(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2011 年 3 月 3 日(03.03.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/024482 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/0783 (2010.01)	*A61P 35/02* (2006.01)
A61K 35/26 (2006.01)	*C12N 5/10* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)	*C12N 15/09* (2006.01)
A61P 31/12 (2006.01)	*C12Q 1/04* (2006.01)
A61P 31/14 (2006.01)	*G01N 33/53* (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)	*G01N 33/544* (2006.01)
A61P 31/20 (2006.01)	*C07K 7/06* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)	*C07K 7/08* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/005326

(22) 国際出願日: 2010 年 8 月 30 日(30.08.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-199109 2009 年 8 月 29 日(29.08.2009) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社バイオメッドコア (BioMedCore Inc.) [JP/JP]; 〒2360004 神奈川県横浜市金沢区福浦１－１－１ 横浜金沢ハイテクセンター・テクノコア Kanagawa (JP). 北海道公立大学法人札幌医科大学 (SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒0600061 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目２９１番地 Hokkaido (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鳥越 俊彦 (TORIGOE, Toshihiko) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 廣橋 良彦 (HIROHASHI, Yoshihiko) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 水内 将人 (MIZUUCHI, Masahito) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 佐藤 昇志 (SATOH, Noriyuki) [JP/JP]; 〒0608556 北海道札幌市中央区南１条西１７丁目北海道公立大学法人札幌医科大学内 Hokkaido (JP). 鈴木 哲 (SUZUKI, Satoshi) [JP/JP]; 〒4580812 愛知県名古屋市緑区神の倉２丁目２６６－３ Aichi (JP). 清水 佳隆 (SHIMIZU, Yoshitaka) [JP/JP]; 〒2360005 神奈川県横浜市金沢区並木１－４－３－７０７ Kanagawa (JP). 佐藤 雄一郎 (SATOH, Yuichiro) [JP/JP]; 〒2480023 神奈川県鎌倉市極楽寺１－５－１７ Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 長谷川 智子, 外 (HASEGAWA, Tomoko et al.); 〒2310002 神奈川県横浜市中区海岸通三丁目９番地 横浜郵船ビル２階長谷川国際特許事務所内 Kanagawa (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

WO 2011/024482 A1

(54) **Title**: METHOD FOR MEASUREMENT OF ABILITY OF INDUCING ANTIGEN-SPECIFIC T CELLS

(54) 発明の名称 : 抗原特異的Ｔ細胞誘導能測定法

(57) **Abstract**: A method for preparing antigen-specific T cells for use in the methods for preventing and treating cancer and infectious diseases utilizing cellular immunity systems; a method for measuring the antigen-specific CTLs-inducing ability of mammal-derived lymphocytes; an antigenic substance for use in the prevention or treatment of diseases associated with HPV16 infection; and a method for preventing or treating diseases associated with HPV16 infection, which comprises administering an antigenic substance or CTLs to a patient.

(57) 要約: 本発明は、細胞性免疫のシステムを利用したがんや感染症などの予防及び治療方法において使用するための抗原特異的なＴ細胞の調製方法を提供する。また、本発明は、哺乳動物由来のリンパ球の抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能を測定する方法を提供する。また、本発明は、ＨＰＶ１６感染に基づく疾患の予防又は治療に利用するための抗原性物質を提供する。また、本発明は抗原性物質又はＣＴＬｓを患者に投与することを含む、ＨＰＶ１６感染に基づく疾患の予防方法又は治療方法に関する。

明　細　書

発明の名称 ： 抗原特異的Ｔ細胞誘導能測定法

技術分野

[0001] 本発明は、ヒト末梢血単核球（以下、「ＰＢＭＣ」又は「ＰＢＭＣｓ」という）の抗原特異的Ｔ細胞誘導能を測定する方法、及びＰＢＭＣから抗原特異的Ｔ細胞を誘導する能力の高い抗原を選択する方法、及び患者の体外において、リンパ球から抗原特異的Ｔ細胞を製造する方法ＰＢＭＣに関する。また、本発明は、ヒトパピローマウイルスタイプ１６の感染に基づく疾患の治療用又は予防用ワクチンとして有用な抗原ペプチドに関する。

