

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5176099号  
(P5176099)

(45) 発行日 平成25年4月3日(2013.4.3)

(24) 登録日 平成25年1月18日(2013.1.18)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53	D
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A

請求項の数 7 (全 26 頁)

(21) 出願番号	特願2006-537705 (P2006-537705)	(73) 特許権者	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
(86) (22) 出願日	平成17年9月22日 (2005.9.22)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/017527	(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
(87) 国際公開番号	W02006/035681	(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
(87) 国際公開日	平成18年4月6日 (2006.4.6)	(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
審査請求日	平成20年9月22日 (2008.9.22)		
(31) 優先権主張番号	特願2004-280649 (P2004-280649)		
(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)		
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H L A - A 1 1 拘束性 T a x 抗腫瘍エピトープ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分として含有する、H L A - A 1 1 に拘束される H T L V - I 認識 C T L 誘導用ワクチン：

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列：

[ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列：

[ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び/又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸：

( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸：

( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列：

10

20

(j) 配列番号1のアミノ酸番号17～19に示されるアミノ酸配列：  
 (k) 配列番号1のアミノ酸番号17～20に示されるアミノ酸配列：  
 (l) 配列番号1のアミノ酸番号17～21に示されるアミノ酸配列：  
 (m) 配列番号1のアミノ酸番号17～22に示されるアミノ酸配列：  
 (n) 配列番号1のアミノ酸番号17～23に示されるアミノ酸配列：  
 (o) 配列番号1のアミノ酸番号17～24に示されるアミノ酸配列：  
 [4] 配列番号4に示されるアミノ酸配列のN末端側に、以下の(p)に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号4に示されるアミノ酸配列のC末端側に以下の(q)に示されるアミノ酸若しくは以下の(r)～(u)に示されるアミノ酸配列のN末端側が付加されているアミノ酸配列：

10

- (p) 配列番号2のアミノ酸番号1に示されるアミノ酸：  
 (q) 配列番号2のアミノ酸番号11に示されるアミノ酸：  
 (r) 配列番号2のアミノ酸番号11～12に示されるアミノ酸配列：  
 (s) 配列番号2のアミノ酸番号11～13に示されるアミノ酸配列：  
 (t) 配列番号2のアミノ酸番号11～14に示されるアミノ酸配列：  
 (u) 配列番号2のアミノ酸番号11～15に示されるアミノ酸配列。

## 【請求項2】

以下の[1]～[4]のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードする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、HLA-A11に拘束されるHTLV-I認識CTL誘導用ワクチン：

20

[1] 配列番号3に示されるアミノ酸配列：  
 [2] 配列番号4に示されるアミノ酸配列：  
 [3] 配列番号3に示されるアミノ酸配列のN末端側に、以下の(a)に示されるアミノ酸若しくは以下の(b)～(g)に示されるアミノ酸配列のC末端側が付加されており、及び/又は、配列番号3に示されるアミノ酸配列のC末端側に以下の(h)に示されるアミノ酸若しくは以下の(i)～(o)に示されるアミノ酸配列のN末端側が付加されているアミノ酸配列：

- (a) 配列番号1のアミノ酸番号7に示されるアミノ酸：  
 (b) 配列番号1のアミノ酸番号6～7に示されるアミノ酸配列：  
 (c) 配列番号1のアミノ酸番号5～7に示されるアミノ酸配列：  
 (d) 配列番号1のアミノ酸番号4～7に示されるアミノ酸配列：  
 (e) 配列番号1のアミノ酸番号3～7に示されるアミノ酸配列：  
 (f) 配列番号1のアミノ酸番号2～7に示されるアミノ酸配列：  
 (g) 配列番号1のアミノ酸番号1～7に示されるアミノ酸配列：  
 (h) 配列番号1のアミノ酸番号17に示されるアミノ酸：  
 (i) 配列番号1のアミノ酸番号17～18に示されるアミノ酸配列：  
 (j) 配列番号1のアミノ酸番号17～19に示されるアミノ酸配列：  
 (k) 配列番号1のアミノ酸番号17～20に示されるアミノ酸配列：  
 (l) 配列番号1のアミノ酸番号17～21に示されるアミノ酸配列：  
 (m) 配列番号1のアミノ酸番号17～22に示されるアミノ酸配列：  
 (n) 配列番号1のアミノ酸番号17～23に示されるアミノ酸配列：  
 (o) 配列番号1のアミノ酸番号17～24に示されるアミノ酸配列：

30

[4] 配列番号4に示されるアミノ酸配列のN末端側に、以下の(p)に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号4に示されるアミノ酸配列のC末端側に以下の(q)に示されるアミノ酸若しくは以下の(r)～(u)に示されるアミノ酸配列のN末端側が付加されているアミノ酸配列：

40

- (p) 配列番号2のアミノ酸番号1に示されるアミノ酸：  
 (q) 配列番号2のアミノ酸番号11に示されるアミノ酸：  
 (r) 配列番号2のアミノ酸番号11～12に示されるアミノ酸配列：  
 (s) 配列番号2のアミノ酸番号11～13に示されるアミノ酸配列：

50

( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列 :

( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列。

【請求項 3】

以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分として含有する、HLA - A 1 1 に拘束される H T L V - I 認識 C T L を識別するための免疫機能検査診断薬 :

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列 :

[ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列 :

[ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び / 又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸 :

( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸 :

( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列 :

( j ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 9 に示されるアミノ酸配列 :

( k ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 0 に示されるアミノ酸配列 :

( l ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 1 に示されるアミノ酸配列 :

( m ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 2 に示されるアミノ酸配列 :

( n ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 3 に示されるアミノ酸配列 :

( o ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 4 に示されるアミノ酸配列 :

[ 4 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( p ) に示されるアミノ酸が付加されており、及び / 又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( q ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( r ) ~ ( u ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :

