

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2006/035681

発行日 平成20年5月15日 (2008.5.15)

(43) 国際公開日 **平成18年4月6日 (2006.4.6)**

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	4B024
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	4B063
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4C084
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 26 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2006-537705 (P2006-537705)	(71) 出願人 504179255 国立大学法人 東京医科歯科大学 東京都文京区湯島 1-5-4 5
(21) 国際出願番号 PCT/JP2005/017527	
(22) 国際出願日 平成17年9月22日 (2005.9.22)	
(31) 優先権主張番号 特願2004-280649 (P2004-280649)	(74) 代理人 100107984 弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日 平成16年9月27日 (2004.9.27)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 原嶋 奈々江 日本国東京都葛飾区亀有 4-34-8-4 02
	(72) 発明者 神奈木 真理 日本国東京都文京区小石川 5丁目 19-1 7-306
	(72) 発明者 田野崎 隆二 日本国東京都中央区築地 5-1-1-12 18
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HLA-A11 拘束性 Tax 抗腫瘍エピートープ

(57) 【要約】

成人T細胞白血病 (ATL) 等のヒトT細胞白血病ウイルスI型 (HTLV-I) 腫瘍に対して抗腫瘍効果を有する細胞傷害活性T細胞 (CTL) を誘導することができる HTLV-I 特異的 CTL 誘導活性ペプチドや、これらを利用した免疫応答誘導用ワクチンや免疫機能検査診断薬等を提供するものである。HLA が一致する同胞ドナーからの造血幹細胞移植 (HSCT) 後に完全寛解を得た ATL 患者の細胞性免疫応答を調査したところ、ATL 患者の HSCT 後の末梢血単核細胞 (PBMC) の培養液において、HTLV-I 特異的 CTL が、HSCT 前にインビトロで構築した自己 HTLV-I 感染 T 細胞に应答して活発に増殖した HLA-A11 拘束性 Tax 88 96 ならびに HLA-A11 拘束性 Tax 272 280 エピートープに選択的に誘導された。これは、患者体内でこのエピートープが強く発現されていたことを意味し、本エピートープがワクチン抗原として有用であることを示している。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチド。

【請求項 2】

配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチド。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドと、マーカートンパク質及び / 又はペプチドタグとを結合させた融合ペプチド。

10

【請求項 4】

H L A - A 1 1 と請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドとが結合したタンパク - ペプチド結合体。

【請求項 5】

H L A - A 1 1 と請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドとが結合したタンパク - ペプチド結合体の 4 量体。

【請求項 6】

請求項 4 記載のタンパク - ペプチド結合体又は請求項 5 記載のタンパク - ペプチド結合体の 4 量体と、マーカートンパク質及び / 又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質。

20

【請求項 7】

以下の (a) 又は (b) のペプチドをコードする D N A 。

(a) 配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチド

(b) 配列番号 3 又は 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチド

【請求項 8】

配列番号 7 又は 8 に示される塩基配列若しくはその相補的配列からなる D N A 。

30

【請求項 9】

請求項 8 記載の D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドをコードする D N A 。

【請求項 10】

配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列を有する H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドからなる H L A - A 1 1 拘束性 T a x エピトープ。

【請求項 11】

配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドを有効成分として含有する免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項 12】

配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドを有効成分として含有する免疫応答誘導用ワクチン。

40

【請求項 13】

請求項 7 ~ 9 のいずれか記載の D N A を発現させることができるベクターを有効成分として含有する免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項 14】

さらに、H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性を増強するアジュバントが含まれている、請求項 8 ~ 10 のいずれか記載の免疫応答誘導用ワクチン。

【請求項 15】

50

請求項 1 1 ~ 1 4 のいずれか記載の免疫応答誘導用ワクチンを有効成分として含有する医薬組成物。

【請求項 1 6】

配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドを有効成分として含有する免疫機能検査診断薬。

【請求項 1 7】

配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドを有効成分として含有する免疫機能検査診断薬。

【請求項 1 8】

請求項 7 ~ 9 のいずれか記載の D N A を発現させることができるベクターを有効成分として含有する免疫機能検査診断薬。

【請求項 1 9】

H L A - A 1 1 と請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドとが結合したタンパク - ペプチド結合体を有効成分として含有する免疫機能検査診断薬。

【請求項 2 0】

H L A - A 1 1 と請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドとが結合したタンパク - ペプチド結合体の 4 量体を有効成分として含有する免疫機能検査診断薬。

【請求項 2 1】

請求項 7 ~ 9 のいずれか記載の D N A を有効成分として含有する H T L V - I 腫瘍の診断薬。

【請求項 2 2】

請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドに特異的に結合する抗体。

【請求項 2 3】

抗体がモノクローナル抗体である請求項 2 2 記載の抗体。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 又は 2 3 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドに特異的に結合する抗体を有効成分として含有する H T L V - I 腫瘍の診断薬。

【請求項 2 5】

請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドを発現することができる発現ベクター。

【請求項 2 6】

請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドを発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項 2 7】

H L A - A 1 1 と請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドとの結合体を発現することができる発現ベクター。

【請求項 2 8】

H L A - A 1 1 と請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドとの結合体を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項 2 9】

H S C T 前の A T L 患者に由来する H T L V - I 感染 T 細胞を用いて、同種の H L A タイプのドナー由来の H S C T 後の同じ患者の P B M C を刺激することを特徴とする H T L V - I 認識 C T L の誘導方法。

【請求項 3 0】

請求項 1 又は 2 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドを用いて、H L A - A 1 1 陽性の A T L 患者の P B M C を刺激することを特徴とする H T L V - I 認識 C T L の誘導方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

請求項 7 ~ 9 のいずれか記載の DNA を発現させることができるベクターを用いて、HLA - A 1 1 陽性の ATL 患者の PBMC を刺激することを特徴とする HTLV - I 認識 CTL の誘導方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、成人 T 細胞白血病 (ATL) 等のヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV - I) 腫瘍に対して抗腫瘍効果を有する細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導することができる HTLV - I 特異的 CTL 誘導活性ペプチドや、該ペプチドをコードする DNA や、これらを利用した免疫応答誘導用ワクチン並びに免疫機能検査診断薬等に関する。

10

【背景技術】**【0002】**

成人 T 細胞白血病 (ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV - I) 感染者の約 5 % が発症する T 細胞悪性腫瘍であり、主に CD 4⁺ 及び CD 25⁺ 成熟 T リンパ球表現型をもつこと、中年又はそれ以降の発症、免疫抑制、及び予後が悪いことを特徴としている (例えば、非特許文献 1、2 参照。)。ATL に対して化学療法を併用した臨床使用により 4 年生存率は 8 ~ 12 % に高まったものの、白血病の他のタイプと比べると依然として低率である (例えば、非特許文献 3、4 参照。)。最近になって、造血幹細胞移植 (HSCT) が一部の ATL 患者に適用されるようになってきた。自己 HSCT の初期の研究は ATL 再発が頻繁に起きることを明らかにした (例えば、非特許文献 5 参照。)。しかしながら、より最近の報告によると、移植片対宿主病 (GVHD) の危険性は同様にあるものの、同種 HSCT の方がより良い結果を生じることが明らかになった (例えば、非特許文献 6 参照。)。以上の報告は、他のタイプの白血病で観察されたように、レシピエントに対するドナーの細胞性免疫応答、つまり移植片対白血病 (GVL) 効果が ATL 細胞根絶に貢献することを強く示唆している。

20

【0003】

ヒト白血球抗原 (HLA) が一致する同胞から受けた同種 HSCT はある程度の GVHD を起こすことが示され、レシピエントのマイナー組織適合抗原 (mHA) が GVHD の標的抗原と考えられてきた (例えば、非特許文献 7 参照。)。男性特異的 H - Y 移植抗原 (例えば、非特許文献 8 参照。)、HA - 1 抗原 (例えば、非特許文献 9 参照。)、CD 31 分子 (例えば、非特許文献 10、11 参照。)、及びヒト血小板抗原 (HPA) (例えば、非特許文献 11、12 参照。) を含むいくつかの mHA が GVHD に関与すると示唆されてきた。同種 HSCT 後の白血病再発の可能性は、移植片から T 細胞を除去した場合又はドナーが遺伝学的に一卵性双生児の場合に増加することが知られており、GVL 効果が白血病再発を防ぐ為に重要であることを示している (例えば、非特許文献 13 参照。)。従って、レシピエントの非造血細胞にではなく造血細胞において発現する mHA 特異的なドナー T 細胞応答を増加することが、GVHD を引き起こさずに GVL 効果を誘導できる戦略の一つとして提案されてきた (例えば、非特許文献 14 参照。)。腫瘍細胞特異的又は腫瘍細胞において過剰発現する bcr / abl 融合タンパク質及び WT - 1 等の腫瘍抗原もまた、GVL 効果の標的抗原の候補である (例えば、非特許文献 15、16 参照。)。