背景技術

[0002] 生体の免疫システムにおける細胞性免疫応答は、がんや感染症などの予防及び治療方法における魅力的な手段として利用することが期待されてきた。生体内において細胞性免疫応答の中心的役割を果たす目的の抗原に特異的な細胞傷害性Ｔ細胞（以下、「ＣＴＬ」又は「ＣＴＬｓ」という）への分化は、抗原の種類や存在量、抗原提示細胞の補助刺激活性や、ＣＤ４陽性Ｔ細胞による抗原提示細胞の活性化能に依存しており、個人差があることが報告されている。このことから、例えば、ワクチンを治療又は予防目的で使用する場合、対象者に対するワクチンの効果を事前に判定することで、個々の患者に適した治療方法又は予防方法を提供することが可能になると考えられている。従来、対象患者へのワクチンの効果を判定するため、当該患者由来のＰＢＭＣｓについて、特定の抗原に対するＣＴＬｓの誘導能を測定する場合、当該患者由来のＰＢＭＣを抗原刺激した４０～６０日後にＣＴＬｓの誘導能を測定することにより行っていた。しかし、従来の方法では、例えば、各患者に適したワクチンを選択するために患者の当該候補ワクチンへの反応性を測定するために１月半～２月の長期間を要していた。また、従来、免疫学の実験、研究において用いられていた末梢血中のがん抗原特異的ＣＴＬ測定法では、抗原ペプチド単独刺激によるＣＴＬ誘導に必要な培養期間は、追加抗

原ペプチド刺激を加えた場合で通常３０日以上であり、短くとも１５日以上であった。例えば、従来の方法では、ＰＢＭＣｓを取得後、樹状細胞とＣＤ８陽性Tリンパ球細胞分画に分離し、樹状細胞分画を増殖させて、そこに対象抗原ペプチドをパルスし（樹状細胞に抗原ペプチドを提示させる段階：第一段階）、その後抗原提示させた当該樹状細胞にＣＤ８陽性Tリンパ球分画に混ぜ、ＣＤ８陽性Tリンパ球細胞を活性化させたＣＴＬを誘導（第二段階）していた。通常、第一段階に１～２週間、第二段階に更に２～３週間要していた（非特許文献１）。更には、そのように長時間培養によってもＣＴＬを誘導できない抗原ペプチドもあり、実際にＣＴＬの誘導を検出できるのは特定の抗原ペプチドに限られていた。ＰＢＭＣに直接抗原を加えてＣＴＬを誘導するｍｉｘｅｄ　ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ－ｐｅｐｔｉｄｅ　ｃｕｌｔｕｒｅ（ＭＬＰＣ）法の改良も報告されているが（非特許文献２）、本方法を用いた場合にも刺激工程（第一段階）に２週間以上を要していた（非特許文献２、第４８９９頁、左カラム下から５行目～右カラム７行目）。また、従来行われていたＭＬＰＣ法では、ペプチドワクチンによる抗原特異的ＣＴＬの誘導の場合、有意に測定できるのはウイルス抗原などの強い抗原に限られており、抗原性が弱くＰＢＭＣ中の抗原特異的ＣＴＬ細胞数も少ない抗原ペプチド、例えばがん抗原ペプチドでは誘導能が低く、抗原特異的ＣＴＬの誘導に再刺激を加えながら１～２カ月以上を要しており、誘導効率が低いことが確認されていた。

[0003] また、例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の自己移植（非特許文献３及び非特許文献４）や、ＰＢＭＣｓをＩＬ－２と接触させた後、抗原特異的な群をハイスループット定量ＰＣＲ（ＨＴ－ｑＰＣＲ）により選択した後、増幅させる方法（特許文献１）等が報告されている。しかし、生体内における目的の抗原に特異的なＣＴＬｓへの分化は、抗原の存在量、抗原提示細胞の補助刺激活性や、ＣＤ４陽性Ｔ細胞による抗原提示細胞の活性化能に依存しており、個人差があることから、患者の自己血に既に存在するＰＢＭＣ集団から、安定的に目的の抗原を認識するリンパ球を分離することは困難であっ