( p ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 に示されるアミノ酸 :

( q ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 に示されるアミノ酸 :

( r ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 2 に示されるアミノ酸配列 :

( s ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 3 に示されるアミノ酸配列 :

( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列 :

( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列。

【請求項 4】

HLA - A 1 1 と、以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる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、HLA - A 1 1 に拘束される H T L V - I 認識 C T L を識別するための免疫機能検査診断薬 :

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列 :

[ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列 :

[ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び / 又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸 :

- (b) 配列番号1のアミノ酸番号6～7に示されるアミノ酸配列：
  - (c) 配列番号1のアミノ酸番号5～7に示されるアミノ酸配列：
  - (d) 配列番号1のアミノ酸番号4～7に示されるアミノ酸配列：
  - (e) 配列番号1のアミノ酸番号3～7に示されるアミノ酸配列：
  - (f) 配列番号1のアミノ酸番号2～7に示されるアミノ酸配列：
  - (g) 配列番号1のアミノ酸番号1～7に示されるアミノ酸配列：
  - (h) 配列番号1のアミノ酸番号17に示されるアミノ酸：
  - (i) 配列番号1のアミノ酸番号17～18に示されるアミノ酸配列：
  - (j) 配列番号1のアミノ酸番号17～19に示されるアミノ酸配列：
  - (k) 配列番号1のアミノ酸番号17～20に示されるアミノ酸配列： 10
  - (l) 配列番号1のアミノ酸番号17～21に示されるアミノ酸配列：
  - (m) 配列番号1のアミノ酸番号17～22に示されるアミノ酸配列：
  - (n) 配列番号1のアミノ酸番号17～23に示されるアミノ酸配列：
  - (o) 配列番号1のアミノ酸番号17～24に示されるアミノ酸配列：
- 【4】配列番号4に示されるアミノ酸配列のN末端側に、以下の(p)に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号4に示されるアミノ酸配列のC末端側に以下の(q)に示されるアミノ酸若しくは以下の(r)～(u)に示されるアミノ酸配列のN末端側が付加されているアミノ酸配列：
- (p) 配列番号2のアミノ酸番号1に示されるアミノ酸：
  - (q) 配列番号2のアミノ酸番号11に示されるアミノ酸： 20
  - (r) 配列番号2のアミノ酸番号11～12に示されるアミノ酸配列：
  - (s) 配列番号2のアミノ酸番号11～13に示されるアミノ酸配列：
  - (t) 配列番号2のアミノ酸番号11～14に示されるアミノ酸配列：
  - (u) 配列番号2のアミノ酸番号11～15に示されるアミノ酸配列。

## 【請求項5】

H L A - A 1 1 と、以下の [ 1 ] ～ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる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、H L A - A 1 1 に拘束される H T L V - I 認識 C T L を識別するための免疫機能検査診断薬：

- [ 1 ] 配列番号3に示されるアミノ酸配列：
- [ 2 ] 配列番号4に示されるアミノ酸配列： 30
- [ 3 ] 配列番号3に示されるアミノ酸配列のN末端側に、以下の(a)に示されるアミノ酸若しくは以下の(b)～(g)に示されるアミノ酸配列のC末端側が付加されており、及び/又は、配列番号3に示されるアミノ酸配列のC末端側に以下の(h)に示されるアミノ酸若しくは以下の(i)～(o)に示されるアミノ酸配列のN末端側が付加されているアミノ酸配列：
- (a) 配列番号1のアミノ酸番号7に示されるアミノ酸：
- (b) 配列番号1のアミノ酸番号6～7に示されるアミノ酸配列：
- (c) 配列番号1のアミノ酸番号5～7に示されるアミノ酸配列：
- (d) 配列番号1のアミノ酸番号4～7に示されるアミノ酸配列：
- (e) 配列番号1のアミノ酸番号3～7に示されるアミノ酸配列： 40
- (f) 配列番号1のアミノ酸番号2～7に示されるアミノ酸配列：
- (g) 配列番号1のアミノ酸番号1～7に示されるアミノ酸配列：
- (h) 配列番号1のアミノ酸番号17に示されるアミノ酸：
- (i) 配列番号1のアミノ酸番号17～18に示されるアミノ酸配列：
- (j) 配列番号1のアミノ酸番号17～19に示されるアミノ酸配列：
- (k) 配列番号1のアミノ酸番号17～20に示されるアミノ酸配列：
- (l) 配列番号1のアミノ酸番号17～21に示されるアミノ酸配列：
- (m) 配列番号1のアミノ酸番号17～22に示されるアミノ酸配列：
- (n) 配列番号1のアミノ酸番号17～23に示されるアミノ酸配列：
- (o) 配列番号1のアミノ酸番号17～24に示されるアミノ酸配列： 50

[ 4 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( p ) に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( q ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( r ) ~ ( u ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

- ( p ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 に示されるアミノ酸：
- ( q ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 に示されるアミノ酸：
- ( r ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 2 に示されるアミノ酸配列：
- ( s ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 3 に示されるアミノ酸配列：
- ( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列：
- ( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列。

10

【請求項 6】

H L A - A 1 1 と、以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる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、H L A - A 1 1 に拘束される H T L V - I 認識 C T L の検出定量試薬：

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列：  
 [ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列：  
 [ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び/又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

20

- ( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸：
- ( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：
- ( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：
- ( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：
- ( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：
- ( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：
- ( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：
- ( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸：
- ( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列：
- ( j ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 9 に示されるアミノ酸配列：
- ( k ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 0 に示されるアミノ酸配列：
- ( l ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 1 に示されるアミノ酸配列：
- ( m ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 2 に示されるアミノ酸配列：
- ( n ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 3 に示されるアミノ酸配列：
- ( o ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 4 に示されるアミノ酸配列：

