含有する SAF、(c) 2% のスクワレン、0.2% の Tween 80、ならびにモノホスホリ脂質 A (MPL)、トレハロースジミコレート (TDM)、および細胞壁骨格 (CWS) などの 1 つまたは複数の細菌細胞壁構成要素、たとえば、MPL + CWS (DETTOX (商標)) を含有する RIBI (商標) アジュバント系 (RAS)、(Ribi Immunochem、モンタナ州 Hamilton); (2) QS21 または STIMULON (商標) (Cambridge Bioscience、マサチューセッツ州 Worcester) などのサポニンアジュバント、または追加の洗剤を欠く ISCOM (免疫刺激複合体) などのそれから作製した粒子を使用し得る、たとえば WO00/07621 号; (3) 完全フロイントアジュバント (CFA) および不完全フロイントアジュバント (IFA); (4) サイトカイン、たとえば、インターロイキン (たとえば、IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12 (WO99/44636 号) など)、インターフェロン (たとえば インターフェロン)、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF)、腫瘍壊死因子 (TNF)、他の TNF スーパーファミリー分子 (たとえば、CH40L、OX40L など) 等; (5) モノホスホリル脂質 A (MPL) または 3-O-脱アシル化 MPL (3dMPL)、たとえば、GB-2220221 号、EP-A-0689454 号、肺炎球菌の糖類と共に使用した場合は、任意選択でミョウバンが実質的に存在しない、たとえば WO00/56358 号; (6) 3dMPL と、たとえば QS21 および / または水中油乳濁液との組合せ、たとえば、EP-A-0835318 号、EP-A-0735898 号、EP-A-0761231 号; (7) CpG モチーフを含むオリゴヌクレオチド [Krieg、Vaccine、2000、19、618~622; Krieg、Curr Opin Mol Ther、2001、3:15~24; Roman 他、Nat. Med.、1997、3、849~854; Weiner 他、PNAS USA、1997、94、10833~10837; Davis 他、J. Immunol、1998、160、870~876; Chu 他、J. Exp. Med、1997、186、1623~1631; Lipford 他、Eur. J. Immunol.、1997、27、2340~2344; Moldoveanu 他、Vaccine、1988、16、1216~1224、Krieg 他、Nature、1995、374、546~549; Klinman 他、PNAS USA、1996、93、2879~2883; Ballas 他、J. Immunol、1996、157、1840~1845; Cowdery 他、J. Immunol、1996、156、4570~4575; Halpern 他、Cell Immunol、1996、167、72~78; Yamamoto 他、Jpn. J. Cancer Res.、1988、79、866~873; Stacey 他、J. Immunol.、1996、157、2116~2122; Messina 他、J. Immunol、1991、147、1759~1

10

20

30

40

50

764; Yi他、J. Immunol、1996、157、4918~4925; Yi他、J. Immunol、1996、157、5394~5402; Yi他、J. Immunol、1998、160、4755~4761; およびYi他、J. Immunol、1998、160、5898~5906; 国際特許出願WO96/02555号、WO98/16247号、WO98/18810号、WO98/40100号、WO98/55495号、WO98/37919号およびWO98/52581号]、すなわち、シトシンがメチル化されていない少なくとも1つのCGジヌクレオチドを含有する; (8) ポリオキシエチレンエーテルまたはポリオキシエチレンエステル、たとえばWO99/52549号、(9) オクトキシノールと組み合わせたポリオキシエチレンソルビタンエステル界面活性剤(WO01/21207号)またはオクトキシノールなどの少なくとも1つの追加の非イオン性界面活性剤と組み合わせたポリオキシエチレンアルキルエーテルもしくはエステル界面活性剤(WO01/21152号); (10) サポニンおよび免疫賦活オリゴヌクレオチド(たとえばCpGオリゴヌクレオチド)(WO00/62800号); (11) 免疫賦活剤および金属塩粒子、たとえばWO00/23105号; (12) サポニンおよび水中油乳濁液、たとえばWO99/11241号; (13) サポニン(たとえばQS21)+3dMPL+IM2(任意選択で+ステロール)、たとえばWO98/57659号; (14) 免疫刺激剤として作用して組成物の有効性を増強する他の物質が含まれる。ムラミルペプチドには、N-アセチル-ムラミル-L-スレオニル-D-イソグルタミン(thr-MDP)、N-25アセチル-ノルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミン(ノル-MDP)、N-アセチルムラミル-L-アラニル-D-イソグルタミニル-L-アラニン-2-(1'-2'-ジバルミトイル-sn-グリセロ-3-ヒドロキシホスホリルオキシ)-エチルアミンMTP-PE)などが含まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0071】

対象免疫原性組成物には、慣用の製薬上許容される賦形剤、たとえば、製薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、マグネシウム、カルボネートなどが含まれることができる。対象免疫原性組成物には、pH調節剤および緩衝剤、毒性調節剤などの、生理的条件下に近似させるために必要な1つまたは複数の製薬上許容される補助物質、たとえば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどが含まれることができる。これらの製剤物中の対象LINE核酸の濃度は広く変動する場合があります、流体体積、粘度、体重などの様々な要素に基づいて、選択した特定の投与様式および患者の要求に従って選択することができる。生じる組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸薬、カプセル、散剤、ゲル、クリーム、ローション、軟膏、エアロゾルなどの形態であり得る。

医薬製剤中の対象LINEポリヌクレオチドの濃度は広く変動する場合があります、たとえば、約0.1重量%未満、約0.1重量%~約2重量%、約2重量%~20重量%、もしくは約20重量%~約50重量%、またはそれより多く、流体体積、粘度などの様々な要素に基づいて、選択した特定の投与様式に従って選択される。

#### 【0072】

一部の実施形態では、対象LINEポリヌクレオチドは、1つまたは複数の脂質を用いて製剤する。たとえば、様々な大きさのリポソームを作製することができる。形成された小リポソームまたは小胞は単層であり、約20~400ナノメートルの範囲の大きさであり、多層小胞を超音波に供することによって、定義された大きさの孔を有する膜を通して圧力下で押し出すことによって、または高圧ホモジェネーションによって生成することができる。直径が約0.1~1μmの範囲の大きさのより大きな単層リポソームは、脂質を有機溶媒または洗剤に溶かし、溶かした薬剤をそれぞれ蒸発または透析によって除去した場合に得ることができる。特定の脂質または厳密な脱水-水和条件を必要とする方法による、より小さな単層リポソームの融合により、細胞と同等またはそれよりも大きい単層胞を得ることができる。

リポソームは、1つまたは複数のカチオン性脂質、たとえば、DDAB、ジメチルジオ

クタデシルアンモニウムブロマイド；N - [ 1 - ( 2 , 3 - ジオロイロキシ ) プロピル ]  
 - N , N , N - トリメチルアンモニウムメチルスルフェート；1 , 2 - ジアシル - 3 - ト  
 リメチルアンモニウム - プロパン ( それだけには限定されないが、ジオレオイル ( D O T  
 A P )、ジミリストイル、ジパルミトイル、ジセアロイルを含む )；1 , 2 - ジアシル -  
 3 - ジメチルアンモニウム - プロパン ( それだけには限定されないが、ジオレオイル、ジ  
 ミリストイル、ジパルミトイル、ジセアロイルを含む ) D O T M A、N - [ 1 - [ 2 , 3  
 - ビス ( オレオイルオキシ ) ] プロピル ] - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロラ  
 イド；D O G S、ジオクタデシルアミドグリシルスペルミン；D C - コレステロール、3  
 - [ N - ( N ' , N ' - ジメチルアミノエタン ) カルバモイル ] コレステロール；D O  
 S P A、2 , 3 - ジオレオイルオキシ - N - ( 2 ( スペルミンカルボキサミド ) - エチル  
 ) - N , N - ジメチル - 1 - プロパンアミニウムトリフルオロアセテート；1 , 2 - ジア  
 シル - s n - グリセロ - 3 - エチルホスホコリン ( それだけには限定されないが、ジオレ  
 オイル ( D O E P C )、ジラウロイル、ジミリストイル、ジパルミトイル、ジステアロイ  
 ル、パルミトイル - オレオイルを含む )、 - アラニルコレステロール；C T A B、セチ  
 ルトリメチルアンモニウムブロマイド；ジ C 1 4 - アミジン、N - t - ブチル - N ' - テ  
 トラデシル - 3 - テトラデシルアミノプロピオンアミジン；1 4 D e a 2、O , O ' - ジ  
 テトラデカノールイル - N - ( トリメチルアンモニオアセチル ) ジエタノールアミンクロ  
 ライド；D O S P E R、1 , 3 - ジオレオイルオキシ - 2 - ( 6 - カルボキシ - スペルミ  
 ル ) - プロピルアミド；N , N , N ' , N ' - テトラメチル - N , N ' - ビス ( 2 - ヒド  
 ロキシエチル ) - 2 , 3 - ジオレオイルオキシ - 1 , 4 - ブタンジアンモニウムヨウ化  
 物；1 - [ 2 - アシルオキシ ) エチル ] 2 - アルキル ( アルケニル ) - 3 - ( 2 - ヒドロ  
 キシエチル ) イミダゾリニウムクロライド誘導体、たとえば、1 - [ 2 - ( 9 ( Z ) - オ  
 クタデセノイルオキシ ) エチル ] - 2 - ( 8 ( Z ) - ヘプタデセニル - 3 - ( 2 - ヒドロ  
 キシエチル ) イミダゾリニウムクロライド ( D O T I M )、1 - [ 2 - ( ヘキサデカノイ  
 ルオキシ ) エチル ] - 2 - ペンタデシル - 3 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) イミダゾリニウ  
 ムクロライド ( D P T I M )；1 - [ 2 - テトラデカノイルオキシ ) エチル ] - 2 - トリ  
 デシル - 3 - ( 2 - ヒドロキシエチル ) イミダゾリニウムクロライド ( D M T I M ) - S o  
 l o d i n 他 ( 1 9 9 5 ) B i o c h e m .、4 3 : 1 3 5 3 7 ~ 1 3 5 4 4 に記載；第  
 四級アミン上のヒドロキシルアルキル部分を含有する 2 , 3 - ジアルキルオキシプロピル第  
 四級アンモニウム化合物誘導体、たとえば、1 , 2 - ジオレオイル - 3 - ジメチル - ヒド  
 ロキシエチルアンモニウムブロマイド ( D O R I )；1 , 2 - ジオレイルオキシプロピル  
 - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド ( D O R I E )；1 , 2 - ジ  
 オレイルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシプロピルアンモニウムブロマイド ( D O R I E - H P )；1 , 2 - ジオレイルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシブ  
 チルアンモニウムブロマイド ( D O R I E - H B )；1 , 2 - ジオレイルオキシプロピル  
 - 3 - ジメチル - ヒドロキシペンチルアンモニウムブロマイド ( D O R I E - H P e )；  
 1 , 2 - ジミリスチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウム  
 ブロマイド ( D M R I E )；1 , 2 - ジパルミチルオキシプロピル - 3 - ジメチル - ヒド  
 ロキシエチルアンモニウムブロマイド ( D P R I E )、1 , 2 - ジステリルオキシプロピ  
 ル - 3 - ジメチル - ヒドロキシエチルアンモニウムブロマイド ( D S R I E ) - た  
 とえば、F e l g n e r 他 ( 1 9 9 4 ) J . B i o l . C h e m .、2 6 9 : 2 5 5 0 ~ 2 5 6  
 1 に記載を含むことができる。上述の脂質の多くは、たとえば、A v a n t i P o l a  
 r L i p i d s , I n c . ; S i g m a C h e m i c a l C o . ; M o l e c u l a r P r o b e s , I n c . ; N o r t h e r m L i p i d s , I n c . ; R o c h e M o l e c u l a r B i o c h e m i c a l s ; および P r o m e g a C o r p . から市販されている。

10

20

30

40

### 【 0 0 7 3 】

リポソームは、カチオン性脂質を、単独で、または他の脂質、特に、コレステロール；  
 1 , 2 - ジアシル - s n - グリセロ - 3 - ホスホエタノールアミン ( それだけには限定され  
 ないが、ジオレオイル ( D O P E )、1 , 2 - ジアシル - s n - グリセロ - 3 - ホスホ

50

コリン；天然卵黄ホスファチジルコリン（PC）など；合成モノおよびジアシルホスホコリン（たとえばモノアシルホスファチジルコリン（MOPC）を含む）ならびにホスホエタノールアミンなどの中性脂肪との混合物で含み得る。上記ジアシル誘導体の合成および天然の不斉脂肪酸ならびに混合製剤物も含まれ得る。

他の適切なリポソーム組成物には、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）およびコレステロールが含まれる。そのようなリポソームは、たとえば米国特許第5,916,588号に記載されている。さらなる適切なリポソーム組成物、およびその調製方法は当分野で知られており、たとえば、米国特許第4,241,046号および第6,355,267号を含めた様々な出版物に記載されている。

#### 【0074】

##### 治療方法

対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を利用する、様々な治療方法が本開示によって企図される。対象治療方法には、個体においてLINEポリペプチドに対する免疫応答を誘導する方法、たとえば、レトロウイルス感染症（たとえばレンチウイルス感染症）を治療するため、癌を治療するためなどの、LINEポリペプチドに対する対象の免疫応答を増強する方法；ならびに、たとえば、自己免疫障害を治療するため、統合失調症を治療するためなどの、LINEポリペプチドに対する対象の免疫応答を減少させる方法が含まれる。

##### レトロウイルスに感染した細胞に対する免疫応答を誘導または増強する方法

本開示は、それを必要としている個体において、レトロウイルスに感染した細胞、たとえばHTLVに感染した細胞に対するT細胞免疫応答を誘導、誘発、または増強する方法を提供する。この方法は、一般に、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量（たとえば対象LINE免疫原性組成物）を個体に投与することを含む。

#### 【0075】

したがって、たとえば、本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINEポリペプチド（たとえば、対象の単離LINEポリペプチド、対象の合成LINEポリペプチド）、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物（たとえば、対象LINE医薬組成物、対象LINE免疫原性組成物）を投与することを含む、個体においてレトロウイルス感染症を治療する方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINE免疫原性組成物、たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物を投与することを含む、個体においてレトロウイルス感染症を治療する方法を提供する。本発明は、個体においてレトロウイルス感染症を治療するための医薬品の調製における、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の使用を提供する。本発明は、個体においてレトロウイルス感染症を治療するための医薬品の調製における、対象LINE免疫原性組成物（たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）の使用を提供する。本発明は、個体においてレトロウイルス感染症を治療するための、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を提供する。本発明は、個体においてレトロウイルス感染症を治療するための、対象LINE免疫原性組成物（たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）を提供する。

#### 【0076】

したがって、たとえば、本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINEポリペプチド（たとえば、対象の単離LINEポリペプチド、対象の合成LINEポリペプチド）、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物（たとえば、対象LINE医薬組成物、対象LINE免疫原性組成物）を投与することを含む、個体においてHTLV感染症を治療する方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINE免疫原性組成物、たとえ

10

20

30

40

50

ば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物を投与することを含む、個体においてHTLV感染症を治療する方法を提供する。本発明は、個体においてHTLV感染症を治療するための医薬品の調製における、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の使用を提供する。本発明は、個体においてHTLV感染症を治療するための医薬品の調製における、対象LINE免疫原性組成物（たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）の使用を提供する。本発明は、個体においてHTLV感染症を治療するための、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を提供する。本発明は、個体においてHTLV感染症を治療するための、対象LINE免疫原性組成物（たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）を提供する。

10

## 【0077】

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体におけるレトロウイルス量（たとえばHTLV量）を、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を用いた治療前の個体におけるウイルス量と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、または少なくとも約90%減少させる量である。

一部の実施形態では、レトロウイルスに感染した細胞に対するT細胞免疫応答を誘導、誘発、または増強する対象方法は、それを必要としている個体に、有効量の対象免疫原性組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体におけるレトロウイルス量を、免疫原性組成物を用いた治療前の個体におけるウイルス量と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、または少なくとも約90%減少させる量である。一部の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリペプチドを含む。他の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリヌクレオチドを含む。

20

## 【0078】

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、レトロウイルスに感染した細胞上に存在するレトロウイルスエピトープに特異的なT細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を用いた治療前の個体におけるレトロウイルスエピトープに特異的なT細胞の数と比較して、レトロウイルスに感染した細胞上に存在するレトロウイルスエピトープに特異的なT細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。

30

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、レトロウイルスに感染した細胞上に存在するレトロウイルスエピトープに特異的なT細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、免疫原性組成物を用いた治療前の個体におけるレトロウイルスエピトープに特異的なT細胞の数と比較して、レトロウイルスに感染した細胞上に存在するレトロウイルスエピトープに特異的なT細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。一部の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリペプチドを含む。他の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリヌクレオチ

40

50

ドを含む。

【0079】

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、レトロウイルスに感染した細胞上に存在するレトロウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を用いた治療前の個体におけるレトロウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数と比較して、レトロウイルスに感染した細胞上に存在するレトロウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。

10

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、レトロウイルスに感染した細胞上に存在するレトロウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、免疫原性組成物を用いた治療前の個体におけるレトロウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数と比較して、レトロウイルスに感染した細胞上に存在するレトロウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。一部の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリペプチドを含む。他の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリヌクレオチドを含む。

20

【0080】

一部の実施形態では、たとえば、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物をナイーブ個体（すなわちHTLVなどのレトロウイルスに感染していない個体）に投与する場合、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体が後にHTLVなどのレトロウイルスに感染した場合に、レトロウイルス感染症の疾患の症状が発生する可能性を減少させる量である。一部の実施形態では、たとえば、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物をナイーブ個体（すなわちレトロウイルスに感染していない個体）に投与する場合、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体が後にHIVなどのレトロウイルスに感染した場合に、レトロウイルス感染症が制限および/または排除される可能性を増加する量である。

30

一部の実施形態では、たとえば、対象免疫原性組成物をナイーブ個体（すなわちHTLVなどのレトロウイルスに感染していない個体）に投与する場合、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体が後にHTLVなどのレトロウイルスに感染した場合に、レトロウイルス感染症の疾患の症状が発生する可能性を減少させる量である。一部の実施形態では、たとえば、免疫原性組成物をナイーブ個体（すなわちレトロウイルスに感染していない個体）に投与する場合、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体が後にHIVなどのレトロウイルスに感染した場合に、レトロウイルス感染症が制限および/または排除される可能性を増加する量である。

40

【0081】

レンチウイルスに感染した細胞に対する免疫応答を誘導または増強する方法

本発明は、それを必要としている個体において、レンチウイルスに感染した細胞、たと

50

えばH I Vに感染した細胞に対するT細胞免疫応答を誘導、誘発、または増強する方法を提供する。この方法は、一般に、対象L I N Eポリペプチド、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物の有効量を個体に投与することを含む。

本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象L I N Eポリペプチド（たとえば、対象の単離L I N Eポリペプチド、対象の合成L I N Eポリペプチド）、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物（たとえば、対象L I N E医薬組成物、対象L I N E免疫原性組成物）を投与することを含む、個体においてレンチウイルス感染症（たとえばH I V感染症）を治療する方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象L I N E免疫原性組成物、たとえば、対象L I N Eポリペプチドまたは対象L I N Eポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物を投与することを含む、個体においてレンチウイルス感染症を治療する方法を提供する。本発明は、個体においてレンチウイルス感染症を治療するための医薬品の調製における、対象L I N Eポリペプチド、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物の使用を提供する。本発明は、個体においてレンチウイルス感染症を治療するための医薬品の調製における、対象L I N E免疫原性組成物（たとえば、対象L I N Eポリペプチドまたは対象L I N Eポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）の使用を提供する。本発明は、個体においてレンチウイルス感染症を治療するための、対象L I N Eポリペプチド、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物を提供する。本発明は、個体においてレンチウイルス感染症を治療するための、対象L I N E免疫原性組成物（たとえば、対象L I N Eポリペプチドまたは対象L I N Eポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）を提供する。

10

20

#### 【0082】

本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象L I N Eポリペプチド（たとえば、対象の単離L I N Eポリペプチド、対象の合成L I N Eポリペプチド）、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物（たとえば、対象L I N E医薬組成物、対象L I N E免疫原性組成物）を投与することを含む、個体においてH I V感染症を治療する方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象L I N E免疫原性組成物、たとえば、対象L I N Eポリペプチドまたは対象L I N Eポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物を投与することを含む、個体においてH I V感染症を治療する方法を提供する。本発明は、個体においてH I V感染症を治療するための医薬品の調製における、対象L I N Eポリペプチド、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物の使用を提供する。本発明は、個体においてH I V感染症を治療するための医薬品の調製における、対象L I N E免疫原性組成物（たとえば、対象L I N Eポリペプチドまたは対象L I N Eポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）の使用を提供する。本発明は、個体においてH I V感染症を治療するための、対象L I N Eポリペプチド、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物を提供する。本発明は、個体においてH I V感染症を治療するための、対象L I N E免疫原性組成物（たとえば、対象L I N Eポリペプチドまたは対象L I N Eポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）を提供する。

30

#### 【0083】

一部の実施形態では、対象L I N Eポリペプチド、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体におけるウイルス量（たとえばH I Vウイルス量）を、対象L I N Eポリペプチド、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物を用いた治療前の個体におけるウイルス量と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、または少なくとも約90%減少させる量である。

40

一部の実施形態では、個体においてレンチウイルスに感染した細胞に対するT細胞免疫応答を誘導、誘発、または増強する対象方法は、個体に有効量の対象免疫原性組成物を投与することを含む。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回ま

50

たは複数回個体に投与した場合に、個体におけるウイルス量を、免疫原性組成物を用いた治療前の個体におけるウイルス量と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約85%、または少なくとも約90%減少させる量である。一部の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリペプチドを含む。他の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリヌクレオチドを含む。

【0084】

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体においてCD4<sup>+</sup>Tリンパ球のレベルおよび機能（複数可）の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を用いた治療前の個体におけるCD4<sup>+</sup>Tリンパ球のレベルと比較して、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、正常範囲内にあるいくつかのCD4<sup>+</sup>Tリンパ球をもたらす量であり、ヒトの正常範囲は、約600～約1500個のCD4<sup>+</sup>Tリンパ球/血液1mm<sup>3</sup>である。

10

20

【0085】

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体においてCD4<sup>+</sup>Tリンパ球のレベルおよび機能（複数可）の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、免疫原性組成物を用いた治療前の個体におけるCD4<sup>+</sup>Tリンパ球のレベルと比較して、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、正常範囲内にあるいくつかのCD4<sup>+</sup>Tリンパ球をもたらす量であり、ヒトの正常範囲は、約600～約1500個のCD4<sup>+</sup>Tリンパ球/血液1mm<sup>3</sup>である。一部の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリペプチドを含む。他の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリヌクレオチドを含む。

30

【0086】

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、レンチウイルスに感染した細胞（たとえばHIVに感染した細胞）上に存在するレンチウイルスエピトープ（たとえばHIVエピトープ）に特異的なT細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を用いた治療前の個体におけるレンチウイルスエピトープに特異的なT細胞の数と比較して、レンチウイルスに感染した細胞（たとえばHIVに感染した細胞）上に存在するレンチウイルスエピトープ（たとえばHIVエピトープ）に特異的なT細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。

40

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、レンチウイルスに感染した細胞上に存在するレンチウイルスエピトープに特異的なT細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象免疫原性組

50

成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、免疫原性組成物を用いた治療前の個体におけるレンチウイルスエピトープに特異的なT細胞の数と比較して、レンチウイルスに感染した細胞上に存在するレンチウイルスエピトープに特異的なT細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。一部の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリペプチドを含む。他の実施形態では、免疫原性組成物は対象LINEポリヌクレオチドを含む。

#### 【0087】

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、レンチウイルスに感染した細胞上に存在するレンチウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を用いた治療前の個体におけるレンチウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数と比較して、レンチウイルスに感染した細胞上に存在するレンチウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、レンチウイルスに感染した細胞上に存在するレンチウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、免疫原性組成物を用いた治療前の個体におけるレンチウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数と比較して、レンチウイルスに感染した細胞上に存在するレンチウイルスエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。

#### 【0088】

一部の実施形態では、たとえば、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物をナイーブ個体（すなわちHIVなどのレンチウイルスに感染していない個体）に投与する場合、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体が後にHIVなどのレンチウイルスに曝されるまたは感染した場合に、レンチウイルス感染症の疾患の症状が発生する可能性を減少させる量である。一部の実施形態では、たとえば、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物をナイーブ個体（すなわちHIVなどのレンチウイルスに感染していない個体）に投与する場合、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体が後にHIVなどのレンチウイルスに感染した場合に、レンチウイルス感染症が制限および/または排除される可能性を増加させる量である。

一部の実施形態では、たとえば、免疫原性組成物をナイーブ個体（すなわちHIVなどのレンチウイルスに感染していない個体）に投与する場合、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体が後にHIVなどのレンチウイルスに曝されるまたは感染した場合に、レンチウイルス感染症の疾患の症状が発生する可能性を減少させる量である。一部の実施形態では、たとえば、免疫原性組成物をナイーブ個体（すなわちHIVなどのレンチウイルスに感染していない個体）に投与する場合、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、個体が後

10

20

30

40

50

にH I Vなどのレンチウイルスに感染した場合に、レンチウイルス感染症が制限および/または排除される可能性を増加させる量である。

【0089】

組合せ療法

対象L I N Eポリペプチド、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物は、レンチウイルス感染症を治療するため、またはレンチウイルス感染症に付随し得る障害（たとえば、細菌感染症、真菌感染症など）を治療するための1つまたは複数の治療剤と併せて投与することができる。治療剤の - ラクタム抗生物質、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン、グラミシジン、バシトラシン、スルホンアミド、ニトロフラゾン、ナリジクス酸、コルチゾン、ヒドロコルチゾン、ベータメタゾン、デキサメタゾン、フルオコルトロン、プレドニゾロン、トリアムシノロン、インドメタシン、スリンダク、アシクロビル、アマンタジン、リマンタジン、組換え可溶性C D 4 ( r s C D 4 )、抗受容体抗体（たとえばライノウイルス用）、ネビラピン、シドホビル ( V i s t i d e ( 商 標 ) )、ホスホノギ酸三ナトリウム ( F o s c a r n e t ( 商 標 ) )、ファムシクロビル、ペンシクロビル、バラシクロビル、核酸/複製阻害剤、インターフェロン、ジドブジン ( A Z T、R e t r o v i r ( 商 標 ) )、ジダノシン (ジデオキシイノシン、d d I、V i d e x ( 商 標 ) )、スタブジン ( d 4 T、Z e r i t ( 商 標 ) )、ザルシタピン (ジデオキシシトシン、d d C、H i v i d ( 商 標 ) )、ネビラピン ( V i r a m u n e ( 商 標 ) )、ラミブジン ( E p i v i r ( 商 標 )、3 T C )、プロテアーゼ阻害剤、サキナビル ( I n v i r a s e ( 商 標 )、F o r t o v a s e ( 商 標 ) )、リトナビル ( N o r v i r ( 商 標 ) )、ネルフィナビル ( V i r a c e p t ( 商 標 ) )、エファビレンツ ( S u s t i v a ( 商 標 ) )、アバカビル ( Z i a g e n ( 商 標 ) )、アンブレナビル ( A g e n e r a s e ( 商 標 ) )、インジナビル ( C r i x i v a n ( 商 標 ) )、ガンシクロビル、A z D U、デラビルジン ( R e s c r i p t o r ( 商 標 ) )、カレトラ、トリジビル、リファンピン、クラチロマイシン、エリスロポエチン、コロニー刺激因子 ( G - C S F および G M - C S F )、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤、アドリアマイシン、フルオロウラシル、メトトレキサート、アスパラギナーゼならびにその組合せ。

10

20

【0090】

対象L I N Eポリペプチド、対象L I N Eポリヌクレオチド、または対象L I N E組成物と組み合わせて投与することができるH I V感染症を治療するための薬剤には、たとえば、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（たとえば、エファビレンツ、ネビラピン、デラビルジン、エトラビルン）、ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤（たとえば、ジドブジン、ジダノシン、ザルシタピン、スタブジン、ラミブジン、アバカビル、エムトリシタピン）、ヌクレオチド類似体逆転写酵素阻害剤（テノホビル、アデフォビル）、H I Vプロテアーゼの阻害剤（サキナビル、リトナビル、インジナビル、ネルフィナビル、アンブレナビル、ロピナビル、ホスアンブレナビル、チプラナビル、ダルナビル）、H I Vインテグラーゼの阻害剤（たとえば、ラルテグラビル、エルビテグラビル）、H I Vの侵入または融合の阻害剤（たとえば、マラビロク、エンフビルチド）、および成熟阻害剤（たとえば、ビベリマツト、ビベコン ( v i v e c o n ) ) が含まれる。

30

40

【0091】

癌を治療する方法

本発明は、さらに、個体において癌を治療する方法を提供し、癌状態は、L I N Eポリペプチドの異常な発現またはL I N Eポリペプチドの発現の増加に関連し、たとえば、癌は、L I N Eポリペプチドの異常な発現を示す（たとえば、L I N Eポリペプチドを、同じ細胞種の非癌性（正常）細胞によって発現されるL I N Eポリペプチドのレベルよりも、少なくとも約15%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍、または10倍より高いレベルで発現する）癌細胞または前癌細胞を含む。そのような癌には、それだけには限定されないが、黒色腫、卵巣癌、乳癌、

50

および精巣癌（奇形腫、精上皮腫、および胚性癌腫またはこれらの種類のうちの1つもしくは複数からなる混合腫瘍を含む）が含まれる。この方法は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINEポリペプチド（たとえば、対象の単離LINEポリペプチド、対象の合成LINEポリペプチド）、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物（たとえば、対象LINE医薬組成物、対象LINE免疫原性組成物）を投与することを含む。一部の実施形態では、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINE免疫原性組成物（たとえば、1つもしくは複数の対象LINEポリペプチドまたは1つもしくは複数の対象LINEポリヌクレオチドを含む対象LINE免疫原性組成物）を投与することを含む。

#### 【0092】

本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINEポリペプチド（たとえば、対象の単離LINEポリペプチド、対象の合成LINEポリペプチド）、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物（たとえば、対象LINE医薬組成物、対象LINE免疫原性組成物）を投与することを含む、個体において、癌（たとえば、黒色腫、卵巣癌、乳癌、および精巣癌（奇形腫、精上皮腫、および胚性癌腫またはこれらの種類のうちの1つもしくは複数からなる混合腫瘍を含む）を治療する方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINE免疫原性組成物、たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物を投与することを含む、個体において癌を治療する方法を提供する。本発明は、個体において癌を治療するための医薬品の調製における、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の使用を提供する。本発明は、個体において癌を治療するための医薬品の調製における、対象LINE免疫原性組成物（たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）の使用を提供する。本発明は、個体において癌を治療するための、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を提供する。本発明は、個体において癌を治療するための対象LINE免疫原性組成物（たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）を提供する。

#### 【0093】

たとえば、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量を、腫瘍の細胞がLINEポリペプチド、たとえばLINE-1ポリペプチドを癌状態のマーカーとして発現する、腫瘍（たとえば固形腫瘍）を有する個体に投与する。

たとえば、1つまたは複数のLINEポリペプチドを含む有効量の対象免疫原性組成物を、腫瘍の細胞がLINEポリペプチド、たとえばLINE-1ポリペプチドを癌状態のマーカーとして発現する腫瘍（たとえば固形腫瘍）を有する個体に投与する。

別の例として、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量を、腫瘍が生じた組織が非癌状態でLINEポリペプチド（たとえばLINE-1ポリペプチド）を発現し、そのような組織が、癌状態のマーカーとしてLINEポリペプチドの発現の増加（たとえば、少なくとも約15%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍、または10倍より高い増加）を示す、腫瘍を有する対象に投与する。

別の例として、有効量の対象免疫原性組成物を、腫瘍が生じた組織が非癌状態でLINEポリペプチド（たとえばLINE-1ポリペプチド）を発現し、そのような組織が、LINEポリペプチドの発現の増加（たとえば、少なくとも約15%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約2倍、少なくとも約5倍、もしくは少なくとも約10倍、または10倍より高い増加）を癌状態のマーカーとして示す、腫瘍を有する対象に投与する。

対象免疫原性組成物を用いた治療を受け入れられる癌には、卵巣癌、乳癌、黒色腫、前

10

20

30

40

50

立腺癌、および精巣癌（精上皮腫、奇形腫、および胚性癌腫を含む）が含まれる。

【0094】

一部の実施形態では、癌治療のコンテキストでは、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、腫瘍の大きさ、癌細胞の数、および癌細胞の転移のうちの1つまたは複数を、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%、癌の完全根絶まで減少させる量である。

一部の実施形態では、癌治療のコンテキストでは、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、腫瘍の大きさ、癌細胞の数、および癌細胞の転移のうちの1つまたは複数を、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、または少なくとも約90%、癌の完全根絶まで減少させる量である。

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、癌細胞上に存在するエピトープに特異的なT細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を用いた治療前の個体における癌細胞エピトープに特異的なT細胞の数と比較して、癌細胞上に存在するエピトープに特異的なT細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。

【0095】

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、癌細胞上に存在するエピトープに特異的なT細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、免疫原性組成物を用いた治療前の個体における癌細胞エピトープに特異的なT細胞の数と比較して、癌細胞上に存在するエピトープに特異的なT細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、癌細胞上に存在するエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を用いた治療前の個体における癌細胞エピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数と比較して、癌細胞上に存在するエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。

【0096】

一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、癌細胞上に存在するエピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の増加をもたらす量である。一部の実施形態では、対象免疫原性組成物の「有効量」とは、1回または複数回個体に投与した場合に、免疫原性組成物を用いた治療前の個体における癌細胞エピトープに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数と比較して、癌細胞上に存在するエピトープに

特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数の、少なくとも約25%、少なくとも約50%、少なくとも約100%または2倍、少なくとも約5倍、少なくとも約10倍、もしくは少なくとも約100倍、あるいはそれより多くの増加をもたらす量である。

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物（たとえば対象LINE免疫原性組成物）は、それを必要としている個体に、標準の癌治療に対するアジュバント治療として投与する。標準の癌治療には、手術（たとえば癌組織の外科的除去）、放射線療法、骨髄移植、化学療法処置、生物学的応答調節物質治療、および前述のものの特定の組合せが含まれる。

放射線療法には、それだけには限定されないが、ビームなどの外部源、または小さな放射源の埋め込みのどちらかによって送達する、X線またはγ線が含まれる。

化学療法剤とは、癌細胞の増殖を減少させる非ペプチド（すなわち非タンパク質）化合物であり、細胞毒性剤および細胞分裂抑制剤が含まれる。化学療法剤の非限定的な例には、アルキル化剤、ニトロソ尿素、代謝拮抗剤、抗腫瘍抗生物質、植物（ビンカ）アルカロイド、およびステロイドホルモンが含まれる。