30

40

【0004】

HTLV - I に対する宿主細胞性免疫応答、特に細胞傷害性 T 細胞の増殖は、無症候性 HTLV - 1 キャリア及び HTLV - I 随伴脊髄症 / 熱帯性瘧疾対麻痺 (HAM / TSP) 患者の PBMC 培養液からは頻繁に見い出されるが、ATL 患者から見い出されることは稀である (例えば、非特許文献 17、18 参照。)。env、gag、pol、pX 遺伝子産物等の HTLV - I 抗原のうち、pX 遺伝子産物である Tax が HTLV - I 特異的な細胞傷害性リンパ球 (CTL) の優位な標的抗原であることが知られている (例えば、非特許文献 19、20 参照。)。Tax はまた、細胞成長を促進しアポトーシスを抑制

50

することによってH T L V - I の白血病化における重要な役割を果たしていることも知られている（例えば、非特許文献 2 1、2 2 参照。）。以上の発見からT a x 特異的C T L がH T L V - I 感染細胞の白血病化の免疫的監視の役割を果たしうることが示唆されている。

【 0 0 0 5 】

本発明者らは以前にヒトH L A - A 2 に拘束されるC T L の主要エピトープを既に見い出している（例えば、非特許文献 2 3 参照。）が、H L A - A 2 は日本人の3 0 ~ 4 0 % のみに陽性である。また、最近樹立したH T L V - I 感染T細胞リンパ腫瘍のモデル動物において、本発明者らはインビボでのT a x 特異的C T L の抗腫瘍効果を明らかにした（例えば、特許文献 1、非特許文献 2 4、2 5 参照。）。このモデルにおいては、T a x をコードするD N A 又はC T L エピトープに対応するペプチドのいずれかを用いたワクチン接種を受けた同系免疫担当ラットから新鮮なT細胞を移植することにより、同系H T L V - I 感染細胞を接種したヌードラットにおける無処置では致命的となるT細胞リンパ腫が根治し得た（例えば、非特許文献 2 6、2 7 参照。）。しかしながら、末梢血でのヒトA T L 細胞におけるH T L V - I 発現は非常に低いので、実験動物における上記の観察がヒトに適用できるかどうかは不明である（例えば、非特許文献 2 8 ~ 3 0 参照。）。

【 0 0 0 6 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 2 - 3 7 2 5 3 2 号公報

【非特許文献 1】Int. J. Cancer 45, 237 243, 1990; Blood 50, 481 492, 1977

【非特許文献 2】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6476 6480, 1981

【非特許文献 3】J. Clin. Oncol 6, 128 141, 1988

【非特許文献 4】J. Clin. Onco 6, 1088 1097, 1988

【非特許文献 5】Bone Marrow Transplant 23, 87 89, 1999

【非特許文献 6】Bone Marrow Transplant 27, 15 20, 2001

【非特許文献 7】N. Engl. J. Med. 334, 281 285, 1996

【非特許文献 8】Science 269, 1588 1590, 1995

【非特許文献 9】Science 279, 1054 1057, 1998

【非特許文献 1 0】N. Engl. J. Med. 334, 286 291, 1996

【非特許文献 1 1】Br. J. Haematol 106, 723 729, 1999

【非特許文献 1 2】Blood 92, 2169 2176, 1998

【非特許文献 1 3】Blood 75, 552 562, 1990

【非特許文献 1 4】Blood 93, 2336 2341, 1999

【非特許文献 1 5】Blood 95, 1781 1787, 2000

【非特許文献 1 6】Blood 96, 1480 1489, 2000

【非特許文献 1 7】Leukemia 8 Suppl 1, S54 59, 1994

【非特許文献 1 8】J. Immunol. 133, 1037 1041, 1984

【非特許文献 1 9】Nature 348, 245 248, 1990

【非特許文献 2 0】Int. Immunol. 3, 761 767, 1991

【非特許文献 2 1】Lancet 1, 1085 1086, 1987

【非特許文献 2 2】J. Virol. 73, 7981 7987, 1999

【非特許文献 2 3】J. Virol. 66, 2928 2933, 1992

【非特許文献 2 4】J. Virol. 74, 428 435, 2000

【非特許文献 2 5】J. Virol. 73, 6031 6040, 1999

【非特許文献 2 6】J. Virol. 74, 9610 9616, 2000;

【非特許文献 2 7】J. Natl. Cancer Inst. 93, 1775 1783, 2001

【非特許文献 2 8】Gann 73, 341 344, 1982

【非特許文献 2 9】Int. J. Cancer 54, 582 588, 1993

【非特許文献 3 0】Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5620 5624, 1989

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

A T L は、日本に多くの保有率を持つ H T L V - I の感染によって引き起こされる腫瘍性疾患であるが、化学療法剤に抵抗性であるため、極めて予後の悪い悪性腫瘍とされてきた。種々の臨床的観察や動物実験結果から、宿主細胞性免疫、特に C T L の抗腫瘍効果が示唆されているが、C T L の主要な標的抗原である H T L V - I T a x には腫瘍化促進機能があることが分かっている。従って、より特異的で安全性の高いワクチン開発のためには、C T L 認識エピトープを特定する必要がある。しかし、ヒト A T L 患者において抗腫瘍効果を持つ C T L エピトープは特定されていなかった。本発明の課題は、A T L 等の H T L V - I 腫瘍に対して抗腫瘍効果を有する C T L を誘導することができる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドや、該ペプチドをコードする D N A や、これらを利用した免疫応答誘導用ワクチン並びに抗腫瘍免疫能検査診断薬等を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、H S C T 前の A T L 患者に由来する H T L V - I 感染 T 細胞に対する、H S C T 後の同じ患者の細胞性免疫応答を調査した。これらの H T L V - I 感染細胞は G V L 効果の標的を含む、レシピエント由来の抗原を所有すると考えられていた。本発明者らは H S C T 後の P B M C が実際にレシピエント由来細胞に应答することを見出した。しかしながら、应答細胞の大部分は H T L V - I 抗原、特に限られた数の T a x エピトープに強く反応した。以上の観察から移植片対 H T L V - I 应答が H S C T 後の A T L 患者に生じたことが明らかとなった。かかる研究の過程で、H L A - A 1 1 に拘束される 2 つの C T L の主要エピトープを見出し、本発明を完成するに至った。

20

【 0 0 0 9 】

すなわち本発明は、(1) 配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドや、(2) 配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドや、(3) 上記 (1) 又は (2) 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドと、マーカートンパク質及びノ又はペプチドタグとを結合させた融合ペプチドや、(4) H L A - A 1 1 と上記 (1) 又は (2) 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドとが結合したタンパク - ペプチド結合体や、(5) H L A - A 1 1 と上記 (1) 又は (2) 記載の H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドとが結合したタンパク - ペプチド結合体の 4 量体や、(6) 上記 (4) 記載のタンパク - ペプチド結合体又は請求項 5 記載のタンパク - ペプチド結合体の 4 量体と、マーカートンパク質及びノ又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質や、(7) 以下の (a) 又は (b) のペプチドをコードする D N A 。

30

(a) 配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチド

(b) 配列番号 3 又は 4 のいずれかに示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドや、(8) 配列番号 7 又は 8 に示される塩基配列若しくはその相補的配列からなる D N A や、(9) 上記 8 記載の D N A とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドをコードする D N A に関する。

40

【 0 0 1 0 】

また本発明は、(1 0) 配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列を有する H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドからなる H L A - A 1 1 拘束性 T a x エピトープや、(1 1) 配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドを有効成分として含有する免疫応答誘導用ワクチンや、(1 2) 配列番号 3 又は 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる H T L V - I 特異的 C T L 誘導活性ペプチドを有効成分として含有する免疫応答誘導用ワクチンや、(1 3) 上記 (7) ~ (9) のいずれか記

50

載のDNAを発現させることができるベクターを有効成分として含有する免疫応答誘導用ワクチンや、(14)さらに、HTLV-I特異的CTL誘導活性を増強するアジュバントが含まれている、上記(8)~(10)のいずれか記載の免疫応答誘導用ワクチンや、(15)上記(11)~(14)のいずれか記載の免疫応答誘導用ワクチンを有効成分として含有する医薬組成物や、(16)配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドを有効成分として含有する免疫機能検査診断薬や、(17)配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなるHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドを有効成分として含有する免疫機能検査診断薬に関する。