30

[ 4 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( p ) に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( q ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( r ) ~ ( u ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

40

- ( p ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 に示されるアミノ酸：
- ( q ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 に示されるアミノ酸：
- ( r ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 2 に示されるアミノ酸配列：
- ( s ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 3 に示されるアミノ酸配列：
- ( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列：
- ( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列。

【請求項 7】

In vitro で、以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドを用いて、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：

50

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列 :

[ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列 :

[ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び / 又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸 :

( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

10

( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸 :

( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列 :

( j ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 9 に示されるアミノ酸配列 :

( k ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 0 に示されるアミノ酸配列 :

( l ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 1 に示されるアミノ酸配列 :

( m ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 2 に示されるアミノ酸配列 :

20

( n ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 3 に示されるアミノ酸配列 :

( o ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 4 に示されるアミノ酸配列 :

[ 4 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( p ) に示されるアミノ酸が付加されており、及び / 又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( q ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( r ) ~ ( u ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :

( p ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 に示されるアミノ酸 :

( q ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 に示されるアミノ酸 :

( r ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 2 に示されるアミノ酸配列 :

( s ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 3 に示されるアミノ酸配列 :

30

( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列 :

( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列。

#### 【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 ( A T L ) 等のヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 ( H T L V - 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 ( 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免疫機能検査診断薬等に関する。

#### 【背景技術】

40

#### 【0002】

成人 T 細胞白血病 ( A T L ) はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 ( H T L V - I ) 感染者の約 5 % が発症する T 細胞悪性腫瘍であり、主に C D 4 <sup>+</sup> 及び C D 2 5 <sup>+</sup> 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。 )。 A T L 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 ~ 1 2 % 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 ( H S C T ) が一部の A T L 患者に適用されるようになってきた。自己 H S C T の初期の研究は A T L 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 ( G V H D ) の危険性は同様に

50

あるものの、同種H S C T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（G V L）効果がA T L細胞根絶に貢献することを強く示唆している。

#### 【0003】

ヒト白血球抗原（H L A）が一致する同胞から受けた同種H S C Tはある程度のG V H D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（m H A）がG V H D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。）、H A - 1抗原（例えば、非特許文献9参照。）、C D 3 1分子（例えば、非特許文献10、11参照。）、及びヒト血小板抗原（H P A）（例えば、非特許文献11、12参照。）を含むいくつかのm H AがG V H Dに關与すると示唆されてきた。同種H S C T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、G V L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m H A特異的なドナーT細胞応答を増加することが、G V H Dを引き起こさずにG V L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b c r / a b l融合タンパク質及びW T - 1等の腫瘍抗原もまた、G V L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。）。

#### 【0004】

H T L V - 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H L T V - 1キャリア及びH T L V - I随伴脊髄症/熱帯性瘧疾対麻痺（H A M / T S P）患者のP B M C培養液からは頻繁に見い出されるが、A T L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。）。e n v、g a g、p o l、p X遺伝子産物等のH T L V - I抗原のうち、p X遺伝子産物であるT a xがH T L V - I特異的な細胞傷害性リンパ球（C T L）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。）。T a xはまた、細胞成長を促進しアポトーシスを抑制することによって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21、22参照。）。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。

#### 【0005】

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23参照。）が、H L A - A 2は日本人の30～40%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24、25参照。）。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26、27参照。）。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28～30参照。）。

#### 【0006】

【特許文献1】特開2002-372532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

10

20

30

40

50

- 【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 10】 N. Engl. J. Med. 334, 286-291, 1996
- 【非特許文献 11】 Br. J. Haematol 106, 723-729, 1999
- 【非特許文献 12】 Blood 92, 2169-2176, 1998
- 【非特許文献 13】 Blood 75, 552-562, 1990
- 【非特許文献 14】 Blood 93, 2336-2341, 1999 10
- 【非特許文献 15】 Blood 95, 1781-1787, 2000
- 【非特許文献 16】 Blood 96, 1480-1489, 2000
- 【非特許文献 17】 Leukemia 8 Suppl 1, S54-59, 1994
- 【非特許文献 18】 J. Immunol. 133, 1037-1041, 1984
- 【非特許文献 19】 Nature 348, 245-248, 1990
- 【非特許文献 20】 Int. Immunol. 3, 761-767, 1991
- 【非特許文献 21】 Lancet 1, 1085-1086, 1987
- 【非特許文献 22】 J. Virol. 73, 7981-7987, 1999
- 【非特許文献 23】 J. Virol. 66, 2928-2933, 1992
- 【非特許文献 24】 J. Virol. 74, 428-435, 2000 20
- 【非特許文献 25】 J. Virol. 73, 6031-6040, 1999
- 【非特許文献 26】 J. Virol. 74, 9610-9616, 2000;
- 【非特許文献 27】 J. Natl. Cancer Inst. 93, 1775-1783, 2001
- 【非特許文献 28】 Gann 73, 341-344, 1982
- 【非特許文献 29】 Int. J. Cancer 54, 582-588, 1993
- 【非特許文献 30】 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】
- 【0007】
- 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。
- 【課題を解決するための手段】 40
- 【0008】
- 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応答することを見出した。しかしながら、応答細胞の大部分は 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 応答が 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。
- 【0009】 50

すなわち本発明は、

(1) 以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分として含有する、HLA - A 1 1 に拘束される HTLV - I 認識 CTL 誘導用ワクチン：

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列：

[ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列：

[ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び / 又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸：

( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸：

( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列：

( j ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 9 に示されるアミノ酸配列：

( k ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 0 に示されるアミノ酸配列：

( l ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 1 に示されるアミノ酸配列：

( m ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 2 に示されるアミノ酸配列：

( n ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 3 に示されるアミノ酸配列：

( o ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 4 に示されるアミノ酸配列：

[ 4 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( p ) に示されるアミノ酸が付加されており、及び / 又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( q ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( r ) ~ ( u ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