#### 【0097】

細胞増殖を減少させる薬剤は当分野で知られており、幅広く使用されている。そのような薬剤には、アルキル化剤、たとえば、ナイトロジェンマスタード、ニトロソ尿素、エチレンジアミン誘導体、スルホン酸アルキルが含まれ、それだけには限定されないが、メクロレタミン、シクロホスファミド（Cytoxan（商標））、メルファラン（L-サルコリシン）、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、セムスチン（メチル-CCNU）、ストレプトゾシン、クロロゾトシン、ウラシルマスタード、クロルメチン、イホスファミド、クロラムブシル、ピポブロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、プスルファン、ダカルバジン、およびテモゾロマイドを含めたトリアゼンが含まれる。

代謝拮抗剤には、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体、およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤が含まれ、それだけには限定されないが、シタラビン（CYTOSAR-U）、シトシンアラビノシド、フルオロウラシル（5-FU）、フロキシウリジン（Fluorouracil）、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン（6-MP）、ペントスタチン、5-フルオロウラシル（5-FU）、メトトレキサート、10-プロバルギル-5,8-ジデアザフォレート（PDDF、CB3717）、5,8-ジデアザテトラヒドロ葉酸（DDATHF）、ロイコボリン、リン酸フルダラビン、ペントスタチン、およびゲムシタピンが含まれる。

#### 【0098】

適切な天然物およびその誘導体（たとえば、ビンカアルカロイド、抗腫瘍抗生物質、酵素、リンホカイン、およびエピポドフィロトキシン）には、それだけには限定されないが、Ara-C、パクリタキセル（Taxol（登録商標））、ドセタキセル（Taxotere（登録商標））、デオキシコホルマイシン、マイトマイシン-C、L-アスパラギナーゼ、アザチオプリン；プレキナール；アルカロイド、たとえば、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ピノレルピン、ピンデシンなど；ポドフィロトキシン、たとえば、エトポシド、テニポシドなど；抗生物質、たとえば、アントラサイクリン、塩酸ダウノルビシン（ダウノマイシン、ルビドマイシン、セルビジン）、イダルビシン、ドキシソルビシン、エピルビシンおよびモルホリノ誘導体など；フェノキシゾンビスシクロペプチド、たとえばダクチノマイシン；塩基性糖ペプチド、たとえばブレオマイシン；アンスラキノングリコシド、たとえばプリカマイシン（ミトラマイシン）；アントラセネジオン、たとえばミトキサントロン；アジリノピロロインドールジオン、たとえばマイトマイシン；大環状免疫抑制剤、たとえば、シクロスポリン、FK-506（タクロリムス、プロGRAF）、ラパマイシンなど等が含まれる。

他の抗増殖性細胞毒性剤は、ナベルベン、CPT-11、アナストラゾール、レトラゾール、カペシタピン、レロキサフィン、シクロホスファミド、イフォスアミド、およびドロキサフィンである。

10

20

30

40

50

## 【0099】

抗増殖活性を有する、微小管に影響を与える薬剤も使用に適しており、それだけには限定されないが、アロコルヒチン（NSC406042）、ハリコンドリニンB（NSC609395）、コルヒチン（NSC757）、コルヒチン誘導体（たとえばNSC33410）、ドルスタチン10（NSC376128）、メイタンシン（NSC153858）、リゾキシシン（NSC332598）、パクリタキセル（Taxol（登録商標））、Taxol（登録商標）誘導体、ドセタキセル（Taxotere（登録商標））、チオコルヒチン（NSC361792）、トリチルシステリン、硫酸ピンラスチン、硫酸ピンクリスチン、それだけには限定されないが、エオプチロンA、エポチロンB、ディスコデルモリドを含めた天然および合成のエポチロン；エストラムスチン、ノコダゾールなどが含まれる。

10

使用に適したホルモンモジュレーターおよびステロイド（合成類似体を含む）には、それだけには限定されないが、副腎皮質ステロイド、たとえば、プレドニゾン、デキサメタゾンなど；エストロゲンおよびプレゲスチン、たとえば、カブロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、エストラジオール、クロミフェン、タモキシフェンなど；ならびに副腎皮質抑制剤、たとえばアミノグルテチミド；17 $\beta$ -エチニルエストラジオール；ジエチルスチルベストロール、テストステロン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、メチルプレドニゾン、メチル-テストステロン、プレドニゾン、トリアムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシプロゲステロン、アミノグルテチミド、エストラムスチン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ロイプロリド、フルタミド（Drogenil）、トレミフェン（Fareston）、およびZoladex（登録商標）が含まれる。エストロゲンは増殖および分化を刺激し、したがってエストロゲン受容体と結合する化合物を用いてこの活性を遮断する。コルチコステロイドはT細胞増殖を阻害し得る。

20

## 【0100】

他の化学療法剤には、金属錯体、たとえば、シスプラチン（cis-DDP）、カルボプラチンなど；尿素、たとえばヒドロキシ尿素；およびヒドラジンたとえばN-メチルヒドラジン；エピドフィロトキシシン；トポイソメラーゼ阻害剤；プロカルバジン；ミトキサントロン；ロイコボリン；テガフルなどが含まれる。他の目的の抗増殖剤には、免疫抑制剤、たとえば、ミコフェノール酸、サリドマイド、デスオキシスベルグアリン、アザスポリン、レフルノミド、ミゾリピン、アザスピラン（SKF105685）；Iressa（登録商標）（ZD1839、4-（3-クロロ-4-フルオロフェニルアミノ）-7-メトキシ-6-（3-（4-ホルホルニル）プロボキシ）キナゾリン）などが含まれる。

30

「タキサン」には、パクリタキセルおよび任意の活性タキサン誘導体またはプロドラッグが含まれる。「パクリタキセル」（本明細書中では、たとえば、ドセタキセル、TAXOL（商標）、TAXOTERE（商標）（ドセタキセルの製剤物）、パクリタキセルの10-デスアセチル類似体およびパクリタキセルの3'-N-デスベンゾイル-3'-N-t-プトキシカルボニル類似体などの、類似体、製剤物、および誘導体が含まれるとして理解されたい）は、当業者に知られている技術を利用して容易に調製し得るか（WO94/07882号、WO94/07881号、WO94/07880号、WO94/07876号、WO93/23555号、WO93/10076号；米国特許第5,294,637号；第5,283,253号；第5,279,949号；第5,274,137号；第5,202,448号；第5,200,534号；第5,229,529号；およびEP590,267号も参照）、または、たとえばSigma Chemical Co.、モンタナ州St. Louis（セイヨウイチイ由来のT7402もしくはタクスス・ヤナネンシス（Taxus yannanensis）由来のT-1912）を含めた様々な市販源から得られ得る。

40

## 【0101】

パクリタキセルは、パクリタキセルの一般的に化学的に利用可能な形態だけでなく、類

50

似体および誘導体（たとえば、上述のTaxotere（商標）ドセタキセル）ならびにパクリタキセルコンジュゲート（たとえば、パクリタキセル-PEG、パクリタキセル-デキストラン、またはパクリタキセル-キシロース）をいうと理解されたい。

また、用語「タキサン」には、親水性誘導体および疎水性誘導体をどちらも含めた様々な既知の誘導体も含まれる。タキサン誘導体には、それだけには限定されないが、国際特許出願WO99/18113号に記載のガラクトースおよびマンノース誘導体；WO99/14209号に記載のピペラジノおよび他の誘導体；WO99/09021号、WO98/22451号、および米国特許第5,869,680号に記載のタキサン誘導体；WO98/28288号に記載の6-チオ誘導体；米国特許第5,821,263号に記載のスルフェンアミド誘導体；ならびに米国特許第5,415,869号に記載のTaxol誘導体が含まれる。さらに、これには、それだけには限定されないが、WO98/58927号；WO98/13059号；および米国特許第5,824,701号に記載のものを含めた、パクリタキセルのプロドラッグが含まれる。

本発明の方法に関連して使用に適した生物学的応答調節物質には、それだけには限定されないが、(1)チロシンキナーゼ(RTK)活性の阻害剤；(2)セリン/スレオニンキナーゼ活性の阻害剤；(3)腫瘍抗原と特異的に結合する抗体などの腫瘍関連抗原拮抗剤；(4)アポトーシス受容体作用剤；(5)インターロイキン-2；(6)IFN-；(7)IFN- (8)コロニー刺激因子；および(9)血管形成の阻害剤が含まれる。

#### 【0102】

自己免疫疾患を治療する方法

本発明は、一般に、それを必要としている個体に、対象LINEポリペプチド（たとえば、対象の単離LINEポリペプチド、対象の合成LINEポリペプチド）、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物（たとえば、対象LINE医薬組成物、対象LINE免疫原性組成物）を、LINEポリペプチドに対する対象の免疫応答を減少させるために有効な量で投与し、それにより自己免疫疾患を治療することを含む、個体において自己免疫障害を治療する方法を提供する。対象方法を用いて治療することができる自己免疫障害には、それだけには限定されないが、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、および1型糖尿病が含まれる。

本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINEポリペプチド（たとえば、対象の単離LINEポリペプチド、対象の合成LINEポリペプチド）、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物（たとえば、対象LINE医薬組成物、対象LINE免疫原性組成物）を投与することを含む、個体において自己免疫障害を治療する方法を提供する。一部の実施形態では、本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINE免疫原性組成物、たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物を投与することを含む、個体において自己免疫障害を治療する方法を提供する。本発明は、個体において自己免疫障害を治療するための医薬品の調製における、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の使用を提供する。本発明は、個体において自己免疫障害を治療するための医薬品の調製における、対象LINE免疫原性組成物（たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）の使用を提供する。本発明は、個体において自己免疫障害を治療するための、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を提供する。本発明は、個体において自己免疫障害を治療するための、対象LINE免疫原性組成物（たとえば、対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象免疫原性組成物）を提供する。

#### 【0103】

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量とは、LINEポリペプチドに対する対象の免疫応答を、対象LINEポリペプチドを用いた治療が存在しない場合のLINEポリペプチドに対

する対象の免疫応答のレベルと比較して、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、または50%より多く減少させるために有効な量をいう。

一部の実施形態では、対象方法は、自己反応性を減少させるために有効であり、「自己反応性を減少させること」には、自己反応性細胞の数を減少させること；自己反応性細胞の活性を減少させること；および自己反応性抗体のレベルを減少させることのうちの1つまたは複数が含まれる。自己反応性は、それだけには限定されないが、Tリンパ球、B細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞および樹状細胞を含めたいくつかの白血球の相互作用に依存する。Tリンパ球にはCD4<sup>+</sup>Tリンパ球およびCD8<sup>+</sup>リンパ球が含まれる。B細胞は、抗原提示細胞と組織を標的とすることができる自己抗体の産生者との両方として機能することができる。一部の実施形態では、対象方法は、様々な自己免疫反応に關与しているこれらの細胞の活性または数を変更することができる。一部の実施形態では、対象方法は、個体において、自己反応性細胞の数および/または活性を、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物で治療していない個体における自己反応性細胞の数および/またはレベルと比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、またはそれより多く減少させるために有効である。

#### 【0104】

一部の実施形態では、対象方法は、自己反応性Tリンパ球の数および/または活性を減少させるために有効である。したがって、一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量とは、個体において、自己反応性Tリンパ球の数および/または活性を、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物で治療していない個体における自己反応性Tリンパ球の数および/またはレベルと比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、またはそれより多く減少させるために有効な量である。

一部の実施形態では、対象方法は、自己反応性B細胞の数および/または活性を減少させるために有効である。したがって、一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量とは、個体において、自己反応性B細胞の数および/または活性を、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物で治療していない個体における自己反応性B細胞の数および/またはレベルと比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、またはそれより多く減少させるために有効な量である。

#### 【0105】

自己反応性Tリンパ球の活性には、それだけには限定されないが、「自己」細胞に向けられた細胞溶解活性；サイトカインの分泌；ケモカインの分泌；ケモカインに対する応答性；および輸送が含まれる。一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量とは、個体において自己反応性Tリンパ球のうちの1つまたは複数の活性を減少させるために有効な量である。

対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の投与が、個体において自己反応性Tリンパ球の数および/または活性のために有効であるかどうかは、既知のアッセイを用いて容易に決定される。たとえば、自己反応性Tリンパ球が自己抗原に対して特異的である場合、自己抗原特異的Tリンパ球の数および活性レベルは、たとえば、細胞質中に検出可能な標識を含み、自己抗原を提示している照射した細胞を、個体からのリンパ球と混合する、混合リンパ球反応を用いて決定する。自己抗原

10

20

30

40

50

提示細胞の細胞質からの検出可能な標識の放出は、個体内に自己反応性リンパ球が存在することを示す。1型糖尿病に関連する自己反応性Tリンパ球の検出方法は当分野で知られており、任意のそのような方法を使用することができる。1型糖尿病に関連する自己反応性Tリンパ球の検出方法の記述には、たとえば、米国特許第6,022,697号を参照されたい。

#### 【0106】

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量とは、自己免疫疾患の1つまたは複数の症状の重症度を減少させるために有効な量である。たとえば、一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量とは、自己免疫疾患の1つまたは複数の症状の重症度を、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物で治療していない個体における症状の重症度と比較して、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%、またはそれより多く減少させるために有効な量である。

10

#### 【0107】

自己免疫障害に関連する症状は当分野で知られている。たとえば、「自己免疫疾患のテキストブック (Textbook of the Autoimmune Diseases)」、R. G. Lahita 編 (2000) Lippincott Williams & Wilkins、第1版を参照されたい。以下は非限定的な例である。

20

多発性硬化症は、中枢神経系 (CNS) 機能不全の様々な症状および徴候によって特徴づけられており、寛解および再発性の増悪を伴う。最も一般的に提示される症状は、1つもしくは複数の四肢、体幹、または顔面の一面の錯感覚；脚または手の脱力または不器用；あるいは視力障害、たとえば、一方の眼球の部分的盲目および疼痛（球後視神経炎）、視界が薄暗くなること、または暗点である。他の一般的な初期症状は、二重視（複視）をもたらす眼麻痺、1つまたは複数の四肢の一過性の脱力、肢の軽微な硬直または異常な疲労、軽微な歩行障害、膀胱制御の困難、めまい、および緩和な情緒障害である。

真性糖尿病 (DM) とは、インスリン分泌および/またはインスリン作用の絶対的または相対的機能障害によりもたらされる高血糖症によって特徴づけられる症候群である。任意の年齢で起こり得るが、I型DMは、最も一般的には小児期または青年期に発生し、30歳より前に診断されるDMの主要な型である。この型の糖尿病はDMの全症例の10~15%を占め、高血糖症によって臨床的に特徴づけられる。

30

組合せ療法

#### 【0108】

一部の実施形態では、対象治療方法は、それを必要としている個体に、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の有効量と、自己免疫障害を治療するために有効な少なくとも1つの追加の薬剤とを投与することを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の薬剤は、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物以外である。

40

一部の実施形態では、対象治療方法は、それを必要としている個体に、有効量の対象LINEポリペプチドと、自己免疫障害を治療するために有効な少なくとも1つの追加の薬剤とを投与することを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加の薬剤は、対象LINEポリペプチド以外である。

#### 【0109】

当業者は、自己免疫障害の治療に適した薬剤（対象LINEポリペプチド以外）を知っているであろう。たとえば、1型糖尿病の治療に適した薬剤には、天然に存在するインスリン、インスリン類似体などを含めたインスリンが含まれる。

本発明における使用に適したインスリンには、それだけには限定されないが、レギュラーインスリン、セミレンテ、NPH、レンテ、プロタミン亜鉛インスリン (PZI)、ウ

50

ルトラレンテ、インスリングラルギン、インスリンアスパルト、アシル化インスリン、単量体インスリン、超活性インスリン、肝選択的インスリン、および任意の他のインスリン類似体または誘導体、ならびに上述のものの任意の混合物が含まれる。本発明における使用に適したインスリンには、それだけには限定されないが、米国特許第4,992,417号；4,992,418号；第5,474,978号；第5,514,646号；第5,504,188号；第5,547,929号；第5,650,486号；第5,693,609号；第5,700,662号；第5,747,642号；第5,922,675号；第5,952,297号；および第6,034,054号；ならびに公開PCT出願W000/121197号；W009/010645号；およびW090/12814号に開示されているインスリン形態が含まれる。インスリン類似体には、それだけには限定されないが、超活性インスリン類似体、単量体インスリン、および肝選択的インスリン類似体が含まれる。

10

#### 【0110】

##### 統合失調症を治療する方法

本発明は、一般に、それを必要としている個体に、有効量の対象LINEポリペプチド（たとえば、対象の単離LINEポリペプチド、対象の合成LINEポリペプチド）、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物（たとえば、対象LINE医薬組成物、対象LINE免疫原性組成物）を投与することを含む、個体において統合失調症を治療する方法を提供する。本発明は、個体において統合失調症を治療するための医薬品の調製における、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の使用を提供する。本発明は、個体において統合失調症を治療するための、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を提供する。

20

これらの実施形態では、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物の「有効量」とは、それを必要としている個体に、1回または複数回投与した場合に、統合失調症の少なくとも1つの症状を、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物を用いた治療が存在しない場合の個体における症状のレベルまたは重症度と比較して、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、またはそれより多く減少させる量である。統合失調症の症状は当分野で知られており、たとえば、「陽性」症状（たとえば、錯覚、幻覚、解体した会話、ひどく解体した行動または緊張病性行動）；および「陰性」症状（たとえば、アロギー、感情の平板化、意欲消失）が含まれる。

30

#### 【0111】

##### 製剤物

上述の対象LINEポリペプチド、または対象LINEポリヌクレオチドは、それを必要としている個体に投与するための様々な方法のうち任意のもので製剤することができる。本発明は、LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む医薬製剤を提供する。LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む免疫原性組成物は上述されている。さらなる製剤物を以下に記載する。

40

LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドを含む対象製剤物には、一般に、賦形剤（たとえば、スクロース、デンプン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、グルコース、セルロース、タルク、リン酸カルシウムまたは炭酸カルシウム）、結合剤（たとえば、セルロース、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ポリプロピロリドン、ポリビニルプロリドン、ゼラチン、アラビアガム、ポリエチレングリコール、スクロースまたはデンプン）、崩壊剤（たとえば、デンプン、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルデンプン、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、炭酸水素ナトリウム、リン酸カルシウムまたはクエン酸カルシウム）、潤滑剤（たとえば、ステアリン酸マグネシウム、軽質無水ケイ酸、タルクまたはラウリル硫酸ナトリウム）、

50

香料（たとえば、クエン酸、メントール、グリシンまたはオレンジ粉末）、保存料（たとえば、安息香酸ナトリウム、亜硫酸水素ナトリウム、メチルパラベンまたはプロピルパラベン）、安定化剤（たとえば、クエン酸、クエン酸ナトリウムまたは酢酸）、懸濁剤（たとえば、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンまたはステアリン酸アルミニウム）、分散剤（たとえばヒドロキシプロピルメチルセルロース）、希釈剤（たとえば水）、および基剤ワックス（たとえば、カカオ脂、白色ワセリンまたはポリエチレングリコール）のうちの1つまたは複数が含まれる。

#### 【0112】

活性剤を含む錠剤は、たとえば、グリセロール、プロピレングリコール、ジエチルフタレート、または三酢酸グリセロールなどの柔軟剤；スクロース、ソルビトール、キシリトール、グルコース、またはラクトースなどの充填剤；チタン水酸化物などの着色料等の適切な賦形剤を任意選択で加えてもよい、適切なフィルム形成剤、たとえば、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースまたはエチルセルロースでコーティングしてもよい。

適切な賦形剤ビヒクルは、たとえば、水、生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびその組合せである。さらに、所望する場合は、ビヒクルは、湿潤剤もしくは乳化剤またはpH緩衝剤などの少量の補助物質を含有し得る。そのような剤形を調製するための実際の方法は、当業者には知られているか、または明らかである。たとえば、レミントンの製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、Mack Publishing Company、ペンシルベニア州Easton、第17版、1985を参照されたい。投与する組成物または製剤物は、いずれの場合でも、治療する対象において所望の状態を達成するために十分な薬剤の量含有する。ビヒクル、アジュバント、担体または希釈剤などの製薬上許容される賦形剤は、容易に公的に入手可能である。さらに、pH調節剤および緩衝剤、等張性調節剤、安定化剤、湿潤剤などの製薬上許容される補助物質は、容易に公的に入手可能である。

#### 【0113】

一部の実施形態、たとえば、レンチウイルスに対する免疫応答を誘導または増強するための使用では、LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドは、経腔送達用に製剤する。腔内投与用の対象製剤物は、腔内生体接着性錠剤、腔内生体接着性微粒子、腔内クリーム、腔内ローション、腔内泡沫、腔内軟膏、腔内ペースト、腔内溶液、または腔内ゲルとして製剤する。

#### 用量

対象LINEポリペプチドまたは対象LINEポリヌクレオチドの適切な用量は、単一または複数の用量で投与した場合に、所望の効果（たとえば、レンチウイルスに対するT細胞免疫応答の増加；癌細胞に対する免疫応答の増加；自己免疫応答の減少など）を有する用量であり、様々な要素に応じて変動するが、一般に、1回の投与または複数の投与に分割して投与する、約1 $\mu$ g～約100mg、たとえば、約1 $\mu$ g～約5 $\mu$ g、約5 $\mu$ g～約10 $\mu$ g、約10 $\mu$ g～約25 $\mu$ g、約25 $\mu$ g～約50 $\mu$ g、約50 $\mu$ g～約100 $\mu$ g、約100 $\mu$ g～約500 $\mu$ g、約500 $\mu$ g～約1mg、約1mg～約10mg、約10mg～約50mg、または約50mg～約100mgの範囲内である。

#### 【0114】

一部の実施形態では、投与あたりの対象LINEポリペプチドの量は、体重に基づいて決定される。たとえば、一部の実施形態では、対象LINEポリペプチドは、約0.5mg/kg～約100mg/kg、たとえば、約0.5mg/kg～約1mg/kg、約1mg/kg～約2mg/kg、約2mg/kg～約3mg/kg、約3mg/kg～約5mg/kg、約5mg/kg～約7mg/kg、約7mg/kg～約10mg/kg、約10mg/kg～約15mg/kg、約15mg/kg～約20mg/kg、約20mg/kg～約25mg/kg、約25mg/kg～約30mg/kg、約30mg/kg～約40mg/kg、約40mg/kg～約50mg/kg/用量、約50mg/kg～約60mg/kg、約60mg/kg～約70mg/kg、約70mg/kg～約80mg

/ kg、約 80 mg / kg ~ 約 90 mg / kg、もしくは約 90 mg / kg ~ 約 100 mg / kg、または約 100 mg / kg より多い量で投与する。

一部の実施形態では、投与あたりの対象 LINE ポリヌクレオチドの量は、体重に基づいて決定される。たとえば、一部の実施形態では、対象 LINE ポリヌクレオチドは、約 0.5 mg / kg ~ 約 100 mg / kg、たとえば、約 0.5 mg / kg ~ 約 1 mg / kg、約 1 mg / kg ~ 約 2 mg / kg、約 2 mg / kg ~ 約 3 mg / kg、約 3 mg / kg ~ 約 5 mg / kg、約 5 mg / kg ~ 約 7 mg / kg、約 7 mg / kg ~ 約 10 mg / kg、約 10 mg / kg ~ 約 15 mg / kg、約 15 mg / kg ~ 約 20 mg / kg、約 20 mg / kg ~ 約 25 mg / kg、約 25 mg / kg ~ 約 30 mg / kg、約 30 mg / kg ~ 約 40 mg / kg、約 40 mg / kg ~ 約 50 mg / kg / 用量、約 50 mg / kg ~ 約 60 mg / kg、約 60 mg / kg ~ 約 70 mg / kg、約 70 mg / kg ~ 約 80 mg / kg、約 80 mg / kg ~ 約 90 mg / kg、もしくは約 90 mg / kg ~ 約 100 mg / kg、または約 100 mg / kg より多い量で投与する。

10

#### 【0115】

当業者は、用量レベルが、具体的な化合物、症状の重症度および対象の副作用に対する感受性の関数として変動する可能性があることを理解されよう。所与の化合物の好ましい用量は、当業者によって様々な手段によって容易に決定可能である。

一部の実施形態では、対象 LINE ポリペプチドまたは対象 LINE ポリヌクレオチドを複数回投与する。LINE ポリペプチドまたは対象 LINE ポリヌクレオチドの投与の頻度は、様々な要素、たとえば症状の重症度などのうちの任意のものに応じて変動する可能性がある。たとえば、一部の実施形態では、LINE ポリペプチドまたは対象 LINE ポリヌクレオチドは、1回 / 月、2回 / 月、3回 / 月、隔週 (qow)、1回 / 週 (qw)、2回 / 週 (biw)、3回 / 週 (tiw)、4回 / 週、5回 / 週、6回 / 週、隔日 (qod)、1日1回 (qd)、1日2回 (qid)、または1日3回 (tid) 投与する。

20

#### 【0116】

LINE ポリペプチドの投与期間、たとえば、LINE ポリペプチドを投与する期間は、様々な要素、たとえば患者の応答などのうちの任意のものに応じて変動する可能性がある。たとえば、LINE ポリペプチドは、約1日 ~ 約1週間、約2週間 ~ 約4週間、約1カ月 ~ 約2カ月、約2カ月 ~ 約4カ月、約4カ月 ~ 約6カ月、約6カ月 ~ 約8カ月、約8カ月 ~ 約1年間、約1年間 ~ 約2年間、もしくは約2年間 ~ 約4年間の範囲、またはそれより長い期間にわたって投与することができる。

30

LINE ポリヌクレオチドの投与期間、たとえば、LINE ポリヌクレオチドを投与する期間は、様々な要素、たとえば患者の応答などのうちの任意のものに応じて変動する可能性がある。たとえば、LINE ポリヌクレオチドは、約1日 ~ 約1週間、約2週間 ~ 約4週間、約1カ月 ~ 約2カ月、約2カ月 ~ 約4カ月、約4カ月 ~ 約6カ月、約6カ月 ~ 約8カ月、約8カ月 ~ 約1年間、約1年間 ~ 約2年間、もしくは約2年間 ~ 約4年間の範囲、またはそれより長い期間にわたって投与することができる。

#### 【0117】

##### 投与経路

慣用かつ製薬上許容される投与経路には鼻腔内、筋肉内、気管内、腫瘍内、経皮、皮下、皮内、局所的塗布、静脈内、経膈、経鼻、および他の非経口投与経路が含まれる。また、適切な投与経路には、経口および直腸経路も含まれる。所望する場合は、投与経路を組み合わせてもよく、または、薬剤および / または所望の効果に応じて調節してもよい。組成物は、単一用量または複数用量で投与することができる。

40

対象 LINE ポリペプチド、対象 LINE ポリヌクレオチド、または対象 LINE 組成物は、全身または局所経路を含めた、慣用薬物の送達に適した任意の利用可能な慣用方法および経路を用いて宿主に投与することができる。一般に、本発明によって企図される投与経路には、必ずしもそれだけには限定されないが、経腸、非経口、または吸入経路が含まれる。

吸入投与以外非経口投与経路には、必ずしもそれだけには限定されないが、局所的、

50

経膈、経皮、皮下、筋肉内、眼窩内、関節内、脊髄内、胸骨内、腫瘍内、腫瘍周囲、および静脈内経路、すなわち、消化管を通るもの以外の任意の投与経路が含まれる。非経口投与は、薬剤の全身または局所送達を達成するために実施することができる。全身送達が所望される場合は、投与は、典型的には、製薬調製物の侵襲性または全身吸収される局所または粘膜投与を含む。

#### 【0118】

また、対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物は、経腸投与によって対象に送達することもできる。経腸投与経路には、必ずしもそれだけには限定されないが、経口および直腸（たとえば坐薬を使用）送達が含まれる。

対象LINEポリペプチド、対象LINEポリヌクレオチド、または対象LINE組成物（たとえば、対象LINE医薬組成物、対象LINE免疫原性組成物）は、粘膜組織、たとえば、経膈組織、直腸組織などに送達することができる。

#### LINE特異的CTLを作製する方法

本発明は、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の集団を*in vitro*で作製する方法を提供する。この方法は、一般に、CD8<sup>+</sup>T細胞またはその前駆体を、抗原提示プラットフォームと会合しているLINEポリペプチドと接触させることを含み、接触は*in vitro*で行う。この方法は、LINEポリペプチド特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の集団を作製するために有用であり、これらはレトロウイルス感染症、レンチウイルス感染症（たとえばHIV感染症）、および癌などの障害を治療する方法において有用である。

#### 【0119】

一部の実施形態では、CD8<sup>+</sup>T細胞を個体から得て、*in vitro*で、抗原提示プラットフォームと会合しているLINEポリペプチドと接触させる。一部の実施形態では、CD8<sup>+</sup>T細胞を含む細胞の混合集団を個体から得て、CD8<sup>+</sup>T細胞を混合集団から単離し、未刺激のCD8<sup>+</sup>T細胞集団を作製する。その後、未刺激のCD8<sup>+</sup>T細胞集団を*in vitro*で抗原提示プラットフォームと会合しているLINEポリペプチドと接触させる。接触ステップは、LINEポリペプチドと結合してLINEポリペプチドに特異的となることができるT細胞受容体を有する未刺激のCD8<sup>+</sup>T細胞集団の少なくとも一部分を活性化する。

CD8<sup>+</sup>T細胞を含む混合細胞集団の供給源は、たとえば全血であることができる。混合細胞集団は、1つまたは複数の方法またはステップで、たとえば、赤血球を除去するため；CD8<sup>+</sup>T細胞について選択するため；および/またはCD4<sup>+</sup>T細胞もしくは他の非CD8<sup>+</sup>細胞集団に対して選択するために操作することができる。未刺激のCD8<sup>+</sup>細胞の数は、約10<sup>2</sup>～約10<sup>9</sup>個の細胞、たとえば、約10<sup>2</sup>個の細胞～約10<sup>3</sup>個の細胞、約10<sup>3</sup>個の細胞～約10<sup>4</sup>個の細胞、約10<sup>4</sup>個の細胞～約10<sup>5</sup>個の細胞、約10<sup>5</sup>個の細胞～約5×10<sup>5</sup>個の細胞、約5×10<sup>5</sup>個の細胞～約10<sup>6</sup>個の細胞、約10<sup>6</sup>個の細胞～約5×10<sup>6</sup>個の細胞、約5×10<sup>6</sup>個の細胞～約10<sup>7</sup>個の細胞、約10<sup>7</sup>個の細胞～約5×10<sup>7</sup>個の細胞、約5×10<sup>7</sup>個の細胞～約10<sup>8</sup>個の細胞、約10<sup>8</sup>個の細胞～約5×10<sup>8</sup>個の細胞、または約5×10<sup>8</sup>個の細胞～約10<sup>9</sup>個の細胞の範囲であることができる。

#### 【0120】

抗原提示プラットフォームは、抗原提示細胞（APC）、たとえば、LINEポリペプチドでパルスしたAPCであることができ、APCは、生存しているか、または不活化されていることができる。一部の実施形態では、抗原提示プラットフォームは、LINEポリペプチドが結合しているビーズ（たとえば、プラスチックビーズ、磁気ビーズなど）、または他の粒子である。天然に存在するAPC以外の抗原提示プラットフォームは当分野で知られており、それだけには限定されないが、ビーズ；不活性化させた表面を操作したウイルス（たとえば、Mosca他（2007）Retrovirology、4：32参照）；人工APC、たとえばリポソーム（たとえば、米国特許公開第2006/0034865号参照）などが含まれる。

10

20

30

40

50

抗原提示プラットフォームには、LINEポリペプチドに加えて、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞集団、たとえば、MHCクラスI分子（たとえばHLAクラスI分子）などの拡大を刺激するために十分な1つまたは複数の表面分子が含まれる。また、抗原提示プラットフォームには、1つまたは複数の共刺激分子が含まれることもでき、適切な共刺激分子には、それだけには限定されないが、抗CD28抗体、抗CD49d抗体などが含まれる）。

#### 【0121】

未刺激のCD8<sup>+</sup>T細胞を、*in vitro*で、抗原提示プラットフォームと会合しているLINEポリペプチドと接触させ、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の数が增加する。この方法は、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の数の10倍～10<sup>6</sup>倍の増加をもたらす。対象方法によって得られるLINE特異的CD8<sup>+</sup>細胞の数は、約10<sup>3</sup>～約10<sup>9</sup>個の細胞、たとえば、約10<sup>3</sup>個の細胞～約10<sup>4</sup>個の細胞、約10<sup>4</sup>個の細胞～約10<sup>5</sup>個の細胞、約10<sup>5</sup>個の細胞～約5×10<sup>5</sup>個の細胞、約5×10<sup>5</sup>個の細胞～約10<sup>6</sup>個の細胞、約10<sup>6</sup>個の細胞～約5×10<sup>6</sup>個の細胞、約5×10<sup>6</sup>個の細胞～約10<sup>7</sup>個の細胞、約10<sup>7</sup>個の細胞～約5×10<sup>7</sup>個の細胞、約5×10<sup>7</sup>個の細胞～約10<sup>8</sup>個の細胞、約10<sup>8</sup>個の細胞～約5×10<sup>8</sup>個の細胞、または約5×10<sup>8</sup>個の細胞～約10<sup>9</sup>個の細胞の範囲であることができる。

本開示は、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を用いた治療方法を提供する。一部の実施形態では、方法は、HIV感染症を治療する方法である。他の実施形態では、方法は、癌を治療する方法である。この方法は、一般に、それを必要としている個体に、有効量のLINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を投与することを含む。一部の実施形態では、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は自己であり、たとえば、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は、混合細胞集団を得た個体と同一の個体に投与する（すなわち、ドナー個体およびレシピエント個体は同一である）。他の実施形態では、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は同種である、たとえば、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は、混合細胞集団を得た個体（ドナー個体）と遺伝的に同一ではない個体（レシピエント個体）に投与する。

#### 【0122】

一部の実施形態では、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を、レシピエント個体に、約10<sup>3</sup>～約10<sup>9</sup>個の細胞、たとえば、約10<sup>3</sup>個の細胞～約10<sup>4</sup>個の細胞、約10<sup>4</sup>個の細胞～約10<sup>5</sup>個の細胞、約10<sup>5</sup>個の細胞～約5×10<sup>5</sup>個の細胞、約5×10<sup>5</sup>個の細胞～約10<sup>6</sup>個の細胞、約10<sup>6</sup>個の細胞～約5×10<sup>6</sup>個の細胞、約5×10<sup>6</sup>個の細胞～約10<sup>7</sup>個の細胞、約10<sup>7</sup>個の細胞～約5×10<sup>7</sup>個の細胞、約5×10<sup>7</sup>個の細胞～約10<sup>8</sup>個の細胞、約10<sup>8</sup>個の細胞～約5×10<sup>8</sup>個の細胞、または約5×10<sup>8</sup>個の細胞～約10<sup>9</sup>個の細胞の量で、1回または複数回投与する。