た。

[0004] 子宮頸がんは世界中で２番目に多い婦人科悪性腫瘍である。子宮頸がん及び前悪性子宮頚部上皮内腫瘍は、ヒトパピローマウイルス（以下、「ＨＰＶ」という）による持続的な感染により引き起こされる。ＨＰＶは、低リスク型と高リスク型に分類され、高リスク型のＨＰＶが子宮頸部上皮内腫瘍（以下、「ＣＩＮ」という）及び子宮頸がんを引き起こすことが知られている。国際がん研究機関（ＩＡＲＣ）は、高リスクＨＰＶ（発がん性ＨＰＶ）として、ＨＰＶタイプ１６，１８，３１，３３，３５，３９，４５，５１，５２，５６，５８，５９，６８，７３及び８２を分類している。ＨＰＶ血清型の分布には地域差があり、アジア、特に日本では子宮頸がんの患者から２１の血清型の高リスク型ＨＰＶが検出されている。また、世界中では、ＨＰＶ１６及び１８が最もよく見られ、７０％以上のケースで見られる血清型である。ＨＰＶは、大きさが約７．９ｋｂの環状の二本鎖ＤＮＡゲノムを持ち、当該ゲノムは８つの遺伝子をコードしている。これらの遺伝子のうち、Ｌ１及びＬ２は構造タンパク質であり、Ｅ１はウイルスＤＮＡの複製機能をもち、Ｅ２はウイルスの転写を調節し、Ｅ４の機能は不明であり、Ｅ５、Ｅ６及びＥ７は形質転換の性質を有している。Ｅ５は細胞増殖を刺激することも知られている（非特許文献５）。同様に、Ｅ６及びＥ７ウイルスがん遺伝子は、互いに作用して子宮頸がんを形成することが知られている。Ｅ５、Ｅ６及びＥ７は、ＣＩＮ３及び子宮頸がんにおいてのみ発現しており、理想的な治療用ワクチンとして使用できると考えられている（非特許文献６）。ＨＰＶウイルスの初期感染後、進行性子宮頸がんの形成には１５から２５年を要し、当該疾患の形成過程においてＥ６及びＥ７がん遺伝子の発現を検出されている。ＨＰＶタイプ１６（ＨＰＶ１６）は、最もよく見られる発がんサブタイプであり、浸潤子宮頸がんケースの約５０％で検出されている。

現在、米国では、ＨＰＶ１６及びＨＰＶ１８の外膜タンパク質に対する中和抗体を誘導することにより持続的ＨＰＶ感染及び関連疾患を防止する予防用ＨＰＶワクチンが市販されている。しかし、これらのワクチンが、既に罹

患しているＨＰＶ１６及びＨＰＶ１８による生殖器病変への有効であるとの報告はない。ＨＰＶの感染により、今後２０年間で５００万人の子宮頸がん患者が死亡するものと推定されており、治療用ワクチンの必要性は未だに高い。

[0005] マンノース被覆リポソームは、ＩＬ－１２産生誘導能、細胞免疫誘導能、ＣＤ８＋ＣＴＬｓの誘導能があることが分かっている（特許文献２、特許文献３、非特許文献７及び非特許文献８）。このことは、このマンノース被覆リポソームが細胞性免疫アジュバントとして機能することを示しており、既に卵白アルブミンを抗原とする抗腫瘍活性が報告されている（特許文献３及び非特許文献９参照）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開ＷＯ２００９／１０２６９７号パンフレット

特許文献2：特開平７－１２６１８５号公報

特許文献3：国際公開ＷＯ２００６／１０４１９９号パンフレット

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ｈｏｒｉｇｕｃｈｉ，Ｙ．ら（２００２）Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，８，３８８５．

非特許文献2：Ｖａｉｏｓ Ｋａｒａｎｉｋａｓら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００３：１７１：４８９８－４９０４

非特許文献3：Ｄｕｄｌｅｙら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２９８：８５０－８５４（２００２）

非特許文献4：Ｄｕｌｅｙら，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．，２３：２３４６－２３５７（２００５）

非特許文献5：Ｚｕｒ，Ｈａｕｓｅｎ，Ｈら、Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｃａｎｃｅｒ，２：３４２－３５０（２００２）

非特許文献6：Ｒｏｄｅｎ，ＲＢら、Ｈｕｍ．Ｐａｔｈｏｌ．，３５：９７１－９８２（２００４）

非特許文献7：Ｆｕｋｕｓａｗａら、ＦＥＢＳ　Ｌｅｔｔｅｒｓ、Ｖｏｌ．４４１、ｐｐ．３５３－３５６（１９９８）

非特許文献8：Ｔａｋａｇｉら、Ｃｙｔｏｋｉｎｅ、Ｖｏｌ．４０、ｐｐ．２４１－２５０（２００７）

非特許文献9：小島ら、Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ　Ｒｅｌｅａｓｅ、Ｖｏｌ．１２９、ｐｐ．２６－３２（２００８）