【0011】

さらに本発明は、(18)上記(7)~(9)のいずれか記載のDNAを発現させることができるベクターを有効成分として含有する免疫機能検査診断薬や、(19)HLA-A11と上記(1)又は(2)記載のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドとが結合したタンパク-ペプチド結合体を有効成分として含有する免疫機能検査診断薬や、(20)HLA-A11と上記(1)又は(2)記載のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドとが結合したタンパク-ペプチド結合体の4量体を有効成分として含有する免疫機能検査診断薬や、(21)上記(7)~(9)のいずれか記載のDNAを有効成分として含有するHTLV-I腫瘍の診断薬や、(22)上記(1)又は(2)記載のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドに特異的に結合する抗体や、(23)抗体がモノクローナル抗体である上記(22)記載の抗体や、(24)上記(22)又は(23)記載のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドに特異的に結合する抗体を有効成分として含有するHTLV-I腫瘍の診断薬や、(25)上記(1)又は(2)記載のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドを発現することができる発現ベクターや、(26)上記(1)又は(2)記載のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドを発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、(27)HLA-A11と上記(1)又は(2)記載のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドとの結合体を発現することができる発現ベクターや、(28)HLA-A11と上記(1)又は(2)記載のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドとの結合体を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、(29)SCT前のATL患者に由来するHTLV-I感染T細胞を用いて、同種のHLAタイプのドナー由来のHSCT後の同じ患者のPBMCを刺激することを特徴とするHTLV-I認識CTLの誘導方法や、(30)上記(1)又は(2)記載のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドを用いて、HLA-A11陽性のATL患者のPBMCを刺激することを特徴とするHTLV-I認識CTLの誘導方法や、(31)上記(7)~(9)のいずれか記載のDNAを発現させることができるベクターを用いて、HLA-A11陽性のATL患者のPBMCを刺激することを特徴とするHTLV-I認識CTLの誘導方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】HSCT後の患者#156(図1)のPBMC中のILT-#156細胞に対するCTL誘導を示す図である。IL2存在下でILT-#156細胞で2回刺激を加え17日間培養したHSCT後の患者#156のPBMCを、ILT-#156()、LCL#156()、HLA A11を共有するTCL Kan()、LCL Kan()、HLA A26を共有するILT-Nkz2()、LCL Nkz()、あるいは無刺激(x)で18時間インキュベーションした後、上清中のIFN-量をELISA分析により測定した。値は2個のサンプルの検定結果の平均値である。

【図2】HSCT後の患者#156から誘導されたCTLのHTLV-IのTax特異的細胞傷害活性を示す図である。HSCT後の患者#156のPBMC培養液をホルマリンで固定化したILT-#156で3回刺激し、その細胞傷害性を⁵¹Cr放出分析を6時間行い調査した。使用した標的細胞はHLAが一致するILT-#156()、LCL-#156()、HLA-A11が一致するTCL-Kan()及びLCL-Kan()

10

20

30

40

50

)、及びHLA-A26が一致するILT-Nkz2()及びLCL-Nkz()であった。黒色の記号はHTLV-I感染細胞を表し、白色の記号はEBV感染細胞を表す。値は3個のサンプルで検定された細胞傷害性(% Lysis)の平均を表す。

【図3】HSC T後の患者#156から誘導されたCTLが認識するHTLV-IのHLA-A11拘束性Taxエピトープのマッピングの結果を示す図である。LCL-#156細胞を10mMのTax蛋白全域にわたるアミノ酸配列に対応する15~24塩基長の合成オリゴペプチド36種類でパルスし、エフェクターであるHSC T後の患者#156 CTL(培養31日)と標的細胞の割合を10:1として混合し、18時間インキュベーションした後、上清液中のIFN- γ をELISA分析により測定した。値は2個のサンプルの検定結果の平均値である。

【図4】HSC T後の患者#156から誘導されたCTLが認識するHTLV-IのHLA-A11拘束性Taxエピトープのより詳細なマッピングの結果を示す図である。図3に示された実験の結果陽性と判明した15~24塩基長のペプチドに加え、BIMASでの検索によってHLA-A11拘束性Taxエピトープである可能性が高いと予測された6種の9塩基長の合成オリゴペプチド10mMでLCL-#156細胞をパルスし、エフェクターであるHSC T後の患者#156 CTL(培養41日)と標的細胞の割合を10:1として混合し、18時間インキュベーションした後、上清液中のIFN- γ をELISA分析により測定した。TCL-Kan及びLCL-Kanは患者#156とHLA-A11が、ILT-Nkz2及びLCL-Nkzは患者#156とHLA-A26が一致する細胞株である。値は2個のサンプルの検定結果の平均値である。

【図5】ILT-#156で刺激されたPBMCをHLA-A*1101/Tax8896あるいはHLA-A*1101/Tax272280の4量体(フィコエリスリン標識、縦軸)とCD8(PE Cy5標識、横軸)で二重染色しフローサイトメトリー分析を行った結果を示す。HSC T後の患者#156のPBMC培養液は41日間培養したものを使用した。右上の数字は4量体に結合し且つCD8陽性であるPBMCの割合を示す。各ケースとも全部で100,000の現象を示している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明のHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチド、すなわち、HTLV-I腫瘍に対して特異的に抗腫瘍効果を有するCTLを誘導することができるペプチドとしては、配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるペプチドや、配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、HTLV-I特異的にCTL誘導活性を有するペプチドであれば特に制限されるものではなく(以下、配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるペプチド及びこれらアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失若しくは付加により改変され、かつHTLV-I特異的にCTL誘導活性を有するペプチドをあわせて「本件ペプチド類」ということがある)、ここで、「1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」とは、例えば1~20個、好ましくは1~15個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個の任意の数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を意味し、アミノ酸の「置換、欠失若しくは付加」の程度及びそれらの位置などは、改変されたペプチドが、配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるペプチドと同様にHTLV-I特異的CTL誘導活性を有する同効物であれば特に制限されず、アミノ酸配列の改変(変異)は、例えば突然変異や翻訳後の修飾などにより生じることもあるが、人為的に改変することもできる。本発明においては、このような改変・変異の原因及び手段などを問わず、上記特性を有する全ての改変ペプチドを包含する。例えば、複数個のアミノ酸が付加された本件ペプチド類として、配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列を含む、配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを挙げることができる。

【0014】

本発明の本件ペプチド類は、化学的又は遺伝子工学的的手法により製造することができる

。化学的方法には、通常の液相法及び固相法によるペプチド合成法が包含される。かかるペプチド合成法は、より詳しくは、アミノ酸配列情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次結合させ鎖を延長させていくステップワイズエロゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法とを包含する。本発明の配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるペプチド類の合成は、そのいずれによることもできる。

【0015】

上記ペプチド合成に採用される縮合法も、公知の各種方法に従うことができる。その具体例としては、例えばアジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA(ジフェニルホスホリルアジド)法、DCC+添加物(1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、N-ヒドロキシサクシナミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド等)、ウッドワード法等を例示できる。これら各方法に利用できる溶媒もこの種ペプチド縮合反応に使用されることがよく知られている一般的なものから適宜選択することができる。その例としては、例えばジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、ヘキサホスホロアミド、ジオキサソ、テトラヒドロフラン(THF)、酢酸エチル等及びこれらの混合溶媒等を挙げることができる。

10

【0016】

なお、上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しないアミノ酸及至ペプチドにおけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチルエステル、第三級ブチルエステル等の低級アルキルエステル、例えばベンジルエステル、p-メトキシベンジルエステル、p-ニトロベンジルエステルアルキルエステル等として保護することができる。また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばTyrの水酸基は、アセチル基、ベンジル基、ベンジルオキシカルボニル基、第三級ブチル基等で保護されてもよいが、必ずしもかかる保護を行う必要はない。更に例えばArgのグアニジノ基は、ニトロ基、トシル基、2-メトキシベンゼンスルホニル基、メチレン-2-スルホニル基、ベンジルオキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アダマンチルオキシカルボニル基等の適当な保護基により保護することができる。上記保護基を有するアミノ酸、ペプチド及び最終的に得られる本発明の本件ペプチド類におけるこれら保護基の脱保護反応もまた、慣用される方法、例えば接触還元法や、液体アンモニア/ナトリウム、フッ化水素、臭化水素、塩化水素、トリフルオロ酢酸、酢酸、蟻酸、メタンサルホン酸等を用いる方法等に従って、実施することができる。

20

30

【0017】

本発明の本件ペプチド類は、上記のように化学合成により得られる他、遺伝子工学的手法を用いて常法により製造することもできる。このようにして得られた本発明の本件ペプチド類は、通常の方法に従って、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、向流分配法等のペプチド化学の分野で汎用されている方法に従って、適宜その精製を行うことができる。

【0018】

本発明の融合ペプチドとしては、本件ペプチド類とマーカートンパク質及び/又はペプチドタグとが結合しているものであればどのようなものでもよく、マーカートンパク質としては、従来知られているマーカートンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げることができ、またペプチドタグとしては、HA、FLAG、Myc等のエピトープタグや、GST、マルトース結合タンパク質、ピオチン化ペプチド、オリゴヒスチジン等の親和性タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合ペプチド類は、常法により作製することができ、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用した本件ペプチド類の精製や、本件ペプチド類の検出や、本件ペプチド類に対する抗体の定量や、その他当該分野の研究用試薬としても有用である。