#### 【0123】

##### 診断方法

本発明は、対象LINEポリペプチドまたは対象LINE組成物を利用する、様々な診断方法を提供する。対象診断方法には、治療に対する患者の応答を監視する方法；疾患の段階を決定する方法；および疾患を検出する方法が含まれる。

一部の実施形態では、対象診断方法は、個体においてLINEポリペプチドを産生する癌細胞の存在を検出することを含む。LINEポリペプチドを産生する癌細胞を検出する方法には、免疫学的方法、たとえば、LINEポリペプチドに特異的な抗体の使用が含まれ、免疫学的アッセイには、たとえば、免疫組織学的アッセイ、および蛍光活性化細胞分析アッセイ（たとえば、LINEポリペプチドに対する蛍光標識した抗体を用いた蛍光活性化細胞分取アッセイ）が含まれる。

#### 【0124】

他の実施形態では、対象診断方法は、一般に、個体から得た生体試料中のLINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の数を検出することを含む。LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の数は、たとえば、<sup>51</sup>Cr放出アッセイを用いて決定することができ、LINEペプチドでパルスし、<sup>51</sup>Crで標識した標的細胞を、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞を含有し得る試験試

10

20

30

40

50

料と接触させる。LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の数は、標的細胞からの<sup>51</sup>Crの放出を測定することによって決定する。

他の実施形態では、対象診断方法は、個体の血清もしくは血漿（または他の生体液）中のLINEポリペプチドを検出することを含む。個体から得た生体液中のLINEポリペプチドの検出は、たとえば、LINEポリペプチドに特異的な抗体を用いた免疫学的アッセイを使用して実施することができる。適切な免疫学的アッセイには、それだけには限定されないが、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、タンパク質プロット（「ウエスタンプロット」）アッセイ、免疫沈降アッセイなどが含まれる。

#### 【0125】

##### LINE特異的抗体

上述のように、一部の実施形態では、対象診断的アッセイでは、LINEポリペプチドに特異的な抗体（「抗LINE抗体」）を用いる。適切な抗LINE抗体には、任意のアイソタイプの全抗体；抗LINE抗体のエピトープ結合断片；ポリクローナル抗体；モノクローナル抗体；人工抗体；単鎖抗体などが含まれる。一部の実施形態では、本発明は、対象LINEポリペプチドと特異的に結合する抗体を提供する。対象LINEポリペプチド特異的抗体は、対象診断的アッセイで使用することができる。一部の実施形態では、対象抗体は単離されている。一部の実施形態では、対象抗体は人工または合成である。

モノクローナル抗体は、慣用技術によって生成する。一般に、免疫化した宿主動物の脾臓および/またはリンパが形質細胞の供給源を提供する。形質細胞を骨髓腫細胞との融合によって不死化して、ハイブリドーマ細胞を生成する。個々のハイブリドーマからの培養上清を、標準技術を用いてスクリーニングして、所望の特異性を有する抗体を産生するものを同定する。モノクローナル抗体の産生に適した動物には、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギなどが含まれる。抗体は、ハイブリドーマ細胞の上清または腹水から、慣用技術、たとえば、不溶性支持体に結合したタンパク質を用いたアフィニティークロマトグラフィー、タンパク質Aセファロースなどによって精製し得る。

抗体は、通常が多量体構造の代わりに単鎖として生成させ得る。単鎖抗体は、Jost他（1994）J.B.C.、269：26267～73、および他のものに記載されている。重鎖の可変領域および軽鎖の可変領域をコードするDNA配列を、グリシンおよび/またはセリンを含めた、小さな中性アミノ酸の、少なくとも約4個のアミノ酸をコードするスペーサーとライゲーションさせる。この融合物によってコードされるタンパク質により、元の抗体の特異性および親和性を保持する機能的可変領域のアセンブリが可能となる。

#### 【0126】

また、適切な抗LINE抗体には、「人工」抗体、たとえば、*in vitro*で産生および選択した抗体および抗体断片も含まれる。一部の実施形態では、そのような抗体は、バクテリオファージまたは他のウイルス粒子の表面上に提示される。多くの実施形態では、そのような人工抗体は、それだけには限定されないがM13遺伝子IIIタンパク質を含めた、ウイルスまたはバクテリオファージの構造タンパク質を有する融合タンパク質として存在する。そのような人工抗体を産生する方法は、当分野で周知である。たとえば、米国特許第5,516,637号；第5,223,409号；第5,658,727号；第5,667,988号；第5,498,538号；第5,403,484号；第5,571,698号；および第5,625,033号を参照されたい。

Fv、F(ab')<sub>2</sub>およびFabなどの抗体断片は、無処置のタンパク質の切断によって、たとえば、プロテアーゼまたは化学的切断によって調製し得る。あるいは、切断された遺伝子を設計する。たとえば、F(ab')<sub>2</sub>断片の一部をコードするキメラ遺伝子には、H鎖のCH1ドメインおよびヒンジ領域、続いて翻訳ストップコドンを含むDNA配列が含まれて、切断された分子が得られる。

#### 【0127】

一部の実施形態では、抗LINE抗体は、たとえば、放射性同位体、検出可能な産物を

10

20

30

40

50

生じる酵素、蛍光タンパク質、色素原タンパク質などで検出可能に標識する。抗LINE抗体は、特異的結合対のメンバー、たとえばビオチン（ビオチン-アビジン特異的結合対のメンバー）などの、他の部分とさらにコンジュゲートさせ得る。また、抗LINE抗体は、それだけには限定されないが、ポリスチレンプレートまたはビーズ、磁気ビーズ、試験条片、膜などを含めた固体担体と結合していてもよい。

LINEポリペプチドに特異的な抗体は、直接または間接的に標識することができる。直接標識には、放射性同位体（たとえば、 $^{125}\text{I}$ ； $^{35}\text{S}$ など）；その産物が検出可能である酵素（たとえば、ルシフェラーゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）；蛍光標識（たとえば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリンなど）；EDTAなどの金属キレート化基を介して抗体に付着した、蛍光発光金属、たとえば、 $^{152}\text{Eu}$ 、またはランタニド系の他のもの；化学発光化合物、たとえば、ルミノール、イソルミノール、アクリジニウム塩など；生物発光化合物、たとえば、ルシフェリン；蛍光タンパク質（たとえば、緑色蛍光タンパク質、黄色蛍光タンパク質など）等が含まれる。間接標識には、LINE特異的抗体に特異的な第2の抗体が含まれ、第2の抗体は、上述のように標識し、特異的結合対、たとえばビオチン-アビジンなどのメンバーである。

#### 【0128】

一部の実施形態では、抗LINE抗体は、抗体と共有結合した、検出可能なシグナルを提供するタンパク質を含む。適切なタンパク質には、それだけには限定されないが、蛍光タンパク質および酵素（たとえば、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）が含まれる。適切な蛍光タンパク質には、それだけには限定されないが、それだけには限定されないがいくつか市販されているアエクオリア・ビクトリア（*Aequoria victoria*）に由来するGFPまたはその誘導体；レニラ・レニホルミス、レニラ・ムレリ、またはプチロサルクス・グエルニ（*Ptilosarcus guernyi*）などの種由来のGFP（たとえば、WO99/49019号およびPeelle他（2001）*J. Protein Chem.*、20:507~519号に記載）を含めた緑色蛍光タンパク質（GFP）；花虫綱の種由来の様々な蛍光および有色タンパク質のうちの任意のもの（たとえば、Matz他（1999）*Nature Biotechnol.*、17:969~973、米国特許公開第2002/0197676号、または米国特許公開第2005/0032085号などに記載）が含まれる。

特定の実施形態では、対象診断的アッセイでは、LINEポリペプチドに特異的な抗体を用い、LINEポリペプチドに特異的な抗体は、LINE-1 p40に対する結合親和性を有する抗体またはその結合断片、たとえばポリクローナル抗体AH40.1を特異的に排除する。

#### 【0129】

レトロウイルス感染症の治療に対する患者の応答の監視

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド組成物は、レトロウイルス感染症、たとえば、HIV感染症、HTLV感染症などの治療に対する患者の応答を監視するために有用である。

したがって、本開示は、レトロウイルス感染症、たとえばHIV感染症の治療に対する患者の応答を監視する方法をさらに提供する。この方法は、一般に、患者からの白血球（WBC）を、*in vitro*で対象LINEポリペプチドと接触させることと；LINEポリペプチドとの接触に反応してWBCによって分泌されたサイトカインを検出することを含む。個体から治療前または治療中のより早い時点に得たWBCによるサイトカイン産生のレベルと比較した、LINEポリペプチドとの接触に反応したWBCによるサイトカイン産生の減少は、治療がレトロウイルス感染症の治療に有効であることの指標である（たとえば、ウイルス量の減少の達成、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球レベルの増加の達成（HIV感染症の場合）などにおいて）。適切なWBCには、それだけには限定されないが、末梢血単核球（PBMC）、単離したTリンパ球、単離したCD4<sup>+</sup>Tリンパ球、単離した

10

20

30

40

50

CD8<sup>+</sup>Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーTリンパ球（NKT、たとえばNK1.1<sup>+</sup>Tリンパ球）などが含まれる。

【0130】

たとえば、一部の実施形態では、対象の監視方法は、a) WBCを*in vitro*で対象の合成LINEポリペプチドと接触させることと（WBCは、患者から、レトロウイルス感染症の治療の開始後の第1の時点に得る）；b) LINEポリペプチドとの接触に反応してWBCによって分泌されたサイトカインを検出し、LINEポリペプチドとの接触に反応した対照WBCによるサイトカイン産生のレベルと比較した、LINEポリペプチドとの接触に反応したWBCによるサイトカイン産生の減少は、治療がレトロウイルス感染症の治療に有効であることを示すことと（対照WBCは、患者から、治療の開始前、または第1の時点よりも前の治療中の時点に得る）を含む。

10

別の例として、一部の実施形態では、対象の監視方法は、a) WBCを*in vitro*で対象の合成LINEポリペプチドと接触させることと（WBCは、患者から、レトロウイルス感染症の治療の開始後の第2の時点に得る）；b) LINEポリペプチドとの接触に反応してWBCによって分泌されたサイトカインを検出することを含み、LINEポリペプチドとの接触に反応した対照WBCによるサイトカイン産生のレベルと比較した、LINEポリペプチドとの接触に反応したWBCによるサイトカイン産生の減少は、治療がレトロウイルス感染症の治療に有効であることを示し、対照WBCは、患者から、治療の開始後の、第2の時点よりも早い第1の時点に得る。

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチド組成物は、HTLV感染症（たとえば、HTLV-IまたはHTLV-II感染症）の治療に対する患者の反応を監視するために有用である。この方法は、一般に、患者からの白血球（WBC）を、*in vitro*で対象LINEポリペプチドと接触させることと；LINEポリペプチドとの接触に反応してWBCによって分泌されたサイトカインを検出することを含む。LINEポリペプチドとの接触に反応したWBCによるサイトカイン産生の減少は、治療がHTLV-IまたはII感染症の治療に有効であることの指標である（たとえば、ウイルス量の減少の達成、CD4<sup>+</sup>Tリンパ球レベルの増加の達成（HIV感染症の場合）などにおいて）。適切なWBCには、それだけには限定されないが、末梢血単核球（PBMC）、単離したTリンパ球、単離したCD4<sup>+</sup>Tリンパ球、単離したCD8<sup>+</sup>Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞、ナチュラルキラーTリンパ球（NKT、たとえばNK1.1<sup>+</sup>Tリンパ球）などが含まれる。

20

30

【0131】

対象の監視方法での使用に適したLINEポリペプチドは、アミノ酸6個、アミノ酸7個、アミノ酸8個、アミノ酸9個、アミノ酸10個、アミノ酸11個、アミノ酸12個、アミノ酸12～15個、アミノ酸15～18個、アミノ酸18～20個、もしくはアミノ酸20～25個の長さ、またはそれより長いことができる。適切なLINEポリペプチドには、上述のLINEポリペプチドのうちの任意のものが含まれる。一部の実施形態では、LINEポリペプチドは、配列番号1～22のうちの任意の1つに記載のアミノ酸配列と少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

PBMCから分泌され、対象の患者監視方法で検出されるサイトカインには、それだけには限定されないが、IFN-、TNF-、およびIL-2が含まれる。

対象の患者監視方法での使用に適した、分泌されたサイトカインを検出する方法には、それだけには限定されないが、免疫学的アッセイ、たとえば、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、または酵素連結免疫スポット（ELISPOT）アッセイ；細胞アッセイなどが含まれる。

一部の実施形態では、患者から治療前または治療中のより早い時点に得たWBCによるサイトカイン産生のレベルと比較した、LINEポリペプチドとの接触に反応したWBCによるサイトカイン産生の少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30

50

%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、もしくは少なくとも約90%またはそれより多くの減少は、レトロウイルス感染症の治療が有効であることを示す。

#### 【0132】

WBCを含む患者試料を、治療の前および後、または治療過程中的の様々な時点で得て、第1の時点で採取した試料と第2の(後の)時点で採取した試料との間のサイトカイン産生のレベルを比較することができる。

一部の実施形態では、患者から得たPBMCを、1つまたは複数のLINEポリペプチドと*in vitro*で接触させ; ELISPOTアッセイを用いてサイトカイン産生を検出する。ELISPOTアッセイは当分野で記載されている。たとえば、Lalvanani他(1997) *J. Exp. Med.*, 186: 859; および米国特許第5,853,697号を参照されたい。これらの実施形態では、PBMCによって産生されたサイトカインのレベルは、スポット形成単位(SFU)の数/10<sup>6</sup>個のPBMCとして表す。SFUの数の減少は、レトロウイルス感染症の治療が有効であることを示す。

癌治療に対する患者の応答の監視

特定の実施形態では、癌の治療レジメンに対する患者の応答を監視する方法を提供する。たとえば、癌に関連するLINEポリペプチドのレベルを、治療レジメンの前、その間、および治療レジメンの後に監視する。

#### 【0133】

一部の実施形態では、LINEポリペプチドのレベルを、たとえば、血清中、特定の細胞集団の表面上などで監視する。

疾患の段階の決定

本開示は、個体における疾患の段階を決定する方法を提供し、LINEポリペプチドのレベルは、疾患の段階または重症度と関連している。この方法は、一般に、個体から得た生体試料中のLINEポリペプチドのレベルを検出することを含む。生体試料中のLINEポリペプチドのレベルは疾患または障害の重症度と相関しており、疾患の段階を決定するために使用する。

一部の実施形態では、疾患の段階を決定する対象方法は、個体から得た生体試料中の、対象LINEポリペプチドに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数を検出することを含む。一部の実施形態では、LINE特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の数は、疾患の段階の指標である。

疾患の検出

#### 【0134】

本開示は、個体において癌などの疾患を検出する方法を提供し、個体から得た生体試料中のLINEポリペプチドの存在またはレベルは、生体試料(したがって個体)中に癌細胞が存在することの指標である。この方法は、一般に、個体から得た生体試料中のLINEポリペプチドのレベルを検出することを含む。LINEポリペプチドのレベルが正常細胞に関連するレベルよりも高い場合は、これが試料中に癌細胞が存在することの指標である。

一部の実施形態では、異常なLINE発現、たとえば、癌組織(たとえば腫瘍)またはHIV感染細胞中の異常に増加したLINE-1発現に関連する疾患の検出は、個体から得た生体試料中の、対象LINEポリペプチドに特異的なCD8<sup>+</sup>T細胞の数を検出することを含む。対象LINEポリペプチドに対するCD8<sup>+</sup>T細胞応答が生体試料中に存在する場合、これは、個体が異常なLINE発現に関連する疾患に罹患していることの指標である。

#### 【0135】

治療に適した対象

レトロウイルス感染症の治療

本開示は、レトロウイルス感染症、たとえばレンチウイルス感染症に罹患している個体; レトロウイルス感染症に罹る危険性のある、感染していない個体; レトロウイルス感染症の治療をしたが、治療への応答が失敗した個体; およびレトロウイルス感染症の治療を

10

20

30

40

50

したが、再発した個体の治療に適した方法を企図する。一部の実施形態では、「危険性のある」個体とは、レトロウイルス感染症（たとえば、HIV感染症などのレンチウイルス感染症）に罹る危険性が一般集団よりも高い個体である。

一部の実施形態では、対象LINEポリペプチドを含む対象免疫原性組成物は、ナイーブ個体、たとえばHIVに感染していない個体に投与する。ナイーブ個体への対象免疫原性組成物の投与は、個体がHIVに感染した場合に、HIV感染症による疾患の重症度を減少させることができる、および/またはHIV感染症を制限することができる、および/またはHIV感染症のクリアランスを行うことができる。

ナイーブ個体への対象免疫原性組成物の投与は、HIV無症状感染、たとえば、HIV感染症の症状の発生をもたらさないHIV感染症のクリアランスをもたらすことができる。たとえば、ナイーブ個体への対象免疫原性組成物の投与は、個体が臨床的HIV感染症を発生しないように（たとえば、個体が、血清転換しない、検出可能なHIVウイルス量を発生しない、検出可能なレベルの血清HIV抗原を有さないなど）、HIV無症状感染のクリアランスをもたらすことができる。

#### 【0136】

たとえば、本発明の方法は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染症に罹患している個体；HIV感染症に関してナイーブであるが、HIV感染症に罹る危険性のある個体；およびHIV感染症の治療をしたが、治療への応答が失敗した個体、または最初は治療に応答したが、続いて再発した個体の治療に適している。そのような個体には、それだけには限定されないが、健康な無傷の免疫系を有するが、HIVに感染する危険性のある、感染していない個体（「危険」個体）が含まれる。危険個体には、それだけには限定されないが、HIVに感染する可能性が一般集団よりも高い個体が含まれる。HIVに感染する危険性のある個体には、それだけには限定されないが、HIVに感染した個体との性行為によりHIV感染の危険性のある個体；静脈内薬物使用者；HIVに感染した血液、血液製品、または他のHIV汚染体液に曝された可能性のある個体；およびHIVに感染した母親によって授乳されている乳児が含まれる。治療に適した個体には、HIV-1、HIV-2、またはその任意の変異体に感染している、または感染する危険性のある個体が含まれる。

#### 【0137】

##### H T L V 感染症の治療

上述の方法は、個体において、ヒトT細胞白血病ウイルス（HTLV）感染症、たとえば、HTLV-IまたはHTLV-II感染症を治療するために使用することができる。したがって、対象方法は、HTLVに感染した個体；未だHTLVに感染していないが、HTLVに感染する危険性のある個体；および未だHTLVに感染していないが、将来HTLVに感染し得る個体の治療にも適している。

#### 【0138】

##### 癌治療

特定の実施形態では、対象方法は、LINEの発現に関連する癌を診断された個体の治療に適しており、そのような癌には、それだけには限定されないが、乳癌、卵巣癌、黒色腫、奇形腫、精上皮腫、前立腺癌および精巣癌（奇形腫、精上皮腫、および胚性癌腫またはこれらの種類のうちの1つもしくは複数からなる混合腫瘍を含む）が含まれる。対象方法は、乳癌を診断された個体；卵巣癌を診断された個体；および精巣癌を診断された個体の治療に適している。また、癌を治療する対象方法は、乳癌、卵巣癌、黒色腫、前立腺癌、または精巣癌の治療をしたが、治療への応答が失敗した個体、または最初は応答したが、その後再発した個体のいずれかの治療にも適している。

##### 自己免疫障害の治療

特定の実施形態では、対象方法は、自己免疫障害を診断された個体の治療に適しており、そのような自己免疫障害には、それだけには限定されないが、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、および1型糖尿病が含まれる。一部の実施形態では、この方法は、自己免疫障害の治療をしたが、治療への応答が失敗した個体、または最初は応

10

20

30

40

50

答したが、その後、再発した個体のいずれかの治療に適している。

【実施例】

【0139】

以下の実施例は、当業者に、本発明をどのように作製および使用するかの完全な開示および説明を提供するために示し、本発明者らがその発明としてみなす範囲を限定することを意図せず、また、以下の実験が、行った実験のすべてこれらの実験しか行っていないことを表すことを意図しない。使用した数値（たとえば、量、温度など）に関して精度を確実にする努力はなされているが、ある程度の実験誤差および偏差を考慮されたい。別段に指摘しない限りは、部は重量部である、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏、圧力は大気圧付近である。標準の略記、たとえば、bp、塩基対；kb、キロ塩基；pl、ピコリットル；sまたはsec、秒；min、分；hまたはhr、時間；aa、アミノ酸；kb、キロ塩基；bp、塩基対；nt、ヌクレオチド；i.m.、筋肉内；i.p.、腹腔内；s.c.、皮下；mAb、モノクローナル抗体などを使用し得る。

10

【0140】

(実施例1)

LINEペプチドはヒト末梢血単核球(PBMC)においてサイトカイン産生を刺激する。

方法

患者。HIV-1陽性の志願者を本試験用を選択した。この研究は、現地の施設審査委員会によって承認され、対象に書面のインフォームドコンセントを与えた。試験は、様々な患者の時点の凍結保存した末梢血単核球(PBMC)で行った。

20

ペプチド選択。候補LINEエピトープは2つの方法で選択した：(1)HIV-1中に見つかるペプチド配列に対する類似度に基づく方法および(2)LINEオープンリーディングフレーム(ORF)ORF1およびLINE ORF2によってコードされるタンパク質の、in silicoで予測した免疫原性に基づく方法。

HIV-1ペプチドに類似のLINE-1ペプチドは、アルゴリズムの短いほぼ完全一致(e値=200000、PAM30マトリックス、SEGフィルターOFF、ワードサイズ=2)パラメータを用いて、HIVタンパク質に対するLINEアミノ酸配列のBLAST検索で同定した(Altschul他、Nucleic Acids Res.、1997、25(17):3389~402)。これらのパラメータは、高度に類似した配列の短い領域の検索に適している。これらのパラメータは、検索のワードサイズを3~2減少させ、SEGフィルターを排除し、予測値を10~20,000以上増加させ、厳密性のより低い類似度マトリックスを使用するオプションを含む(BLOSUM62に対してPAM30)。LINE配列データをNCBIデータベースおよびL1塩基データベース(Penzkofer他、Nucleic Acids Res.、2004、33:D498~D500)から得て、検索用にBLASTデータベースにフォーマットしたファイルにコンパイルした。HIV HXB-2参照株の配列も、検索用に別のBLASTデータベースフォーマットファイルにコンパイルした。BLASTアルゴリズムの短いほぼ完全一致のパラメータは、通常はタンパク質の多様性によって圧倒されているペプチド配列間の短い一致の検出を容易にする。タンパク質間の全体的な配列保存は、内在性ウイルスおよびHIVに対するCD8<sup>+</sup>T細胞応答間の任意の相互作用の原因としては比較的重要ではなく、むしろ、そのような相互作用は、エピトープの大きさの領域内のアミノ酸配列の高レベルの類似度または同一性に依存する。既知のHIVエピトープに対して類似度を有する候補LINEペプチドをペプチド合成およびさらなる試験のために選択した。さらに、既知のエピトープ外のHIVタンパク質に対して類似度を有するLINE領域も、さらなる研究のために選択した。

30

40

【0141】

また、LINE-1からの候補エピトープペプチドを、in silicoで予測した、LINE-1 ORF1およびLINE-1 ORF2によってコードされるタンパク質の免疫原性に基づいて同定した。LINE-1 ORF1およびORF2配列は、プロ

50

テオソーム切断部位、生じる分解産物の、抗原プロセッシング (TAP) 機構に関連するトランスポーターと結合する最良の潜在性を有するサブセット、およびこれらの分解産物のうちの、様々なヒト白血球抗原 (HLA) 分子に対して最良の結合親和性を有するペプチドを同定する、エピトープ予測ソフトウェア (NETCTL (商標)) を用いて分析した (Larsen 他、European Journal of Immunology、35 (8) : 2295 ~ 303、2005)。この方法に従って同定した LINE-1 ペプチドを、図 12 に示す表に提供する。

ELISPOT アッセイ。Meiklejohn 他、J. Immunol. Methods、(2004) 288、135 ~ 47 に記載のように、酵素連結免疫スポット (ELISPOT) アッセイ分析を行った。プレートを 16 時間、37 °C でインキュベーションした。HIV および LINE ペプチドの応答比較のために、均等な抗原濃度を用いた。アッセイは、保存した試料からの細胞の回収が原因で単一ウェルの使用が強いられた場合以外は、それぞれの条件について 2 つ組ウェルで行った。プレートは AID ELISPOT 読取器 (Cell Technology) で計数した。2 つ組ウェルのスポットの合計の平均をとり、すべてのスポット数を、IFN- $\gamma$  のスポット形成単位 (SFU) の数 /  $1 \times 10^6$  個の PBMC に対して正規化した。培地対照ウェルからのスポット値を減算して、それぞれのペプチドに対する応答を決定した。培地の減算後に生じるペプチド値が < 0 のすべてのものを、さらなる分析のために 0 と設定した。

【0142】

結果

図 10 に示す表は、HIV-1 タンパク質に対する LINE アミノ酸配列の BLAST 検索 (Altschul 他、Nucleic Acids Res.、1997、25 (17) : 3389 ~ 402) を用いて同定した候補 LINE ポリペプチドを提供する。

図 11 に示す表は、HIV-1 タンパク質に対する LINE アミノ酸配列の BLAST 検索から生じる、対象 LINE ポリペプチドと HIV タンパク質配列との間の例示的な配列アラインメントを提供する。垂直線はアミノ酸配列の一致を示し、「\*」は一致しないアミノ酸を示す。「対象」HIV-1 配列の NCBI データベース受託番号を提供する。図 12 に示す表は、in silico エピトープ予測を用いて同定した LINE-1 ペプチドを表す。

【0143】

HIV 感染細胞中の LINE-1 転写物のレベルの増加

LINE-1 転写物のレベルに in vitro で影響を与える HIV-1 感染の能力を、HIV-1 感染およびモック感染の対照中の転写物の発現のレベルを比較することによって監視した。平行して、細胞 DNA を、定量的 RT-PCR (qRT-PCR) によって、LINE-1 のゲノムコピー数の増加について調査した。初代 CD4<sup>+</sup> T 細胞を抗 CD3 / 抗 CD28 で活性化させ、HIV-1-81A の R5 向性株に感染させた。感染の 144 時間後には、モック感染対照と比較して、LINE-1 転写物のレベルの有意な増加が観察された。144 時間の HIV-1-81A 感染培養物中で、LINE-1 の増加した - アクチン標準化 DNA 定量が観察された。すべての RNA 試料を Trizol で単離し、逆転写前に DNase で処理した。トリパンブルー色素排除は、HIV-1-81A とモック感染対照との間で同様であった。

【0144】

HIV-1 に感染した対象から単離した PBMC における LINE-1 ポリペプチドに特異的な免疫応答の検出

図 13 に示す表は、それぞれ配列番号 1 ~ 7 に対応する単離 LINE ポリペプチド LiD9R、LiE13E、LiK10I、Lil9C、Lim12T、Lin13V および LiQ9E の ELISPOT アッセイの結果を提供する。試験 ID 2 ~ 34 は感染していない対照を表し、試験 ID 429 ~ 841 は HIV に感染した個体を表す。「LINE」の列は、LiE13E、LiK10I、Lil9C、Lim12T、Lin13V および LiQ9E からなる LINE ポリペプチドのプールに対する応答を表す。Gag および N

e f の列は、G a g および N e f H I V タンパク質（それぞれのタンパク質に由来するペプチドのプール）に対する応答を表す。P H A および S E B の列は、陽性対照に対する応答を表す。結果はスポット形成単位（S F U）/  $1 \times 10^6$  個の P B M C である。50 未満の値はバックグラウンドであるとみなされ、50 以上の値は肯定応答であるとみなされる。「N T」の記号は、特定の患者試料を、特定の試験日に示した条件下で試験しなかったことを意味する。E L I S P O T アッセイの結果は、L I N E ポリペプチド抗原刺激に応答したサイトカイン産生を、H I V に感染した対象に由来する P B M C 中で検出できることを示す。

図 1 4 に示す表は、それぞれ配列番号 8 ~ 1 1 に対応する単離 L I N E ポリペプチド L i I V 9、L i K I 9、L i R V 9、L i T V 9 の E L I S P O T アッセイの結果を提供する。試験 I D 3 0 ~ 4 2 は感染していない対照を表し、試験 I D 5 6 2 ~ 6 5 3 は H I V に感染した個体を表す。G a g および N e f の列は、H I V タンパク質 G a g および N e f（それぞれのタンパク質に由来するペプチドのプール）に対する応答を表す。S E B の列は、陽性対照に対する応答を表す。結果はスポット形成単位（S F U）/  $1 \times 10^6$  個の P B M C である。50 未満の値はバックグラウンドであるとみなされ、50 以上の値は肯定応答であるとみなされる。「N T」の記号は、特定の患者試料を、特定の試験日に示した条件下で試験しなかったことを意味する。E L I S P O T アッセイの結果は、L I N E ポリペプチド抗原刺激に応答したサイトカイン産生を、H I V に感染した対象に由来する P B M C 中で検出できることを示す。

#### 【 0 1 4 5 】

データは、L I N E 転写物の発現および H I V - 1 感染に関連する L I N E ペプチドに向けられた T 細胞応答の上昇を実証する。H I V - 1 に感染した個体における L I N E に対する自然に生じる T 細胞応答は、新規 H I V - 1 ワクチンのパラダイムとして、応答を感染の初期または危険性のある感染していない個体においてに誘導することの実行可能性を示す。H I V - 1 ワクチンの開発の最大の困難の 1 つは、ワクチンを用いて誘発させた特異的免疫応答を逃れることを可能にする、ウイルスの変異性を克服することである。L I N E はゲノムにコードされる要素であり、L I N E 挿入物の制御解除された転写から産生される翻訳産物は、可変性が H I V - 1 タンパク質よりもはるかに低いことが予測される。L I N E 抗原の産生および提示が細胞の H I V - 1 感染の結果である場合、L I N E 産物は、H I V - 1 感染を免疫系に伝達する、安定した認識可能な代用マーカーとして役割を果たす。ワクチン接種によって、L I N E 代用マーカーを認識するように免疫系を教育することで、H I V - 1 に感染した細胞の死滅が誘導され、可変性の高い H I V - 1 抗原を認識する必要性が回避される場合がある。

#### 【 0 1 4 6 】

##### (実施例 2)

H I V に感染した細胞の L 1 特異的 C D 8 + T 細胞認識方法

対象。対象は、カナダ免疫不全研究共同 (C a n a d i a n I m m u n o d e f i c i e n c y R e s e a r c h C o l l a b o r a t i v e) (C I R C) コホート、カナダ、T o r o n t o、および S C O P E コホート、カリフォルニア大学サンフランシスコ校 (U C S F) の参加者から選択した。慢性進行者は、> 1 年間の間 H I V - 1 に感染しており、C D 4 + T 細胞計数の低下が > 5 0 個の細胞 /  $\text{mm}^3$  / 年である個体として定義された。ウイルス対照者は、> 1 年間の間 H I V - 1 に感染しており、C D 4 + T 細胞の計数の低下の証拠が見られず、ウイルス量が < 5, 0 0 0 個のコピー /  $\text{m l}$  の b D N A である個体として定義された。本研究はトロント大学施設審査委員会および U C S F ヒト研究委員会 (C o m m i t t e e o n H u m a n R e s e a r c h) によって承認されており、対象は書面のインフォームドコンセントを与えた。試験は、凍結保存した P B M C で解凍直後に行った。

#### 【 0 1 4 7 】

L 1 - p 1 5 0 タンパク質発現の免疫沈降 / ウェスタンブロット分析。H I V - 1 に感

染していないドナーからPBMCを得た。Easysep (Stemcell Technologies) を用いてCD4<sup>+</sup>T細胞を単離し、10%のFBS、グルタミン、ペニシリン/ストレプトマイシン、および50U/mlのIL-2を添加したRPMI培地 (Hofmann-Laroché) 中の、CD3およびCD28に対するモノクローナル抗体 (mAb) (ebiosciences) を用いて、48時間刺激した。これらの細胞を2つの等しいアリコートに分割し、そのうちの一方を0.05MOIのHIV-1-NL4-3に感染させ、他方をモック感染対照として維持した。感染後の示した時点 (48および170時間) に、10<sup>6</sup>個の細胞を、完全プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を添加した放射性免疫沈降アッセイ (RIPA) 緩衝液で溶解した。免疫沈降は、シーズタンパク質G (Seize Protein G) 免疫沈降キット (Pierce Biotechnology) を用いて、製造者の指示に従って行った。タンパク質を、5mgの全細胞溶解液タンパク質から、40μgのヤギポリクローナル抗L1-p150 S19 (Santa Cruz Biotechnologies) を用いて免疫沈降した。これらの溶出液を、YM-50 50kDaの分子量カットオフのマイクロコン (Millipore) を用いてそれぞれ約50μlまで濃縮した、3つの等しい部分に分割し、NuPageシステム (Invitrogen) を用いて製造者のプロトコルに従って、3つの別々のゲル上の還元性ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) によって分離した。タンパク質を、ポリ(フッ化ビニリデン) (PVDF) 膜に1時間、100Vで移した。ウエスタンブロットは、1:200希釈の抗L1-p150 S19およびC16抗体 (Santa Cruz Biotechnologies)、次いで1:10,000希釈のロバ抗ヤギIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) (Jackson Immunoresearch)、および1:10,000希釈の抗HIV-1-p24抗血清 (NIH AIDS 試薬プログラム (NIH AIDS reagent program) カタログ番号4250)、次いで1:10,000希釈のヤギ抗ウサギIgG-HRP (Jackson Immunoresearch) でプロービングする、標準の手順によって行った。

#### 【0148】

エピトープ選択およびペプチド合成。Brouha他 ((2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:5280) によって提示されている「ホット」L1要素のコンセンサスヌクレオチド配列を翻訳して、L1のORF1およびORF2のアミノ酸配列を誘導した。これらの配列をNetCTLアルゴリズム (インターネット上のcbs.dtu.dk/services/NetCTL/) にアップロードして、A2およびB7スーパーファミリーエピトープの両方を予測した。これらのスーパーファミリーのそれぞれの、最上位スコアの予測されたエピトープを、両方について高いスコアを有し、したがって幅広い反応性の潜在性を有するペプチドを選択しする目的で相互参照した。ペプチドは、標準の9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニル (Fmoc) 化学によって合成した。たとえば、「Fmoc固相ペプチド合成：実用的な手法 (Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach)」W.C.ChanおよびP.D.White編 (2000) Oxford Univ. Pressを参照されたい。