発明の概要

[0008] 本発明者らは、ＣＴＬ測定方法において、マンノースで被覆したリポソームに抗原性物質を封入して抗原提示細胞を刺激することにより、従来問題となっていた抗原提示時間、誘導効率の低さの問題を克服し、安定的かつ短時間で抗原特異的なＣＴＬを誘導することができることを見出した。本発明者らは、特に、マンノースで被覆したリポソームに抗原性物質を封入して抗原提示細胞を刺激することにより、安定的かつ短時間で抗原特異的なＣＴＬを誘導することができることを見出した。本発明の方法によれば、二週間未満という短い時間で、かつ、非常に高いレベル（従来法の１０倍以上のレベル）でＣＴＬを誘導、検出することができる。すなわち、本発明によれば、ＣＴＬ測定系における抗原暴露をマンノースで被覆したリポソームに抗原性物質を封入し添加することにより、例えば、７から１０日間で従来法の１０倍以上という驚くべき数のＣＴＬを誘導、検出することができる。

また、本発明者らは、上述のような生体外における抗原特異的なＣＴＬ誘導方法を利用することにより、生体外で抗原特異的ＣＴＬを効率的に調製することができることを見出し、本発明を完成させた。

また、本発明者らは、ＨＰＶ１６のＥ６Ｅ７Ｅ８融合遺伝子を封入したマンノース被覆リポソームを用いることにより、ＨＰＶ１６に特異的なＣＴＬｓを誘導することができることを見出した。更に、本発明者らは、リンパ球から誘導したＣＴＬｓがＨＰＶ１６のＥ６又はＥ７由来のアミノ酸配列をコードするペプチドでパルスしたＴ２－Ａ２４０２細胞により活性化することから、ＨＰＶ１６のＥ６又はＥ７由来のアミノ酸配列をコードするペプチド

を抗原として認識することを見出した。

[0009] 本発明は、哺乳動物由来のリンパ球の抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能を測定する方法、すなわち、ｅｘ ｖｉｖｏにおいて、リンパ球をマンノース被覆リポソームに封入した抗原で刺激し、当該抗原特異的ＣＴＬｓを増殖させ、生じたＣＴＬｓの有無又は数を測定することにより、当該リンパ球の前記抗原に対するＣＴＬｓ誘導能を測定する方法に関する。また、本発明は、抗原特異的ＣＴＬｓを誘導可能な抗原を比較的短時間でスクリーニングする方法を提供する。具体的には、本発明は、リンパ球をマンノース被覆リポソームで封入した抗原で刺激し、当該抗原特異的ＣＴＬｓを誘導し、得られた抗原特異的ＣＴＬｓの有無又は数を測定することにより当該リンパ球の前記抗原に対するＣＴＬｓ誘導能を測定し、ＣＴＬｓの誘導能が高い抗原を選択することを備えるスクリーニング方法に関する。更に、本発明は、細胞性免疫のシステムを利用したがんや感染症などの予防及び治療方法において使用するための抗原特異的なＴ細胞の調製方法を提供する。より具体的には、本発明は、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて、比較的短時間で安定的に所望の抗原に特異的なＣＴＬｓを誘導することができることに基づき、ｅｘ ｖｉｖｏにおいて、ＰＢＭＣをマンノース被覆リポソームに封入した抗原で刺激することにより抗原特異的ＣＴＬｓを製造する方法に関する。

また、別の態様において、本発明は、ＨＰＶ１６感染に基づく疾患の予防又は治療に利用するための抗原性物質、具体的には、ＨＰＶ１６Ｅ６Ｅ７Ｅ８融合遺伝子、並びに、ＨＰＶ１６Ｅ６の８－１９番目、ＨＰＶ１６Ｅ６の４９－５７番目、ＨＰＶ１６Ｅ６の６６－７４番目、ＨＰＶ１６Ｅ６の８２－９０番目、ＨＰＶ１６Ｅ６の８７－９５番目、ＨＰＶ１６Ｅ６の９８－１０６番目、ＨＰＶ１６Ｅ７の１０－２０番目、ＨＰＶ１６Ｅ７の５１－６０番目、及び、ＨＰＶ１６Ｅ７の８３－９３番目のアミノ酸配列を有するペプチドを提供する。また、本発明は、ＨＰＶ１６感染に基づく疾患の予防又は治療に利用するためのＣＴＬｓを提供する。特に、本発明はＨＬＡ－Ａ２４遺伝子を有するＨＰＶ１６感染患者の予防又は治療に利用するための抗原性