( p ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 に示されるアミノ酸：

( q ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 に示されるアミノ酸：

( r ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 2 に示されるアミノ酸配列：

( s ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 3 に示されるアミノ酸配列：

( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列：

( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列；や、

(2) 以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドをコードする 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、HLA - A 1 1 に拘束される HTLV - I 認識 CTL 誘導用ワクチン：

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列：

[ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列：

[ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び / 又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸：

( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

- ( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸 :  
 ( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( j ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 9 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( k ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 0 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( l ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 1 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( m ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 2 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( n ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 3 に示されるアミノ酸配列 : 10  
 ( o ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 4 に示されるアミノ酸配列 :
- [ 4 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( p ) に示されるアミノ酸が付加されており、及び / 又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( q ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( r ) ~ ( u ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :
- ( p ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 に示されるアミノ酸 :  
 ( q ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 に示されるアミノ酸 :  
 ( r ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 2 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( s ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 3 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列 : 20  
 ( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列 ;
- に関する。

## 【 0 0 1 0 】

また本発明は、

( 3 ) 以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドを有効成分として含有する、HLA - A 1 1 に拘束される H T L V - I 認識 C T L を識別するための免疫機能検査診断薬 :

- [ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列 :  
 [ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列 : 30  
 [ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び / 又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :
- ( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸 :  
 ( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 : 40  
 ( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸 :  
 ( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( j ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 9 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( k ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 0 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( l ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 1 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( m ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 2 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( n ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 3 に示されるアミノ酸配列 :  
 ( o ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 4 に示されるアミノ酸配列 : 50

[ 4 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( p ) に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( q ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( r ) ~ ( u ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

( p ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 に示されるアミノ酸：

( q ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 に示されるアミノ酸：

( r ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 2 に示されるアミノ酸配列：

( s ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 3 に示されるアミノ酸配列：

( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列：

( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列；や、

10

( 4 ) H L A - A 1 1 と、以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる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、H L A - A 1 1 に拘束される H T L V - I 認識 C T L を識別するための免疫機能検査診断薬：

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列：

[ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列：

[ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び/又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

20

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸：

( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列：

( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸：

( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列：

( j ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 9 に示されるアミノ酸配列：

30

( k ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 0 に示されるアミノ酸配列：

( l ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 1 に示されるアミノ酸配列：

( m ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 2 に示されるアミノ酸配列：

( n ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 3 に示されるアミノ酸配列：

( o ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 4 に示されるアミノ酸配列：

[ 4 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( p ) に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( q ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( r ) ~ ( u ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列：

( p ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 に示されるアミノ酸：

40

( q ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 に示されるアミノ酸：

( r ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 2 に示されるアミノ酸配列：

( s ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 3 に示されるアミノ酸配列：

( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列：

( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列；や、

( 5 ) H L A - A 1 1 と、以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる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、H L A - A 1 1 に拘束される H T L V - I 認識 C T L を識別するための免疫機能検査診断薬：

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列：

50

[ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列 :

[ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び/又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸 :

( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

10

( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸 :

( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列 :

( j ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 9 に示されるアミノ酸配列 :

( k ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 0 に示されるアミノ酸配列 :

( l ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 1 に示されるアミノ酸配列 :

( m ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 2 に示されるアミノ酸配列 :

( n ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 3 に示されるアミノ酸配列 :

20

( o ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 2 4 に示されるアミノ酸配列 :

[ 4 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( p ) に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号 4 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( q ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( r ) ~ ( u ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :

( p ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 に示されるアミノ酸 :

( q ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 に示されるアミノ酸 :

( r ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 2 に示されるアミノ酸配列 :

( s ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 3 に示されるアミノ酸配列 :

( t ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 4 に示されるアミノ酸配列 :

30

( u ) 配列番号 2 のアミノ酸番号 1 1 ~ 1 5 に示されるアミノ酸配列 ; や、

( 6 ) H L A - A 1 1 と、以下の [ 1 ] ~ [ 4 ] のいずれかに示されるアミノ酸配列からなる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、H L A - A 1 1 に拘束される H T L V - I 認識 C T L の検出定量試薬 :

[ 1 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列 :

[ 2 ] 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列 :

[ 3 ] 配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の N 末端側に、以下の ( a ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( b ) ~ ( g ) に示されるアミノ酸配列の C 末端側が付加されており、及び/又は、配列番号 3 に示されるアミノ酸配列の C 末端側に以下の ( h ) に示されるアミノ酸若しくは以下の ( i ) ~ ( o ) に示されるアミノ酸配列の N 末端側が付加されているアミノ酸配列 :

40

( a ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 7 に示されるアミノ酸 :

( b ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 6 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( c ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 5 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( d ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 4 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( e ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 3 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( f ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 2 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( g ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 ~ 7 に示されるアミノ酸配列 :

( h ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 に示されるアミノ酸 :

( i ) 配列番号 1 のアミノ酸番号 1 7 ~ 1 8 に示されるアミノ酸配列 :

50

(j) 配列番号1のアミノ酸番号17~19に示されるアミノ酸配列：  
 (k) 配列番号1のアミノ酸番号17~20に示されるアミノ酸配列：  
 (l) 配列番号1のアミノ酸番号17~21に示されるアミノ酸配列：  
 (m) 配列番号1のアミノ酸番号17~22に示されるアミノ酸配列：  
 (n) 配列番号1のアミノ酸番号17~23に示されるアミノ酸配列：  
 (o) 配列番号1のアミノ酸番号17~24に示されるアミノ酸配列：  
 [4] 配列番号4に示されるアミノ酸配列のN末端側に、以下の(p)に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号4に示されるアミノ酸配列のC末端側に以下の(q)に示されるアミノ酸若しくは以下の(r)~(u)に示されるアミノ酸配列のN末端側が付加されているアミノ酸配列：  
 (p) 配列番号2のアミノ酸番号1に示されるアミノ酸：  
 (q) 配列番号2のアミノ酸番号11に示されるアミノ酸：  
 (r) 配列番号2のアミノ酸番号11~12に示されるアミノ酸配列：  
 (s) 配列番号2のアミノ酸番号11~13に示されるアミノ酸配列：  
 (t) 配列番号2のアミノ酸番号11~14に示されるアミノ酸配列：  
 (u) 配列番号2のアミノ酸番号11~15に示されるアミノ酸配列；  
 に関する。