ELISPOT。ELISPOTアッセイは、標準の手順を用いて行った (参考文献)。細胞を10<sup>5</sup>個のPBMC/ウェルで播種した。L1エピトープを表す個体ペプチドを10μg/mlで使用し、CMV pp65プールを5μg/ml/ペプチドで、HIV-1ビッグプールを1μg/ml/ペプチドで使用した。インキュベーションは、16時間、37、5%のCO<sub>2</sub>で行った。

#### 【0149】

CD8<sup>+</sup>T細胞のクローニング。2つの異なるクローニング方法を本研究で用いた：抗原特異的細胞をin vitro拡大によって濃縮する標準プロトコル、抗原特異的細胞を磁気捕捉によって濃縮したおよび磁気細胞分離 (MACS) 方法。

手短に述べると、CD8<sup>+</sup>T細胞は、ペプチドを用いて、全ex vivo PBMC

10

20

30

40

50

のコンテキスト中で16時間刺激した。この刺激に应答してサイトカイン(たとえばIFN- $\gamma$ )を産生するCD8<sup>+</sup>T細胞をサイトカイン捕捉試薬で標識し、磁気ビーズを用いた特異的標識を可能にした(IFN- $\gamma$ -分泌アッセイ、Miltenyi Biotech)。その後、これらの抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞をバルク集団から磁気分離によって濃縮し、段階希釈で播種し、CD3(クローンOKT3)およびCD28(クローンCD28.7)に対するmAb(どちらもebioscienceから)を用いて、照射した同種PBMCおよびB細胞リンパ腫系を使用して拡大した。

濃縮後、細胞を段階希釈で照射した支持細胞上に播種した。限界希釈の抗原特異的クローンを2回目の限界希釈に供した後、50U/mlのIL-2(Hoffman-La-Roche)を含むRPMI 10%のウシ胎児血清(FBS)中で拡大および維持し、照射した支持細胞を隔週で加えた。クローン「L1-30」がMACS方法によって得られた。

#### 【0150】

HIV-1感染。NL4-3および81AのHIV-1ストックは、FuGene6(Roche)を用いてHEK293T細胞を形質移入し、4日後に上清を収集することによって調製した。多様なクレードのHIV-1を表す初代単離体は、NIH AIDS試薬プログラムから受け取ったままの状態で使用した。活性化した初代CD4<sup>+</sup>T細胞標的は、標準の方法によって調製した。p24抑制アッセイおよび免疫沈降/ウエスタンプロット以外のすべての実験において、以前に記載されているように(Sacha, J. Immunol, 2007; 178: 2746~2754)、高レベルの感染を得るためにマグネトフェクションを用いた。p24抑制アッセイには、0.02感染多重度(MOI)のHIV-1を標的細胞に1時間加え、その後、洗い流し、感染を37 $^{\circ}$ C、5%のCO<sub>2</sub>で進行させた。

認識アッセイ。HIV-1に感染した細胞の認識についてCD8<sup>+</sup>T細胞クローンおよび系を試験することは、以前に記載されているように行った(Sacha, J. Immunol, 2007; 178: 2746~2754)。手短に述べると、再刺激の約2週間後、CD8<sup>+</sup>T細胞エフェクター系およびクローンをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、1:1の比(少なくともそれぞれ2 $\times$ 10<sup>4</sup>個)のHIV-1およびモック感染CD4<sup>+</sup>T細胞標的と合わせた。動力学的アッセイには、感染細胞を感染後の指定した時間に加えた。エフェクターおよび標的を37 $^{\circ}$ C、5%のCO<sub>2</sub>で1時間、一緒に培養した。CD107aが読取りとして示された実験では(たとえばTO2)、5 $\mu$ g/mlのPEとコンジュゲートした抗CD107a mAb(BD)をこの段階で加えた(1時間の同時培養の前)。その後、プレフェルジンAを10 $\mu$ g/mlの最終濃度まで加え、インキュベーションをさらに5時間進行させた。その後、細胞を、CD4およびCD8に対するmAbを用いて表面染色し、cytofix/cytoperm(Becton Dickinson; BD)を用いて透過処理し、その後、mAb(BD)を用いてインターフェロン-ガンマ(IFN- $\gamma$ )または腫瘍壊死因子-アルファ(TNF- $\alpha$ )のどちらかについて染色した。フローサイトメトリーは、LSRIIまたはFACSCalibur装置のどちらか(どちらもBD)で行った。

#### 【0151】

排除アッセイ。標的自己、またはHLAミスマッチCD4<sup>+</sup>T細胞を、マグネトフェクション(上記参照)によってHIV-1に同時感染させた。感染の2時間後、標的細胞を、洗浄したCD8<sup>+</sup>T細胞エフェクター系およびクローン(最近の再刺激の少なくとも3週間後)と1:1で混合した。標的およびエフェクターを48時間、37 $^{\circ}$ C、5%のCO<sub>2</sub>で同時培養した。細胞を、CD4およびCD8に対する蛍光色素とコンジュゲートしたmAb(BD)ならびにアミンレッド生存度色素(Invitrogen)で表面染色した。cytofix/cytoperm(BD)を用いた透過処理後、細胞を、HIV-1-Gagに対するフルオレセインイソチオシアネート(FITC)とコンジュゲートしたモノクローナル抗体(クローンKc57、Beckman Coulter)で染色した。分析はLSRIIフローサイトメトリー装置(BD)で行った。

10

20

30

40

50

p 2 4 産生の抑制。自己およびヒト白血球抗原 ( H L A ) ミスマッチ C D 4 + T 細胞標的を H I V - 1 N L 4 - 3 に感染させ ( 上記 H I V - 1 感染参照 )、 $2 \times 10^4$  個の細胞 / ウェルで 9 6 ウェルの丸底プレートに播種した。C D 8 + T 細胞エフェクターを最新の再刺激の 3 週間後に採取し、P B S で  $2 \times$  洗浄し、所望の比でウェルに加えた。エフェクター / 標的の混合物を、合計体積  $200 \mu\text{l}$  の、 $50 \text{ U} / \text{ml}$  の I L - 2 を添加した R P M I - 10 % の F B S 中でインキュベーションした。感染の 9 日後、 $100 \mu\text{l}$  の培地を取り出し、p 2 4 酵素連結免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) ( N C I F r e d e r i c k ) によって、製造者の指示に従ってアッセイした。p 2 4 の濃度は、N C I F r e d e r i c k によって供給される p 2 4 標準を用いた検量線に基づいて計算した。

H L A - A、B、C の遮断。抗 H L A - A、B、C マウスモノクローナル I g G 1 抗体 ( クローン G 4 6 - 2 . 6 )、およびマウス I g G 1 対照抗体は、B D B i o s c i e n c e s から得た。標的およびエフェクター集団を上述のように調製した。標的およびエフェクターを同時培養する前に、感染した標的細胞を、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$  の抗 H L A - A、B、C またはアイソタイプ対照と共に、30 分間、37、5 % の C O <sub>2</sub> でインキュベーションした。その後、エフェクターおよび標的細胞を上述のように同時培養し、認識について評価した。

【 0 1 5 2 】

結果

L 1 p 1 5 0 は H I V - 1 に感染した細胞中で検出可能であるが、非感染の初代 C D 4 + T 細胞中では検出可能でない。

C D 4 + T 細胞を H I V - 1 に感染していない個体由来の P B M C から濃縮し、C D 3 および C D 2 8 に対するモノクローナル抗体 ( m A b ) を用いて 4 8 時間刺激した。続いて、これらの細胞を、0 . 0 5 M O I で標準の感染プロトコルを用いて、H I V - 1 - N L 4 - 3 に感染させるか、モック感染対照として維持した ( 方法参照 )。細胞を、感染の 4 8 および 1 7 0 時間後の時点で、完全プロテアーゼ阻害剤カクテル ( R o c h e ) を添加した R I P A 緩衝液で溶解した。全細胞溶解液からのタンパク質を S D S - P A G E によって分離し、S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y の S 1 9 および C 1 6 抗 L 1 - O R F 2 ポリクローナル抗体 ( p A b ) を用いたウエスタンブロットによって分析した。これらの研究では、予測された分子量  $150 \text{ kDa}$  でいかなるバンドを検出することも失敗した。本アッセイの感度を増加させるために、本発明者らは、ウエスタンブロット分析の前に免疫沈降ステップを含めた。上記試料の全細胞溶解液からの  $5 \text{ mg}$  のタンパク質を、抗 L 1 p 1 5 0 S 1 9 抗体 ( S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y ) を用いたシーズクラシック ( G ) 免疫沈降キット ( P i e r c e ) を使用して免疫沈降した。保持された画分を S D S - P A G E によって分離し、その後、S 1 9 抗体、または抗 L 1 - p 1 5 0 C 1 6 抗体 ( S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y ) のどちらかを用いたウエスタンブロットでプロービングした。

【 0 1 5 3 】

ウエスタンブロットを S 1 9 または C 1 6 のどちらかでプロービングした場合には、H I V - 1 N L 4 - 3 感染の 1 7 0 時間後の試料中で、予測された L 1 - p 1 5 0 の分子量  $150 \text{ kDa}$  にバンドが観察された ( 図 1 A、B )。このバンドは、モック感染試料、および H I V - 1 感染の 4 8 時間後の試料の両方では存在しなかった。L 1 - p 1 5 0 - S 1 9 免疫沈降画分を抗 H I V - 1 - G a g でプロービングした場合は、バンドは検出されなかった。これらのデータは、初代 C D 4 + T 細胞の *in vitro* の H I V - 1 感染が L 1 - p 1 5 0 の発現をもたらすことを実証している。免疫沈降およびウエスタンブロット後にかすかなバンドしか検出されなかったことは、L 1 - p 1 5 0 が、H I V - 1 感染細胞中で低レベルでしか発現されていないことを示している。このことは、高レベルの L 1 - p 1 5 0 の発現は毒性があることを示す最近のデータと矛盾しない ( W a l l a c e、G e n e .、2008 ; 418 ( 1 ~ 2 ) : 75 ~ 81 )。しかし、低レベルの L 1 p 1 5 0 の発現が、細胞免疫応答を刺激するために十分であり得る。

【 0 1 5 4 】

図1Aおよび1B. L1-p150は、HIV-1に感染した初代CD4<sup>+</sup>T細胞中で発現される。HIV-1に感染していない個体からの初代CD4<sup>+</sup>T細胞を、48時間の抗CD3/CD28を用いた刺激によって活性化した。その後、細胞を2つのアリコートへと分割し、0.05MOIのHIV-1-NL4-3に感染させるか、またはモック感染対照として維持した。アリコートを感染(またはモック感染)の48および170時間後に採取し、プロテアーゼ阻害剤を含むRIPA緩衝液に溶解した。溶解物をポリクローナル抗L1-p150抗体S19(Santa Cruz Biotechnologies)で免疫沈降した。これらの免疫沈降からの溶出液を濃縮し、SDS-PAGEによって分離し、抗L1-p150抗体S19または抗L1-p150抗体C16(Santa Cruz Biotechnologies)のどちらかを用いたウエスタンブロットでプロービングした。図1A. S19抗体で免疫沈降し、C16抗体でプロービングした試料のウエスタンブロット。図1B. S19抗体で免疫沈降およびプロービングをどちらも行った試料のウエスタンブロット。それぞれのプロットのレーン1にはPage Rulerタンパク質ラダー(Fermentas)を載せ、レーン2には大腸菌中で発現されるL1-p150のエンドヌクレアーゼドメインを載せた(p150検出の陽性対照であるが、L1-ORF2pの断片でしかないので、はるかに小さな分子量で流れる)。55kDaおよび25kDaの濃いバンドは、免疫沈降で用いた抗体の重鎖および軽鎖を表す。S19およびC16はどちらもヤギに由来するため、二次抗体は、プロービングおよび免疫沈降のどちらで使用した抗体とも反応する。陽性対照L1-エンドヌクレアーゼドメインは免疫沈降しなかったため、これらのバンドはこのレーンに存在しない。

10

20

#### 【0155】

L1に対する細胞免疫応答はHIV-1に感染した個体からのPBMC中で検出可能である。

コンセンサス「ホット」L1 p40およびp150配列を、NetCTLアルゴリズムを用いて分析して、潜在的なHLA A02、B07、およびB58制限T細胞エピートープを予測した。7個のp40および10個のp150エピートープに対応するペプチドを作製し、多様な臨床特徴を有する60人のHIV-1に感染した個体(SCOPEコホート、ペプチド配列には図13に示す表、対象の特徴には図16に示す表を参照)、および27人の危険性の低いHIV-1に感染していない個体からのPBMC中でIFN- $\gamma$ 産生を刺激するその能力について、ELISPOTによって試験した。HIV-1に感染した個体において、p40およびp150のどちらに由来するエピートープにも対する頻繁なIFN- $\gamma$  応答、ならびにHIV-1に感染していない個体における応答の欠如が観察された(図2)。

30

図2. HIV-1に感染した個体の末梢血中ではL1に対する免疫応答が存在するが、感染していない個体では存在しない。60人のHIV-1に感染した個体および27人のHIV-1に感染していない対象からの凍結保存したPBMCを、10<sup>5</sup>個の細胞/ウェルで、IFN- $\gamma$  ELISPOTアッセイにおいて、合成L1 p40(ORF1p)およびp150(ORF2p)ペプチドに対する応答性について試験した。ORF1pペプチドは接頭文字「L101」によって示し、ORF2pは接頭文字「L102」によって示す。ペプチドの配列および特徴は、図15に示す表に示す。HIV-1に感染した対象の情報は、図16および17に示す表に示す。

40

#### 【0156】

L1 p150特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンはHLAに制限された様式でHIV-1に感染した細胞を特異的に認識する。

L1-p150エピートープ「KVYRFNAI」(KI9; 配列番号10)に特異的な6個のCD8<sup>+</sup>T細胞クローンを、および2個のCMV-pp65特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンを、HAARTなしに>10年間の間検出不可能なウイルス量を維持したHIV-1に感染した個体から得た。これらのクローンを、以前に記載されている細胞内サイトカイン染色に基づいた認識アッセイを用いて、自己のHIV-1感染細胞に対して特異的に応答するその能力について試験した(Sacha, J. Immunol, 2007; 1

50

78 : 2746 ~ 2754)。手短に述べると、CD4<sup>+</sup>T細胞を自己PBMCから濃縮し、HIV-1 NL4-3に感染させるか、またはモック感染対照として維持した。クローンを、モック感染、HIV-1-NL4-3に感染した標的、および同族ペプチドでパルスしたモック感染標的と共に6時間同時培養し、CD107a染色およびクローンからのIFN- $\gamma$ 産生のレベルをフローサイトメトリーによって評価した。これらのデータを図3Aに要約する。

#### 【0157】

試験したすべてのL1-p150-KI9およびCMV-pp65に特異的なクローンによる、ペプチドでパルスしたモック感染標的の認識が観察された。6個のL1-p150-KI9特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンのそれぞれについて、HIV-1に感染した標的細胞の強い認識が観察された。これは、CMV-pp65特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンによるHIV-1に感染した標的細胞の認識の欠如と対照的である。図3B~Eは、L1-p150-KI9特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローン「L1-30」の詳細なデータを示す。KI9エピトープは、HIV-1-NL4-3中のどの配列とも高い度合いの同一性を保有しない(最高で、NL4-3配列:NCBI受託番号M19921とのcluster alignmentによる1/9個のアミノ酸同一性)。

#### 【0158】

L1-p150-KI9特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンがHIV-1由来のペプチドを直接相互認識することは期待されていなかった。しかし、この可能性は、L1-30-KI9クローンが、すべてのHIV-1コンセンサス配列遺伝子産物にわたる重複する15量体のプール、「HIV-1-ビッグプール」に対して、IFN- $\gamma$  ELISPOTによって応答するかどうかを試験することによって、直接検査した。このクローンは、HIV-1-ビッグプールを認識することに失敗した一方で、その同族L1-p150ペプチドの強力な認識を示す。平行して、同じ個体から得られたHIV-1-Gag特異的クローンを、HIV-1-GagプールおよびHIV-1-ビッグプールの両方を認識する能力について試験し、どちらのプールに対しても同様の規模の応答が観察された(図3B)。次に、クローンL1-30を、自己およびHLA mismatch HIV-1-NL4-3に感染したおよびモック感染標的細胞の認識について試験した。自己のHIV-1感染標的細胞の強力な認識が観察され、高レベルのCD107a染色、およびIFN- $\gamma$ の産生が明示された(89.2%のCD107a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>) (図3C)。これは、モック感染自己標的(23.8%のCD107a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>)、またはモックもしくはHIV-1のどちらかに感染したHLA mismatch標的(それぞれ14.1%および11.2%のCD107a<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>)との同時培養後に、CD107a<sup>+</sup>またはIFN- $\gamma$ <sup>+</sup>クローン細胞のどちらかが低頻度であることと対照的である。この実験をさらに4回繰り返し、同様の結果となった。一緒にすると、これらのデータは、L1-p150特異的T細胞が、HIV-1ペプチドを直接認識せずに、HLAに制限された様式でHIV-1に感染した細胞を認識することを支持している。

#### 【0159】

自己細胞の認識がHIV-1の用量に依存しているかどうかを決定するために、クローンL1-30エフェクター細胞を、 $1.6 \times 10^{-4} \sim 2.0 \times 10^{-2}$ の範囲のMOIの4倍段階希釈のHIV-1-NL4-3に感染した等数の自己CD4<sup>+</sup>T細胞標的、およびモック感染対照と混合した。上記のように、CD107aに対するmAbを同時インキュベーションに含め、CD107a染色は、クローン応答性の読取りとしてフローサイトメトリーによって評価した。CD107a染色は、モック感染の0.56%のCD107a<sup>+</sup>から $2 \times 10^{-2}$ のMOIの16.7%のCD107a<sup>+</sup>の範囲の、増加するHIV-1力価に伴って、用量依存的な様式で増加した(図3D)。L1特異的クローンがHIV-1感染細胞を認識する動力学的を検査した(図3E)。高力価のHIV-1および以前に記載したマグネトフェクションプロトコルを用いて、標的細胞のHIV-1感染を同期した(Sachal, J. Immunol, 2007; 178:2746~2754)(方法参照)。感染後の様々な時点に、L1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンを感染した標

10

20

30

40

50

的と1時間混合し、その後、プレフェルジンA (BFA)で治療し、さらに5時間インキュベーションした。図3E中に示す時間は、標的およびクローンを最初に混合した感染後の時間を表す。BFAの添加は、新しく産生されたペプチド:MHC複合体が細胞表面へと輸送されることを防止し、したがって、培養物上のT細胞に提示されたエピトープが、BFAの添加時存在するものに限定される。以前の実験と同様、CD107aおよびサイトカイン染色をクローン刺激の読取りとして用いた。図3Eに示すデータは、クローン細胞上のTNF- $\alpha$ 染色を表し、CD107aまたはIFN- $\gamma$ を読取りとして使用することで、比較可能な動力的がもたらされる。L1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンによる標的の認識はHIV-1感染の2時間以内に一貫して観察され、応答のピークは12時間で82.4%のTNF- $\alpha$ であった。

10

#### 【0160】

図3A~E. L1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は感染の2時間以内にHIV-1感染細胞を特異的に認識する。A. 6個のL1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンおよび2個のCMV特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンを、エリートコントローラーHIV-1感染個体から限界希釈方法によって得た。これらのクローンを、HIV-1-NL4-3に感染した、モック感染対照として維持した、または同族ペプチドでパルスした自己CD4<sup>+</sup>T細胞標的と同時培養した。標的細胞の認識は、CD4、CD8、CD107a、およびIFN- $\gamma$ に対するmAbを用いた細胞内サイトカイン染色フローサイトメトリーによって評価した。モック感染細胞に対するバックグラウンド応答を減算した後の%のIFN- $\gamma$ 産生クローン細胞(CD8<sup>+</sup>ゲート)を示す。B. クローンは、同族ペプチドに対する応答性、およびHIV-1ビッグプール(すべてのHIV-1遺伝子産物にわたる15量体ペプチドからなる)に対する交差反応性について、IFN- $\gamma$  ELISPOTによって確認された。3つ組で試験したL1-ORF-2-KVIYRFNAI(配列番号10)エピトープに特異的なクローン「L1-30」からの結果を示す。また、平行して、HIV-1-Gag特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンを、Gagプールペプチド、およびHIV-1ビッグプールに対する応答性について試験したことも示す。どちらのクローンにも、ブドウ球菌エンテロトキシンB(SEB)を陽性対照として用いた。C. L1p150-KVIYRFNAI(配列番号10)特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンL1-KI9-30の代表的な認識アッセイデータを示す。D. L1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンL1-KI9-30を、0~0.02MOIのHIV-1-NL4-3の段階希釈に感染した自己CD4<sup>+</sup>T細胞標的の認識について試験した。認識は、フローサイトメトリー、刺激期間の開始時にmAbを加えた脱顆粒マーカーCD107aの染色によって評価した。E. クローンL1-KI9-30を、HIV-1-NL4-3の感染の0、2、6、12、および24時間後における自己CD4<sup>+</sup>T細胞標的の認識について試験した。標的の同時HIV-1感染はマグネトフェクションによって達成した(方法参照)。ペプチドのMHC-I提示は、プレフェルジンAを添加することによって示した時点で停止させ、刺激をさらに5時間進行させた。

20

30

#### 【0161】

L1 p150特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンはHIV-1に感染した細胞を特異的に排除し、ウイルス複製を抑制する。

40

L1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンによるHIV-1感染細胞の認識が、HIV-1に感染した細胞の排除をもたらすかどうかを決定した。標的自己、またはHLAミスマッチCD4<sup>+</sup>T細胞を、HIV-1 81AのNL4-3/Ba-Lキメラクローン(Ba-Lに由来し、CCR5向性を与えるenvのV1~V3領域を例外として、81AはNL4-3の類遺伝子である)に、マグネトフェクションによって同時感染させた。感染の2時間後、標的細胞を、PBMCで十分に洗浄した後のL1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンL1-30と1:1で混合したか、または追加のエフェクターなしで平行に維持した。標的およびエフェクターを48時間同時培養した。その後、細胞をCD4およびCD8について表面染色し、PEとコンジュゲートしたmAb、クローンKc57(Beckman Coulter)を用いてHTV-1-Gagについて細胞内染色した。フローサイト

50

メトリー分析により、L1-30-KI9を存在させずに培養した場合に、自己およびHLAミスマッチ標的細胞の強い感染が明らかとなった（それぞれ24.5%および31.5%）。Gag<sup>+</sup>標的細胞の頻度の劇的な減少が、L1-30-KI9と同時培養した自己細胞で観察され、Gag<sup>+</sup>標的細胞の頻度の緩和な減少のみがHLAミスマッチ対照で観察された（独立した自己排除アッセイで93.1%および92.7%の減少に対して、独立したHLAミスマッチ排除アッセイで30.5%および31.1%の減少）（図4A）。したがって、L1-p150特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンL1-30-KI9は、HIV-1に感染した初代CD4<sup>+</sup>T細胞を*in vitro*で特異的に排除する。

#### 【0162】

L1-30-KI9が、HIV-1に感染した細胞を感染後（2時間以内）に非常に迅速に認識し、HIV-1に感染した細胞を排除する能力を考慮して、本発明者らは、このクローンが用量依存性様式でHIV-1複製を*in vitro*で抑制すると仮説をたてた。自己およびHLAミスマッチCD4<sup>+</sup>T細胞標的を、標準の感染プロトコルを用いて0.02MOIのHIV-1NL4-3に感染させた（マグネトフェクションではない、プロトコル参照）。これらの標的細胞を $2 \times 10^4$ 個の細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種した。CD8<sup>+</sup>T細胞エフェクターを最新の再刺激の3週間後に採取し、PBSで洗浄し、1:1~1:3125のエフェクター:標的の比の範囲の5倍段階希釈で加えた。それぞれのエフェクター:標的の比を3つ組で試験し、標的のみおよびエフェクターのみの対照も同様である。同じ個体からの、L1-30-KI9 L1-p150特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンおよびCMV特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンを、どちらも自己およびHLAミスマッチ標的細胞に対して試験した。感染後9日目に、上清をHIV-1粒子産生の読取りとしてp24 ELISAによってアッセイした（NCIFredrick）。自己標的細胞からのp24の産生はL1-30-KI9クローンによって強力に抑制され、最大の抑制は1:4のエフェクター:標的の比で観察された（図4B）。したがって、L1-p150特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンL1-30-KI9は、HIV-1-ウイルス粒子の産生を強力に阻害する。

#### 【0163】

図4Aおよび4B. L1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンによるHIV-1に感染した細胞の排除およびウイルス産生の抑制。A. CD4<sup>+</sup>T細胞標的をマグネトフェクションによってHIV-1-NL4-3に同時感染させた。L1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンL1-30-KI9を感染した自己およびHLAミスマッチ標的に1:1の比で加えた。対照感染培養物を、CD8<sup>+</sup>T細胞の添加なしで平行に維持した。感染を18時間進行させ、この時点で、細胞をCD4に対するmAbで表面染色し、HIV-1-Gagに対するmAb（Ki67、Beckman Coulter）で細胞内染色した。HIV-1-Gag（x軸）対CD4（y軸）のフローサイトメトリープロットを示す。クローン抑制は2つ組で示す。B. CD4<sup>+</sup>T細胞標的を0.02MOIのHIV-1-NL4-3に感染させ、15,000個の細胞/ウェルで96ウェルプレートに播種した。エフェクターCD8<sup>+</sup>T細胞クローン（L1-30）を所与の比で加え、感染を9日間進行させた。この時点で、上清中のHIV-1-p24レベルを、3つ組で既知のp24濃度の標準と共に試験した。検量線に基づいて計算したp24の濃度を示す。誤差バーは標準偏差を表す。

#### 【0164】

L1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞は、多様なHIV-1およびHIV-2の単離体に感染した細胞を包括的に認識する。

L1特異的T細胞は、HIV-1に感染した細胞の表面上に提示される、安定してゲノムにコードされるL1抗原を認識するため、これらの細胞の認識は、HIV-1-配列の可変性とは独立しているはずである。5個の研究室に適応した単離体および37個の初代単離体を含む42個の多様なHIV-1ウイルスのパネルを、NIH AIDS 試薬プログラムから獲得した。クレードによるこれらの初代単離ウイルスの分類は、クレードB-9個の単離体、クレードC-10個の単離体、クレードD-4個の単離体、クレードA-

10

20

30

40

50

8個の単離体、クレードE - 1個の単離体、クレードG - 1個の単離体、CRFO1\_\_AE - 2個の単離体、CRFO2\_\_AG - 2個の単離体であった。向性では、パネルは、4個のCXCR4向性ウイルス、27個のCCR5向性ウイルス、2個の二重向性ウイルス、および4個の未知の向性のウイルスを含む。NCBI受託番号を含めたこれらの単離体の詳細は図18に示す表に示す。この多様なHIV-1のパネルに加えて、HIV-2の単離体「60145K」をNIH AIDS試薬プログラムから得た。

図18に示す表中の実験コードは以下のとおりである：TO1：最初の多様な単離体認識アッセイ（カナダ、Torontoで行った）；SF1：多様な単離体認識アッセイ（カリフォルニア州San Franciscoで行った）；TO2：多様な単離体認識アッセイ（カナダ、Torontoで行った）。

#### 【0165】

L1-p150特異的クローンL1-30-KI9を、上述のフローサイトメトリーアッセイを用いて、自己およびHLAミスマッチ初代CD4<sup>+</sup>T細胞の認識について試験した。パネルを3つの別々の実験：「TO1」、「SF1」、および「TO2」で試験した。これらの実験の日付およびそれぞれで試験したウイルスを図18に示す表に示す。TO1のデータを図5に示し、図6をSF1、図7をTO2に示す。それぞれの実験で、モック感染対照を、非感染の自己CD4<sup>+</sup>T細胞に対するクローンL1-30のバックグラウンド応答性の測度として用いた。追加の対照の様々な組をそれぞれの実験に組み込み、応答性の様々な読取りを用いた。TO1（図5）CD107a染色（脱顆粒）およびTNF- $\alpha$ 産生を認識の読取りとして用いた。

試験したHIV-1単離体のそれぞれに感染した自己標的の認識およびHIV-2に感染した自己標的の認識が観察された。HLAミスマッチCD4<sup>+</sup>T細胞をHIV-1-1165MBおよびHIV-1-IIBに感染させ、L1-30クローンをこれらの標的の認識について試験し、これはMHC-I非依存性の認識を示す。これらの対照の認識は観察されなかった。平行して、クローンL1-30が、自己またはHLAミスマッチCD4<sup>+</sup>細胞標的のどちらかによって提示されるその同族ペプチド「KI9」を認識する能力を試験した。ペプチドでパルスした自己標的のみの認識が観察された。この実験で用いた追加の対照は、L1-30と同じ個体由来するCMV-p65特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンを、HIV-1に感染した自己標的細胞の認識について試験することであった。このCMV-p65特異的クローンをを用いた認識の欠如が観察され、L1-p150特異的クローンL1-30によるHIV-1に感染した細胞の認識の特異的性質がさらに支持された（図5）。

#### 【0166】

図5A~E、多様なHIV-1パネルおよびHIV-2を用いたL1特異的T細胞クローン認識アッセイ。図3に詳述した認識アッセイを、多様なHIV-1単離体のパネル、およびHIV-2 60145Kに感染した初代CD4<sup>+</sup>T細胞を用いて、クローンL1-30で繰り返した（ウイルスの詳細には図18に示す表参照）。CD107aをTNF- $\alpha$ による脱顆粒のマーカーとしてプロットした、CD8<sup>+</sup>細胞（クローン）でゲートしたフローサイトメトリーデータを示す。図5Aおよび5Bは、所与のウイルスに感染した自己細胞に対するクローンの応答を示す（モック=非感染、モック+KI9ペプチド=10 $\mu$ g/mlの合成KI9ペプチドでパルスした非感染の細胞）。HLAミスマッチCD4<sup>+</sup>T細胞標的をこれらのウイルスのサブセットに感染させ、対照として試験した。図5Cに示す結果は、クローンL1-30が自己を認識するがHLAミスマッチ感染標的細胞を認識しないことを実証している。L1-p150特異的クローンL1-30と同じ個体から得たCMV-p65特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンも自己の感染標的の認識について試験し、認識の欠如が実証された（図5DおよびE）。

実験（図6A~D）では、SF1 CD107a染色（脱顆粒）およびIFN- $\gamma$ 産生を認識の読取りとして使用した。自己およびHLAミスマッチCD4<sup>+</sup>細胞標的の両方を、試験した7個のウイルスのそれぞれに感染させた。比較可能な規模の感染が、試験したウイルスのそれぞれについて自己およびHLAミスマッチ標的細胞で観察された（図6A

10

20

30

40

50

、B)。クローンL1-30を、これらの標的のそれぞれの認識について試験した。これらのウイルスのそれぞれに感染した自己CD4<sup>+</sup>細胞標的の認識が観察され、これはHLAミスマッチ標的感染細胞の認識の欠如と対照的であった。

#### 【0167】

図6．L1特異的T細胞クローンの多様なHIV-1パネル認識アッセイ「SF1」。  
L1-p150特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンを、追加の多様なHIV-1の単離体の認識についてさらに試験した。実験の設定は図5に示すものと同様であり、ウイルスの詳細は図18に示す表から入手可能である。A、B．A．自己およびB．HLAミスマッチCD4<sup>+</sup>T細胞標的におけるHIV-1感染のレベルの評価として、CD4染色によるHIV-1-Gag染色を示す、フローサイトメーターデータを示す。C、D．C．自己およびD．HLAミスマッチ標的に対するクローン細胞の応答性の評価として、CD107a染色によるIFN- $\gamma$ 染色を示す、CD8<sup>+</sup>T細胞(クローン)でゲートしたフローサイトメーターデータを示す(「モック」=非感染の細胞、BCL+KI9ペプチド=10 $\mu$ g/mlのKI9ペプチドでパルスした自己B細胞系)。

実験TO2では、CD107a染色(脱顆粒)およびIFN- $\gamma$ 産生を認識の読取りとして用い、さらに17個のHIV-1-単離体に感染した自己CD4<sup>+</sup>標的細胞の認識についてクローンL1-30を試験した(図7)。標的細胞をSF1よりも低いレベルのHIV-1に感染させ、より低いレベルの認識がもたらされた。様々な単離体に感染した標的細胞の認識のレベルにある程度の可変性が観察された(1.49%~8.21%のCD107a<sup>+</sup>)。クローンによって示された応答のレベルが、CD4<sup>+</sup>T細胞標的集団内の感染のレベルに相関していたかどうかを試験した。感染した標的細胞の%を、抗HIV-1-Gag(Kc57-RD1、BD Biosciences)を用いたフローサイトメーター染色によって測定し、%CD107a<sup>+</sup>クローン細胞に対してプロットした。

#### 【0168】

図7．L1特異的T細胞クローンの多様なHIV-1パネル認識アッセイ「TO2」。  
L1-p150特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンを、追加の多様なHIV-1の単離体の認識についてさらに試験した試験した。実験の設定は図5、6に示すものと同様であり、ウイルスの詳細は図18に示す表から入手可能である。

これら2つのパラメータ( $R = 0.5766$ 、 $p = 0.0078$ 、図8)の間で強力な相関が観察され、これは、これらの様々なウイルスストックを用いた様々なレベルのHIV-1感染が、標的細胞に対するクローン応答性のレベルの可変性に主に貢献していることを示している。さらに、感染した標的細胞あたりの認識の度合いが、任意の特定のウイルスクレードについて、一貫してより高いまたは低いわけではないことが観察された(図8)。ウイルス配列の可変性はクレード内で多発しているため、HIV-1単離体の配列可変性は、L1-p150特異的クローンL1-30で観察された認識の度合いの要因ではないという証拠を提供する。実験TO2の追加の対照として、HIV-1-89SM\_145またはHIV-1-94US\_3393のどちらかに感染した標的細胞を、10 $\mu$ g/mlのHLA-A、B、Cに対する遮断抗体(クローンG46-2.6、BD Biosciences)と共にプレインキュベーションすることが、クローンL1-30による認識を防止するかどうかを試験した。これを、感染した標的細胞と等量のIgG1アイソタイプ対照とのプレインキュベーションに比較した。HLA-A、B、Cとのプレインキュベーションで認識の強力な阻害が観察された(図9)。一緒にすると、これらのデータは、L1-p150-KI9特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローン「L1-30」は、配列可変性とは独立して、MHC-1に制限された様式で、HIV-1またはHIV-2に感染した細胞を認識することを実証している。