40

【0019】

50

本発明のタンパク - ペプチド結合体としては、H L A - A 1 1 と本件ペプチド類との結合体であれば特に制限されるものではなく、例えばH L A - A 1 1 分子と配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるペプチドとの結合体など、かかる結合体を認識するC T L に結合できる形態のものが好ましい。また、本発明のタンパク - ペプチド結合体の4量体としては、H L A - A 1 1 と本件ペプチド類とが結合したタンパク - ペプチド結合体の4量体であれば特に制限されるものではなく、上記タンパク - ペプチド結合体を、ストレプトアビジンを核として4量体(テトラマー)としたものを例示することができ、例えばH L A - A 1 1 のC末端に酵素Bir Aの基質を発現させておき、Bir A dependent biotinylation法でビオチン化したH L A - A 1 1 と、フィコエリトリン(P E)標識脱グリコシル化アビジンを4 : 1で混合することにより得ることができる(Altman, J.D., et al. : Science 274, 94 96, 1996)。これらタンパク - ペプチド結合体及びその4量体は、化学合成された本件ペプチド類と、H L A - A 1 1 遺伝子(アクセッションナンバー P 1 3 7 4 6)や - 2ミクログロブリン遺伝子(アクセッションナンバー N M _ 0 0 4 0 4 8)を利用した遺伝子工学的手法を用いて常法により作製したH L A - A 1 1 のドメイン及び - 2ミクログロブリンとをリフォールディングバッファー中でインビトロで結合させる(Garboczi et al.Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 89: 3429 3433, 1992)ことにより、あるいは本件ペプチド類をコードするDNAとH L A - A 1 1 遺伝子や - 2ミクログロブリン遺伝子とをそれぞれ利用した遺伝子工学的手法を用いて常法により本件ペプチド類とH L A - A 1 1 のドメインや - 2ミクログロブリンとを同一宿主細胞内で共発現させ、精製後にこれらを結合させることにより作製することができる。

10

20

【0020】

本発明の融合タンパク質としては、上記タンパク - ペプチド結合体又はタンパク - ペプチド結合体の4量体とマーカータンパク質及び/又はペプチドタグとが結合しているものであればどのようなものでもよく、マーカータンパク質としては、従来知られているマーカータンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、蛍光色素、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、H R P、G F Pなどを具体的に挙げることができ、またペプチドタグとしては、H A、F L A G、M y c等のエピトープタグや、G S T、マルトース結合タンパク質、ビオチン化ペプチド、オリゴヒスチジン等の親和性タグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に例示することができる。かかる融合タンパク質類は、常法により作製することができ、N i - N T AとH i sタグの親和性を利用したタンパク - ペプチド結合体の精製や、C T Lの検出や、その他当該分野の研究用試薬としても有用である。

30

【0021】

本発明の本件ペプチド類に特異的に結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げる事ができ、これらは上記本件ペプチド類を抗原として用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の本件ペプチド類に特異的に結合する抗体は、例えば、A T L等のH T L V - I腫瘍の診断に有用であるばかりでなく、本件ペプチド類のH T L V - I特異的C T L誘導の活性機構や分子機構を明らかにする上で有用である。

40

【0022】

本件ペプチド類に対する抗体は、慣用のプロトコールを用いて、動物(好ましくはヒト以外)に、該本件ペプチド類、該本件ペプチド類と免疫原性を有するタンパク質との複合体、該本件ペプチド類を膜表面に提示した細胞等を投与することにより産生され、例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法(Nature 256, 495 497, 1975)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法(Immunology Today 4, 72, 1983)及びE B V - ハイブリドーマ法(MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77 96, Alan R.Liss, Inc., 1985)など任意の方法を用いることができる。

【0023】

50

また、本発明のDNAとしては、上記本件ペプチド類をコードするDNAや、(配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列からなるHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドをコードする)配列番号7又は8に示される塩基配列若しくはその相補的配列からなるDNAや、かかる配列番号7又は8に示される塩基配列若しくはその相補的配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドをコードするDNAであれば特に制限されるものではない(以下、上記の本発明のDNAを総称して「本件DNA群」ということがある。)。上記「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズする」条件としては、例えば、42℃でのハイブリダイゼーション、及び1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による42℃での洗浄処理を挙げることができ、65℃でのハイブリダイゼーション、及び0.1×SSC、0.1%のSDSを含む緩衝液による65℃での洗浄処理をより好ましく挙げることができる。なお、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を与える要素としては、上記温度条件以外に種々の要素があり、当業者であれば、種々の要素を組み合わせ、上記例示したハイブリダイゼーションのストリンジェンシーと同等のストリンジェンシーを実現することが可能である。これら本発明のDNA群には、例えば、(配列番号1又は2に示されるアミノ酸配列からなるHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドをコードする)配列番号5又は6に示される塩基配列若しくはその相補的配列からなるDNA等も含まれる。また、本発明のDNA群は、本件ペプチド類を遺伝子工学的手法を用いて常法により作製するときに有利に用いることができる他、特に本発明のDNA群のアンチセンス鎖は、ATL等のHTLV-I腫瘍の診断用プローブとして有用である。

10

20

【0024】

本発明のHLA-A11拘束性Taxエピトープとしては、インビボやインビトロにおいてCTLを誘導することができる、上記配列番号3又は4に示されるアミノ酸配列を有するHTLV-I特異的CTL誘導活性ペプチドからなるエピトープであれば特に制限されるものではない。かかるHLA-A11拘束性Taxエピトープを含めた本件ペプチド類や、本件DNA群を発現させることができるベクターは、細胞性免疫や体液性免疫等の本発明の免疫応答誘導用ワクチンにおける有効成分として用いることができる。本発明の免疫応答誘導用ワクチンはATL等のHTLV-I腫瘍の治療に用いることができる。

【0025】

また、本発明の免疫応答誘導用ワクチンとしては、さらに細胞性の又は局所的な免疫を増強する種々のアジュバントを含むものがより好ましく、かかるアジュバントとしては、例えば、効率よくペプチド特異的なCTLを誘導することができる樹状細胞、CpGモチーフを含むISS-ODN(Immunostimulatory DNA sequences oligodeoxynucleotide; Nat. Med. 3, 849-854, 1997)、細胞傷害性T細胞を刺激するQS21(Quil1aia saponaria, Cambridge Biotech, Worcester, MAより商業的に入手可能)、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、酸化アルミニウム、油性エマルジョン、サポニン、ビタミンE溶解物等を具体的に挙げることができる。アジュバントを用いる場合、アジュバントとなる種々の菌体成分や毒素等と、前記本発明の本件ペプチド類とを連続してコードするDNAから作製した組換え融合タンパクあるいは組換え融合ペプチドとして用いることもできる。

30

40

【0026】

また、上記本発明の免疫応答誘導用ワクチンを有効成分として含有する本発明の医薬組成物は、医薬的に容認可能な担体又は希釈剤、免疫賦活剤、添加剤等を含んでいてもよく、かかる担体又は希釈剤としては、例えば、SPGAなどの安定化剤や、ソルビトール、マンニトール、澱粉、スクロース、グルコース、デキストラン等の炭水化物や、アルブミン、カゼイン等のタンパク質や、ウシ血清、スキムミルク等のタンパク質含有物質や、リン酸緩衝液、生理食塩水、水等の緩衝液などを具体的に挙げることができる。免疫賦活剤としては、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-12(IL-12)、腫瘍壊死因子(THF-)等のサイトカインを具体的に例示することができ、添加剤としては、低分子量のポリペプチド(約10残基未満)、タンパク質、アミノ酸、グル

50

コース又はデキストランを含む炭水化物、EDTAなどのキレート剤、蛋白質安定化剤、微生物増殖阻止若しくは抑制剤等を例示することができるがこれらに限定されるものではない。

【0027】

また、本発明の医薬組成物は、経口、静脈内、腹腔内、鼻腔内、皮内、皮下、筋肉内等により投与することができる形態のものが好ましい。投与すべき有効量は、医薬品や医薬組成物の種類・組成、投与方法、患者の年齢や体重等を考慮して適宜決定することができる、これらを1日あたり1～数回投与することが好ましい。また、経口投与する場合、通常、製剤用担体と混合して調製した製剤の形で投与される。この際、製剤に用いることができる担体としては、製剤分野において常用され、かつ本発明のペプチドと反応しない物質が用いられる。また、剤型としては、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤、懸濁剤、坐剤、軟膏、クリーム剤、ゲル剤、貼付剤、吸入剤、注射剤等を具体的に例示することができ、これらの製剤は常法に従って調製され、特に液体製剤にあつては、用時、水又は他の適当な媒体に溶解又は懸濁する形態とすることもできる。また錠剤、顆粒剤は周知の方法でコーティングしてもよい。注射剤の場合には、本発明のペプチドを水に溶解させて調製されるが、必要に応じて生理食塩水あるいはブドウ糖溶液に溶解させてもよく、また緩衝剤や保存剤を添加してもよい。またこれらの製剤は、治療上価値のある他の成分を含有していてもよい。

10

【0028】

さらに、本発明の本件ペプチド類は、HTLV-Iの感染予防及び/又はHTLV-I関連疾患の症状改善用食品素材として、プリン、クッキー、パン、ケーキ、ゼリー、煎餅などの焼き菓子、羊羹などの和菓子、冷菓、チューインガム等のパン・菓子類や、うどん、そば等の麺類や、かまぼこ、ハム、魚肉ソーセージ等の魚肉練り製品や、ヨーグルト、ドリンクヨーグルト、ジュース、牛乳、豆乳、酒類、コーヒー、紅茶、煎茶、ウーロン茶、スポーツ飲料等の各種飲料や、みそ、しょう油、ドレッシング、マヨネーズ、甘味料等の調味料類や、豆腐、こんにゃく、その他佃煮、餃子、コロケ、サラダ等の各種総菜へ配合し、機能性食品として摂取することもできる。