10

## 【0011】

さらに本発明は、

20

(7) *In vitro*で、以下の[1]~[4]のいずれかに示されるアミノ酸配列からなるペプチドを用いて、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：

[1] 配列番号3に示されるアミノ酸配列：  
 [2] 配列番号4に示されるアミノ酸配列：  
 [3] 配列番号3に示されるアミノ酸配列のN末端側に、以下の(a)に示されるアミノ酸若しくは以下の(b)~(g)に示されるアミノ酸配列のC末端側が付加されており、及び/又は、配列番号3に示されるアミノ酸配列のC末端側に以下の(h)に示されるアミノ酸若しくは以下の(i)~(o)に示されるアミノ酸配列のN末端側が付加されているアミノ酸配列：

30

(a) 配列番号1のアミノ酸番号7に示されるアミノ酸：  
 (b) 配列番号1のアミノ酸番号6~7に示されるアミノ酸配列：  
 (c) 配列番号1のアミノ酸番号5~7に示されるアミノ酸配列：  
 (d) 配列番号1のアミノ酸番号4~7に示されるアミノ酸配列：  
 (e) 配列番号1のアミノ酸番号3~7に示されるアミノ酸配列：  
 (f) 配列番号1のアミノ酸番号2~7に示されるアミノ酸配列：  
 (g) 配列番号1のアミノ酸番号1~7に示されるアミノ酸配列：  
 (h) 配列番号1のアミノ酸番号17に示されるアミノ酸：  
 (i) 配列番号1のアミノ酸番号17~18に示されるアミノ酸配列：  
 (j) 配列番号1のアミノ酸番号17~19に示されるアミノ酸配列：  
 (k) 配列番号1のアミノ酸番号17~20に示されるアミノ酸配列：  
 (l) 配列番号1のアミノ酸番号17~21に示されるアミノ酸配列：  
 (m) 配列番号1のアミノ酸番号17~22に示されるアミノ酸配列：  
 (n) 配列番号1のアミノ酸番号17~23に示されるアミノ酸配列：  
 (o) 配列番号1のアミノ酸番号17~24に示されるアミノ酸配列：

40

[4] 配列番号4に示されるアミノ酸配列のN末端側に、以下の(p)に示されるアミノ酸が付加されており、及び/又は、配列番号4に示されるアミノ酸配列のC末端側に以下の(q)に示されるアミノ酸若しくは以下の(r)~(u)に示されるアミノ酸配列のN末端側が付加されているアミノ酸配列：

(p) 配列番号2のアミノ酸番号1に示されるアミノ酸：

50

- (q) 配列番号2のアミノ酸番号11に示されるアミノ酸：  
 (r) 配列番号2のアミノ酸番号11～12に示されるアミノ酸配列：  
 (s) 配列番号2のアミノ酸番号11～13に示されるアミノ酸配列：  
 (t) 配列番号2のアミノ酸番号11～14に示されるアミノ酸配列：  
 (u) 配列番号2のアミノ酸番号11～15に示されるアミノ酸配列；

に関する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】HSC T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。IL-2存在下でILT-#156細胞で2回刺激を加え17日間培養したHSC T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-Nkz-2( )、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。

10

【図2】HSC T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。HSC T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<sup>51</sup>Cr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( )、及びHLA-A26が一致するILT-Nkz-2( )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。

20

【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#156CTL(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-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。

30

【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#156CTL(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-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-Nkz-2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。

40

【図5】ILT-#156で刺激されたPBMCをHLA-A\*1101/Tax88-96あるいはHLA-A\*1101/Tax272-280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

50

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。

10

**【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。

20

**【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-ヒドロキシサクシンアミド、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。

30

**【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Ty r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、メタンスルホン酸等を用

40

50

いる方法等に従って、実施することができる。

【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、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。

【0019】

本発明のタンパク-ペプチド結合体としては、HLA-A11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HLA-A11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CTL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、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HLA-A11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HLA-A11と、フィコエリトリン（PE）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、HLA-A11遺伝子（アクセッションナンバー P13746）や -2ミクログロブリン遺伝子（アクセッションナンバー NM\_004048）を利用した遺伝子工学的的手法を用いて常法により作製したHLA-A11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ピトロで結合させる（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HLA-A11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的手法を用いて常法により本件ペプチド類とHLA-A11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。

【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、蛍光色素、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事ができ、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、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、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用したタンバ

10

20

30

40

50

ク - ペプチド結合体の精製や、CTL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。

【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、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、ATL等のHTLV-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。

10

【0022】

本件ペプチド類に対する抗体は、慣用のプロトコルを用いて、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EBV-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。

20

【0023】

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。

30

40

【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

50

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事ができる。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。

10

#### 【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事ができる。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。

20

#### 【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、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、特に液体製剤にあっては、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。

30

#### 【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。

40

#### 【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

50

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 H T L V - 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 D N A 群を発現させることができるベクター、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 H T L V - I T a x 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 P E 等の蛍光標識体はフローサイトメトリーによる C T L 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、P E 標識テトラマー（タンパク - ペプチド結合体の 4 量体）と、F I T C や P E - C y 5 で標識した C D 8 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 C D 8 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。