#### 【0169】

図8．多様なHIV-1-単離体に感染した自己細胞に対するクローンL1-30の応答性の度合いは、感染のレベルに相関する。図7に示す認識アッセイで使用した標的集団中のHIV-1に感染した細胞のパーセンテージをフローサイトメーターによって測定し、HIV-1-Gagに対する蛍光色素抗体(Kc57-RD1)で染色した。脱顆粒(

CD107a+)によるクローンL1-30応答のパーセンテージによる、感染した標的(x軸)のパーセンテージを示す。

図9. 抗HLA-A、B、C抗体とのプレインキュベーションによる感染細胞の認識の遮断。図7に示す認識アッセイでは、ウイルス89SM\_145および94\_US\_3393の認識も、自己標的細胞を10µg/mlの抗HLA-A、B、C抗体(クローンG46-2.6、BD Biosciences)または10µg/mlのIgG1アイソタイプ対照と共にプレインキュベーションした後に試験した。CD107a染色によるCD8染色(脱顆粒のマーカーとして)を示すフローサイトメトリーデータを示す。

【0170】

(実施例3)

L1特異的T細胞クローンは多様なHIV-1の単離体に感染した細胞の死滅を媒介するL1-ORF-2-KVIYRFNAI(配列番号10)エピトープ特異的クローン「L1-30」を、HIVに感染した細胞の死滅について試験した。

L1-30クローンが由来する個体およびHLAミスマッチ個体の2人のドナーからのCD4<sup>+</sup>T細胞標的を、多様なHIV-1の単離体のパネルを用いてマグネトフェクションによって同時感染させ、感染を24時間進行させた。L1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞クローンL1-30-KI9を、感染した自己およびHLAミスマッチ標的に、1:15のクローン:標的の比で加えた。対照感染培養物を、CD8<sup>+</sup>T細胞の添加なしで平行に維持した。感染をさらに18時間進行させ、この時点で、細胞を、CD4に対するmAbで表面染色し、HIV-1-Gagに対するmAb(Ki67、Beckman Coulter)で細胞内染色した。感染の度合いは、フローサイトメトリーアッセイにおいてKi67+に染色される細胞の%として測定した。データを図19に示す。

図19に示すように、LINE-1-ORF2p特異的クローンL1-30-KI9は、試験したHIV-1のすべての単離体に感染した自己細胞を強力に排除した。クローンと同時培養したHLAミスマッチ標的における感染レベルの減少は、自己標的で観察されたものよりも規模が小さかった。データは、LINE-1特異的CD8<sup>+</sup>T細胞が、多様なHIV-1の単離体に感染した自己細胞を特異的に認識および排除することを実証している。

【0171】

(実施例4)

L1特異的T細胞クローンはHIVに感染した細胞の死滅を媒介する。

CD8<sup>+</sup>T細胞を、治療なしで感染の自然の制御を示しているHIVに感染した個体(HIVウイルス量<50個のコピー/mlのbDNA)から単離した。これらの細胞を、*in vitro*で7日間、LINE-1-ORF1-RPNLRIGV(配列番号9)、HIV-Gagプールペプチド(NIH AIDS試薬プログラムからのコンセンサスペプチド)、CMV pp65プールペプチド(JPT Peptide Technologies)のいずれかと共に、ペプチドでパルスした自己B細胞リンパ腫系を用いて拡大した。これらの拡大したB細胞系を、1:1の比で、HIV-1-NL4-3に感染させたか、またはモック感染対照として維持した自己CD4<sup>+</sup>T細胞と混合した。陽性対照として、拡大した系を、ペプチド(RPNLRIGV(配列番号9)、プールしたGagペプチド、またはプールしたCMV pp65ペプチドのいずれか)でパルスした、HIV-1-NL4-3に感染した自己CD4<sup>+</sup>T細胞とも混合した。

エフェクターおよび標的を、37、5%のCO<sub>2</sub>で1時間、一緒に培養した。5µg/mlのPEとコンジュゲートした抗CD107a mAb(BD)をこの段階で加えた(1時間の同時培養の前)。その後、プレフェルジンAを10µg/mlの最終濃度まで加え、インキュベーションをさらに5時間進行させた。その後、細胞を、CD4およびCD8に対するmAbを用いて表面染色し、cytofix/cytoperm(Beckton Dickinson; BD)を用いて透過処理し、その後、mAb(BD)を用いて、インターフェロン-ガンマ(IFN-)または腫瘍壊死因子-アルファ(TNF-)のどちらかについて染色した。フローサイトメトリーをFACSCalibur装置

10

20

30

40

50

( B D ) で行った。

【 0 1 7 2 】

結果は、H I V - 1 - N L 4 - 3 に感染した自己細胞が、L I N E - 1 - R P N L R L I G V ( 配列番号 9 ) で拡大した C D 8 + T 細胞、および H I V - 1 - G a g で拡大した C D 8 + T 細胞を刺激することを示している。H I V - 1 N L 4 - 3 に感染した自己細胞は、C M V - p p 6 5 で拡大した C D 8 + T 細胞を刺激しなかった ( 陰性対照として用いる ) 。データは、L I N E - 1 特異的 C D 8 + T 細胞が H I V - 1 に感染した細胞を特異的に認識することを実証している。

本発明を、その具体的な実施形態を参照しながら説明したが、当業者には、本発明の真の精神および範囲から逸脱せずに、様々な変更を行い、均等物で置き換え得ることが理解されよう。さらに、本発明の特定の状況、材料、組成物、方法、方法ステップまたは複数のステップ、目的、精神および範囲に適應するために、多くの改変を行い得る。すべてのそのような改変が、本明細書に添付する特許請求の範囲内にあることが意図される。

【 図 1 A - B 】

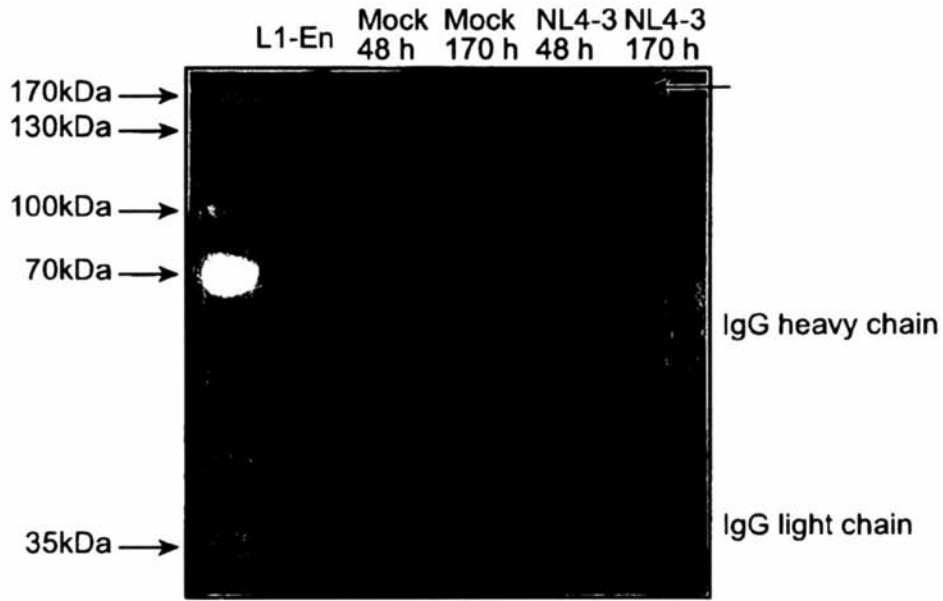


FIG. 1A

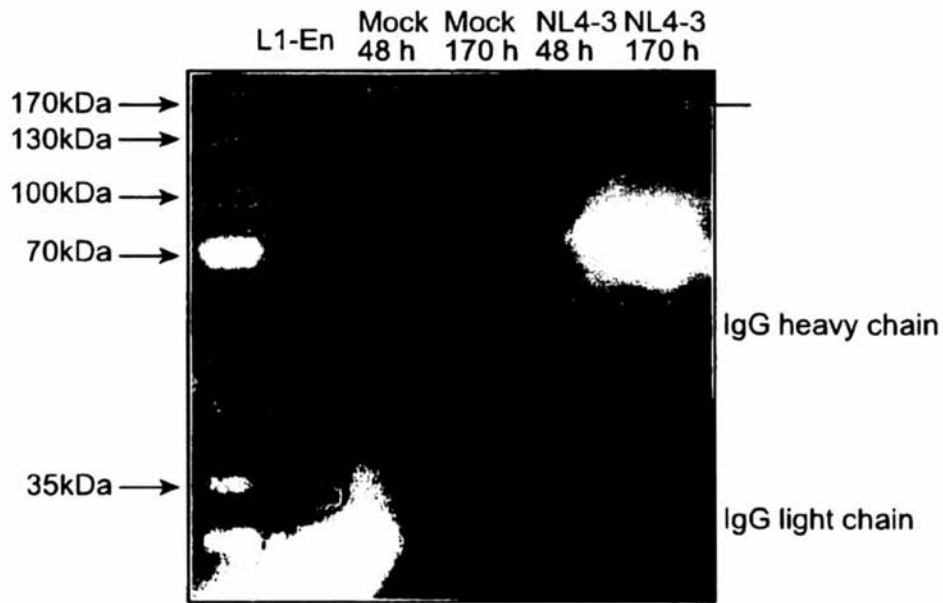
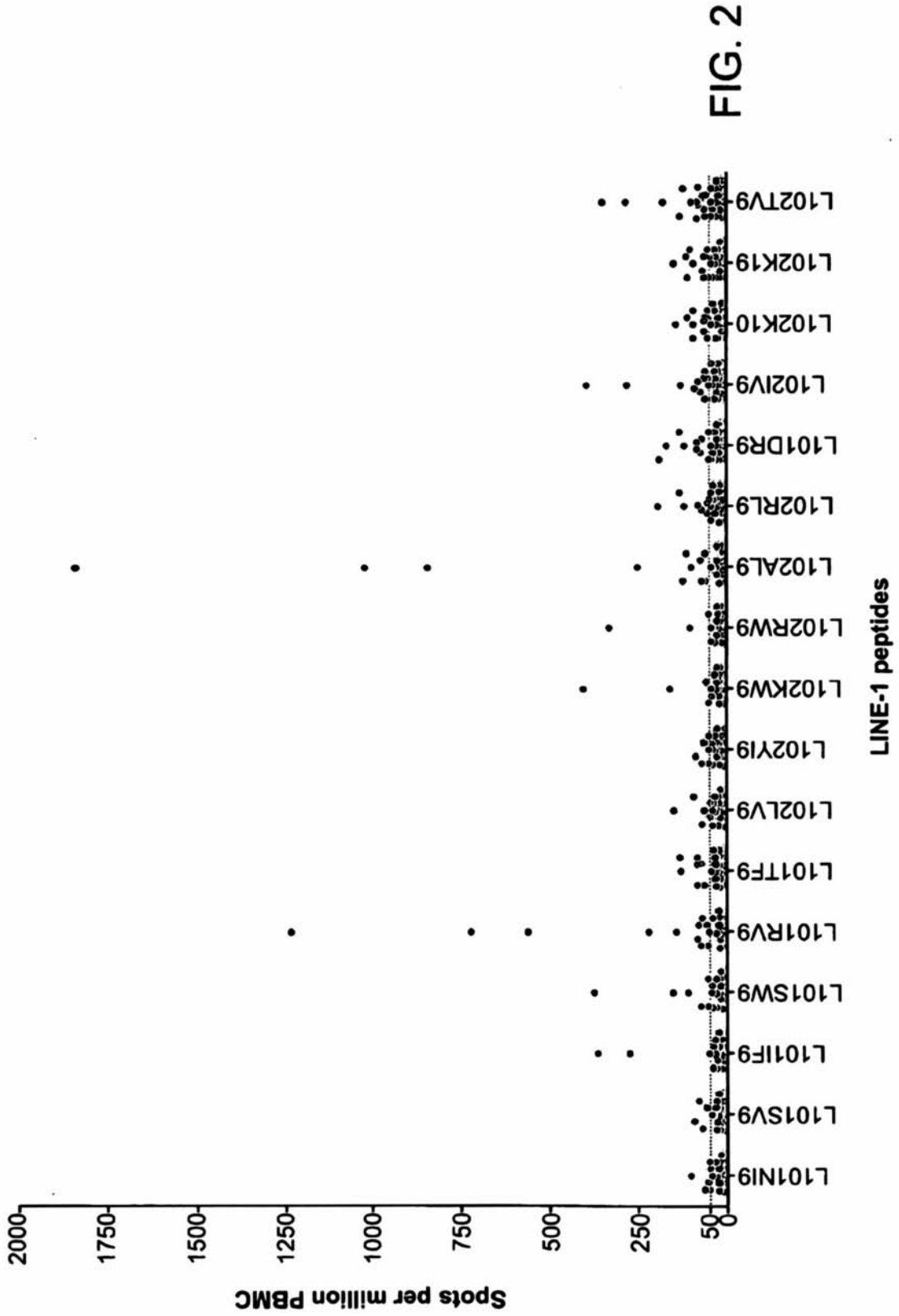


FIG. 1B

【 図 2 】



【 図 3 A - B 】

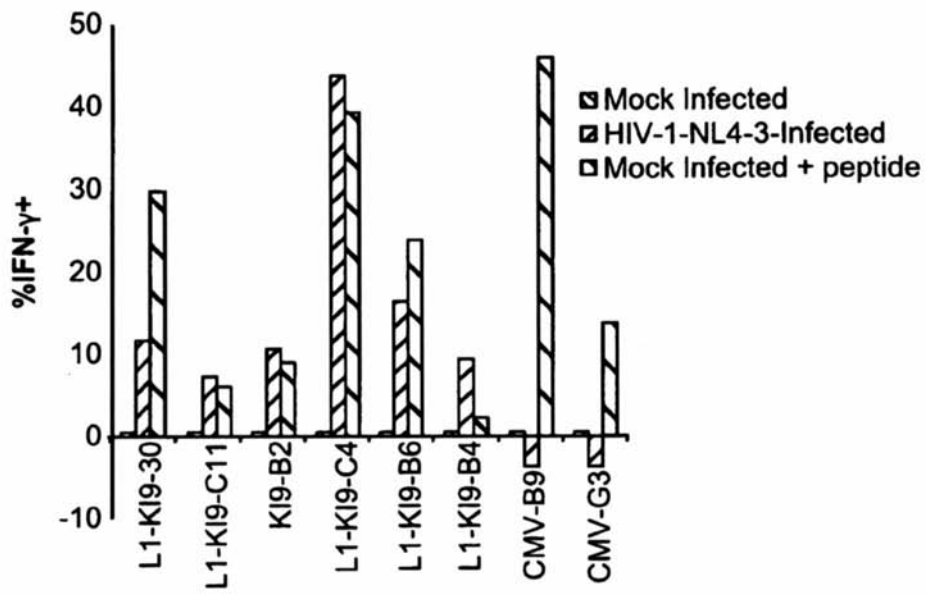


FIG. 3A

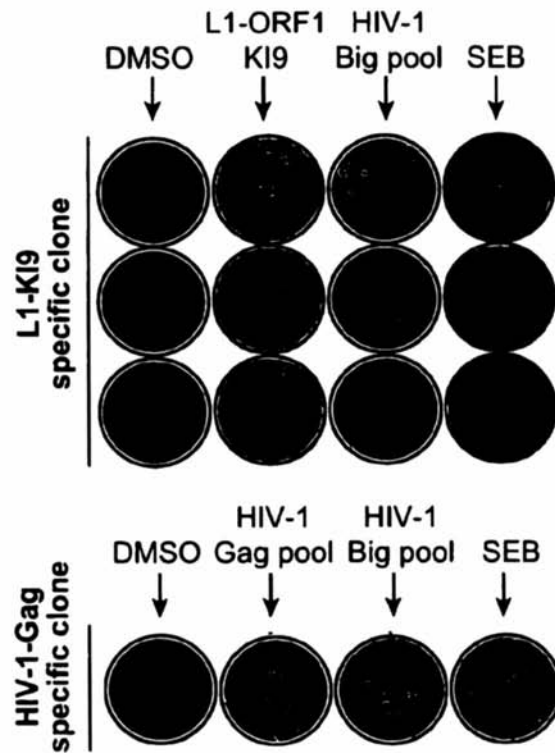


FIG. 3B

【 図 3 C 】

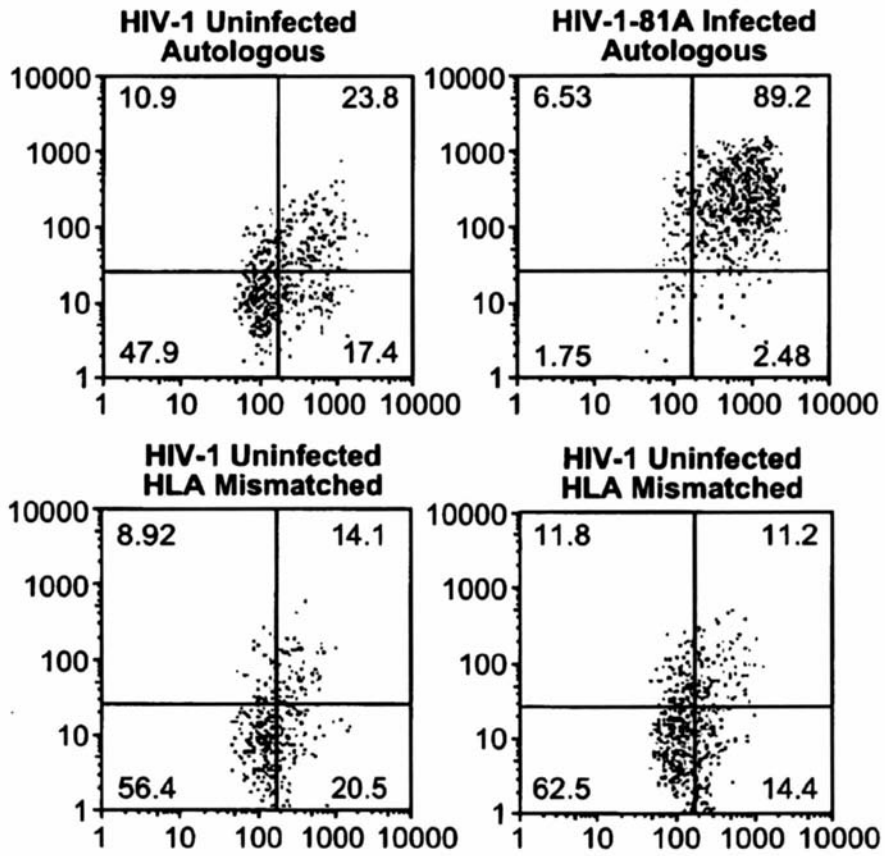


FIG. 3C

【 図 3 D 】

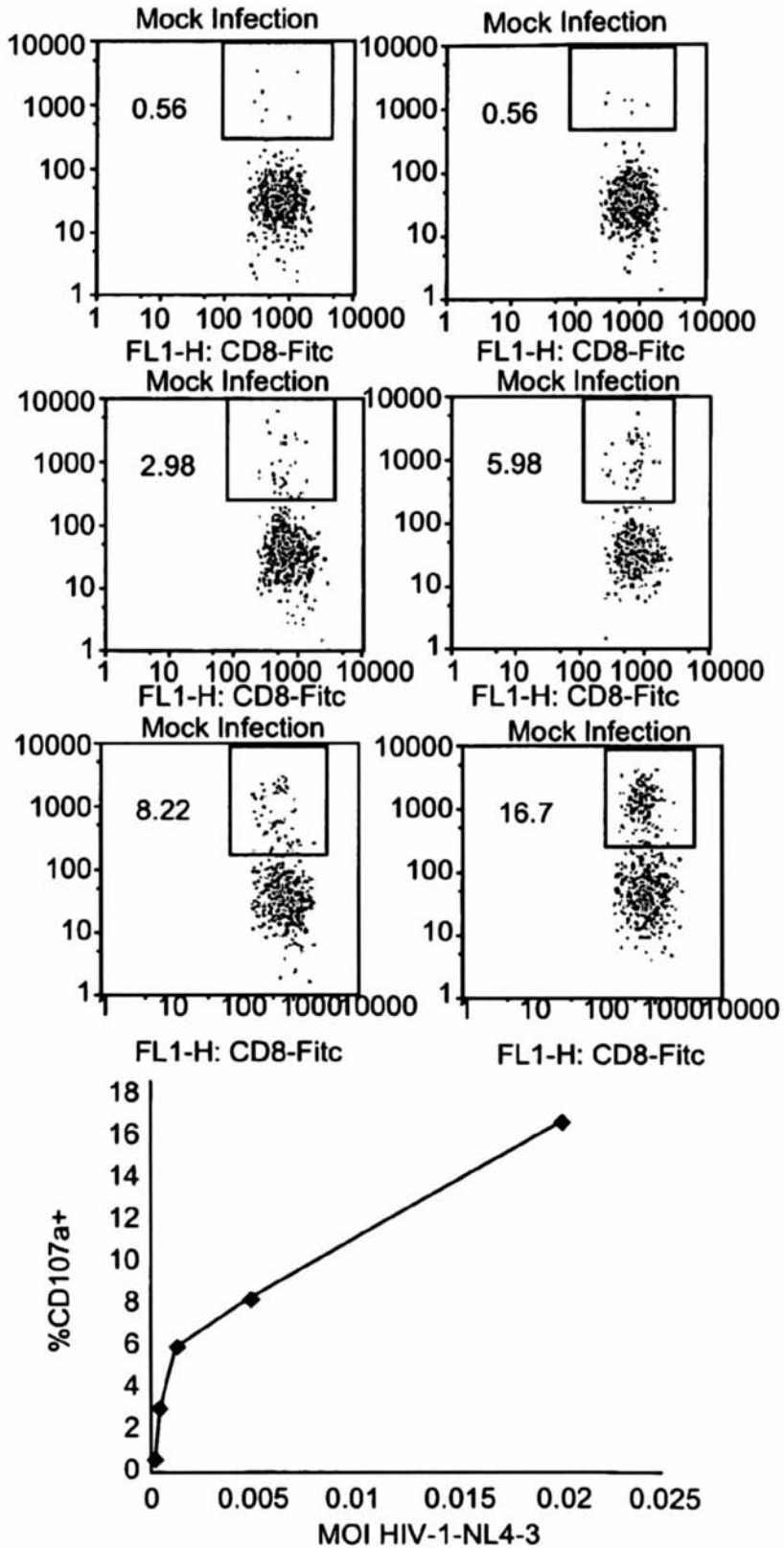
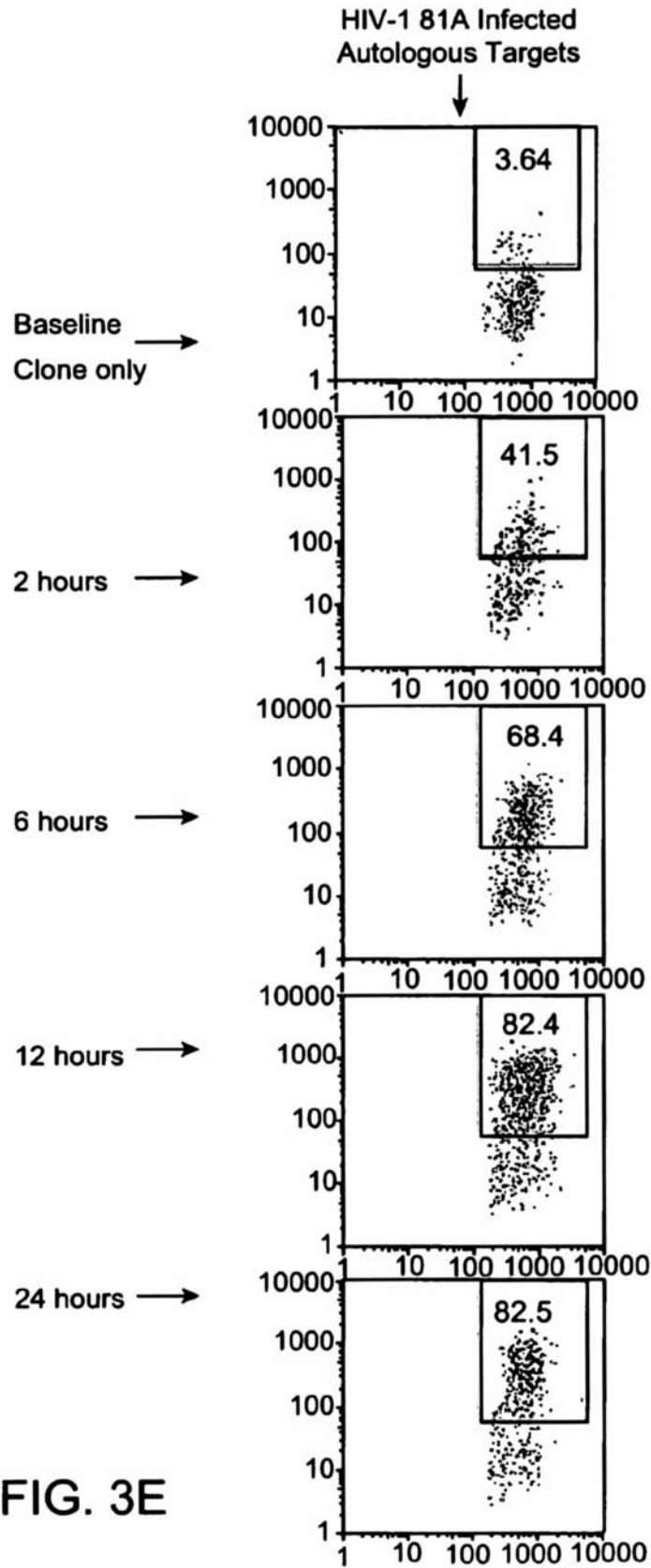


