

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成23年2月17日(2011.2.17)

【公表番号】特表2010-514669(P2010-514669A)

【公表日】平成22年5月6日(2010.5.6)

【年通号数】公開・登録公報2010-018

【出願番号】特願2009-524039(P2009-524039)

【国際特許分類】

C 0 7 K	7/06	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)
A 6 1 K	48/00	(2006.01)
A 6 1 K	39/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/00	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
A 6 1 P	37/02	(2006.01)

【F I】

C 0 7 K	7/06	Z N A
C 1 2 N	5/00	1 0 2
C 1 2 N	5/00	2 0 2 L
A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	43/00	1 0 5
A 6 1 P	37/02	

【手続補正書】

【提出日】平成22年12月22日(2010.12.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 2 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 2 9】

【図1】Foxp3に由来するペプチドを用いて誘導したCTLに対するIFN-ELISPOTアッセイ法の結果を示す写真を表す。図1Aにおいて、Foxp3-A24-9-363(SEQ ID NO 3)で刺激したウェル番号2番および7番、Foxp3-A24-9-366(SEQ ID NO 7)で刺激したウェル番号1番および6番、Foxp3-A24-9-190(SEQ ID NO 9)で刺激したウェル番号5番、およびFoxp3-A24-10-87(SEQ ID NO 67)で刺激したウェル番号7番、ならびにFoxp3-A24-10-60(SEQ ID NO 74)で刺激したウェルのCTLが、対照と比較して強力なIFN-産生を示した。図1Bにおいて、Foxp3-A24-9-207(SEQ ID NO 4)で刺激したウェル番号4番、Foxp3-A24-9-332(SEQ ID NO 5)で刺激したウェル番号6番、Foxp3-A24-9-337(SEQ ID NO 8)で刺激したウェル番号6番、およびFoxp3-A24-10-114(SEQ ID NO 12)で刺激したウェル番号1番のCTLが、対照と比較して強力なIFN-産生を示した。

【図2】Foxp3に由来するペプチドを用いて誘導したCTLに対するIFN-ELISPOTアッセイ法の結果を示す写真を表す。図2Aにおいて、Foxp3-A2-9-390(SEQ ID NO 15)で刺激したウェル番号2番、Foxp3-A2-9-69(SEQ ID NO 16)で刺激したウェル番号2番、Foxp3-A2-9-252(SEQ ID NO 17)で刺激したウェル番号6番、Foxp3-A2-10-359(SEQ ID NO 22)で刺激したウェル番号4番、Foxp3-A2-263(SEQ ID NO 24)で刺激したウェル番号7番、ならびにFoxp3-A2

-10-94(SEQ ID NO 27)で刺激したウェル番号2番および5番のCTLが、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図2Bにおいて、Foxp3-A2-10-233(SEQ ID NO 28)で刺激したウェルのすべて、Foxp3-A2-10-152(SEQ ID NO 29)で刺激したウェル番号6番および7番、Foxp3-A2-10-77(SEQ ID NO 30)で刺激したウェル番号5番、およびFoxp3-A2-10-246(SEQ ID NO 37)で刺激したウェル番号1番、ならびにFoxp3-A2-10-94(SEQ ID NO 27)で刺激したウェルのCTLが、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図2Cにおいて、Foxp3-A2-9-390(SEQ ID NO 15)で刺激したウェル番号1番、2番、4番、5番、7番、9番、11番、および12番、Foxp3-A2-9-304(SEQ ID NO 19)で刺激したウェル番号5番および11番、Foxp3-A2-9-68(SEQ ID NO 18)で刺激したウェル番号7番、ならびにFoxp3-A2-9-252(SEQ ID NO 17)で刺激したウェル番号12番のCTLが、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。

【図3】陽性ウェル中の細胞を増殖(expand)させ、IFN- γ ELISAアッセイ法を実施したこと示す。図3A、B、およびCにおいて、Foxp3-A02-9-390(SEQ ID NO: 15)で刺激したCTL株(黒抜きのひし形)は、対照(黒抜きの四角形)と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図3Dにおいて、Foxp3-A02-9-252(SEQ ID NO: 17)で刺激したCTL株(黒抜きのひし形)は、対照(黒抜きの四角形)と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図3Eにおいて、Foxp3-A24-10-60(SEQ ID NO: 74)で刺激したCTL株(黒抜きのひし形)は、対照(黒抜きの四角形)と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図3Fにおいて、Foxp3-A02-10-94(SEQ ID NO: 27)で刺激したCTL株(黒抜きのひし形)は、対照(黒抜きの四角形)と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図3Gにおいて、Foxp3-A24-10-87(SEQ ID NO: 67)で刺激したCTL株(黒抜きのひし形)は、対照(黒抜きの四角形)と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。