20

【0029】

本発明の免疫機能検査診断薬としては、本件ペプチド類、本件DNA群を発現させることができるベクター、HLA-A11と本件ペプチド類とが結合したタンパク-ペプチド結合体、又は該タンパク-ペプチド結合体の4量体を有効成分とし、免疫機能、特にHTLV-Iに対する免疫機能を検査・診断しうるものであれば特に制限されるものではないが、通常は、本件ペプチド類の標識体、発現産物が標識体となる本件DNA群を発現させることができるベクター、HLA-A11と本件ペプチド類とが結合したタンパク-ペプチド結合体の標識体、又は該タンパク-ペプチド結合体の4量体の標識体を用いることが好ましい。標識体とするために用いられる標識化物質としては、上記のマーカータンパク質やペプチドタグの他、放射性同位元素を用いることができる。本発明の免疫機能検査診断薬を用いた免疫機能検査診断は、対象被験者の末梢血白血球（リンパ球）に本発明の免疫機能検査診断薬を接触させ、本件ペプチド類等におけるエピトープを認識するT細胞と結合させることによりHTLV-I Tax特異的T細胞を識別することができる。免疫機能検査診断薬の中でも、上記タンパク-ペプチド結合体の4量体のPE等の蛍光標識体はフローサイトメトリーによるCTLの検出・定量を可能にするため、免疫機能検査診断薬の他、ワクチン効果判定に特に有用である。例えば、ヘパリン末梢血検体から単核球分画を分離し、PE標識テトラマー（タンパク-ペプチド結合体の4量体）と、FITCやPE Cy5で標識したCD8抗体等の活性化マーカー抗体とで2重染色し、フローサイトメーターでCD8陽性テトラマー陽性の細胞数を計算することにより、対象被験者の免疫機能の検査・診断を行うことができる。また、新鮮血液検体ではテトラマー陽性細胞数が非常に少ないことがよくあることから、新鮮血液検体だけでなく、本件ペプチド類やその発現細胞などで一回刺激をした後、数日～1週間培養後に同様の染色解析をすることもできる。

30

40

50

【 0 0 3 0 】

本発明の発現ベクターとしては、本件ペプチド類や、HLA-A11（ドメイン及び/又は-2ミクログロブリン）と本件ペプチド類との結合体を発現することができるものであればどのようなものでもよく、使用される発現系としては、上記本件ペプチド類を細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げる

ことができるが、中でもウイルス系ベクターが好ましい。これら発現系は、発現を起こさせるだけでなく、発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。また、読み枠を変えて翻訳することができる発現ベクターシリーズも有利に用いることができる。本発明の発現ベクターは、本発明の免疫応答誘導用ワクチンにおける有効成分として有用である。

10

【 0 0 3 1 】

本発明の宿主細胞としては、本件ペプチド類や、HLA-A11（ドメイン及び/又は-2ミクログロブリン）と本件ペプチド類との結合体を発現することができる発現系を含む細胞であればどのようなものでもよく、使用される宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真核細胞や、ドロソフィラS2、スポドプテラSf9等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c3T3細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞、卵母細胞等の動物植物細胞などを挙げる

ことができる。また、本件ペプチド類を発現することができる発現系の宿主細胞への導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及びSambrookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレップローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。これら本発明の宿主細胞は、本件ペプチド類のHTLV-I特異的CTL誘導の活性機構や分子機構を明らかにする上で有用である。

20

30

【 0 0 3 2 】

本発明のHTLV-I認識CTLの誘導方法としては、HSC T前のATL患者に由来するHTLV-I感染T細胞を用いて、同種のHLAタイプ、すなわちHLA-A11タイプのドナー由来のHSC T後の同じ患者のPBMCをインビトロ、インビボ又はエクスビボで刺激するCTLを誘導する方法や、本件ペプチド類を用いて、HLA-A11陽性のATL患者のPBMCをインビトロ、インビボ又はエクスビボで刺激するHTLV-I認識CTLの誘導方法や、本件DNA群を発現させることができるベクターを用いて、例えばPBMC中の抗原提示細胞に遺伝子工学的にペプチドを発現させるなど、HLA-A11陽性のATL患者のPBMCをインビトロ、インビボ又はエクスビボで刺激するHTLV-I認識CTLの誘導方法であれば特に制限されるものではなく、かかる誘導方法により得られるHTLV-I認識CTLは、養子免疫療法としてATL等のHTLV-I腫瘍の治療に用いることができる他、HTLV-I特異的CTL誘導の活性機構や分子機構を明らかにする上で有用である。

40

【 実施例 】

【 0 0 3 3 】

以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

50

A [方法と材料]

A - 1 (レシピエント/ドナー組み合わせ及び血液サンプル)

H L A が一致する同胞ドナーから H S C T を受けた急性型 A T L 患者並びにドナーから末梢血サンプルを得た。患者は H S C T 後 3 ヶ月で完全寛解を得て、以後それを維持している。ヘパリン処置した血液を、移植 1 4 7 日後に採取し末梢血単核細胞 (P B M C) をフィコール・ハイパックプラス勾配遠心法により単離し、使用するまで一部を液体窒素で保存した。

【 0 0 3 4 】

A - 2 (細胞株)

H S C T 前の患者に由来する H T L V - I 感染 T 細胞株である I L T - # 1 5 6 を、下記の手順で樹立した。 P B M C から C D 8 ⁺ 細胞を除去した後に 1 μ g / m l のフィットヘマグルチニン (P H A) - P で刺激し、次に 1 0 % 熱不活性ウシ胎児血清 (F C S) と、 3 0 U / m l の組換えヒト I L - 2 又は 1 0 n g / m l の組換えヒト I L - 1 5 を含む R P M I - 1 6 4 0 培地で 5 % の二酸化炭素と共に 3 7 ° C で 2 ヶ月以上維持した。また、エプスタイン・バールウイルス (E B V) 形質転換 B 細胞株である L C L - # 1 5 6 は、 E B V を含む B 9 5 - 8 細胞の上清を用いて感染させたドナーの C D 1 9 ⁺ P B M C からインピトロで樹立した。

10

【 0 0 3 5 】

A - 3 (H T L V - I 特異的 C T L の誘導)

H S C T 後の患者の全細胞又は C D 8 ⁺ 細胞を豊富に含む 2 6 0 万個の P B M C を、 1 μ g / m l の P H A - P で刺激し、次に 1 % ホルムアルデヒド / P B S で前処理した同数の I L T - # 1 5 6 細胞と混合した。これらの T 細胞を 1 0 % F C S 及び 1 0 0 U / m l の組換えヒト I L - 2 を添加した A I M - V TM 培地 (G I B C O Invitrogen 社製) で維持し、 1 4 日間隔にて定期的に I L T - # 1 5 6 細胞で刺激をあたえた。

20

【 0 0 3 6 】

A - 4 (合成ペプチド)

本発明者らは H T L V - I の T a x タンパク質の配列すべてを網羅するために 1 5 ~ 2 4 塩基長のペプチドを用意した。これに加え、コンピュータ予測プログラムである B I M A S (<http://bimas.dcrn.nih.gov/molbil/hla#bind/>) を文献 (J. Immunol. 152, 163 175, 1994; J. Immunol. 152, 3913 3924, 1994) 記載の方法に従い使用し、 H L A A 1 1 と結合する可能性のある 9 塩基長の H T L V - I T a x ペプチドを用意した。

30

【 0 0 3 7 】

A - 5 (C T L 分析)

様々なエフェクター細胞対標的細胞 (E / T) 割合において ⁵¹ C r 放出分析を 6 時間行い、細胞傷害活性を測定した。特異的細胞傷害性を式 ([実験により得られた ⁵¹ C r 放出量 - 自発性の ⁵¹ C r 放出量] / [最大 ⁵¹ C r 放出量 - 自発性の ⁵¹ C r 放出量] × 1 0 0 %) により算出した。エフェクター細胞が産生する I F N - γ を測定するために、様々な E / T 割合において標的細胞と 1 8 時間インキュベーションした後に、 E L I S A 法 (ヒト I F N - γ E L I S A キット, Biosource 社製、 Camarillo, California) を用いて二重測定した。

40

【 0 0 3 8 】

A - 6 (4 量体染色)

フィコエリトリン (P E) 複合型 H L A - A * 1 1 0 1 / T a x 8 8 9 6 (K V L T P P I T H ; 配列番号 3) 並びに H L A - A * 1 1 0 1 / T a x 2 7 2 2 8 0 (Q S S S F I F H K ; 配列番号 4) 4 量体は、 N I A I D Tetramer Facility, Emory Univ. Vaccine Center at Yerkes (Atlanta, Georgia) に合成を委託し提供を受けた。リンパ球を、 P E C y 5 複合型抗 C D 8 抗モノクロナール抗体 (B D Pharmingen 社製) を用いて 3 0 分間染色した後、 4 量体を用いてさらに 6 0 分間 4 色で染色し、次に CellQuest ソフトウェア (Beckton Dickinson 社製) を用いて F A C S Calibur で 2 色解析を行った。