FIG. 3D

【 図 3 E 】



【 図 4 A - 4 B 】

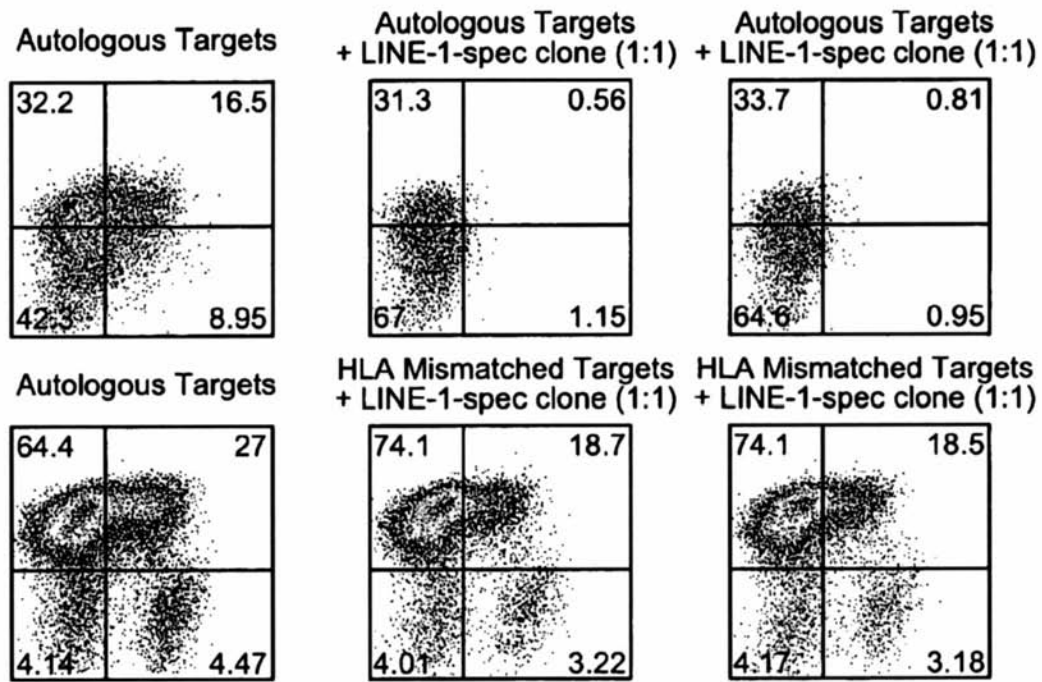


FIG. 4A

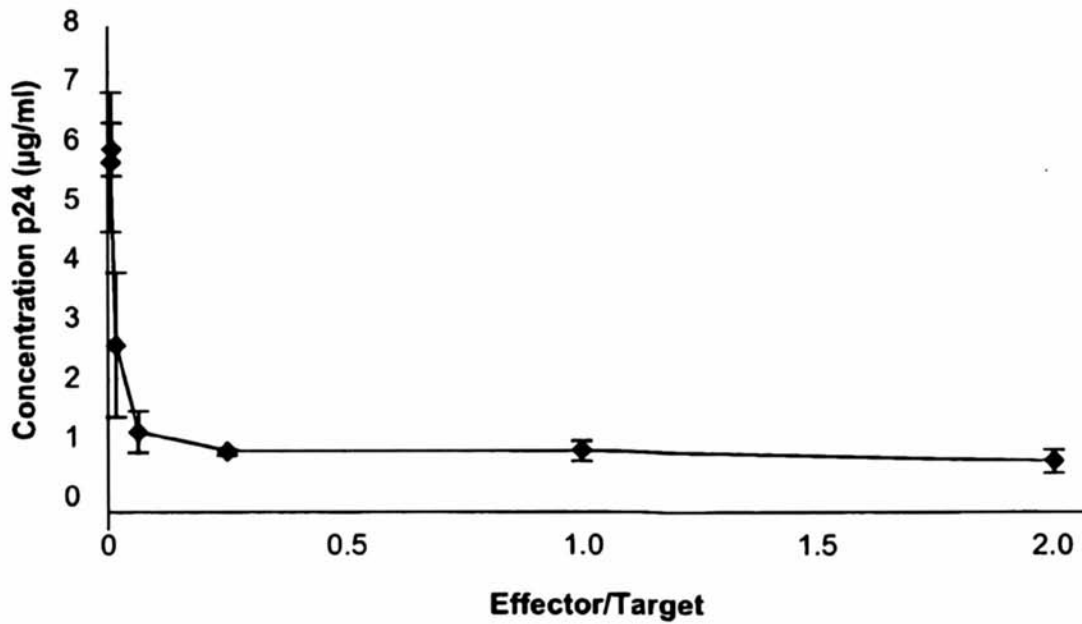


FIG. 4B

【 5 A 】

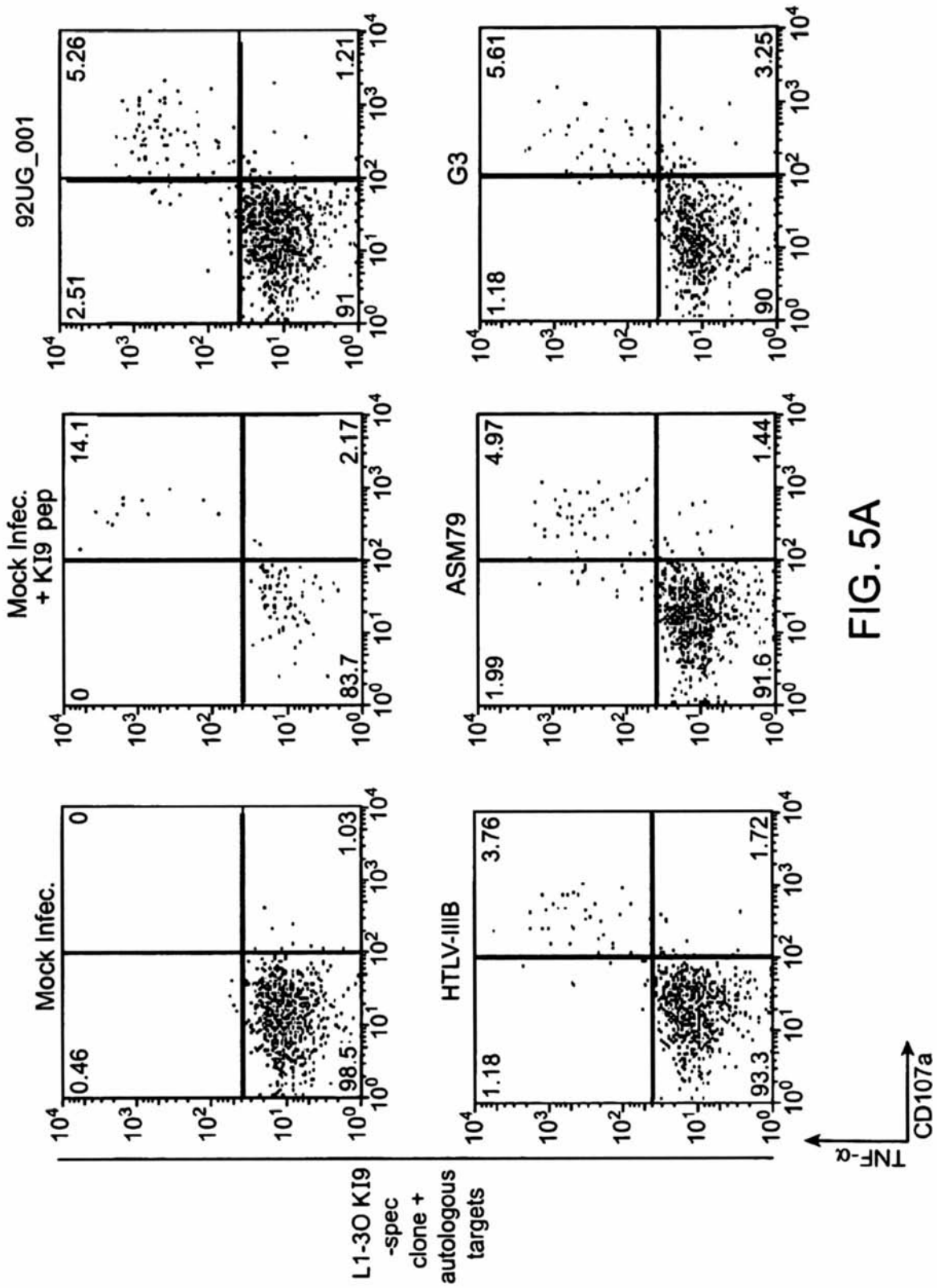


FIG. 5A

【 図 5 B 】

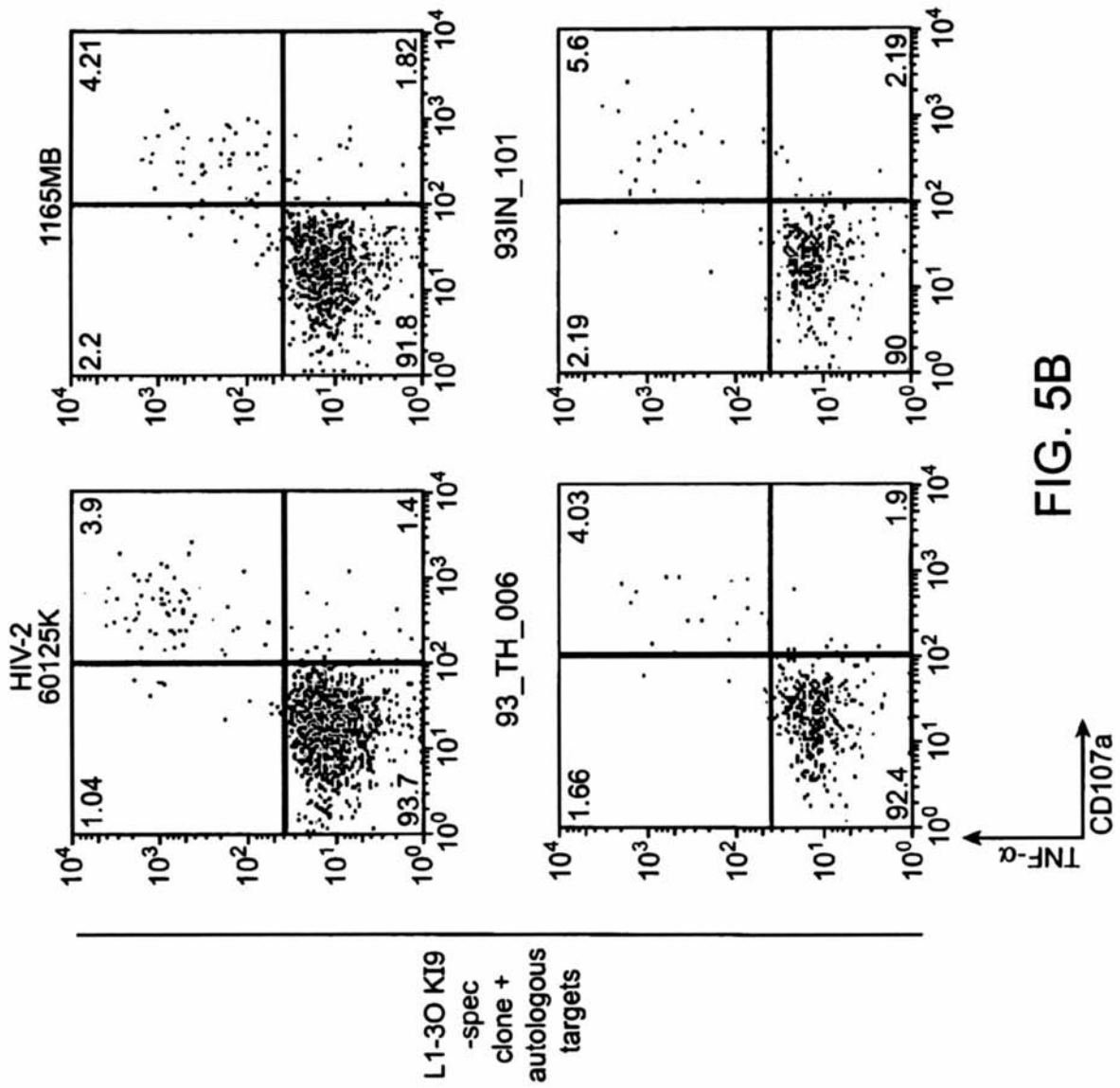


FIG. 5B

【 5 C 】

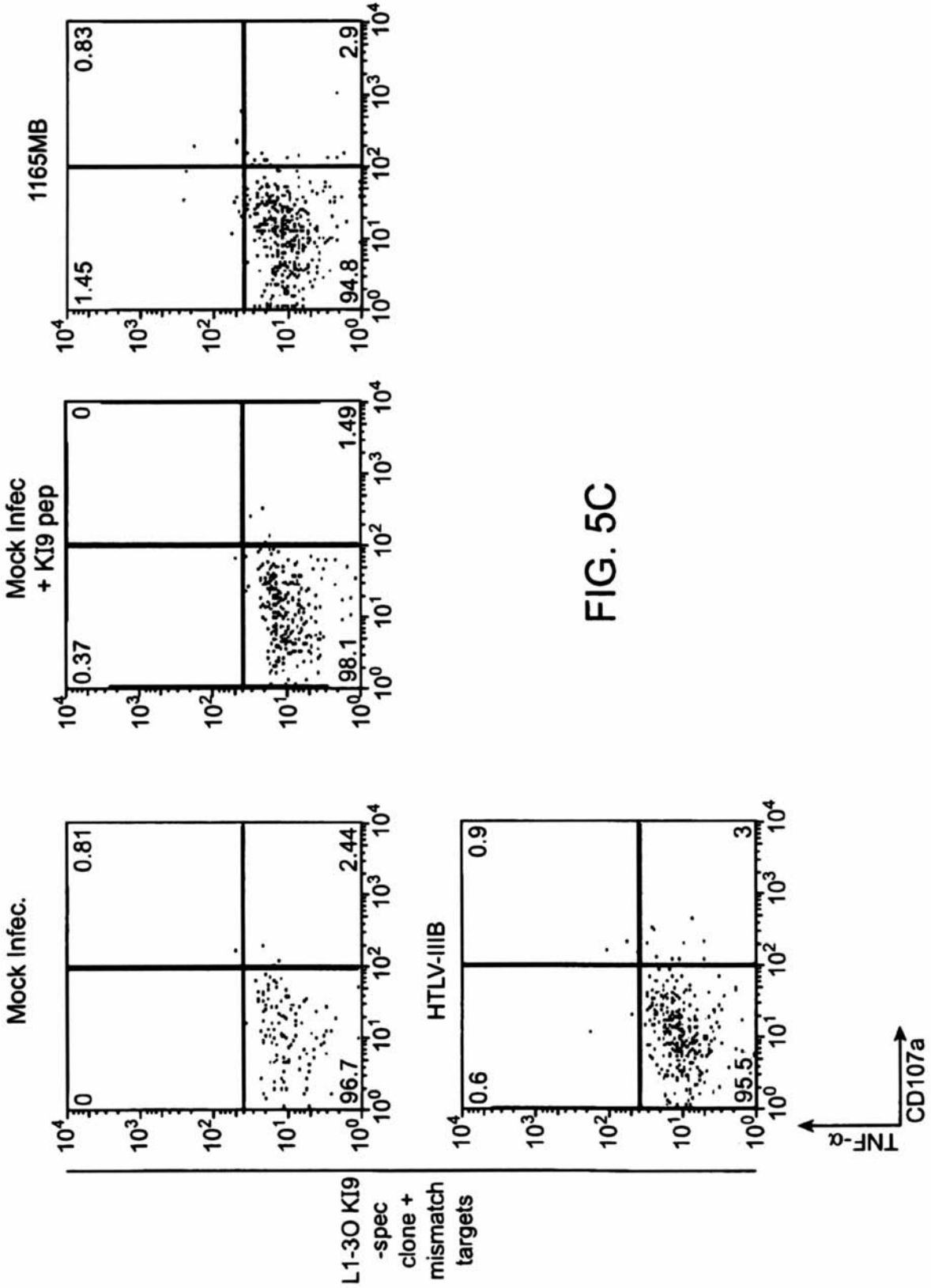


FIG. 5C

F

【 図 5 D 】

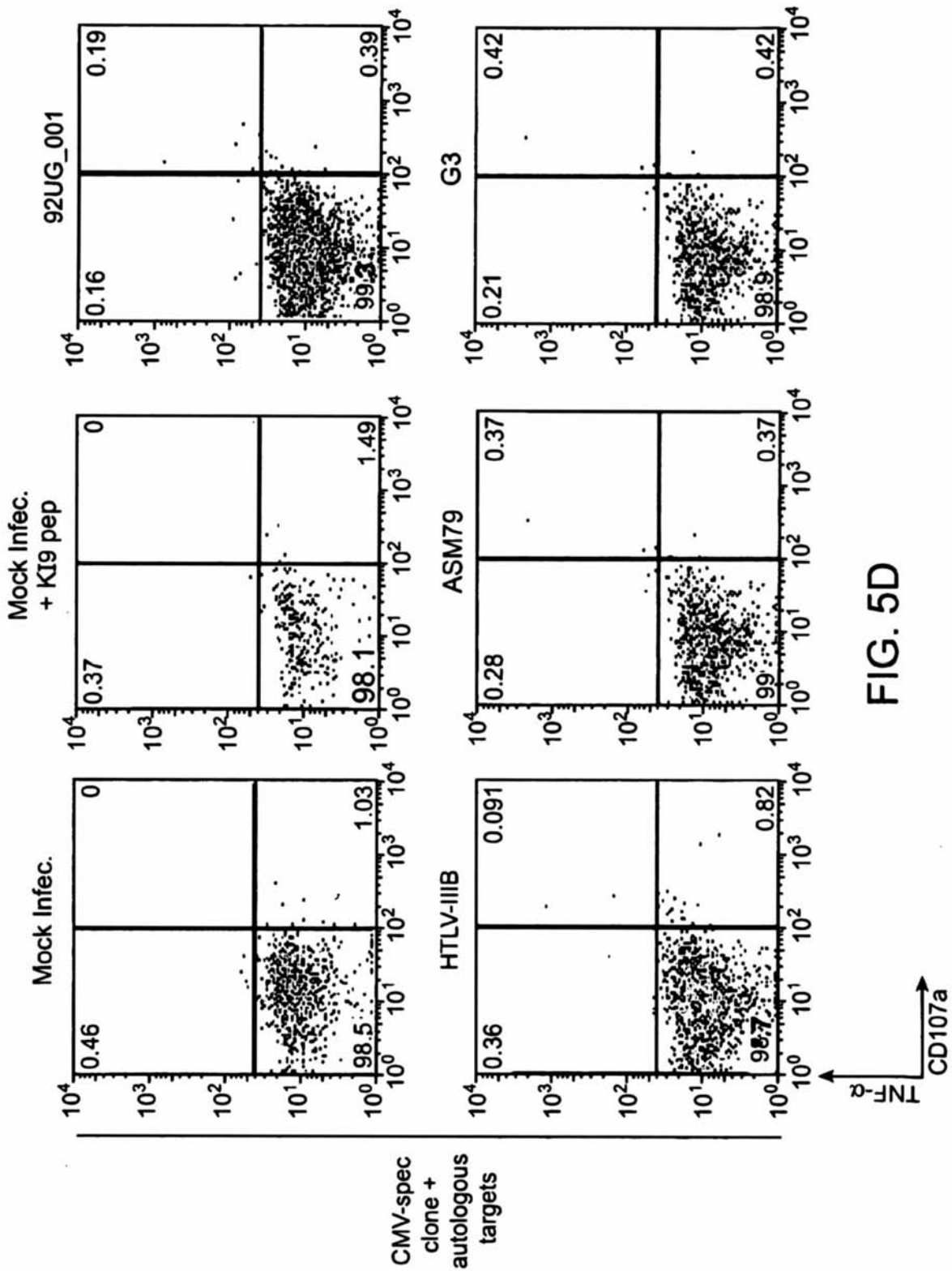
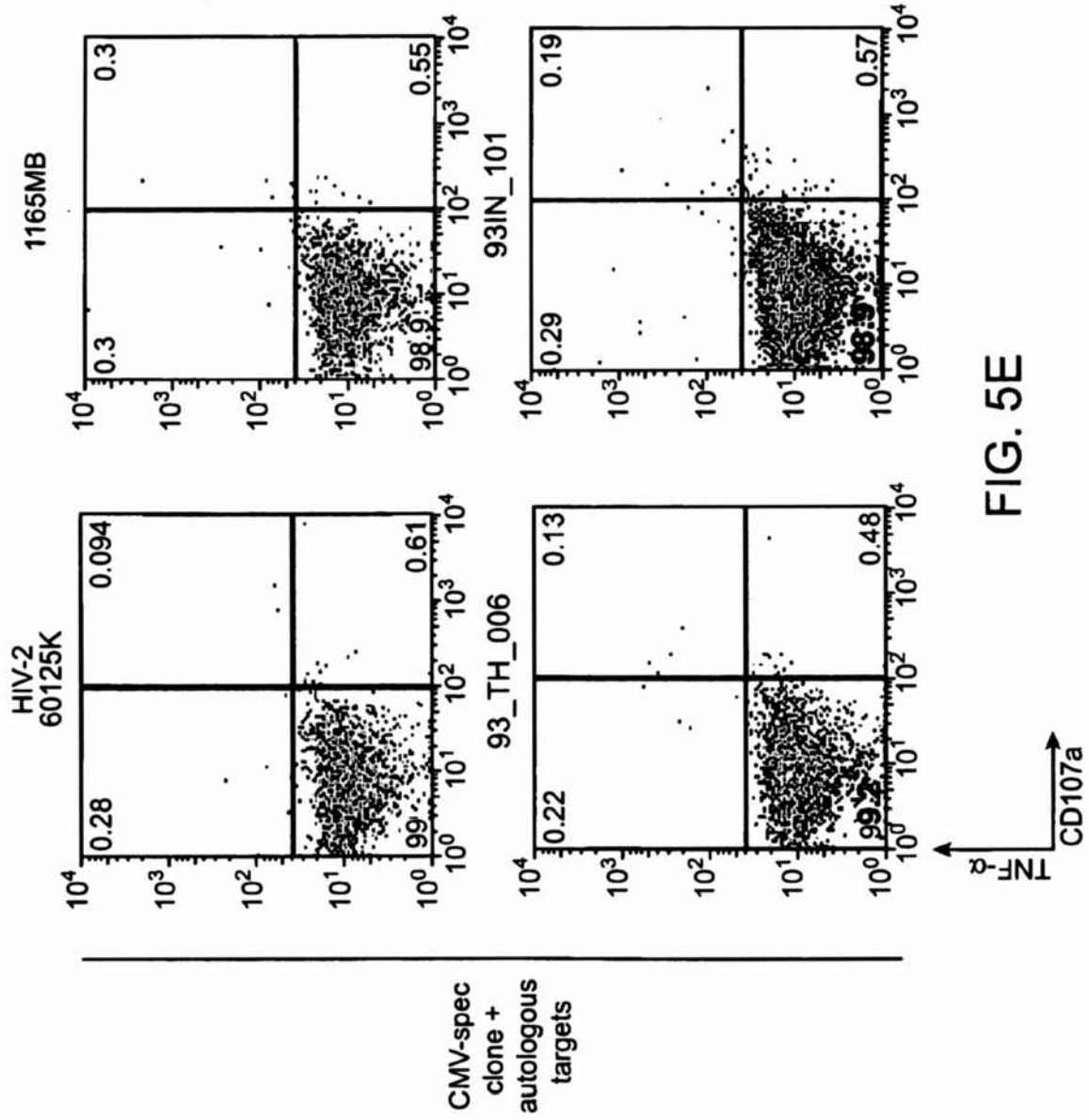


FIG. 5D

【 図 5 E 】



【 図 6 A 】

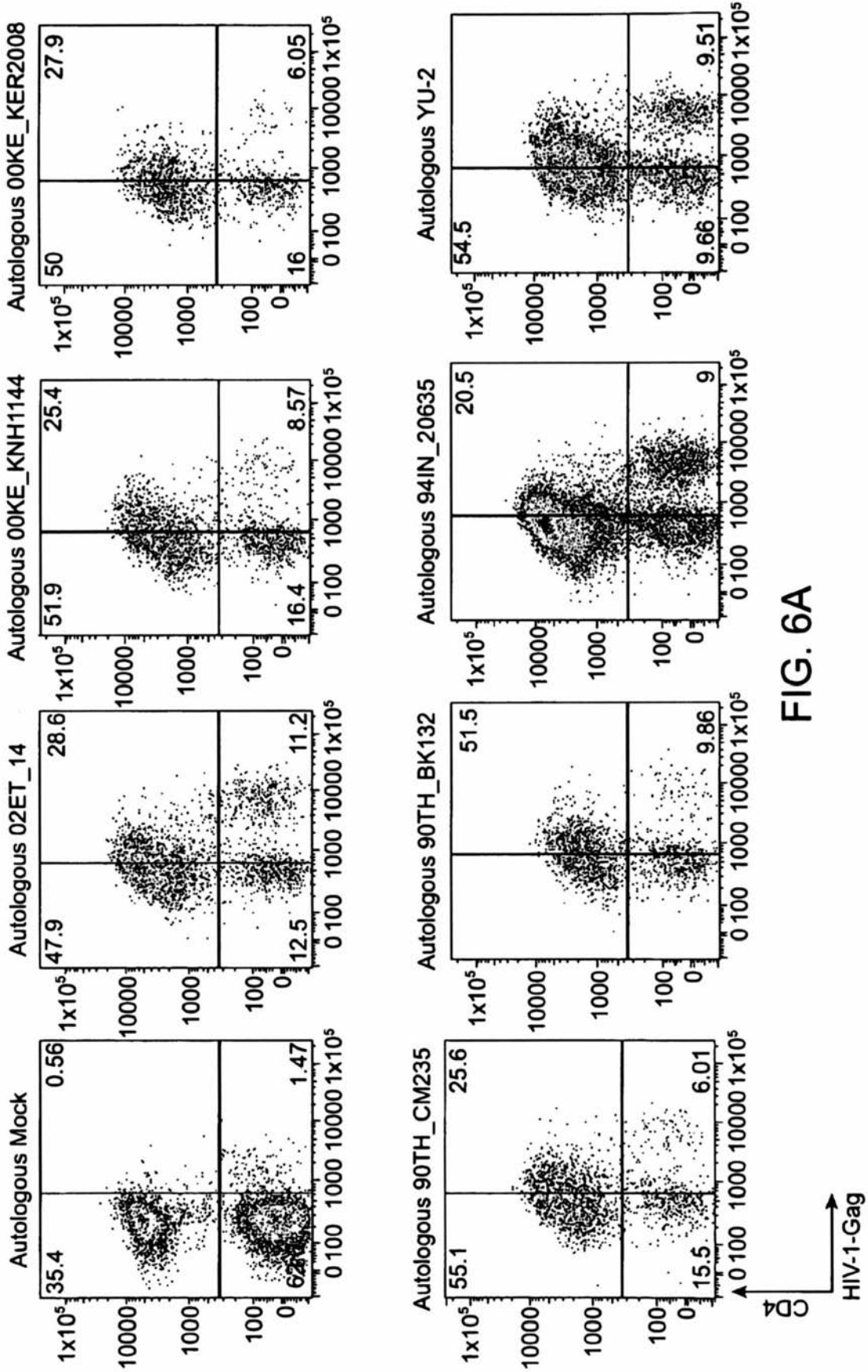


FIG. 6A

【 6 B 】

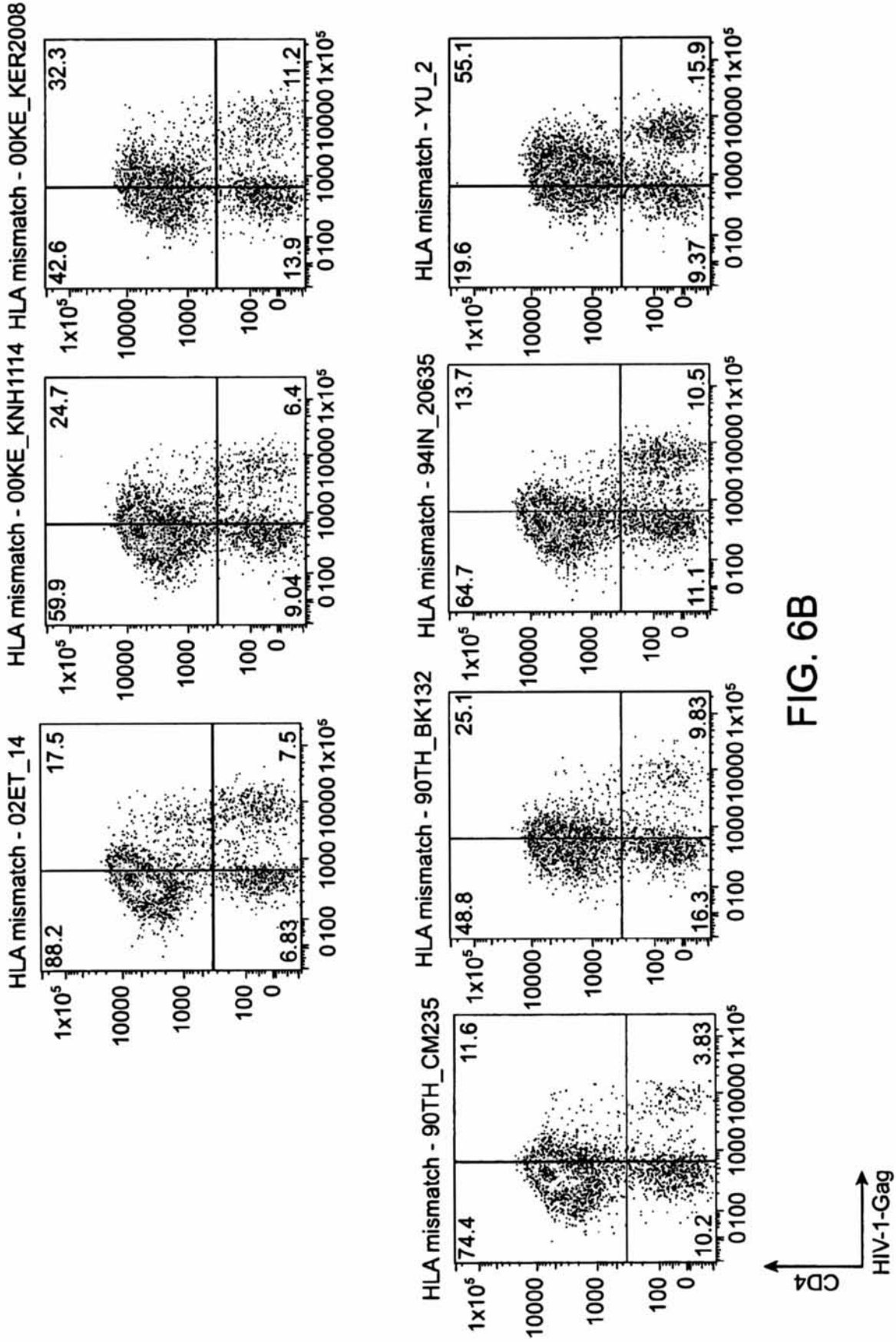


FIG. 6B

【 図 6 C - 1 】

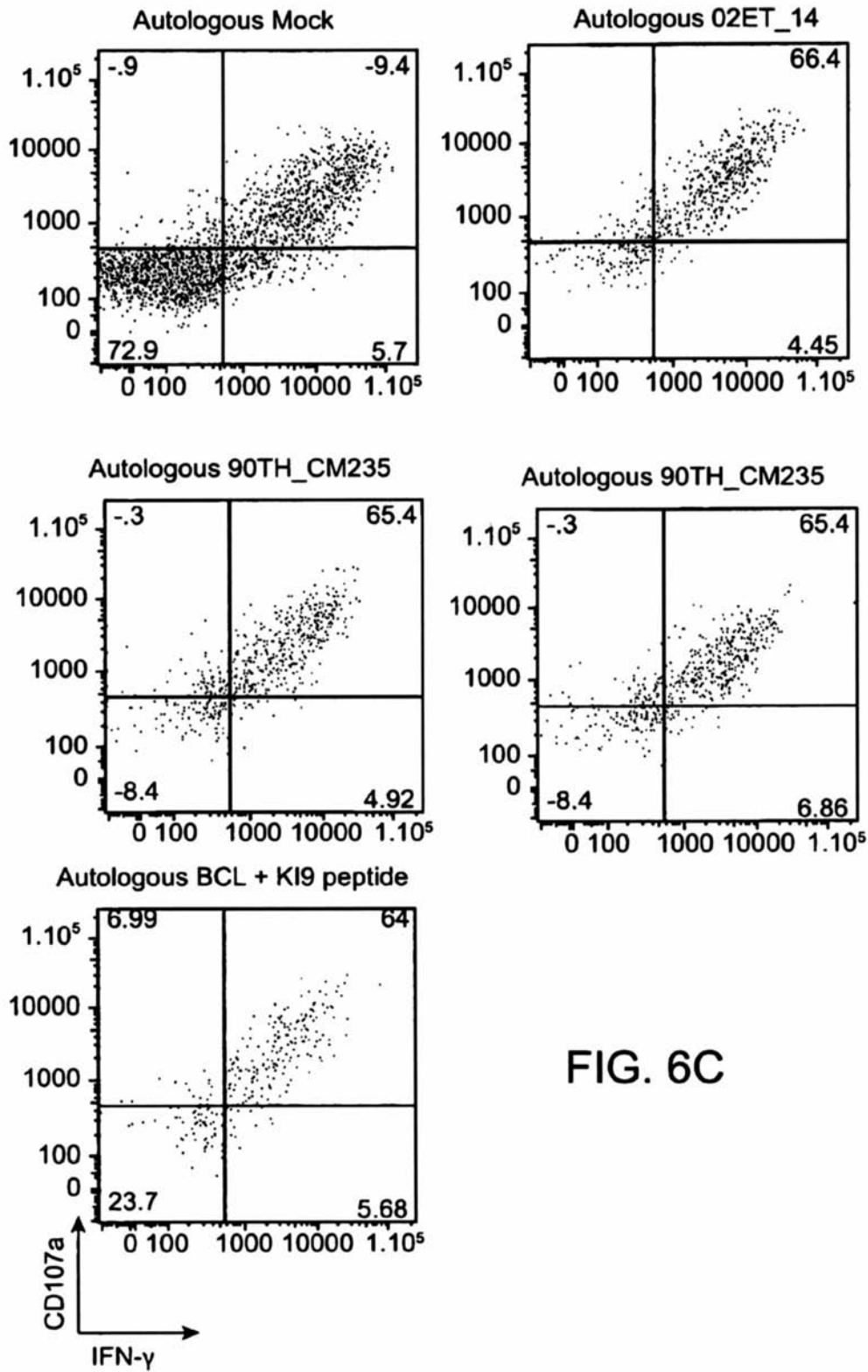


FIG. 6C

【 図 6 C - 2 】

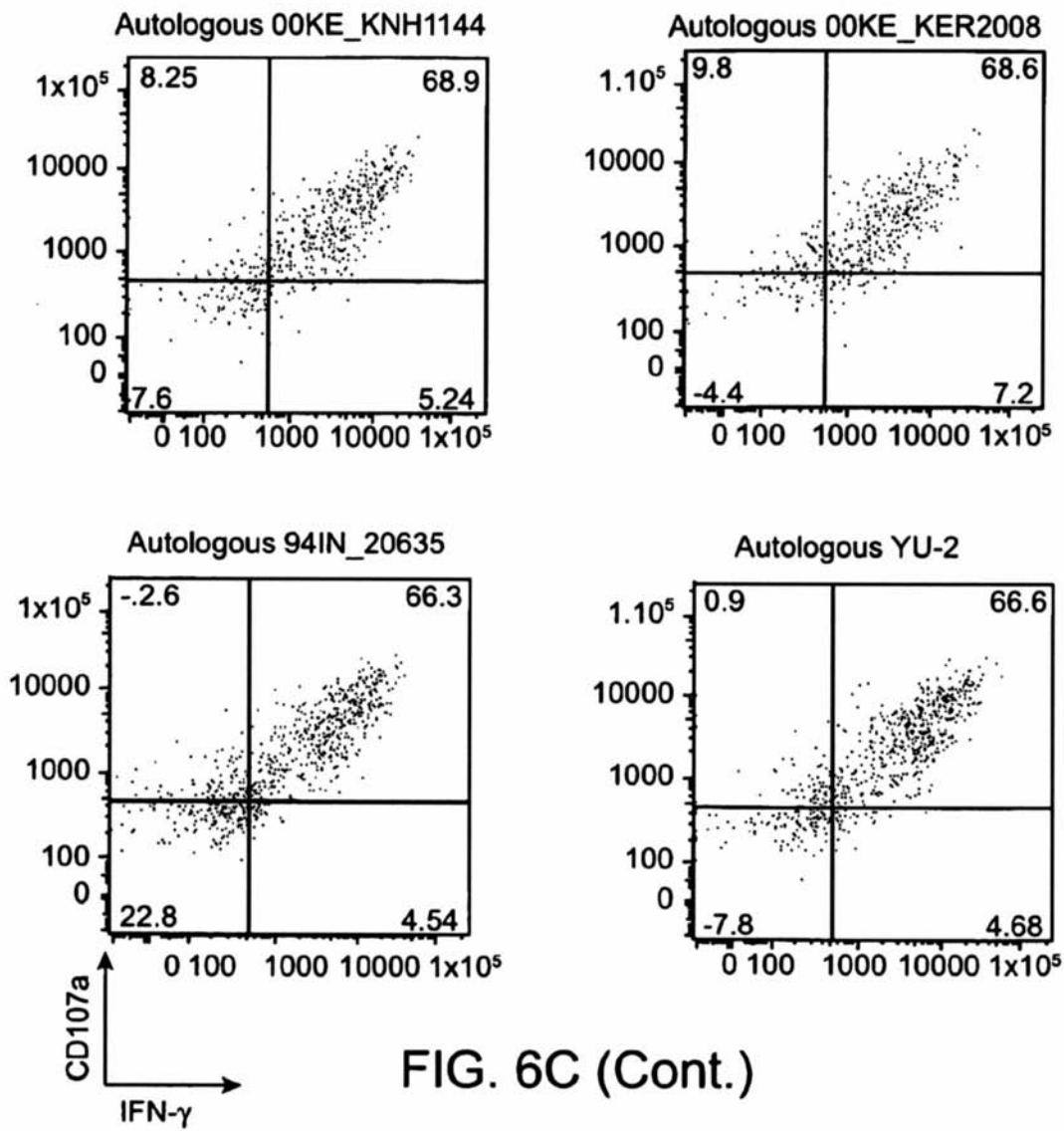


FIG. 6C (Cont.)