【図4】Foxp3およびHLA-A*02またはHLA-A*24を内因的に発現する標的細胞に対する特異的CTL活性を示す。図4AおよびBにおいて、Foxp3-A02-9-390(SEQ ID NO: 15)およびFoxp3-A02-9-252(SEQ ID NO: 17)を用いて産生させたCTL株は、Foxp3およびHLA-A02の両方をトランسفェクトされた293Tに対して高い特異的CTL活性を示した。その一方で、これは、対照に対しては有意な特異的CTL活性を示さなかった。図4Cにおいて、Foxp3-A02-9-252(SEQ ID NO: 17)を用いて産生させたCTL株は、Foxp3およびHLA-A24の両方をトランسفェクトされた293Tに対して高い特異的CTL活性を示した。その一方で、これは、対照に対しては有意な特異的CTL活性を示さなかった。

【図5】Foxp3-252_hペプチドおよびFoxp3-252_mペプチドの免疫原性のインビオ解析を示す。IFAを結合させたペプチドまたはIFAのみを、0日目および7日目にBALB/cマウスに皮下注射した。14日目に、ワクチン接種したマウスの脾細胞を回収し、応答細胞(responder cell)として使用した。対応するペプチドでパルスしたRLmale1細胞(黒抜きの四角形)、またはペプチド無しのRLmale1細胞(白抜きの四角形) 1×10^4 個を、IFN- γ ELISPOTアッセイ法のための刺激細胞(stimulator cell)として使用した。Foxp3-252_h(A)およびFoxp3-252_m(B)を用いたワクチン接種を5匹のマウス(M1～M5)に実施し、各アッセイ法における対照として、ペプチド無しのIFA注射を3匹のマウス(N1～N3)に実施した。

【図6】Foxp3エピトープペプチドを用いたワクチン接種のインビオでの抗腫瘍効果を示す。4T1乳癌細胞株 1×10^5 個を0日目にBALB/cマウスに注射した。Foxp3-252_hと結合させたIFA(白抜きの円)、Foxp3-252_mと結合させたIFA(黒抜きの四角形)、ペプチド無しのIFA(黒抜きの三角形)を3日目および10日目に注射した。通常の腫瘍増殖の対照として、ワクチン接種無しのマウス(x)もこのアッセイ法において準備した。腫瘍増殖抑制の有意な差が、Foxp3エピトープペプチドをワクチン接種した場合において観察された。*はP<0.01、**はP<0.005である。

【図7】HLA分子に対するFoxp3-9-252置換物の親和性に関するアッセイ法を示す。図7Aにおいて、Foxp3-9-252-WTを用いて誘導されたCTLは、HLA-A2分子上にFoxp3-9-252-9Vペプチドを提示する細胞を認識する。Foxp3-9-252-WTペプチドを用いて誘導したCTL株を応答細胞として、およびFoxp3-9-252-WTペプチドまたはFoxp3-9-252-9VペプチドでパルスしたT2細胞を刺激細胞としてそれぞれ用いて、IFN- γ ELISPOTアッセイ法を実施した。ペプチドパルスを施さなかったT2細胞を対照として調製した。図7Bにおいて、Foxp3-9-252-9VおよびFoxp3-9-252-WTは、HLA-A2分子に対して同等の親和性を示す。Foxp3-9-252-WTペプチ

ドを用いて誘導したCTL株を応答細胞として(1×10^5 細胞/ウェル)、およびFoxp3-9-252-WTペプチド(黒抜きの円)、Foxp3-9-252-9Vペプチド(白抜きの円)、またはHIV-A02ペプチド(黒抜きの三角形)でパルスしたT2細胞を刺激細胞として(1×10^4 細胞/ウェル)用いて、IFN-

ELISAアッセイ法を実施した。各ペプチドの種類およびペプチド濃度で、刺激細胞のペプチドパルスを37℃で2時間実施した。図7Cにおいて、CTLは、HLA-A2分子を標的とするFoxp3-9-252置換物による刺激によって誘導され得る。HLA-A2分子を標的とするすべての置換ペプチドに対するCTLは、「材料および方法」において説明する方法で作製した。Foxp3-9-252-3Mで刺激したウェル番号3および7、Foxp3-9-252-3Lで刺激したウェル番号7、ならびにFoxp3-9-252-9Vで刺激したウェル番号8の細胞が、対照と比較してIFN- γ 産生を示した。図7Dにおいて、Foxp3-9-252-9Vを用いて作製したCTLは、Foxp3-9-252-WTペプチドでコーティングされた刺激細胞を認識する。Foxp3-9-252-9Vペプチドを用いて誘導したCTL株を応答細胞として使用した。Foxp3-9-252-9Vペプチド(黒抜きの円)またはFoxp3-9-252-WTペプチド(白抜きの円)と共にインキュベートしたT2細胞、およびペプチド無しで(白抜きの四角)インキュベートしたT2細胞を、このアッセイ法において刺激細胞として使用した(1×10^4 細胞/ウェル)。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 5】