【 0 0 3 9 】

50

B [結果]

B - 1 (H S C T 前の H T L V - I 感染細胞と反応する H S C T 後のレシピエントからの C T L 誘導)

H S C T 前のレシピエント由来の造血細胞に対する H S C T 後のレシピエントの免疫応答を調べるために、本発明者らは H S C T 前の患者から、I L - 2 又は I L - 1 5 の存在下で P H A の刺激を受けた P B M C を 2 ヶ月以上維持することにより、T 細胞株である I L T - # 1 5 6 を樹立した。この細胞株は C D 4 陽性で、H T L V - I の T a x、p 1 9 等の H T L V - I 抗原に陽性であった。

【0040】

I L T - # 1 5 6 細胞に対する H S C T 後の患者の P B M C における T 細胞応答を、造血細胞がドナー由来の造血細胞に完全に置換された H S C T 1 4 7 日後に調べた。インビトロで I L - 2 の存在下においてホルムアルデヒド処理した I L T - # 1 5 6 で 2 回刺激した H S C T 後の患者の P B M C の I L T - # 1 5 6 及び L C L - # 1 5 6 細胞に対するインターフェロンガンマ (I F N -) 産生能力を培養 1 7 日後に測定した。一晚インキュベーションした後、I L T - # 1 5 6 に対しては I F N - が産生されたが、L C L - # 1 5 6 細胞に対しては産生されなかった (図 1)。また H L A A 1 1 を共有する同種 H T L V I 感染 T C L K a n 細胞に対しても I F N - が産生されたが、H L A A 1 1 を共有する L C L - K a n、H L A A 2 6 を共有する H T L V I 感染 I L T - N k z 2 や L C L - N k z に対しては I F N - は産生しなかった。

【0041】

B - 2 (H S C T 後の患者から誘導した C T L の H T L V - I 特異性)

次に、H S C T 後の患者 P B M C から I L T - # 1 5 6 に対して増殖したエフェクター細胞の細胞傷害特異性を $^{51}C r$ 放出分析により調べた。このエフェクター細胞はほとんどが C D 8 陽性であり、I L T - # 1 5 6 に対して顕著なレベルの細胞傷害性を示すとともに (図 2)、H L A - A 1 1 を共有する同種 H T L V - I 感染 T C L K a n 細胞を効果的に死滅させたが、H L A A 1 1 を共有する L C L - K a n、H L A A 2 6 を共有する H T L V I 感染 I L T - N k z 2 や L C L - N k z に対しては死滅させなかった。以上の結果は、I L T - # 1 5 6 に応答して H S C T 後の患者 P B M C から増殖した細胞株が、H L A A 1 1 に拘束される H T L V - I 抗原特異的 C D 8⁺ 細胞傷害性 T リンパ球 (C T L) を含むことを強く明示した。

【0042】

本発明者らは、H T L V - I 特異的 C T L の主要認識抗原が T a x であることから、樹立された C T L も T a x を認識する可能性が最も高いと考え、T a x アミノ酸配列に対応する 1 5 ~ 2 4 塩基長のオリゴペプチドのパネルを用いて H S C T 後の患者由来 C T L 株の認識エピトープを調べた。オリゴペプチド T a x 8 1 1 0 4 (Q R T S K T L K V L T P P I T H T T P N I P P S ; 配列番号 1) 及び T a x 2 7 1 2 8 5 (L Q S S S F I F H K F Q T K A ; 配列番号 2) でパルスされた L C L - # 1 5 6 細胞は、H S C T 後の患者の C T L 株によって選択的に死滅させられた (図 3)。続いて、T a x のアミノ酸配列の中で、H L A - A 1 1 拘束性エピトープである可能性が最も高いとコンピュータプログラムが予測した 5 種の 9 塩基長のオリゴペプチドを用いたところ、T a x 8 8 9 6 (K V L T P P I T H ; 配列番号 3) 及び T a x 2 7 2 2 8 0 (Q S S S F I F H K ; 配列番号 4) が応答細胞と選択的に反応した (図 4)。T a x 8 8 9 6 は T a x 8 1 1 0 4 に含まれ、T a x 2 7 2 2 8 0 は T a x 2 7 1 2 8 5 に含まれている。以上の結果は、H S C T 後の患者由来 C T L 株の中に、2 種類の H T L V - I の T a x 特異的 C T L クローンが優位な集団を占めており、C T L クローンの一つは H L A - A 1 1 拘束性 T a x 8 8 9 6 エピトープを、もう一つの C T L クローンは H L A - A 1 1 拘束性 T a x 2 7 2 2 8 0 エピトープを認識することを示している。

【0043】

C [考察]

本発明者らは以前、A T L 患者において、H L A が一致する同胞からの骨髓非破壊性 H S C T 後に、限られた数のエピトープに対する H T L V - I の T a x 特異的 C T L 応答が

10

20

30

40

50

おこることを見い出した (Cancer Res. 64, 391-399, 2004)。今回、新たなH S C T後のA T L患者由来P B M Cから、H L A - A 1 1に拘束される2個のT a xエピトープに対するC T L応答を見い出した。これらのC T Lは、H L A A * 1 1 0 1 / T a x 8 8 9 6ならびにH L A A * 1 1 0 1 / T a x 2 7 2 2 8 0の4量体で染色されるC T Lを多数含有していた (図5)。

G V L効果の正確な標的抗原及びG V L効果に対するH T L V - IのT a x特異的C T Lの貢献度は充分には解明されていない。しかし、H A M / T S P患者において観察されたと同様の、強力で選択的なH T L V - I特異的C T L応答が、H L A一致の同胞からの同種H S C T後にA T L患者に樹立されたことは、患者体内でC T Lエピトープが強く発現されていたことを意味し、本発明のC T Lエピトープがワクチン抗原として有用であることを示す。このワクチン抗原を用いると、H T L V - I感染細胞の増殖をインビボで抑制するC T Lを誘導できる可能性がある。

10

【産業上の利用可能性】

【0044】

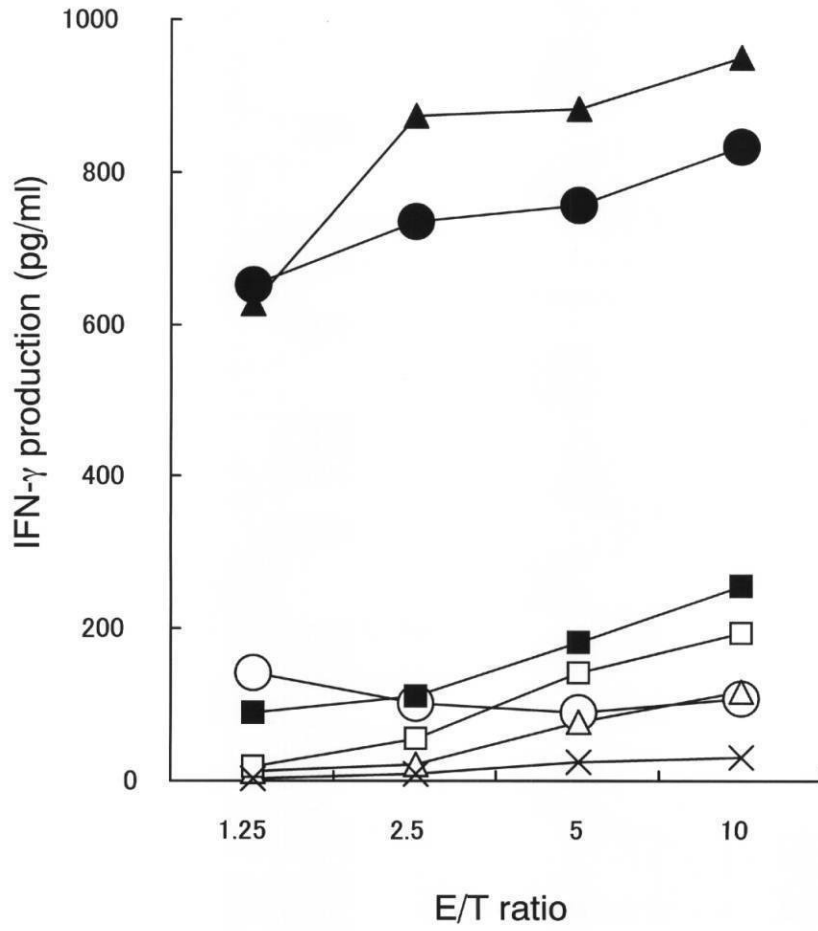
(1) 本発明により、日本人でH L A遺伝子頻度が9.3%であるH L A - A 1 1に拘束されるC T Lの主要エピトープが見出された。H T L V - Iに対する免疫応答の検査に本エピトープ部位のペプチドを使用することによって、これまでに見出したH L A - A 2, H L A - A 2 4に拘束されるT a xエピトープと合わせ、日本人集団のかなりの部分をカバーできることになる。