#### 【 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、H L A - A 1 1 ( 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、S V 4 0 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

#### 【 0 0 3 1 】

本発明の宿主細胞としては、本件ペプチド類や、H L A - A 1 1 ( 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 S 2、スポドプテラ S f 9 等の昆虫細胞や、L 細胞、C H O 細胞、C O S 細胞、H e L a 細胞、C 1 2 7 細胞、B A L B / c 3 T 3 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）、B H K 2 1 細胞、H E K 2 9 3 細胞、B o w e s メラノーマ細胞、卵母細胞等の動植物細胞などを挙げる

10

20

30

40

50

、形質導入、スクレープローディング (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 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。

#### 【 0 0 3 2 】

本発明の H T L V - I 認識 C T L の誘導方法としては、H S C T 前の A T L 患者に由来する H T L V - I 感染 T 細胞を用いて、同種の H L A タイプ、すなわち H L A - A 1 1 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 をインビトロ、インビボ又はエキスビボで刺激する C T L を誘導する方法や、本件ペプチド類を用いて、H L A - A 1 1 陽性の A T L 患者の P B M C をインビトロ、インビボ又はエキスビボで刺激する H T L V - I 認識 C T L の誘導方法や、本件 D N A 群を発現させることができるベクターを用いて、例えば P B M C 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、H L A - A 1 1 陽性の A T L 患者の P B M C をインビトロ、インビボ又はエキスビボで刺激する H T L V - I 認識 C T L 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 H T L V - I 認識 C T L は、養子免疫療法として A T L 等の H T L V - I 腫瘍の治療に用いることができる他、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。

#### 【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。

#### 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 <sup>+</sup> 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 <sup>+</sup> P B M C からインビトロで樹立した。

#### 【 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 <sup>+</sup> 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 <sup>TM</sup> 培地 ( G I B C O - I n v i t r o g e n 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。

#### 【 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.dcr.t.nih.gov/molbil/hla#bind/>) を文献 ( J . I m m u n o l . 1 5 2 , 1 6 3 - 1 7 5 , 1 9 9 4 ; J . I m m u n o l . 1 5 2 , 3 9 1 3 - 3 9 2 4 , 1 9 9 4 ) 記載の方法に従い使用し、H L A - A 1 1 と

10

20

30

40

50

結合する可能性のある9塩基長のHTLV-I Taxペプチドを用意した。

【0037】

A-5 (CTL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<sup>51</sup>Cr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<sup>51</sup>Cr放出量 - 自発性の<sup>51</sup>Cr放出量] / [最大<sup>51</sup>Cr放出量 - 自発性の<sup>51</sup>Cr放出量] × 100%)により算出した。エフェクター細胞が産生するIFN- $\gamma$ を測定するために、様々なE/T割合において標的細胞と18時間インキュベーションした後に、ELISA法(ヒトIFN- $\gamma$  ELISAキット, Biosource社製、Camarillo, California)を用いて二重測定した。

10

【0038】

A-6 (4量体染色)

フィコエリトリン(PE)複合型HLA-A\*1101/Tax88-96(KVLTTPPTH; 配列番号3)並びにHLA-A\*1101/Tax272-280(QSSSFIFHK; 配列番号4)4量体は、NIAID 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、PE-Cy5複合型抗CD8抗モノクローナル抗体(BD Pharmingen社製)を用いて30分間染色した後、4量体を用いてさらに60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FACSCaliburで2色解析を行った。

【0039】

B [結果]

B-1 (HSC T前のHTLV-I感染細胞と反応するHSC T後のレシピエントからのCTL誘導)

HSC T前のレシピエント由来の造血細胞に対するHSC 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HSC T前の患者から、IL-2又はIL-15の存在下でPHAの刺激を受けたPBMCを2ヶ月以上維持することにより、T細胞株であるILT-#156を樹立した。この細胞株はCD4陽性で、HTLV-IのTax、p19等のHTLV-I抗原に陽性であった。

【0040】

ILT-#156細胞に対するHSC T後の患者のPBMC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HSC T147日後に調べた。インビトロでIL-2の存在下においてホルムアルデヒド処理したILT-#156で2回刺激したHSC T後の患者のPBMCのILT-#156及びLCL-#156細胞に対するインターフェロンガンマ(IFN- $\gamma$ )産生能力を培養17日後に測定した。一晚インキュベーションした後、ILT-#156に対してはIFN- $\gamma$ が産生されたが、LCL-#156細胞に対しては産生されなかった(図1)。またHLA-A11を共有する同種HTLV-I感染TCL-Kan細胞に対してもIFN- $\gamma$ が産生されたが、HLA-A11を共有するLCL-Kan、HLA-A26を共有するHTLV-I感染ILT-Nkz-2やLCL-Nkzに対してはIFN- $\gamma$ は産生しなかった。

30

【0041】

B-2 (HSC T後の患者から誘導したCTLのHTLV-I特異性)

次に、HSC T後の患者PBMCからILT-#156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<sup>51</sup>Cr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CD8陽性であり、ILT-#156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)、HLA-A11を共有する同種HTLV-I感染TCL-Kan細胞を効果的に死滅させたが、HLA-A11を共有するLCL-Kan、HLA-A26を共有するHTLV-I感染ILT-Nkz-2やLCL-Nkzに対しては死滅させなかった。以上の結果は、ILT-#156に反応してHSC T後の患者PBMCから増殖した細胞株が、HLA-A11に拘束されるHTLV-I抗原特異的CD8<sup>+</sup>細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を含むことを強く明示した。

40

50

## 【 0 0 4 2 】

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。

10

## 【 0 0 4 3 】

## 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 応答がおこることを見出した ( 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 ) 。