Foxp3特異的ペプチドによるCTL株の樹立

陽性のウェル中のこれらの細胞を増殖させ、IFN- γ ELISAアッセイ法を実施した。図3A、B、およびCにおいて、Foxp3-A02-9-390(SEQ ID NO: 15)で刺激したCTL株は、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図3Dにおいて、Foxp3-A02-9-252(SEQ ID NO: 17)で刺激したCTL株は、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図3Eにおいて、Foxp3-A24-1-0-60(SEQ ID NO: 74)で刺激したCTL株は、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図3Fにおいて、Foxp3-A02-10-94(SEQ ID NO: 27)で刺激したCTL株は、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。図3Gにおいて、Foxp3-A24-10-87(SEQ ID NO: 67)で刺激したCTL株は、対照と比較して強力なIFN- γ 産生を示した。

【手続補正3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 17、3～5、7～9、12、15～16、18～19、22、24、27～30、37、67、または74のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項2】

以下の群より選択されるアミノ酸配列を含む、細胞障害性T細胞誘導能を有するペプチド：

(a) SEQ ID NO: 17、3～5、7～9、12、67、または74; および

(b) 1つ、2つ、またはいくつかのアミノ酸が置換または付加されている、SEQ ID NO: 17、3～5、7～9、12、67、または74。

【請求項3】

N末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、またはトリプトファンである、請求項2記載のペプチド。

【請求項4】

C末端アミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、ま

たはメチオニンである、請求項2または3記載のペプチド。

【請求項5】

以下の群より選択されるアミノ酸配列を含む、細胞障害性T細胞誘導能を有するペプチド：

(a) SEQ ID NO: 17、15～16、18～19、22、24、27～30、または37; および

(b) 1つ、2つ、またはいくつかのアミノ酸が置換または付加されている、SEQ ID NO: 17、15～16、18～19、22、24、27～30、または37。

【請求項6】

N末端から2番目のアミノ酸が、ロイシンまたはメチオニンである、請求項5記載のペプチド。

【請求項7】

C末端アミノ酸がバリンまたはロイシンである、請求項5または6記載のペプチド。

【請求項8】

置換ペプチドが、SEQ ID NO: 95、97、または98のアミノ酸配列を含む、請求項2または5記載のペプチド。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか一項記載の1種もしくは複数種のペプチド、または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、T-reg細胞を調節するための薬学的物質。

【請求項10】

T-reg細胞の増殖を阻害することが意図される、請求項9記載の薬学的物質。

【請求項11】

HLA抗原がHLA-A24である対象に投与することが意図される、請求項9記載の薬学的物質。

。

【請求項12】

HLA抗原がHLA-A02である対象に投与することが意図される、請求項9記載の薬学的物質。

。

【請求項13】

T-reg細胞の機能を抑制することが意図される、請求項9記載の薬学的物質。

【請求項14】

癌を治療することが意図される、請求項9記載の薬学的物質。

【請求項15】

ワクチンである、請求項14記載の薬学的物質。

【請求項16】

請求項1～8のいずれか一項記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドに加えて、癌細胞に対する細胞障害性T細胞を誘導する能力を有する別のペプチドまたは該他のペプチドをコードする別のポリヌクレオチドを含む、請求項15記載の薬学的物質。

【請求項17】

HLA抗原および請求項1～8のいずれか一項記載のペプチドを含む複合体をその表面に提示するエキソソーム。

【請求項18】

HLA抗原がHLA-A24である、請求項17記載のエキソソーム。

【請求項19】

HLA抗原がHLA-A2402である、請求項17記載のエキソソーム。

【請求項20】

HLA抗原がHLA-A02である、請求項17記載のエキソソーム。

【請求項21】

HLA抗原がHLA-A0201である、請求項17記載のエキソソーム。

【請求項22】

請求項1～8のいずれか一項記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオ

チドの、高い細胞障害性T細胞誘導能を有する抗原提示細胞を含む薬学的組成物の製造における使用。

【請求項23】

請求項1~8のいずれか一項記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドの、細胞障害性T細胞を含む薬学的組成物の製造における使用。

【請求項24】

高い細胞障害性T細胞誘導能を有する抗原提示細胞を誘導する方法であって、請求項1~8のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子をインピット口で抗原提示細胞に移入する段階を含む、方法。