(2) 現在では、それぞれのH L Aについて親和性のあるアミノ酸アンカーモチーフからエピトープの予測が可能である。しかしながら、生体内の病原体に対する宿主の免疫反応は必ずしもこの予測と一致しない。本発明により同定されたエピトープは感染個体から得られたものであり、しかも他のエピトープよりも非常に強い選択性を持って認識されている。

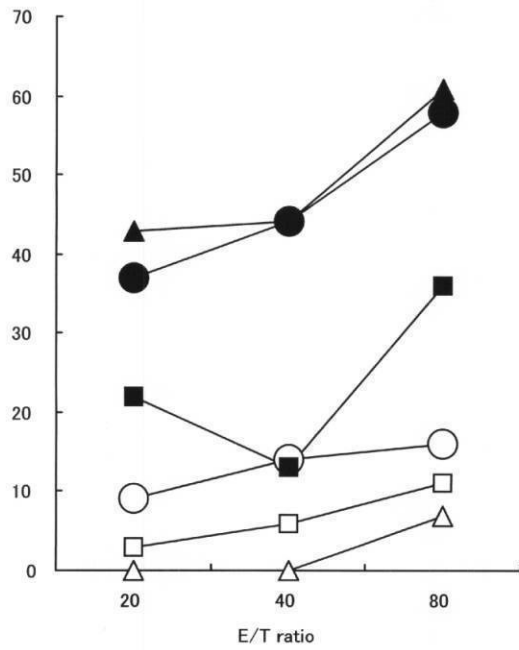
20

(3) A T L患者からH T L V - I特異的C T Lが誘導されることは稀だが、幹細胞移植後に完全寛解に入ったA T L症例から、本発明により同定されたエピトープに対するC T Lが選択的に誘導された。これは、患者体内でこのエピトープが強く発現されていたことを意味し、本エピトープがワクチン抗原として有用であることを示している。

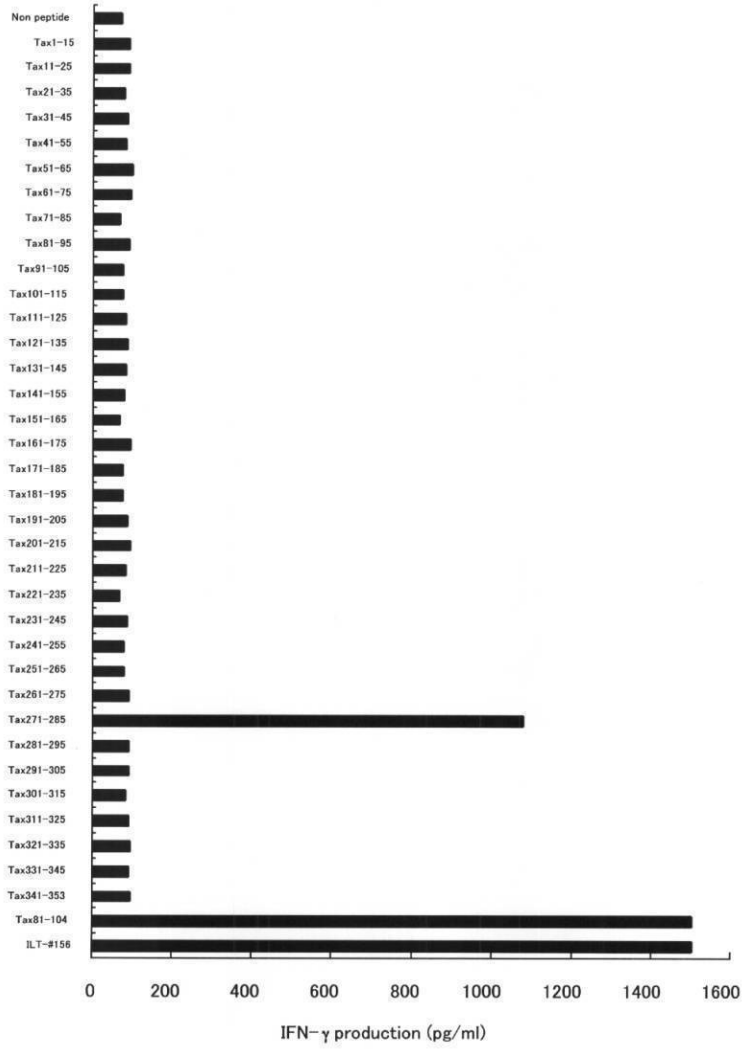
【 図 1 】



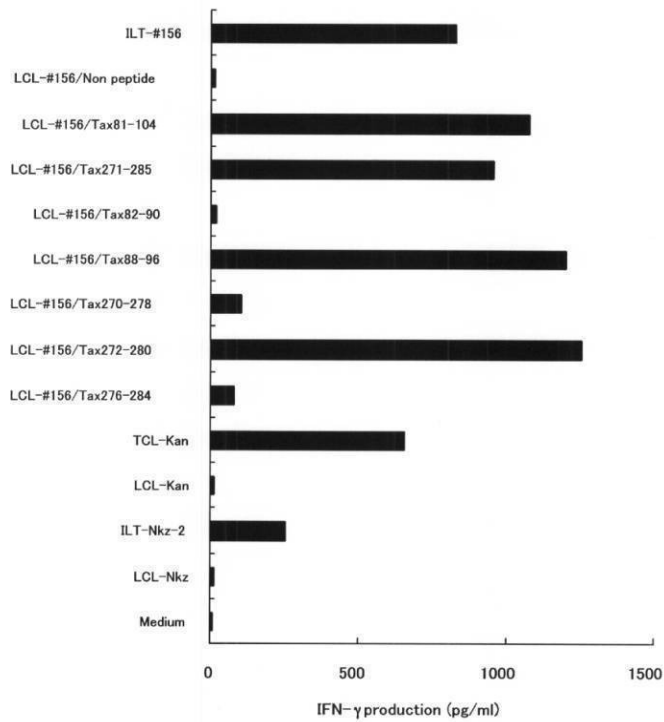
【 図 2 】



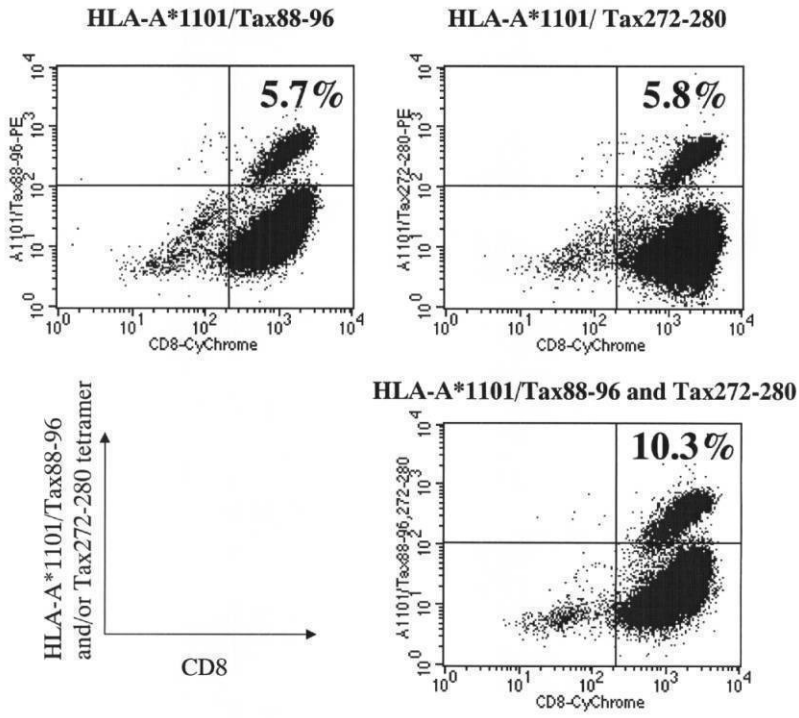
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

2006035681000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/017527
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09 (2006.01), A61K39/21 (2006.01), A61P31/14 (2006.01), C07K7/06 (2006.01), C07K16/10 (2006.01), C07K19/00 (2006.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09 (2006.01), A61K39/21 (2006.01), A61P31/14 (2006.01), C07K7/06 (2006.01), C07K16/10 (2006.01), C07K19/00 (2006.01) 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) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus (STN), REGISTRY (STN), SwissProt/PIR/Geneseq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2002-507397 A (EPIMMUNE INC.), 12 March, 2002 (12.03.02), Full text; particularly, Par. No. [0144]; table 62 & WO 1999/045954 A1 & EP 1064022 A1	1-3, 7-15, 18, 21-26, 30, 31 4-6, 16, 17, 19, 20, 27, 28
Y	BIEGANOWSKA, K. et al., "Direct Analysis of Viral-Specific CD8+ T Cells with Soluble HLA-A2/Tax11-19 Teramer Complexes in Patients with Human T Cell Lymphotropic Virus-Associated Myelopathy", J.Immunol., (1999), Vol.162, pages 1765 to 1771, full text	4-6, 16, 17-20, 27, 28
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "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 09 December, 2005 (09.12.05)		Date of mailing of the international search report 27 December, 2005 (27.12.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017527