物質又はＣＴＬsを提供するものである。ある態様において、本発明は前記抗原性物質又は前記ＣＴＬｓを有効成分として含有する、ＨＰＶ１６感染に基づく疾患の予防又は治療のための医療用組成物である。また、一の態様において、本発明は前記抗原性物質又は前記ＣＴＬｓを患者に投与することを含む、ＨＰＶ１６感染に基づく疾患の予防方法又は治療方法に関する。

[0010] より具体的には、本発明は、以下の（１）～（４１）に関する。

（１） ｅｘ ｖｉｖｏにおける、リンパ球の抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能の測定方法であって、

哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、

前記リンパ球と抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームとを接触させること、及び、

前記抗原に特異的なＣＴＬｓを検出することを備える方法。

（２） 更に、インターロイキン２の存在下で細胞を増殖させることを備える、（１）に記載の方法。

（３） マンノース被覆リポソームが、マンノトリオース被覆リポソームである、（１）又は（２）に記載の方法。

（４） 前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記リンパ球を接触させることが、５～３０日間行われることを特徴とする、（１）～（３）のいずれか１項に記載の方法。

（５） 哺乳動物由来のリンパ球が、ヒト末梢血由来リンパ球である、（１）～（４）のいずれか１項に記載の方法。

（６） 前記抗原性物質が、以下から選択される少なくとも１の物質である、（１）～（５）のいずれか１項に記載の方法：

サバイビン２Ｂペプチド、

ヒトパピローマウイルスタイプ１６のＥ５、Ｅ６及びＥ７の融合遺伝子、

サイトメガロウイルス ｐｐ６５由来ペプチド、

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（

配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド、

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列をコードするＤＮＡを含む核酸。

（７）　ｅｘ　ｖｉｖｏにおける、抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能が高い抗原性物質のスクリーニング方法であって、

哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、

前記リンパ球と被験物質を封入したマンノース被覆リポソームとを接触させること、

前記被験物質又は抗原に特異的なＣＴＬｓを検出すること、及び、

検出された抗原特異的ＣＴＬｓが多い被験物質を、前記哺乳動物に対して抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能が高い抗原性物質として選択することを備える方法。

（８）　更に、前記被験物質又は抗原に特異的なＣＴＬｓを検出する前に、インターロイキン２の存在下で細胞を増殖させることを備える、（７）に記載の方法。

（９）　マンノース被覆リポソームが、マンノトリオース被覆リポソームである、（７）又は（８）に記載の方法。

（１０）　前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記リンパ球を接触させることが、５～３０日間行われることを特徴とする、（７）～（９）のいずれか１項に記載の方法。

（１１）　哺乳動物由来のリンパ球が、ヒト末梢血由来リンパ球である、（

７）～（１０）のいずれか１項に記載の方法。

（１２）　ｅｘ　ｖｉｖｏにおける抗原特異的ＣＴＬｓの製造方法であって、

哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、及び、

前記リンパ球に抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームと接触させることを備える方法。

（１３）　更に、インターロイキン２の存在下で細胞を増殖させることを備える、（１２）に記載の方法。

（１４）　マンノース被覆リポソームが、マンノトリオース被覆リポソームである、（１２）又は（１３）に記載の製造方法。

（１５）　前記リンパ球と前記抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームとの接触が、３～３０日間行われることを特徴とする、（１２）～（１４）のいずれか１項に記載の製造方法。

（１６）　哺乳動物由来のリンパ球が、ヒト末梢血由来リンパ球である、（１２）～（１５）のいずれか１項に記載の製造方法。

（１７）　前記抗原性物質が、以下から選択される少なくとも１の物質である、（１２）～（１６）のいずれか１項に記載の製造方法：

サバイビン２Ｂペプチド、

ヒトパピローマウイルスタイプ１６のＥ５、Ｅ６及びＥ７の融合遺伝子、

サイトメガロウイルス　ｐｐ６５由来ペプチド、

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド、

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（

配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列をコードするＤＮＡを含む核酸。

（１８）　（１２）～（１７）のいずれか１項に記載の方法により製造された抗原特異的ＣＴＬｓを含有する、感染性疾患又はがんの治療又は予防用医療用組成物。

リンパ球リンパ球リンパ球リンパ球リンパ球リンパ球リンパ球リンパ球リンパ球リンパ球リンパ球リンパ球（１９）　抗原特異的ＣＴＬｓを得る方法であって、抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームを対象に投与すること、及び、