【 図 6 D 】

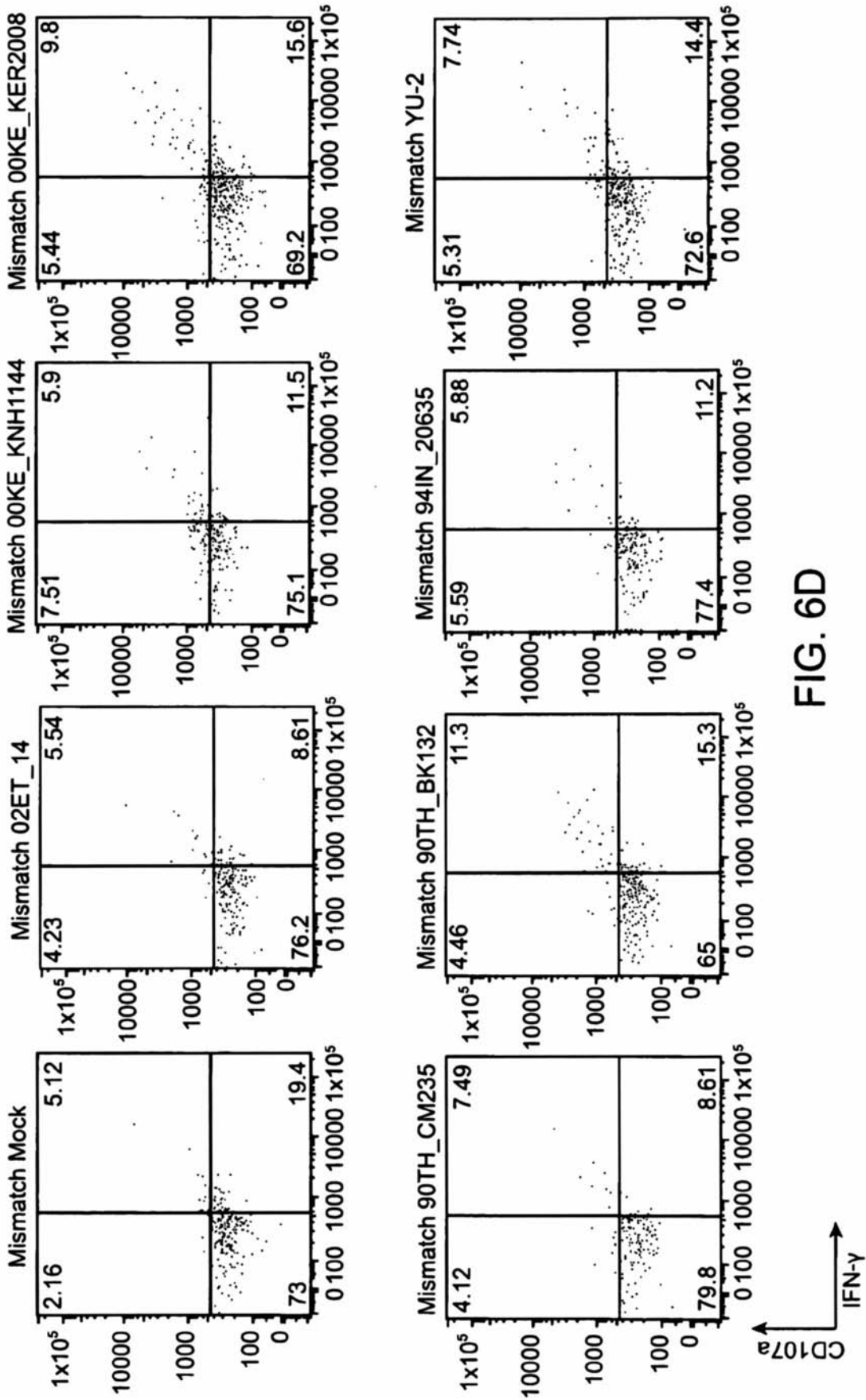
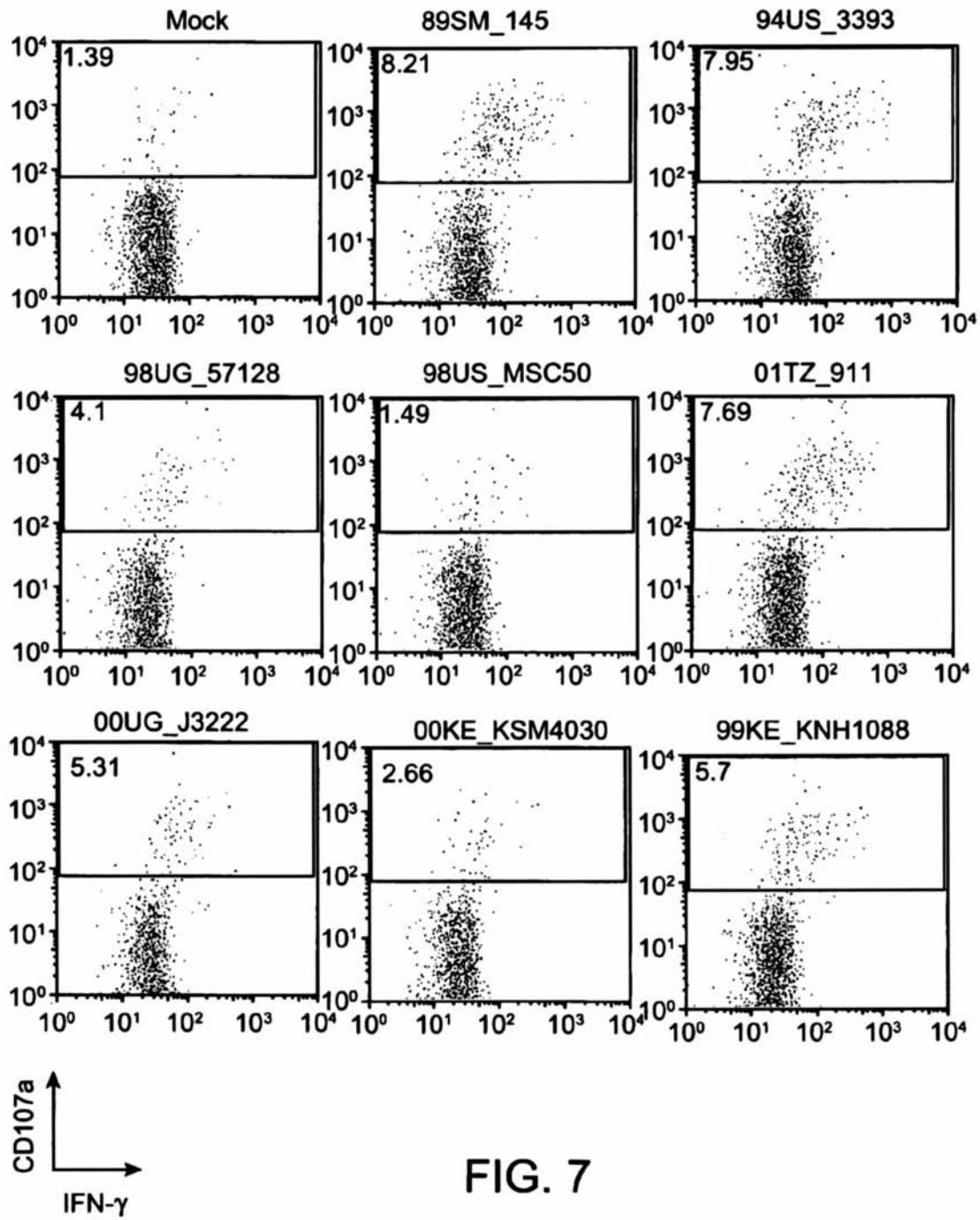


FIG. 6D

【 図 7 - 1 】



【 図 7 - 2 】

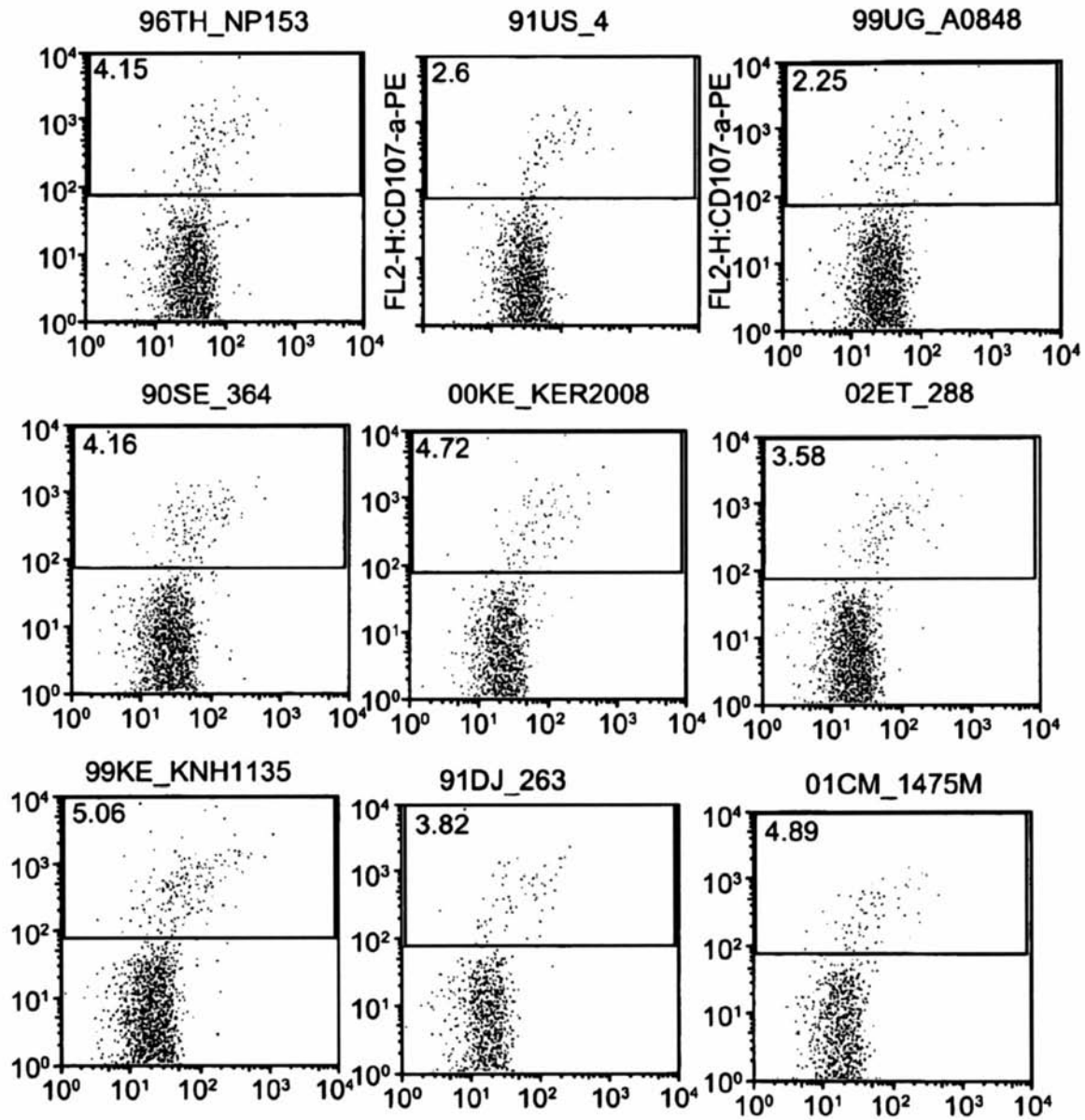


FIG. 7 (Cont.)

【 8 】

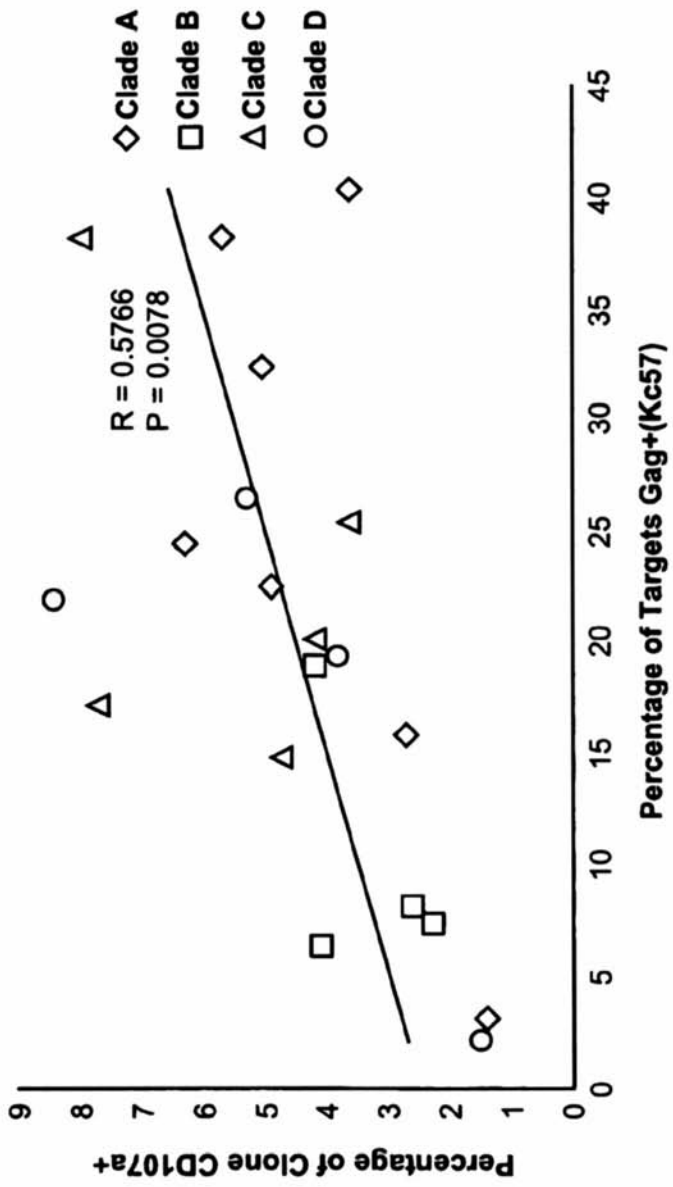


FIG. 8

【 図 9 】

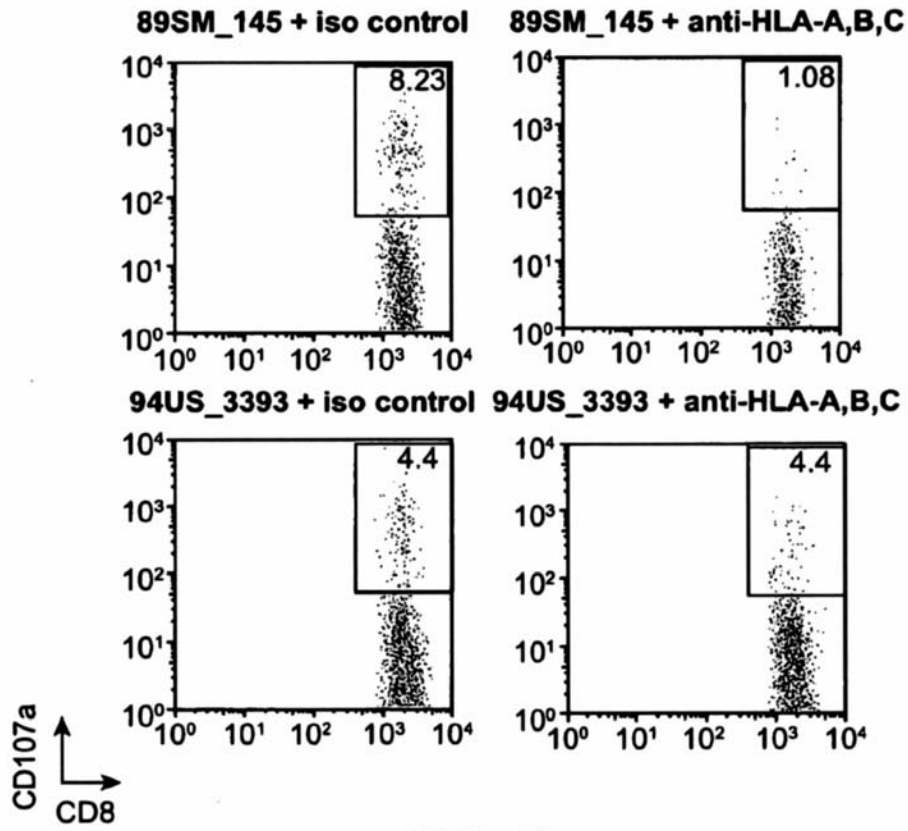


FIG. 9

【 1 0 】

Peptide Name	Peptide Sequence	HIV epitope matches	Source	Hydrophobicity	Sequence Number	Included in LINE pool
LiE13E	MNEMKREGKFRE (SEQ ID NO:1)	No known epitope	LINE1		LINE 1.5 ORF 1 U93562	Yes
LiQ9E	SQLKELEKQE (SEQ ID NO:2)	Human	LINE1		LINE 1.6 ORF 2 U93562	Yes
LiM12T	MLRAAREKGVVT (SEQ ID NO:3)	B44/A2/A11: Partials	LINE1	50.00%	LINE 1.12 ORF 1 U93565	Yes
LiK10I	KIDRLLARLI (SEQ ID NO:4)	Human: partial	LINE1	60.00%	LINE 1.14 ORF 2 U93566	Yes
LiL9C	LRAAREKGC (SEQ ID NO:5)	B14	LINE1	44.44%	LINE 1.24 ORF 1 U93571	Yes
LiN13V	NGKQKKAGFAILV (SEQ ID NO:6)	B57	LINE1	46.15%	LINE 1.24 ORF 2 U93571	Yes
LiD9R	DELREEGVR (SEQ ID NO:7)	B51 partial	LINE1	22.22%	LINE 1.33 ORF 1 U93573	Yes

FIG. 10

【 図 1 1 - 1 】

Peptide Name	Sequence Alignment	Percent Identity	Sequence Identifier	Accession Number	Sequence Origin
LiE13E	3 EMKREGK 6		SEQ ID NO:42		LINE-1
		100%			
HIV-1	6 EMKREGK 12		SEQ ID NO:43	AAL05400	HIV-1 (reverse
LiE13E	2 NEMKREGK 9		SEQ ID NO:44		LINE-1
	*	87%			
HIV-1	138 NEMEREGK 145		SEQ ID NO:45	AAY54352	HIV-1 (pol protein)
LiE13E	2 NEMKREGK 9		SEQ ID NO:44		LINE-1
	*	87%			
HIV-1	200 NEMEREGK 207		SEQ ID NO:45	AAV84155	HIV-1 (pol protein)
LiE13E	2 NEMKREGK 9		SEQ ID NO:44		LINE-1
	*       *	75%			
HIV-1	138 DEMKKEGK 145		SEQ ID NO:46	AAV84155	HIV-1 (pol protein)
LiQ9E	2 QLKELEKQ 9		SEQ ID NO:47		LINE-1
	*       *	75%			
HIV-1	924 QIKELQKQ 931		SEQ ID NO:48	AAP74169	HIV-1 (pol protein)
LiQ9E	2 QLKELEKQ 9		SEQ ID NO:47		LINE-1
	*       *	75%			
HIV-1	209 QIKELQKQ 216		SEQ ID NO:48	AAP74169	HIV-1 (integrase)
LiQ9E	2 QLKELEKQ 9		SEQ ID NO:47		LINE-1
	*       *	75%			
HIV-1	924 QIKELQKQ 931		SEQ ID NO:48	AAP74169	HIV-1 (pol gene product)

FIG. 11

【 図 1 1 - 2 】

Peptide Name	Sequence Alignment	Percent Identity	Sequence Identifier	Accession Number	Sequence Origin
LiQ9E	1 SQL--KELEKQ 9		SEQ ID NO:49		LINE-1
	* **   *	63%			
HIV-1	920 SELQTKELQKQ 930		SEQ ID NO:50	CAC05362	HIV-1 (gag-pol precursor)
LiM12T	1 ML--RAAREKGWVT 12		SEQ ID NO:51		LINE-1
	**  *	66%			
HIV-1	23 MLMICSAA-EKGWVT 36		SEQ ID NO:52	AAG22509	HIV-1 (envelope protein)
LiM12T	1 MLRAAREKGWVT 12		SEQ ID NO:51		LINE-1
	* * *  *	66%			
HIV-1	23 MIRSAAEKLWVT		SEQ ID NO:53	ABD66951	HIV-1 (envelope glycoprotein)
LiM12T	7 EKGWVT 12		SEQ ID NO:54		LINE-1
		100%			
HIV-1	33 EKGWVT 38		SEQ ID NO:55	AAG22514	HIV-1 (envelope protein)
LiM12T	1 MLRAAREKGWVT 12		SEQ ID NO:51		LINE-1
	* * *  *	66%			
HIV-1	24 MIRSAAEKLWVT 35		SEQ ID NO:56	ABD67014	HIV-1 (envelope glycoprotein)
LiK10I	1 KIDRLLARLI 10		SEQ ID NO:57		LINE-1
	*	90%			
HIV-1	38 KIDRLDRLI 47		SEQ ID NO:58	ABM67916	HIV-1 (vpu protein)
LiK10I	1 KIDRLLARLI 10		SEQ ID NO:57		LINE-1
	*   *	80%			
HIV-1	38 KVDRLIARLI 47		SEQ ID NO:59	ABI47959	HIV-1 (vpu protein)

FIG. 11 (Cont. 1)

【 図 1 1 - 3 】

Peptide Name	Sequence Alignment	Percent Identity	Sequence Identifier	Accession Number	Sequence Origin
LiK10I	1 KIDRLLAR 8		SEQ ID NO:60		LINE-1
		100%			
HIV-1	38 KIDRLLAR 45		SEQ ID NO:61	AAR22106	HIV-1 (vpu protein)
LiK10I	1 KIDRLLAR 8		SEQ ID NO:60		LINE-1
		100%			
HIV-1	38 KIDRLLAR 45		SEQ ID NO:61	AAD34577	HIV-1 (vpu protein)
LiI9C	2 RAAREKGC 9		SEQ ID NO:62		LINE-1
	*	87%			
HIV-1	364 RAARKKGC		SEQ ID NO:63	ABN04586	HIV-1 (gag protein)
LiN13V	6 KAGFAIL 12		SEQ ID NO:64		LINE-1
		100%			
HIV-1	18 KAGFAIL 24		SEQ ID NO:65	AAQ76746	HIV-1 (envelope glycoprotein)
LiN13V	7 AGFAILV 13		SEQ ID NO:66		LINE-1
	*	85%			
HIV-1	18 AGFAILI 24		SEQ ID NO:67	ABI49358	HIV-1 (envelope glycoprotein)
LiN13V	7 AGFAIL 12		SEQ ID NO:68		LINE-1
		100%			
HIV-1	220 AGFAIL 225		SEQ ID NO:69	ABQ02721	HIV-1 (envelope glycoprotein)
LiN13V	7 AGFAIL 12		SEQ ID NO:68		LINE-1
		100%			
HIV-1	224 AGFAIL 229		SEQ ID NO:69	CAK49347	HIV-1 (envelope protein)

FIG. 11 (Cont. 2)

【 図 1 1 - 4 】

Peptide Name	Epitope Alignment	Percent Identity	Sequence Identifier	Accession Number	Sequence Origin
LiD9R	1 DELREEGVR 9		SEQ ID NO:70		LINE-1
	*  *  *	66%			
HIV-1	24 EELKEEAVR 32		SEQ ID NO:71	ABD98374	HIV-1 (vpr protein)
LiD9R	1 DELREEGVR 9		SEQ ID NO:70		LINE-1
	*  *  *	66%			
HIV-1	24 EELKEEAVR 32		SEQ ID NO:71	AAO47114	HIV-1 (vpr protein)
LiD9R	1 DELREEGVR 9		SEQ ID NO:70		LINE-1
	*  *  *	66%			
HIV-1	24 EELKEEAVR 32		SEQ ID NO:71	CAA75966	HIV-1 (vpr)
LiD9R	1 DELREEGVR 9		SEQ ID NO:70		LINE-1
	*  *  *	66%			
HIV-1	24 EELKEEAVR 32		SEQ ID NO:71	AAA44862	HIV-1 (vpr protein)
LiD9R	1 DELREE 6		SEQ ID NO:72		LINE-1
	*	83%			
HIV-1	78 DELREQ 83		SEQ ID NO:73	AAC78965	HIV-1 (envelope glycoprotein)

FIG. 11 (Cont. 3)

LINE-1 peptides identified using silico epitope prediction.

LiTV9	TMRYHLTPV (SEQ ID NO:8)	Blast: LINE-1-ORF2 and homologous top 100 hits, no significant HIV similarity
LiRV9	RPNLRLLGV (SEQ ID NO:9)	Blast: LINE-1-p40, no significant HIV similarity
LiK19	KVIYRFNAI (SEQ ID NO:10)	Blast: top hits all LINE-1-ORF2, HIV most 5/9 shared
LiV9	IYLENPIV (SEQ ID NO:11)	Blast: top hits LINE-1-ORF2, up to 6 shared HIV-env, 5 in HIV vpu

FIG. 12

【 13 - 1 】

ELISPOT assay results from HIV BLAST predicted LINE-1 epitopes

StudyID	LiD9R	LiE13E	LiK10I	LiL9C	LiM12T	LiN13V	LiQ9E	LINE	Gag	Nef	PHA	SEB
2	0	0	0	0	0	5	0	5	NT	NT	1110	NT
11	0	0	0	5	0	0	0	0	NT	NT	175	NT
12	0	0	0	0	0	15	0	0	NT	NT	1325	NT
13	0	130	0	70	120	90	170	10	NT	NT	NT	4710
16	45	0	0	40	75	30	35	50	NT	NT	NT	4870
18	0	0	0	5	5	0	0	0	NT	NT	NT	825
30	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
31	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
32	0	NT	430	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
33	325	NT	15	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
34	0	NT	20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
429	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	920	425	335	NT
443	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	40	870	130	NT	1740
443	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	305	1625	150	NT	2160
443	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	15	825	180	NT	1655
443	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	1695	595	NT	4975
443	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	1190	480	NT	4735
443	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	885	70	NT	2310
450	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	55	80	60	NT	1940
474	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	140	120	79	NT
478	0	NT	0	NT	0	0	0	0	0	785	0	NT
506	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	50	440	1140	NT	1250
506	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	10	50	75	NT	1770
539	8.5	0	0	8.5	0	7.5	0	5	0.5	4.5	9.5	NT
539	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	1105	1705	540	2305	NT

FIG. 13

【 1 3 - 2 】

StudyID	LiD9R	LiE13E	LiK10I	LiL9C	LiM12T	LiN13V	LiQ9E	LINE	Gag	Nef	PHA	SEB
548	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	65	125	315	NT	1505
548	NT	NT	NT	NT	0	NT	NT	10	290	1550	NT	1750
548	NT	NT	NT	NT	30	NT	NT	30	750	1325	NT	4950
562	0	0	0	0	0	0	5	5	85	0	NT	1495
562	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	175	505	1040	NT	2415
562	100	235	900	90	0	40	120	385	1750	1795	NT	4910
562	395	NT	275	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
562	85	80	580	45	0	35	0	250	1670	1720	NT	4885
562	45	NT	125	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
562	200	NT	75	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
581	NT	0	NT	10	NT	NT	NT	910	1880	350	0	NT
583	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	45	100	1725	NT
583	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	10	2265	670	2660	NT
583	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
583	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
583	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
586	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	180	90	NT	1560
586	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5	340	195	NT	2320
586	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
586	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
586	0	NT	70	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
618	0	NT	NT	NT	65	NT	NT	85	115	395	NT	4845
623	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	25	45	940	1305	NT
623	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	0	455	1405	NT
623	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
623	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
623	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
639	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	75	2355	540	1965	NT
647	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	55	605	35	NT
647	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5	1170	1710	1535	NT
653	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	605	90	NT	1715
653	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	1095	1030	NT	1945

FIG. 13 (Cont. 1)

【 1 3 - 3 】

StudyID	LiD9R	LiE13E	LiK10I	LiL9C	LiM12T	LiN13V	LiQ9E	LINE	Gag	Nef	PHA	SEB
653	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
653	0	NT	90	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
653	0	NT	0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
721	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	615	935	NT	1910
721	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	20	655	710	NT	1400
721	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	385	425	NT	1715
721	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	55	0	520	NT	745
747	20	95	555	55	10	5	40	NT	NT	NT	NT	2235
747	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	170	1620	1685	NT	2455
747	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	90	710	685	NT	4965
769	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	20	240	350	2420	NT
785	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	0	775	NT	2225
785	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	50	0	175	NT	2360
789	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	5	415	180	NT	1930
789	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	385	455	NT	1640
792	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0	910	1720	1790	NT
804	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	10	920	165	NT	2505
821	NT	NT	NT	NT	45	NT	NT	205	1390	1070	NT	4985
821	NT	NT	NT	NT	35	NT	NT	40	120	170	NT	1930
829	NT	NT	NT	NT	40	NT	NT	120	230	485	NT	4920
829	NT	NT	NT	NT	15	NT	NT	45	80	315	NT	4785
836	130	NT	NT	NT	80	NT	NT	185	175	340	NT	4735
836	35	NT	NT	NT	30	NT	NT	40	75	515	NT	4600
839	NT	NT	NT	NT	NT	60	NT	55	1125	785	NT	4870
841	0	60	125	0	15	60	0	40	385	480	NT	1935
841	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	135	460	1355	NT	2500
841	40	130	355	55	20	50	170	185	0	410	NT	4925

FIG. 13 (Cont. 2)

【 図 1 4 - 1 】

ELISPOT results from *in silico* predicted LINE-1 epitopes.

StudyID	LiIV9	LiKI9	LIRV9	LiTV9	Gag	Nef	SEB
30	0	0	0	0	NT	NT	2860
31	15	20	0	0	NT	NT	2460
34	0	30	0	0	NT	NT	1070
35	105	0	0	0	NT	NT	3490
36	0	0	0	0	NT	NT	3825
37	0	0	0	15	NT	NT	2240
38	0	0	0	0	NT	NT	2610
39	0	0	20	0	NT	NT	2835
40	0	0	0	0	NT	NT	3235
41	0	0	0	0	NT	NT	1430
42	0	0	0	0	NT	NT	2560
562	10	380	540	240	1385	1170	2830
562	95	155	60	65	855	605	2985
562	40	190	180	60	1095	735	3305
583	0	0	0	0	2095	245	3855
583	0	0	70	0	960	110	3845
583	0	30	70	0	425	170	2045
586	0	0	0	0	0	0	1120
586	0	0	0	0	50	70	2840
586	0	20	5	0	10	170	3315
623	65	70	280	70	380	790	3085
623	0	85	115	50	245	605	3625
623	0	30	0	0	270	640	3760
653	0	125	0	0	990	1770	3110

FIG. 14

【 図 1 4 - 2 】

StudyID	LiV9	LiK19	LiRV9	LiTV9	Gag	Nef	SEB
653	25	185	85	45	655	1470	4395
653	0	80	15	35	380	600	3090

FIG. 14 (Cont.)

【 図 15 】

Origin	Protein	HLAsuper-predicted	PeptideName	Sequence	SEQ ID NO:
LINE-1	ORF-1	A2	L1O1A2SV9	SLQEIWDYV	12
LINE-1	ORF-1	A2	L1O1A2NI9	NLEECITRI	13
LINE-1	ORF-1	B7	L1O1B7RV9	RPNRLIGV	9
LINE-1	ORF-1	B7	L1O1B7TF9	TPRHIVRF	14
LINE-1	ORF-2	A2	L1O2A2LV9	LLFNIVLEV	15
LINE-1	ORF-2	A2	L1O2A2YI9	YTMEYYAAI	16
LINE-1	ORF-2	B7	L1O2B7RL9	RARIAKSIL	17
LINE-1	ORF-2	B7	L1O2B7AL9	APRFIKQVL	18
LINE-1	ORF-1	B58	L1O1B58IF9	ISYPAKLSF	19
LINE-1	ORF-1	B58	L1O1B58SW9	SSPATEQSW	20
LINE-1	ORF-2	B58	L1O2B58KW9	KATVTKTAW	21
LINE-1	ORF-2	B58	L1O2B58RW9	RVNRQPTTW	22
LINE-1	ORF2	not tested	LiK10I	KIDRLLARLI	4
LINE-1	ORF1	not tested	LiD9R	DELREEGVR	7
LINE-1	ORF2	B7/A2	LiTV9	TMRYHLTPV	8
LINE-1	ORF2	B7/A2	LiKI9	KVIYRFNAI	10
LINE-1	ORF2	B7/A2	LiIV9	IVYLENPIV	11

FIG. 15

【 図 16 - 1 】

Group	SCOPE ID	VL num	VL	VL assay	CD4	ARV	A allele 1	A allele 2	B allele 1	B allele 2	Cw allele 1	Cw allele 2
A	1016	1023	1023	bDNA	568	None	A*0201	A*0201	B*1302	B*5201	Cw*06	Cw*16
A	1068	299	299	bDNA	419	None	A*31010 2	A*330301 or 0302	B*510101 to 0105	B*5801	Cw*03	Cw*14
A	1071	130	130	bDNA	571	None	A*01010 1 or 0102	A*680101 to 0103	B*0801	B*270502 to 0506	Cw*07	Cw*07
A	1095	324	324	bDNA	372	None	A*02010 101 to 0109	A*030101 01 or 0103	B*1302	B*1501010 1 or 0103 or B*1534	Cw*03	Cw*06
A	1119	102	102	bDNA	1067	None	A*01010 1 or 0102	A*020101 01 to 0109	B*4402010 1 to 0203	B*520101 to 0104		
A	1133	440	440	PCR	442	None	A*03010 101 or 0103	A*310102	B*570101 or 0102	B*570301 or 0302 or 09		
A	1143	241	241	bDNA	581	None	A*01010 1 or 0102	A*0304 or 11N	B*0702	B*5701		
A	1155	1490	1490	bDNA	271	None	A*02010 101 to 0112	A*020101 01 to 0112	B*1518	B*4402010 1 to 0203	Cw*0501	Cw*0704
A	1157	962	962	bDNA	601	None			B*1501	B*3501		
A	1179	137	137	bDNA	733	None	A*3101	A*3301	B*5703	B*7801	Cw*0701	Cw*1601
A	1185	861	861	bDNA	658	None			B*5201	B*5701	Cw*0602	Cw*1202
A	1504	944	944	bDNA	947	None	A*0201	A*03	B*3501	B*5701	Cw*04	Cw*06

FIG. 16

【 図 16 - 2 】

Group	SCOPE ID	VL num	VL	VL assay	CD4	ARV	A allele 1	A allele 2	B allele 1	B allele 2	Cw allele 1	Cw allele 2
A	1508	84	84	bDNA	843	None	A*3002	A*6602	B*5801	B*8101	Cw*07	Cw*08
A	1516	132	132	bDNA	657	None	A*03010 101 or 0103	A*030101 01 or 0103	B*1402	B*570301 or 0302 or 09		
A	1525	97	97	bDNA	861	None	A*03010 101 or 0103	A*2301	B*0801	B*5301		
A	1531	546	546	bDNA	585	None	A*03010 101 or 0103	A*290201 or 0202	B*4436	B*5801		
A	1536	731	731	bDNA	668	None			B*1510	B*5703		
A	1545	249	249	bDNA	826	None	A*3402	A*7401	B*440302	B*5702		
A	1564	390	390	bDNA	548	None	A*2301	A*3202	B*4001	B*5701	Cw*0304	Cw*0602
A	3051	310	310	bDNA	457	None	A*0202	A*2402	B*1302	B*1503	Cw*0210	Cw*0602
B	2003	50	<50	bDNA	429	ABC, 3TC, RTV, FTV	A*01	A*29	B*35	B*45	Cw*06	Cw*06
B	2006	50	<50	bDNA	480	3TC, TDF,I DV	A*0201	A*24	B*27	B*44	Cw*02	Cw*16
B	2013	50	<50	bDNA	519	ABC, 3TC,I DV	A*11	A*24	B*07	B*44	Cw*05	Cw*07
B	2017	50	<50	bDNA	639	ABC, NVP, LPV/r	A*0201	A*68	B*51	B*51	Cw*02	Cw*15
B	2039	50	<50	bDNA	575	D4T, 3TC,I DV,R TV	A*0201	A*0201	B*15	B*18	Cw*03	Cw*12

FIG. 16 (Cont. 1)

【 16 - 3 】

Group	SCOPE ID	VL num	VL	VL assay	CD4	ARV	A allele 1	A allele 2	B allele 1	B allele 2	Cw allele 1	Cw allele 2
B	2048	50	<50	bDNA	316	AZT/ 3TC, NFV	A*24	A*31	B*07	B*39	Cw*07	Cw*12
B	2049	50	<50	bDNA	346	D4T, 3TC, FTV	A*11	A*24	B*15	B*15	Cw*08	Cw*08
B	2050	50	<50	PCR	437	AZT/ 3TC, NVP, NFV	A*01	A*23	B*15	B*40	Cw*03	Cw*07
B	2055	75	<75	bDNA	295	3TC, TDF, EFV	A*0201	A*33	B*27	B*58	Cw*01	Cw*03
B	2056	50	<50	bDNA	977	D4T, 3TC,I DV,R TV	A*03	A*32	B*3501	B*4402	Cw*01	Cw*04
B	2058	50	<50	bDNA	520	D4T, 3TC, NFV	A*01	A*0201	B*2705	B*5501	Cw*01	Cw*03
B	2063	50	<50	bDNA	716	D4T, 3TC, EFV	A*24	A*31	B*08	B*40	Cw*03	Cw*07
B	2072	50	<50	bDNA	884	D4T, EFV, RTV, FTV	A*24	A*68	B*4001	B*5101	Cw*03	Cw*14
B	2085	50	<50	bDNA	955	DDI, D4T,I DV	A*01	A*34	B*35	B*44	Cw*04	Cw*05
B	2087	50	<50	bDNA	529	D4T,	A*03	A*68	B*07	B*18	Cw*07	Cw*07

FIG. 16 (Cont. 2)

【 16 - 4 】

Group	SCOPE ID	VL num	VL	VL assay	CD4	ARV	A allele 1	A allele 2	B allele 1	B allele 2	Cw allele 1	Cw allele 2
						3TC,I DV						
B	2089	50	<50	bDNA	1167	AZT/ 3TC, RTV	A*01	A*68	B*08	B*53	Cw*04	Cw*07
B	2096	50	<50	bDNA	648	D4T, 3TC, NVP	A*0201	A*24	B*27	B*44	Cw*02	Cw*05
B	2100	50	<50	bDNA	690	AZT, 3TC,I DV	A*0201	A*26	B*27	B*27	Cw*01	Cw*01
B	2102	50	<50	PCR	1041	AZT/ 3TC/ ABC, ATV, RTV	A*11	A*24	B*51	B*52	Cw*12	Cw*16
B	6049	50	<50	bDNA	585	AZT, 3TC, NFV	A*0201	A*26	B*27	B*35	Cw*01	Cw*12
C	3001	82959	82959	bDNA	279	None	A*0201	A*03	B*07	B*44	Cw*05	Cw*07
C	3016	81907	81907	bDNA	478	None	A*01	A*0201	B*07	B*08	Cw*07	Cw*07
C	3025	48973	48973	bDNA	54	None	A*03	A*24	B*15	B*39	Cw*03	Cw*12
C	3026	14510	14510	bDNA	602	None	A*0202	A*03	B*44	B*57	Cw*04	Cw*07
C	3049	50935	50935	bDNA	470	None	A*01	A*30	B*08	B*42	Cw*07	Cw*17
C	3058	11775	11775	bDNA	296	None	A*0201	A*23	B*14	B*35	Cw*04	Cw*08
C	3059	50625	50625	bDNA	230	None	A*25	A*31	B*18	B*44	Cw*02	Cw*12
C	3073	46716	46716	bDNA	66	None	A*0201	A*32	B*1402	B*4001	Cw*03	Cw*08
C	3076	44988	44988	bDNA	284	None	A*0201	A*6901	B*35	B*51	Cw*01	Cw*12
C	3079	23577	23577	bDNA	222	None	A*30	A*68	B*1402	B*3910	Cw*08	Cw*12