【請求項25】

請求項1~8のいずれか一項記載のペプチドによって誘導される、単離された細胞障害性T細胞。

【請求項26】

HLA抗原と請求項1~8のいずれか一項記載のペプチドとで形成された複合体を含む、抗原提示細胞。

【請求項27】

請求項24記載の方法によって誘導される、請求項26記載の抗原提示細胞。

【請求項28】

対象においてT-reg細胞を調節するための免疫原生組成物の製造における、請求項1~8のいずれか一項記載のペプチドもしくは該ペプチドの免疫学的に活性な断片、または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

治療方法を実施する際、対象または患者はヒトであつてよい。前述の発明の概要および以下の詳細な説明はいずれも、例示的な態様のものであり、本発明も本発明の他の代替の態様も限定しないことを理解すべきである。

【請求項1001】

SEQ ID NO: 3~5、7~9、12、15~19、22、24、27~30、37、67、または74のアミノ酸配列からなるペプチド。

【請求項1002】

以下の群より選択されるアミノ酸配列を含む、細胞障害性T細胞誘導能を有するペプチド：

(a) SEQ ID NO: 3~5、7~9、12、17、67、または74; および

(b) 1つ、2つ、またはいくつかのアミノ酸が置換または付加されている、SEQ ID NO: 3~5、7~9、12、17、67、または74。

【請求項1003】

N末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、またはトリプトファンである、請求項1002記載のペプチド。

【請求項1004】

C末端アミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、またはメチオニンである、請求項1002または1003記載のペプチド。

【請求項1005】

以下の群より選択されるアミノ酸配列を含む、細胞障害性T細胞誘導能を有するペプチド：

(a) SEQ ID NO: 15~19、22、24、27~30、または37; および

(b) 1つ、2つ、またはいくつかのアミノ酸が置換または付加されている、SEQ ID NO: 15~

19、22、24、27～30、または37。

[請求項1006]

N末端から2番目のアミノ酸が、ロイシンまたはメチオニンである、請求項1005記載のペプチド。

[請求項1007]

C末端アミノ酸がバリンまたはロイシンである、請求項1005または1006記載のペプチド。

[請求項1008]

置換ペプチドが、SEQ ID NO: 95、97、または98のアミノ酸配列を含む、請求項1002または1005記載のペプチド。

[請求項1009]

請求項1001～1007のいずれか一項記載の1種もしくは複数種のペプチド、または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、T-reg細胞を調節するための薬学的物質。

[請求項1010]

T-reg細胞の増殖を阻害することが意図される、請求項1009記載の薬学的物質。

[請求項1011]

HLA抗原がHLA-A24である対象に投与することが意図される、請求項1009記載の薬学的物質。

[請求項1012]

HLA抗原がHLA-A02である対象に投与することが意図される、請求項1009記載の薬学的物質。

[請求項1013]

T-reg細胞の機能を抑制することが意図される、請求項1009記載の薬学的物質。

[請求項1014]

癌を治療することが意図される、請求項1009記載の薬学的物質。

[請求項1015]

ワクチンである、請求項1014記載の薬学的物質。

[請求項1016]

請求項1002、1005記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドに加えて、癌細胞に対する細胞障害性T細胞を誘導する能力を有する別のペプチドまたは該他のペプチドをコードする別のポリヌクレオチドを含む、請求項1015記載の薬学的物質。

[請求項1017]

HLA抗原および請求項1002または1005記載のペプチドを含む複合体をその表面に提示するエキソソーム。

[請求項1018]

HLA抗原がHLA-A24である、請求項1017記載のエキソソーム。

[請求項1019]

HLA抗原がHLA-A2402である、請求項1017記載のエキソソーム。

[請求項1020]

HLA抗原がHLA-A02である、請求項1017記載のエキソソーム。

[請求項1021]

HLA抗原がHLA-A0201である、請求項1017記載のエキソソーム。

[請求項1022]

請求項1002、1005記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与することによって、高い細胞障害性T細胞誘導能を有する抗原提示細胞を誘導する方法。

。

[請求項1023]

請求項1002、1005記載のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを投与することによって、細胞障害性T細胞を誘導する方法。

[請求項1024]

高い細胞障害性T細胞誘導能を有する請求項1022記載の抗原提示細胞を誘導する方法であって、請求項1002または1005記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む遺伝子を抗原提示細胞に移入する段階を含む、方法。

[請求項1025]

請求項1002記載のペプチドによって誘導される、単離された細胞障害性T細胞。

[請求項1026]

HLA抗原と請求項1002または1005記載のペプチドとで形成された複合体を含む、抗原提示細胞。

[請求項1027]

請求項1024記載の方法によって誘導される、請求項1026記載の抗原提示細胞。

[請求項1028]

対象においてT-reg細胞を調節する方法であって、請求項1002記載のペプチドもしくは該ペプチドの免疫学的に活性な断片、または該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むワクチンを該対象に投与する段階を含む、方法。