投与された対象から前記抗原性物質に特異的なＣＴＬｓを採取することを備える方法。

（２０）　マンノース被覆リポソームが、マンノトリオース被覆リポソームである、（１９）に記載の方法。

（２１）　前記抗原性物質が、以下から選択される少なくとも１の物質である、（１９）又は（２０）に記載の方法：

サバイビン２Ｂペプチド、

ヒトパピローマウイルスタイプ１６のＥ５、Ｅ６及びＥ７の融合遺伝子、

サイトメガロウイルス　ｐｐ６５由来ペプチド、

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド、

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（

配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列をコードするＤＮＡを含む核酸。

（２２）　（１９）～（２１）のいずれか１項に記載の方法により製造された抗原特異的ＣＴＬｓを含有する、感染性疾患又はがんの治療又は予防用医療用組成物。

（２３）　感染性疾患又はがんの治療又は予防方法であって、

抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームを調製すること、及び

抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームを対象に投与することを備える方法。

（２４）　マンノース被覆リポソームが、マンノトリオース被覆リポソームである、（２３）に記載の方法。

（２５）　前記抗原性物質が、以下から選択される少なくとも１の物質である、（２３）又は（２４）に記載の方法：

サバイビン２Ｂペプチド、

ヒトパピローマウイルスタイプ１６のＥ５、Ｅ６及びＥ７の融合遺伝子、

サイトメガロウイルス　ｐｐ６５由来ペプチド、

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド、

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩ

ＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列をコードするＤＮＡを含む核酸。（２６）

感染性疾患又はがんの治療又は予防方法であって、

（ｉ）以下の（ａ）～（ｄ）のステップを備える、ｅｘ　ｖｉｖｏにおける抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能が高い抗原性物質を選択する工程：

（ａ）哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、

（ｂ）前記リンパ球と被験物質を封入したマンノース被覆リポソームとを接触させること、

（ｃ）前記被験物質又は抗原に特異的なＣＴＬｓを検出すること、及び、

（ｄ）検出された抗原特異的ＣＴＬｓが多い被験物質を、前記哺乳動物に対して抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能が高い抗原性物質として選択すること、並びに、

（ｉｉ）前記（ｉ）において選択された抗原性物質を対象に投与することを備える方法。

（２７）　感染性疾患又はがんの治療又は予防方法であって、

（ｉ）以下のステップを備えるｅｘ　ｖｉｖｏにおける、抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能が高い抗原性物質を選択する工程：

（ａ）哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、

（ｂ）前記リンパ球と被験物質を封入したマンノース被覆リポソームとを接触させること、

（ｃ）前記被験物質又は抗原に特異的なＣＴＬｓを検出すること、及び、

（ｄ）検出された抗原特異的ＣＴＬｓが多い被験物質を、前記哺乳動物に対して抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能が高い抗原性物質として選択すること、

（ｉｉ）前記（ｉ）において選択された抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームを調製すること、並びに、

（ｉｉｉ）前記（ｉｉ）において調製した抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームを対象に投与することを備える方法。

（２８）　感染性疾患又はがんの治療又は予防方法であって、

（ｉ）以下の（ａ）～（ｄ）のステップを備える、ｅｘ　ｖｉｖｏにおける抗原特異的ＣＴＬｓ得る工程：

（ａ）哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、

（ｂ）前記リンパ球と抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームとを接触させること、及び、

（ｃ）前記抗原に特異的なＣＴＬｓを選択すること、及び、

（ｉｉ）前記（ｉ）において選択された抗原特異的ＣＴＬｓを対象に投与することを備える方法。

（２９）　感染性疾患又はがんの治療又は予防方法であって、

（ｉ）以下の（ａ）～（ｄ）のステップを備える、ｅｘ　ｖｉｖｏにおける抗原特異的ＣＴＬｓ得る工程：

（ａ）哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、

（ｂ）前記リンパ球と抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームとを接触させること、及び、

（ｃ）前記抗原に特異的なＣＴＬｓを選択すること、及び、

（ｉｉ）前記（ｉ）において選択された抗原特異的ＣＴＬｓを、当該抗原特異的ＣＴＬｓの調製において用いたリンパ球を提供した哺乳動物自身に投与することを備える方法。

（３０）　ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）、又は、ＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド。