20

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のと同様の、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。

30

## 【 産業上の利用可能性 】

## 【 0 0 4 4 】

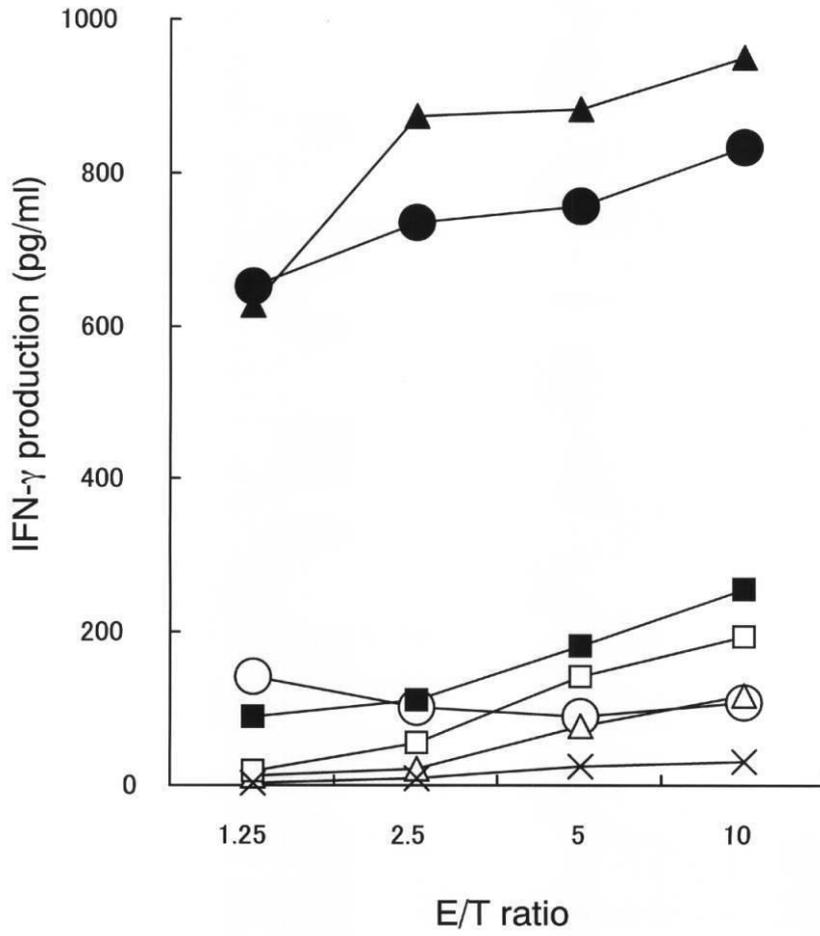
( 1 ) 本発明により、日本人で H L A 遺伝子頻度が 9 . 3 % である H L A - A 1 1 に拘束される C T L の主要エピトープが見出された。H T L V - I に対する免疫応答の検査に本エピトープ部位のペプチドを使用することによって、これまでに見出した H L A - A 2 , H L A - A 2 4 に拘束される T a x エピトープと合わせ、日本人集団のかなりの部分をカバーできることになる。