FIG. 16 (Cont. 3)

【 16 - 5 】

Group	SCOPE ID	VL num	VL	VL assay	CD4	ARV	A allele 1	A allele 2	B allele 1	B allele 2	Cw allele 1	Cw allele 2
C	3086	54377	54377	bDNA	83	None	A*0201	A*68	B*15	B*40	Cw*03	Cw*03
C	3092	24799	24799	bDNA	34	None	A*0201	A*03	B*15	B*52	Cw*03	Cw*16
C	3101	19387	19387	bDNA	406	None	A*01	A*33	B*51	B*52	Cw*02	Cw*16
C	3119	33720	33720	bDNA	346	None	A*03	A*24	B*15	B*35	Cw*03	Cw*04
C	3130	13033	13033	bDNA	214	None	A*03	A*68	B*0801	B*3503	Cw*07	Cw*12
C	3158	15880	15880	PCR	218	None	A*01	A*29	B*08	B*44	Cw*07	Cw*16
C	3183	24606	24606	bDNA	127	None			B*1501	B*1801		
C	6014	75000	>7500	PCR	330	None	A*0201	A*0201	B*27	B*40	Cw*01	Cw*03
C	6028	31700	31700	PCR	422	None	A*23	A*26	B*07	B*47	Cw*07	Cw*07
C	6043	22900	22900	PCR	307	None	A*0201	A*29	B*35	B*44	Cw*04	Cw*16

FIG. 16 (Cont.4)

【 図 17 】

<b>Viral load</b>	<b>Mean</b>	<b>Median</b>	<b>SE</b>	<b>Range</b>	<b>Max</b>	<b>Min</b>
A	454.38	310.00	86.74	1440.00	1490.00	50.00
B	51.32	50.00	1.32	25.00	75.00	50.00
C	1820721.65	82433.00	1574809.97	31688225.00	31700000.00	11775.00
<b>CD4</b>	<b>Mean</b>	<b>Median</b>	<b>SE</b>	<b>Range</b>	<b>Max</b>	<b>Min</b>
A	624.00	585.00	43.82	796.00	1067.00	271.00
B	648.37	585.00	57.83	872.00	1167.00	295.00
C	273.40	281.50	34.63	568.00	602.00	34.00

FIG. 17

【 18 - 1 】

Virus Name	Lab Adapted or Primary Isolate	Clade	Tropism	Source	NCBI Accession	L1-30-clone recogn. tested in expt(s)	Recognized by L1-30 Clone?
JR-CSF	Lab Adapted	B	R5	NIH AIDS Reagent Program	M38429	TO1	YES
IIIB	Primary	B	X4	NIH AIDS Reagent Program	A04321	TO1	YES
90US_873	Primary	B	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY713412	TO2	YES
91US_1	Primary	B	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY173952	TO2	YES
NL4-3	Lab Adapted	B	X4	NIH AIDS Reagent Program	M19921	TO1	YES
YU-2	Lab Adapted	B	R5	NIH AIDS Reagent Program	M93258	TO1	YES
Ba-L	Lab Adapted	B	R5	NIH AIDS Reagent Program	AB221005	SF1, TO2	YES
HTLV-IIIMN	Lab Adapted	B	X4	NIH AIDS Reagent Program	X01762	TO2	YES
92FR BX08	Primary	B	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY713411	TO2	YES
94US_33931 N	Primary	B	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY713410	TO2	YES
96TH_NP15 38	Primary	B	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY713408	TO2	YES

FIG. 18

【 18 - 2 】

Virus Name	Lab Adapted or Primary Isolate	Clade	Tropism	Source	NCBI Accession	L1-30-clone recogn. tested in expt(s)	Recognized by L1-30 Clone?
91US_4	Primary	B	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY173955	TO2	YES
90TH_BK132	Primary	B	X4	NIH AIDS Reagent Program	AY173951	SF1, TO2	YES
99UG_A084	Primary	D	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY304496	TO2	YES
83M1	Primary	D	R5	NIH AIDS Reagent Program	AF484516	TO2	YES
00UG_J3222	Primary	D	R5	NIH AIDS Reagent Program	AF484502	TO2	YES
98UG_57128	Primary	D	R5	NIH AIDS Reagent Program	AF484502	TO2	YES
92UG_001	Primary	D	Dual	NIH AIDS Reagent Program	AJ320848	TO1	YES
94IN_20635	Primary	C	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY713414	SF1, TO2	YES
93IN_101	Primary	C	R5	NIH AIDS Reagent Program	AB023804	TO1	YES
98US_MSC50	Primary	C	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY444801	TO2	YES
01TZ_911	Primary	C	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY253322	TO2	YES
1165MB	Primary	C	unknown	NIH AIDS Reagent Program	AY463230	TO1	YES
02ET_14	Primary	C	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY255825	SF1, TO2	YES
02ET_288	Primary	C	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY713417	TO2	YES
90SE_364	Primary	C	R5	NIH AIDS Reagent Program	AY713416	TO2	YES

FIG. 18 (Cont. 1)

【 ☒ 1 8 - 3 】

Virus Name	Lab Adapted or Primary Isolate	Clade	Tropism	Source	NCBI Accession	L1-30-clone recogn. tested in expt(s)	Recognized by L1-30 Clone?
				Reagent Program			
89SM_145	Primary	C	R5	NIH AIDS	AY713415	TO2	YES
01CM_1475 M	Primary	CRF02_AG	R5	NIH AIDS	AY371138	TO2	YES
91DJ_263	Primary	CRF02_AG	R5	NIH AIDS	AF063223	TO2	YES
90TH_CM23 5	Primary	CRF01_AE	R5	NIH AIDS	AF259954	SF1	YES
99KE_KNH1 135	Primary	A	R5	NIH AIDS	AF47065	TO2	YES
99KE_KNH1 088	Primary	A	R5	NIH AIDS	AF457063	TO2	YES
00KE_KSM4 030	Primary	A	R5	NIH AIDS	AF457079	TO2	YES
00KE_KNH1 209	Primary	A	R5	NIH AIDS	AF457069	TO2	YES
00KE_KNH1 207	Primary	A	R5	NIH AIDS	AF457068	TO2	YES
00KE_KNH1 144	Primary	A	R5	NIH AIDS	AF47066	SF1, TO2	YES
92UG_029	Primary	A	R5	NIH AIDS	AY713407	TO1	YES
00KE_KER20 08	Primary	A	Dual	NIH AIDS	AF457052	SF1, TO2	YES
92TH_006	Primary	E	Unknown	NIH AIDS	AY669776	TO1	YES

FIG. 18 (Cont. 2)

【 18 - 4 】

<b>Virus Name</b>	<b>Lab Adapted or Primary Isolate</b>	<b>Clade</b>	<b>Tropism</b>	<b>Source</b>	<b>NCBI Accession</b>	<b>L1-30-clone recogn. tested in expt(s)</b>	<b>Recognized by L1-30 Clone?</b>
<b>92TH_007</b>	Primary	CRF01_AE	R5	NIH AIDS Reagent Program	AF009384	TO1	YES
<b>G3</b>	Primary	G	Unknown	NIH AIDS Reagent Program	AF116736	TO1	YES
<b>HIV-2 60145K</b>	Primary	Gag A		NIH AIDS Reagent Program	Not available	TO1	YES

FIG. 18 (Cont. 3)

【 図 19 】

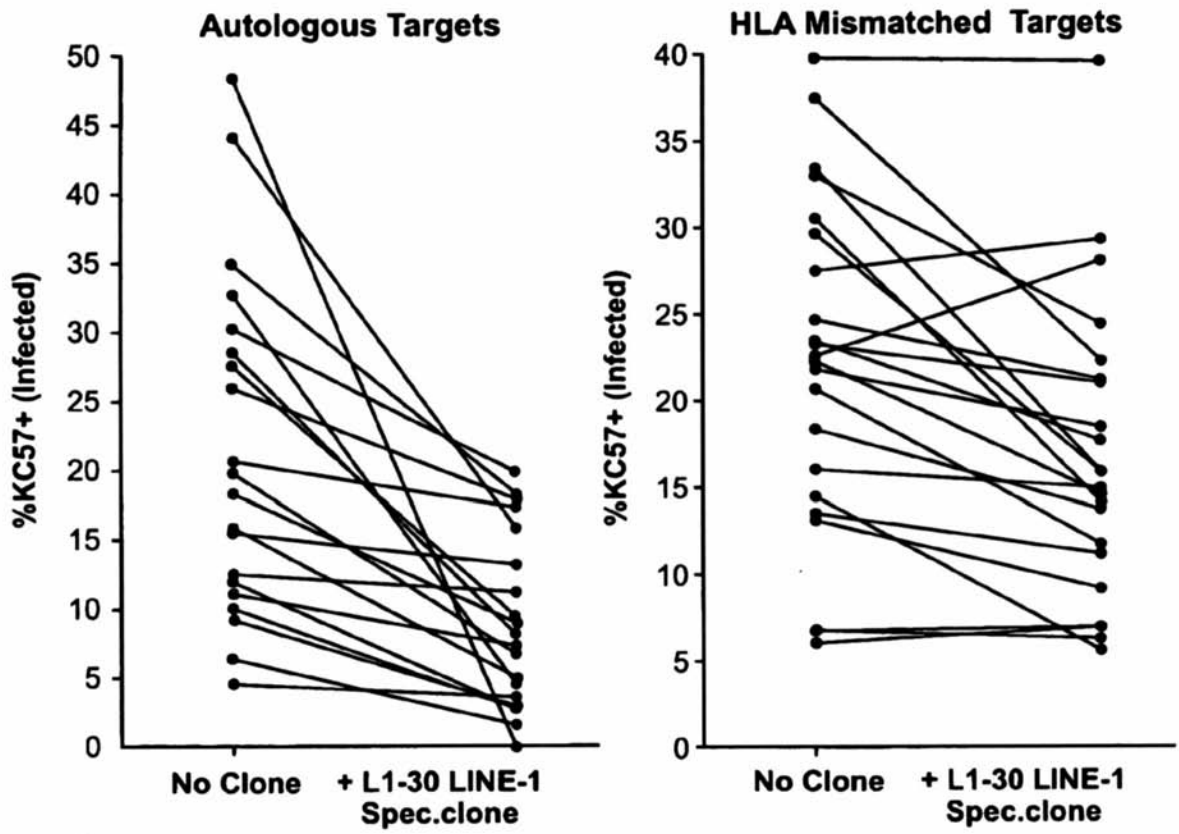


FIG. 19

【 図 2 0 】

MGKKQNRKTGNSKTQ  
 QNRKTGNSKTQSASP  
 TGNSKTQSASPPPKE  
 KTQSASPPPKERSSS  
 ASPPPKERSSSPATE  
 PKERSSSPATEQSWM  
 SSSPATEQSWMENDF  
 ATEQSWMENDFDEL  
 SWMENDFDELREEGF  
 NDFDELREEGFRRSN  
 ELREEGFRRSNYSEL  
 EGFRRSNYSELREDI  
 RSNYSELREDIQTKG  
 SELREDIQTKGKEVE  
 EDIQTKGKEVENFEK  
 TKGKEVENFEKNLEE  
 EVENFEKNLEECITR  
 FEKNLEECITRITNT  
 LEECITRITNTEKCL  
 ITRITNTEKCLKELM  
 TNTEKCLKELMELKT  
 KCLKELMELKTKARE  
 ELMELKTKARELREE  
 LKTKARELREECRSL  
 ARELREECRSLRSRC  
 REECRSLRSRCDQLE  
 RSLRSRCDQLEERVS  
 SRCQLEERVSAMED

QLEERVSAMEDEMNE  
 RVSAMEDEMNEMKRE  
 MEDEMNEKREGKFR  
 MNEMKREGKFREKRI  
 KREGKFREKRIKRNE  
 KFREKRIKRNEQSLQ  
 KRIKRNEQSLQEIWD  
 RNEQSLQEIWDYVVR  
 SLQEIWDYVVRPNLR  
 IWDYVVRPNLRLIGV  
 VKRPNLRLIGVPESD  
 NLRLIGVPESDVENG  
 IGVPESDVENGTKLE  
 ESDVENGTKLENTLQ  
 ENGTKLENTLQDIIQ  
 KLENTLQDIIQENFP  
 TLQDIIQENFPNLAR  
 IIQENFPNLARQANV  
 NFPNLARQANVQIQE  
 LARQANVQIQEIQRT  
 ANVQIQEIQRTQRY  
 IQEIQRTQRYSSRR  
 QRTQRYSSRRATPR  
 QRYSSRRATPRHIIV  
 SRRATPRHIIVRFTK  
 TPRHIIVRFTKVEMK  
 IIVRFTKVEMKEKML  
 FTKVEMKEKMLRAAR

EMKEKMLRAAREKGR  
 KMLRAAREKGRVTLK  
 AAREKGRVTLKGKPI  
 KGRVTLKGKPIRLTA  
 TLKGKPIRLTADLSA  
 KPIRLTADLSAETLQ  
 LTADLSAETLQARRE  
 LSAETLQARREWGPI  
 TLQARREWGPIFNIL  
 RREWGPIFNILKEKN  
 GPIFNILKEKNFQPR  
 NILKEKNFQPRISYP  
 EKNFQPRISYPAKLS  
 QPRISYPAKLSFISE  
 SYPKLSFISEGEIK  
 KLSFISEGEIKYFID  
 ISEGEIKYFIDKQML  
 EIKYFIDKQMLRDFV  
 FIDKQMLRDFVTTRP  
 QMLRDFVTTRPALKE  
 DFVTTRPALKELLKE  
 TRPALKELLKEALNM  
 LKELLKEALNMERNN  
 LKEALNMERNNRYQP  
 LNMERNNRYQPLQNH  
 RNNRYQPLQNHAK

FIG. 20

【 図 2 1 A 】

MTGSNSHITILTLNI  
 NSHITILTLNINGLN  
 TILTLNINGLNSAIK  
 LNINGLNSAIKRHRL  
 GLNSAIKRHRLASWI  
 AIKRHRLASWIKSQD  
 HRLASWIKSQDPSVC  
 SWIKSQDPSVCCIQE  
 SQDPSVCCIQETHLT  
 SVCCIQETHLTCRDT  
 IQETHLTCRDTHRLK  
 HLTCRDTHRLKIKGW  
 RDTHRLKIKGWRKIY  
 RLKIKGWRKIYQANG  
 KGWRKIYQANGKQKK  
 KIYQANGKQKKAGVA  
 ANGKQKKAGVAILVS  
 QKKAGVAILVSDKTD  
 GVAILVSDKTD FKPT  
 LVSDKTD FKPTKIKR  
 KTD FKPTKIKRDKG  
 KPTKIKRDKEGHYIM  
 IKRDKEGHYIMVKGS  
 KEGHYIMVKGS IQQE  
 YIMVKGS IQQEELTI  
 KGS IQQEELTILNIY  
 QQEELTILNIYAPNT  
 LTILNIYAPNTGAPR  
 NIYAPNTGAPRFIKQ  
 PNTGAPRFIKQVLS  
 APRFIKQVLSDLQRD  
 IKQVLSDLQRDLDSH  
 LSDLQRDLDSHTLIM  
 QRDLDSHTLIMGDFN  
 DSHTLIMGDFNTPLS  
 LIMGDFNTPLSTLDR  
 DFNTPLSTLDRSTRQ

PLSTLDRSTRQKVNK  
 LDRSTRQKVNKDTQE  
 TRQKVNKDTQELNSA  
 VNKDTQELNSALHQA  
 TQELNSALHQADLID  
 NSALHQADLIDIYRT  
 HQADLIDIYRTLHPK  
 LIDIYRTLHPKSTEY  
 YRTLHPKSTEYTFFS  
 HPKSTEYTFFSAPHH  
 TEYTFFSAPHHTYSK  
 FFSAPHHTYSKIDHI  
 PHHTYSKIDHIVGSK  
 YSKIDHIVGSKALLS  
 DHIVGSKALLSKCKR  
 GSKALLSKCKRTEII  
 LLSKCKRTEIITNYL  
 CKRTEIITNYLSDHS  
 EIITNYLSDHSAIKL  
 NYLSDHSAIKLELRI  
 DHSAIKLELRIKNLT  
 IKLELRIKNLTQSR  
 LRIKNLTQSRSTTWK  
 NLTQSRSTTWKLNLL  
 SRSTTWKLNLLNLLND  
 TWKLNLLNLLNDYVWH  
 NNLLNLLNDYVWHNEMK  
 LNDYVWHNEMKAEIK  
 VWHNEMKAEIKMFFE  
 EMKAEIKMFFETNEN  
 EIKMFFETNENKDTT  
 FFETNENKDTTYQNL  
 NENKDTTYQNLWDAF  
 DTTYQNLWDAFKAVC  
 QNLWDAFKAVCRGKF  
 DAFKAVCRGKFIALN  
 AVCRGKFIALNAYKR

GKFIALNAYKRKQER  
 ALNAYKRKQERSKID  
 YKRKQERSKIDTLTS  
 QERSKIDTLTSQLKE  
 KIDTLTSQLKELEKQ  
 LTSQLKELEKQEQTH  
 LKELEKQEQTHSKAS  
 EKQEQTHSKASRRQE  
 QTHSKASRRQEITKI  
 KASRRQEITKIRAE  
 RQEITKIRAEKEIE  
 TKIRAEKEIETQKT  
 AELKEIETQKTLQKI  
 EIETQKTLQKINESR  
 QKTLQKINESRSWFF  
 QKINESRSWFFERIN  
 ERSWFFERINKIDR  
 WFFERINKIDRPLAR  
 RINKIDRPLARLIKK  
 IDRPLARLIKKKREK  
 LARLIKKKREKNQID  
 IKKKREKNQIDTIKN  
 REKNQIDTIKNDKGD  
 QIDTIKNDKGDITTD  
 IKNDKGDITTDPTTEI  
 KGDITTDPTTEIQTTI  
 TTDPTTEIQTTIREYY  
 TEIQTTIREYYKHL  
 YKHLTYANKLENLE  
 EYKHLTYANKLENLE  
 EMDT  
 HLYANKLENLEEMDT  
 NKLENLEEMDTFLDT  
 NLEEMDTFLDTYTL  
 P  
 MDTFLDTYTLPRLNQ  
 LDYTLPRLNQEEVE  
 E  
 TLPRLNQEVEESLNR  
 LNQEVEESLNRPI TG

FIG. 21A

【 図 2 1 B 】

EVESLNRPIITGSEIV	NHMI ISIDA EKA FDK	FLYTNNRQTESQIMG
LNRPIITGSEIVAIIN	ISIDA EKA FDK IQQP	NNRQTESQIMGELPF
ITGSEIVAI INSLPT	AEKA FDK IQQP FMLK	TESQIMGELPF TIAS
EIVAI INSLPTKKSP	FDK IQQP FMLK TLNK	IMGELPFTIASKRIK
I INSLPTKKSPGPDG	QQP FMLK TLNK LGID	LPFTIASKRIKYLGI
LPTKKSPGPDGFTAE	MLK TLNK LGID GTYF	IASKRIKYLGIQLTR
KSPGPDGFTA E F YQR	LNK LGID GTYF KI IR	RIKYLGIQLTRDVKD
PDGFTA E F YQRYKEE	GID GTYF KI IRAI YD	LGIQLTRDVKDLFKE
TAEFYQRYKEELVPF	TYFKI IRAI YDKPTA	LTRDVKDLFKENYKP
YQRYKEELVPFLLKL	I IRAI YDKPTANI IL	VKDLFKENYKPLLKE
KEELVPFLLKLFQSI	IYDKPTANI ILNGQK	FKENYKPLLKEIKEE
VPFLLKLFQSI EKEG	PTANI ILNGQKLEAF	YKPLLKEIKEETNKW
LKLFQSI EKEGILPN	I ILNGQKLEAFPLKT	LKEIKEETNKWKNIP
QSI EKEGILPNSFYE	GQKLEAFPLKTGTRQ	KEETNKWKNIPCSWV
KEGILPNSFYEASII	EAFPLKTGTRQGCPL	NKWKNIPCSWVGRIN
LPNSFYEASII LIPK	LKTGTRQGCPLSPLL	NIPCSWVGRINIVKM
FYEASII LIPKGRD	TRQGCPLSPLLFNIV	SWVGRINIVKMAILP
SIILIPKGRD TTKK	CPLSPLLFNIVLEVL	RINIVKMAILPKVIY
IPKGRD TTKKENFR	PLLFNIVLEVLARAI	VKMAILPKVIYRFNA
GRD TTKKENFRPISL	NIVLEVLARAIRQEK	ILPKVIYRFNAIPIK
TKKENFRPISLMNID	EVLARAIRQEKEIKG	VIYRFNAIPIKLPMT
NFRPISLMNIDAKIL	RAIRQEKEIKGIQLG	FNAIPIKLPMTFFTE
ISLMNIDAKILNKIL	QEKEIKGIQLGKEEV	PIKLPMTFFTELEKT
NIDAKILNKILANRI	IKGIQLGKEEVKLSL	PMTFFTELEKTTLKF
KILNKILANRIQQHI	QLGKEEVKLSL FADD	FTELEKTTLKFIWNQ
KILANRIQQHIKKLI	EEVKLSL FADD MIVY	EKTTLKFIWNQKRAR
NRIQQHIKKLIHHDQ	LSL FADD MIVYLENP	LKFIWNQKRARI AKS
QHIIKKLIHHDQVGF	ADD MIVYLENP IVSA	WNQKRARI AKSILSQ
KLIHHDQVGFIPGMQ	IVYLENP IVSAQNLL	RARI AKSILSQKNKA
HDQVGFIPGMQGFN	ENP IVSAQNLLKLIS	AKSILSQKNKAGGIT
GFIPGMQGFNIRKS	VSAQNLLKLISNFSK	LSQKNKAGGITLPDF
GMQGFNIRKSINVI	NLLKLISNFSK VSGY	NKAGGITLPDFKLYY
WFNIRKSINVIQHIN	LISNFSK VSGYKINV	GITLPDFKLYYKATV
RKSINVIQHINRAKD	FSK VSGYKINVQKSQ	PDFKLYYKATVTKTA
NVIQHINRAKDKNHM	SGYKINVQKSQAFLY	LYYKATVTKTAWYWY
HINRAKDKNHMIISI	INVQKSQAFLYTNNR	ATVTKTAWYWYQNRD
AKDKNHMIISIDA EK	KSQAFLYTNNRQTES	KTAWYWYQNRDIDQW

FIG. 21B

【 図 2 1 C 】

YWYQNRDIDQWNRTE	KSFCTAKETTIRVNR	WDCKLVQPLWKSVMR
NRDIDQWNRTEPSEI	TAKETTIRVNRQPTT	LVQPLWKSVMRFLRD
DQWNRTEPSEIMPHI	TTIRVNRQPTTWEKI	LWKSVMRFLRDLELE
RTEPSEIMPHIYNYL	VNRQPTTWEKIFATY	VWRFLRDLELEIPFD
SEIMPHIYNYLIFDK	PTTWEKIFATYSSDK	LRDLELEIPFDPAIP
PHIYNYLIFDKPEKN	EKIFATYSSDKGLIS	ELEIPFDPAIPLGI
NYLIFDKPEKNQWG	ATYSSDKGLISRIYN	PFDPAIPLGIYPNE
FDKPEKNQWGKDSL	SDKGLISRIYNELKQ	AIPLLGIYPNEYKSC
EKNKQWGKDSLFNKW	LISRIYNELKQIYKK	LGIYPNEYKSCCYKD
QWGKDSLFNKWCWEN	IYNELKQIYKKKTNN	PNEYKSCCYKDTCTR
DSLFNKWCWENWLAI	LKQIYKKKTNNPIKK	KSCCYKDTCTRMFIA
NKWCWENWLAI CRKL	YKKKTNNPIKKWAKD	YKDTCTRMFIAALFT
WENWLAI CRKLKLDP	TNNPIKKWAKDMNRH	CTRMFIAALFTIAKT
LAI CRKLKLDPFLTP	IKKWAKDMNRHFSKE	FIAALFTIAKTWNQP
RKLKLDPFLTPYTKI	AKDMNRHFSKEDIYA	LFTIAKTWNQPKCPT
LDPFLTPYTKINSRW	NRHFSKEDIYAAKKH	AKTWNQPKCPTMIDW
LTPYTKINSRWIKDL	SKEDIYAAKHKMKCC	NQPKCPTMIDWIKKM
TKINSRWIKDLNVKP	IYAAKHKMKCCSSSL	CPTMIDWIKKMWHIY
SRWIKDLNVKPKTIK	KKHKMKCCSSSLAIRE	IDWIKKMWHIYTMEY
KDLNVKPKTIK TLEE	KKCCSSSLAIREMQIK	KKMWHIYTMEYAAI
VKPKTIK TLEENLGI	SSLAIREMQIKTTMR	HIYTMEYAAIKNDE
TIK TLEENLGITIQD	I REMQIKTTMRYHLT	MEYAAIKNDEFISF
LEENLGITIQDIGVG	QIKTTMRYHLTPVRM	AAIKNDEFISFVGTW
LGITIQDIGVGKDFM	TMRYHLTPVRMAI IK	DEFISFVGTWМКLE
IQDIGVGKDFMSKTP	HLTPVRMAI IKKSGN	ISFVGTWМКLETIIL
GVGKDFMSKTPKAMA	VRMAI IKKSGNNRCW	GTWМКLETIILSKLS
DFMSKTPKAMATKDK	I IKKSGNNRCWRGCG	KLETIILSKLSQEOK
KTPKAMATKDKIDKW	SGNNRCWRGCGEIGT	IILSKLSQEOKTKHR
AMATKDKIDKWDLIK	RCWRGCGEIGTLLHC	KLSQEOKTKHRIFSL
KDKIDKWDLIKLSF	GCGEIGTLLHCWWD	EQKTKHRIFSLIGGN
DKWDLIKLSFCTAK	IGTLLHCWWDCKLVQ	
LIKLSFCTAKETTI	LHCWWDCKLVQPLWK	

FIG. 21C

【 配列表 】

2010539901000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/10883
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/00 (2009.01) USPC - 424/185.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC- 424/185.1  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) PubWEST, Google Scholar Search Terms: CD8+, long interspersed nuclear element, cancer, LINE, produce, generate, population, cell, antigen presenting platform, HIV, ummunodeficiency, surface, T cell		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	WO 2004/039952 A2 (WILLIAMS et al.), 13 May 2004 (13.05.2004), SEQ ID NO 133, para [0009]-[0010], [0019], [0178], [0225]-[0226], [0262]-[0263], [0296], [0300], [0303], [0391]-[0392], [0481], [0494]-[495], [0510], [0518]-[0519], [0593], [0652], [0657].	1-7, 14-21, 24-29, 32-35, 38  30, 31, 36, 37
Y	US 2007/0031445 A1 (SANDERSON et al.), 08 Feb. 2007 (08.02.2007), para [0010], [0015]	30, 31, 36, 37
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* 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 application or patent 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 10 Feb. 2009 (10.02.2009)		Date of mailing of the international search report <b>23 MAR 2009</b>
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. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young  PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/10883

<b>Box No. II</b>	<b>Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
<b>Box No. III</b>	<b>Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.</p> <p>Group I: claims 1-7, 14-21 and 24-38, directed to an immunogenic composition comprising an isolated LINE polypeptide. Group II: claims 8-13, 22 and 23, directed to a nucleic acid encoding a LINE polypeptide, and immunogenic compositions comprising said nucleic acid. Group III: claim 31, directed to a method of generating a population of CD8<sup>+</sup> cells Group IV: claim 39, directed to a method of monitoring a patient's response to a treatment for a retrovirus infection.</p> <p>- Please see extra sheet for continuation -</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input checked="" type="checkbox"/> 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.: 1-7, 14-21 and 24-38</p> <p><b>Remark on Protest</b></p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/10883

## Continuation of Box III:

The inventions listed as Groups I - IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the Group I claims is providing an immunogenic composition comprising an isolated LINE polypeptide - not required by the claims of Groups II-IV. The special technical feature of the Group II claims is a nucleic acid encoding a LINE polypeptide, and immunogenic compositions comprising said nucleic acid - not required by the claims of Groups I, III or IV. The special technical feature of the Group III claims is a method of generating a population of CD8+ cells, not required by the claims of Groups I, II or IV. The special technical feature of the Group IV claims is a method of monitoring a patient's response to a treatment for a retrovirus infection - not required by the claims of Groups I-III. Neither of these special technical features is common to the other group, nor do they correspond to a special technical feature in the other group.

The only common technical element shared by the above groups is that they are related to a LINE polypeptide having a particular sequence. This common technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2005/0196754 A1 to Ormanac et al. (see SEQ ID NO 37231). Therefore, the inventions of Group I and Group II lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/711 (2006.01)	A 6 1 K 31/711	
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P
A 6 1 K 39/12 (2006.01)	A 6 1 K 39/12	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(71) 出願人 592130699

ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア

The Regents of The University of California

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94607 オークランド フランクリン ストリート 1

111 トウエルフス フロア

(71) 出願人 510080565

オストロウスキー, マリオ

カナダ国, オンタリオ M5S 1A8, トロント, 1 キングス カレッジ サークル, メディ

カル サイエンシズ ビルディング

(71) 出願人 510080576

ジョーンズ, アール. ブラッドリー

カナダ国, オンタリオ M5S 1A8, トロント, 1 キングス カレッジ サークル, メディ

カル サイエンシズ ビルディング

(74) 代理人 100149294

弁理士 内田 直人

(74) 代理人 100137512

弁理士 奥原 康司

(72) 発明者 ニクソン, ドウグラス

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94114, サン フランシスコ, # B, シックスティーン

ス ストリート 3759

(72) 発明者 ガリソン, キース

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94502, アラメダ, ハーバーロード 206

(72) 発明者 メイクルジョン, ドゥンカン

アメリカ合衆国, ニューハンプシャー州 03784, ウェスト レバノン, ハドコック レーン

4

(72) 発明者 オストロウスキー, マリオ

カナダ国, オンタリオ M5S 1A8, トロント, 1 キングス カレッジ サークル, メディ

カル サイエンシズ ビルディング

(72) 発明者 ジョーンズ, アール. ブラッドリー

カナダ国, オンタリオ M5S 1A8, トロント, 1 キングス カレッジ サークル, メディ

カル サイエンシズ ビルディング

(72)発明者 アグロウアル, アシシ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 5 3 9, フレモント, パインヒル サークル 1 6 8 1

(72)発明者 ヘヒト, フレデリック エム.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 1 1 0, サン フランシスコ, ワード 8 4, ビルディング  
グ 8 0, ポトレロ アヴェニュー 9 9 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 AA14 CA02 DA03 HA14 HA15 HA17  
4B063 QA19 QQ08 QQ43 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48 QR56 QR77  
QS33 QS34 QX01  
4B065 AA94X BB34 CA24 CA46  
4C085 AA03 AA13 AA14 BA69 BB11 BB23 CC23 DD62 DD86 EE01  
EE06 FF02 FF12 GG10  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA05 MA56 NA14 ZB26 ZB33 ZC55  
ZC75  
4C087 AA01 AA02 BC83 MA01 NA14 ZB26 ZB33 ZC55  
4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA05 CA40 DA86 EA20 EA51 EA53  
FA74

专利名称(译)	长链散在重复多肽组合物及其使用方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2010539901A</a>	公开(公告)日	2010-12-24
申请号	JP2010525831	申请日	2008-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	杰伊大卫格莱斯顿制度津市 加利福尼亚大学董事会 马里奥·奥斯特洛夫斯基 琼斯厄尔·布拉德利		
申请(专利权)人(译)	周杰伦大卫格莱斯顿制度津市 加州大学董事会 奥斯特洛夫斯基, 马里奥 琼斯, 伯爵.布拉德利		
[标]发明人	ニクソンドウグラス ガリソンキース メイクルジョンドウンカン オストロウスキーマリオ ジョーンズアールブラッドリー アグロウアルアシシ ヘイトフレデリックエム		
发明人	ニクソン,ドウグラス ガリソン,キース メイクルジョン,ドウンカン オストロウスキー,マリオ ジョーンズ,アール.ブラッドリー アグロウアル,アシシ ヘイト,フレデリック エム.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C12N5/0783 C12Q1/02 C12Q1/68 A61P31/18 A61P35/00 A61K31/711 A61K39/00 A61K39/39 A61K35/76 G01N33/53 A61K39/12		
CPC分类号	C07K14/47 A61K39/0005 A61K39/0011 A61K2039/53 A61K2039/55 A61K2039/57 C12N2740/16011 G01N33/5047 G01N2333/15 G01N2333/52		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12N5/00.202.L C12Q1/02 C12Q1/68.A A61P31/18 A61P35/00 A61K31/711 A61K39/00.H A61K39/39 A61K35/76 G01N33/53.P A61K39/12		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/AA14 4B024/CA02 4B024/DA03 4B024/HA14 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B065/AA94X 4B065/BB34 4B065/CA24 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BA69 4C085/BB11 4C085/BB23 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD86 4C085/EE01 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/FF12 4C085/GG10 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/MA56 4C086/NA14 4C086/ZB26 4C086/ZB33 4C086/ZC55 4C086/ZC75 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/MA01 4C087/NA14 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4C087/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA05 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA51 4H045/EA53 4H045/FA74		
代理人(译)	内田直人		
优先权	60/973993 2007-09-20 US		
其他公开文献	JP2010539901A5		

## 摘要(译)

本发明提供LINE多肽;和组合物,包括免疫原性组合物,包含主题LINE多肽。本发明提供了一种重组核酸,其包含编码主题LINE多肽的核苷酸序列。主题组合物可用于刺激对LINE肽的T细胞免疫应答。本发明进一步提供了刺激个体对逆转录病毒或慢病毒感染细胞的免疫应答的方法。本发明进一步提供了治疗与其中异常表达LINE多肽的组织相关的癌症的方法。还提供了治疗病症的方法,涉及降低对LINE多肽的免疫应答。