（３１）　ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、

ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）、又は、ＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列をコードするＤＮＡを含む核酸。

（３２）　ＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子を含む核酸。

（３３）　ＨＬＡ－Ａ２４によって提示される、ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）、又は、ＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を有する抗原の少なくとも１つを認識するＣＴＬｓ。

（３４）　ヒトパピローマウイルスタイプ１６に感染した患者由来である、（３３）に記載のＣＴＬｓ。

（３５）　（２８）に記載のペプチド、又は、（２９）若しくは（３０）に記載の核酸を抗原性物質として含有し、あるいは、（３３）若しくは（３４）に記載のＣＴＬｓを有効成分として含有する、ヒトパピローマウイルスタイプ１６の感染に基づく疾患の治療又は予防のための医療用組成物。

（３６）　前記抗原性物質がマンノース被覆リポソームに封入されていることを特徴とする、（３５）に記載の医療用組成物。

（３７）　対象がＨＬＡ－Ａ２４遺伝子を有することを特徴とする、（３５）又は（３６）に記載の医療用組成物。

（３８）　ワクチンである、（３５）～（３７）のいずれか１項に記載の医療用組成物。

（３９）　感染性疾患又はがんの治療又は予防方法であって、（２８）に記載のペプチド、（２９）若しくは（３０）に記載の核酸、又は、（３３）若しくは（３４）に記載の脂肪傷害性Ｔ細胞を対象に投与することを備える方法。

（４０）　前記抗原性物質がマンノース被覆リポソームに封入されていることを特徴とする、（３５）に記載の方法。

（４１） 対象がＨＬＡ－Ａ２４遺伝子を有することを特徴とする、（３９）又は（４０）に記載の方法。

[0011] 本明細書において、「細胞傷害性Ｔ細胞」又は「ＣＴＬｓ」とは、Ｔリンパ球細胞のうち、感染細胞等の破壊を行う細胞のことであり、ＣＤ８＋Ｔ細胞、又はキラーＴ細胞と呼ばれることもある。本明細書において、ＣＴＬｓは、好ましくは標的とする抗原に特異的に活性化され又は標的とする抗原を提示する細胞に特異的にアポトーシスを引き起こすＴ細胞（抗原特異的ＣＴＬｓ）である。抗原特異的ＣＴＬｓとしては、例えば、サバイビン２Ｂペプチド、ヒトパピローマウイルスタイプ１６由来ペプチド（ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド）、又はサイトメガロウイルス ｐｐ６５ペプチドを抗原として特異的に認識するＣＴＬｓを挙げることができる。

[0012] 本明細書において、「哺乳動物由来のリンパ球」とは、哺乳動物から採取したリンパ球であれば特に限定されなず、PBMC（末梢血リンパ球）、腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)、所属リンパ節リンパ球、胸腹水中のリンパ球を含む。好ましくは、イヌ、ネコ、ウサギ、リス、ハムスター等の愛玩動物、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ等の経済動物、又は、ヒトから採取したリンパ球であり、より好ましくは、ヒトから採取したリンパ球である。また、リンパ球を採取するための血液はどこから採取したものでもよく、好ましくは末梢血から採取した末梢血リンパ球である。本明細書における、哺乳動物由来のリンパ球は、リンパ球を包含する限り精製の程度が限定されるものではなく、リンパ球として分離精製された状態であってもよいし、例えば血液等の他の血液成分や夾雑物を含む状態であってもよい。本発明の哺乳動物由来のリンパ球は、少なくとも、リンパ系幹細胞又はナイーブＴ細胞等のＴ細胞又はそ

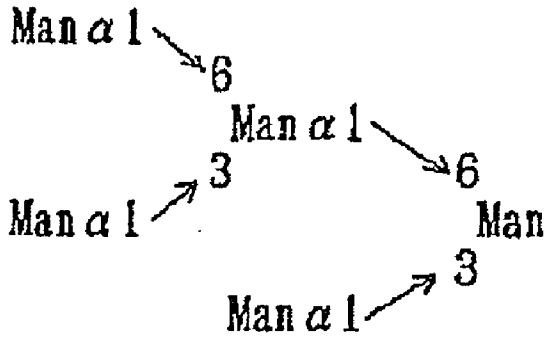
の前駆体、並びに、マクロファージ又は樹状細胞等の抗原提示細胞を含む。本発明の哺乳動物由来のリンパ球として、好ましくは、イヌ、ネコ、ウサギ、リス、ハムスター等の愛玩動物、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ヤギ等の経済動物、又は、ヒトの末梢血リンパ球であり、より好ましくはヒト末梢血リンパ球である。