( 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。

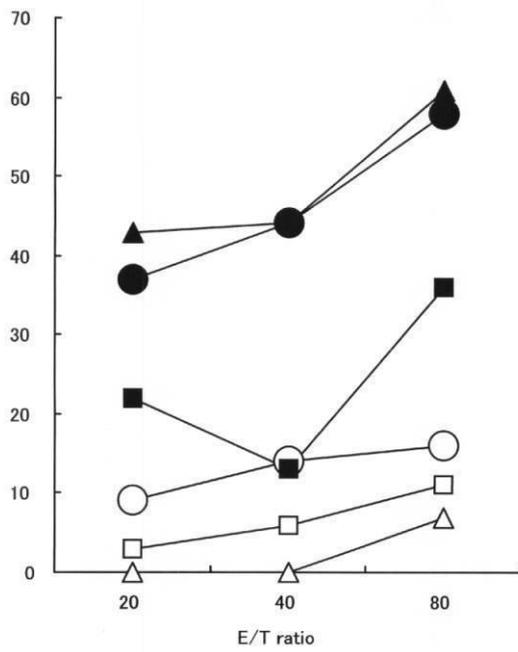
40

( 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。

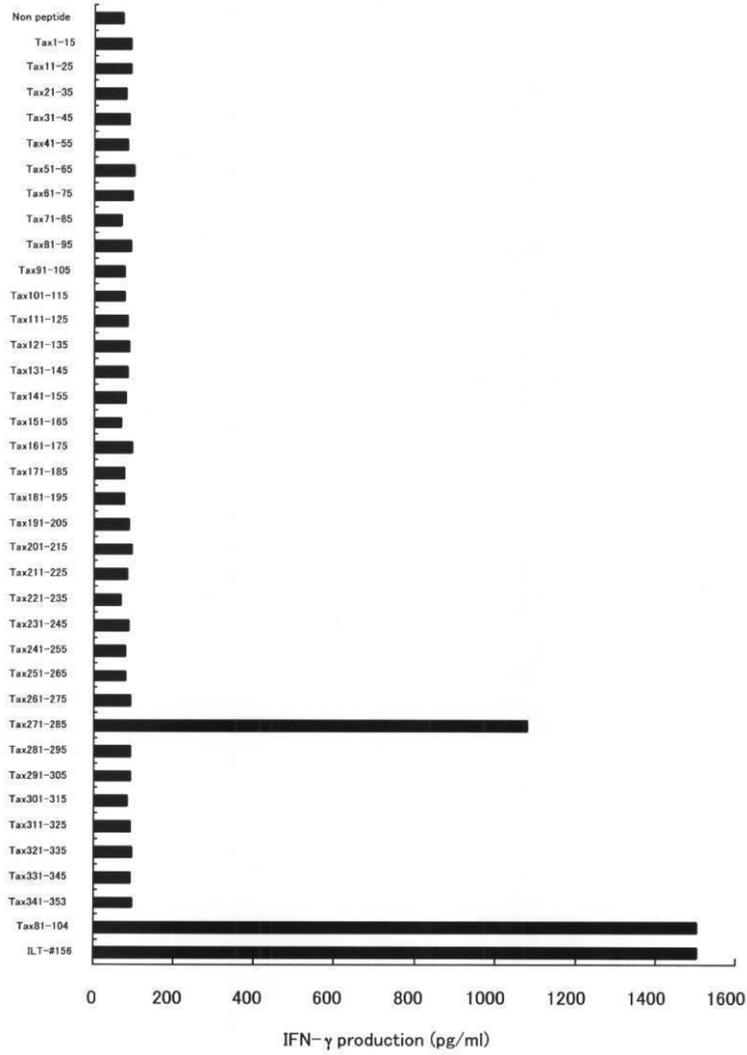
【 図 1 】



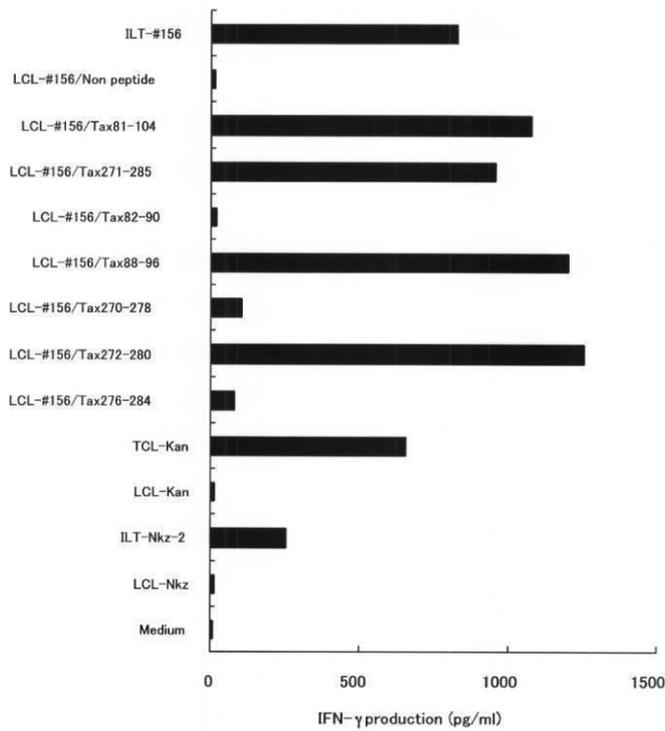
【 図 2 】



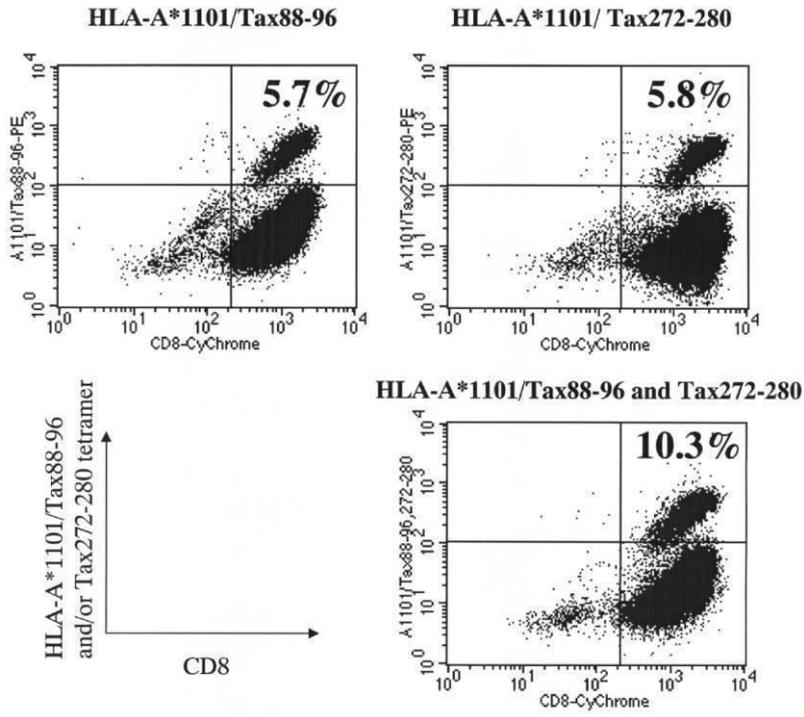
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



【 配列表 】

0005176099000001.app

## フロントページの続き

審査官 佐藤 巖

- (56)参考文献 特表平11-501124(JP,A)  
特表2002-507397(JP,A)  
特開2002-372532(JP,A)  
ALTMAN, J.D. et al., Science, 1996年, Vol.274, pp.94-96  
PARKER, C.E. et al., J. Virol., 1994年, Vol.68, No.5, pp.2860-2868  
HARASHIMA, N. et al., Cancer Res., 2004年 1月, Vol.64, pp.391-399  
大沢利昭ら, 免疫学辞典, 2001年, 第2版, p.421  
BIEGANOWSKA, K. et al., J. Immunol., 1999年, Vol.162, pp.1765-1771  
原嶋奈々江ら, 日本免疫学会総会・学術集会記録, 2004年11月 5日, Vol.34, p.266
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A61K 39/00  
A61K 38/00  
G01N 33/53  
C12N 15/00-15/90  
MEDLINE/CA/BIOSIS/WPIDS(STN)  
REGISTRY(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
SwissProt/PIR/GeneSeq