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PARKEER, C.E. et al., "Circulating Anti-Cytotoxic T Lymphocytes from Human T-Cell Leukemia Virus Type I-Infected People, with and without Tropical Spastic Paraparesis, Recognize Multiple Epitopes Simultaneously", J.Virology, (1994), Vol.68, No.5, pages 2860 to 2868; full text	2, 7, 9, 12, 18, 21-26
Y	PARKEER, C.E. et al., "Circulating Anti-Cytotoxic T Lymphocytes from Human T-Cell Leukemia Virus Type I-Infected People, with and without Tropical Spastic Paraparesis, Recognize Multiple Epitopes Simultaneously", J.Virology, (1994), Vol.68, No.5, pages 2860 to 2868; full text	3, 11, 13-15, 17, 30, 31
X	HARASHIMA, N. et al., "Graft-versus-Tax Response in Adult T-Cell Leukemia Patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation," CANCER RESEARCH, (Jan. 2004), Vol.64, pages 391 to 399; full text	2, 7, 9, 10, 18, 21-26, 29
P, X	WO 2004/092373 A1 (Japan Science and Technology Corp.), 28 October, 2004 (28.10.04), Full text; particularly, Claim 29; Figs. 3, 5 (Family: none)	2, 7, 9, 10, 18, 21-26, 29
P, X	HARASHIMA, N. et al., "Identification of two New HLA-A* 1101-Restricted Tax Epitopes Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes in an Adults T-Cell Leukemia Patient after Hematopoietic Stem Cell Transplantation", J.Virology, (Aug.2005) Vol.79, No.15, pages 10088 to 10092, full text	1-31
A	KANNAGI, M. et al., "Target Epitope in the Tax Protein of Human T-cell Leukemia Virus Type I Recognized by Class I Major Histocompatibility Complex-restricted cytotoxic T Cells", J.Virology, (1992), Vol.66, No. 5, pages 2928 to 2933, full text	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/017527

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)
<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>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: The inventions as claimed in claims 1 to 31 are classified into two groups relating respectively to the general inventive concept "a peptide having an activity of inducing (HLA-A11-restricted) HTLV-1-specific CTL containing an amino acid sequence represented by SEQ ID NO:3 or 4, and a DNA comprising a base sequence represented by SEQ ID NO:7 or 8 or a complementary sequence thereof" (claims 1 to 28, 30 and 31), and the general inventive concept "a method of inducing HTLV-1-recognizing CTL characterized by stimulating PBMC of an ATL patient after HSCT from an HLA-identical donor by using HTLV-1-infected T cells originating in the same patient before the HSCT" (claim 29).</p> <p>1. <input checked="" 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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</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 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.:</p> <p>Remark on Protest the <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee. <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>	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/017527	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), A61K39/21 (2006.01), A61P31/14 (2006.01), C07K7/06 (2006.01), C07K16/10 (2006.01), C07K19/00 (2006.01)			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), A61K39/21 (2006.01), A61P31/14 (2006.01), C07K7/06 (2006.01), C07K16/10 (2006.01), C07K19/00 (2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/CAplus (STN) REGISTRY (STN) SwissProt/PIR/Geneseq			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	JP 2002-507397 A, (エビミュオン, インコーポレイティッド), 2002.03.12, 全文, 特に、段落番号【0144】:【表 62】 & WO 1999/045954 A1	1-3,7-15,18, 21-26,30,31	
Y	& EP 1064022 A1	4-6,16,17,19, 20,27,28	
Y	BIEGANOWSKA, K. et al., "Direct Analysis of Viral-Specific CD8+ T Cells with Soluble HLA-A2/Tax11-19 Tetramer Complexes in Patients with Human T Cell Lymphotropic Virus-Associated Myelopathy", J.Immunol., (1999), Vol.162, pp.1765-1771, 全文	4-6,16,17-20, 27,28	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 09.12.2005		国際調査報告の発送日 27.12.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 伏見 邦彦	4B 3384
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/017527
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	PARKER, C.E. et al., "Circulating Anti-Tax Cytotoxic T Lymphocytes from Human T-Cell Leukemia Virus Type I-Infected People, with and without Tropical Spastic Paraparesis, Recognize Multiple Epitopes Simultaneously", J.Virology, (1994), Vol.68, No.5, pp.2860-2868, 全文	2,7,9,12,18, 21-26
Y	J.Virology, (1994), Vol.68, No.5, pp.2860-2868, 全文	3,11,13-15, 17,30,31
X	HARASHIMA, N. et al., "Graft-versus-Tax Response in Adult T-Cell Leukemia Patients after Hematopoietic Stem Cell Transplantation", CANCER RESEARCH, (Jan. 2004), Vol.64, pp.391-399, 全文	2,7,9,10,18, 21-26,29
PX	WO 2004/092373 A1, (独立行政法人科学技術振興機構), 2004.10.28, 全文, 特に、請求項 29, 第 3 図, 第 5 図 (ファミリーなし)	2,7,9,10,18, 21-26,29
PX	HARASHIMA, N. et al., "Identification of two New HLA-A*1101-Restricted Tax Epitopes Recognized by Cytotoxic T Lymphocytes in an Adults T-Cell Leukemia Patient after Hematopoietic Stem Cell Transplantation", J.Virology, (Aug. 2005), Vol.79, No.15, pp.10088-10092, 全文	1-31
A	KANNAGI, M. et al., "Target Epitope in the Tax Protein of Human T-Cell Leukemia Virus Type I Recognized by Class I Major Histocompatibility Complex-restricted cytotoxic T Cells", J.Virology, (1992), Vol.66, No.5, pp.2928-2933, 全文	1-31

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 5 / 0 1 7 5 2 7

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、
2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-31に記載の発明は、「配列番号3又は配列番号4に示されるアミノ酸配列を含む(HLA-A11拘束性の)HTLV-1特異的CTL誘導活性ペプチド、及び、配列番号7又は配列番号8に示される塩基配列若しくはその相補配列からなるDNA」の一般的発明概念(請求の範囲1-28,30,31)、「HSCT前のALT患者に由来するHTLV-1感染T細胞を用いて、同種のHLAタイプのドナー由来のHSCT後の同じ患者のPBMCを刺激することを特徴とするHTLV-1認識CTLの誘導方法」の一般的発明概念(請求の範囲29)の、2つに分類される。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2005年4月)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21		4 C 0 8 7
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	A	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18		
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	H	
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14	Z	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02		
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00		
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 K 35/76		
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	

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

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA01 GA11 HA12 HA15 HA20
 4B063 QA19 QQ02 QQ42 QR32 QR55 QS32 QX01
 4B065 AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA45 CA46
 4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08 BA23 BA24 CA18 CA25 DC50
 NA14 ZB27
 4C085 AA03 CC03 CC08 DD01 DD61 GG01
 4C087 AA01 AA02 BB33 BB34 BC83 CA04 CA12 NA14 ZB27
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA15 BA17 BA18 BA40 CA40 DA76
 EA31 EA50 FA20

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	HLA-A11限制性Tax抗肿瘤表位		
公开(公告)号	JPWO2006035681A1	公开(公告)日	2008-05-15
申请号	JP2006537705	申请日	2005-09-22
申请(专利权)人(译)	国立大学法人东京医科齿科大学		
[标]发明人	原嶋奈々江 神奈木真理 田野崎隆二		
发明人	原嶋 奈々江 神奈木 真理 田野崎 隆二		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/47 C12Q1/68 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 A61K39/00 A61K35/14 A61K38/00 A61K48/00 A61K35/76 A61P35/02 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/00 A61K2121/00 C07K16/10 C12N2740/14022		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/47 C12Q1/68.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K16/18 A61K39/00.H A61K35/14.Z A61K37/02 A61K48/00 A61K35/76 A61P35/02 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B024/HA20 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QS32 4B063/QX01 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA45 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA23 4C084/BA24 4C084/CA18 4C084/CA25 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZB27 4C085/AA03 4C085/CC03 4C085/CC08 4C085/DD01 4C085/DD61 4C085/GG01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB33 4C087/BB34 4C087/BC83 4C087/CA04 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB27 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA20		
优先权	2004280649 2004-09-27 JP		
其他公开文献	JP5176099B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明旨在提供具有诱导对人T细胞白血病病毒I型 (HTLV-1) 特异的细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 的活性的肽, 其对HTLV-1肿瘤 (例如成人T细胞白血病) 具有抗肿瘤作用 (ATL) ; 以及用于诱导免疫应答的疫苗, 用于测试免疫功能的诊断试剂等。通过检查来自HLA相同的同胞供体的造血干细胞移植 (HSCT) 后达到完全缓解的患者的细胞免疫应答, 发现在ATL患者的外周血单核细胞 (PBMC) 的液体培养中 HSCT, HTLV-I 特异的CTL由HLA-A11限制的Tax 88-96和HLA-A11限制的Tax 272-280表位选择性诱导, 这些表位响应体外培养的受自身HTLV-1感染的T细胞而强烈增殖在HSCT之前。该现象表明这些表位在患者中强烈表达, 表明这些表位可用作疫苗抗原。