[0013] 本明細書において、「抗原性物質」は、目的とする抗原に特異的なＣＴＬｓを誘導することができる物質であれば特に限定されず、例えば、微生物粉砕物、タンパク質、ペプチド、又は核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡ）であることができる。抗原性物質としては、例えば、ＣＴＬｓにより細胞死を誘導しようとする細胞において特異的に発現している物質若しくは発現が向上している物質、又は当該細胞に感染することにより存在する物質（好ましくは非自己の物質）、あるいはその一部を使用することができ、例えば、細菌、真菌等の微生物、ウイルス、がん細胞由来であってもよい。また、抗原性物質は、既に、予防用又は治療用ワクチンとして報告されている物質であってもよく、例えば、インフルエンザワクチン、ＨＩＶワクチン、コレラワクチン、Ｂ型肝炎ワクチン、破傷風ワクチン、狂犬病ワクチン、サバイビン２Ｂを含むがんワクチン等のワクチン、又はその一部若しくはその改変体であってもよい。本発明の方法において使用する抗原性物質は、１種類である必要はなく、２種類以上の別の抗原性物質を個別に含んでいてもよいし、２種類以上の抗原性物質の結合物であってもよい。抗原性物質としては、例えば、サバイビン２Ｂペプチド、ヒトパピローマウイルスタイプ１６由来ペプチド（ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド）、若しくはサイトメガロウイルス由来ペプチド（好ましくは、サイトメガロウイルス　ｐｐ６５　４９５－５０

３ペプチド（配列番号２６））（以下、総称して「本発明の抗原性ペプチド」という）、又はこれらのペプチドをコードするＤＮＡ、あるいは、ＨＰＶＥ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子を挙げることができる。特に、ヒトパピローマウイルスタイプ１６由来ペプチドのうち、ＨＬＡ－Ａ２４拘束性の抗原性物質として、好ましくは、ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチドである。

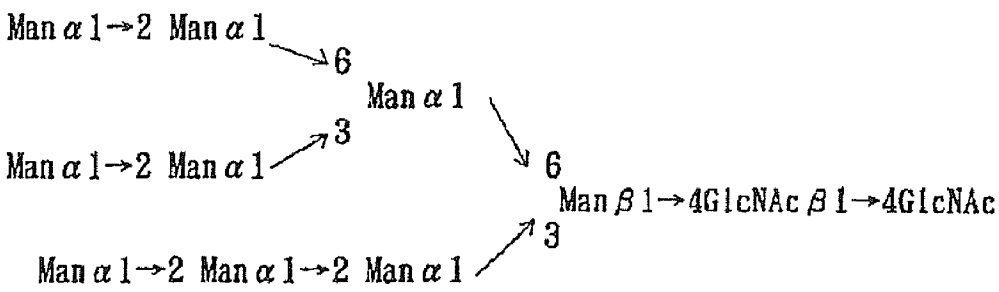
[0014] 本明細書において、「マンノース被覆リポソーム」とは、表面に少なくとも１つのマンノースが結合したリポソームのことである。マンノースは、例えば、Ｄ－マンノースであってもよい。表面に結合するマンノースの数は、好ましくは、２～１１個であり、例えば、マンノビオース、マンノトリオース、マンノテトラオース、マンノペンタオース、マンノヘキサオース、又は、マンノペンタオースである。また、２糖以上のマンノースは、α１→２結合、α１→３結合、α１→４結合、α１→６結合、β１→４結合により結合することができる。例えば、マンノペンタオース、マンノヘンデカオースは、以下の構造を取ることができる。

[0015] [化1]



[0016]

[化2]



（式中、α1→2結合しているManは、それぞれ独立に、存在してもよく存在しなくてもよい。）

[0017] マンノース被覆リポソームは、様々な粒形のマンノース被覆リポソームの混合物であってもよいが、好ましくは所望の平均粒径又は粒度分布を示すリポソームであり、例えば、平均粒径が１００～１０００ｎｍ、１５０～７００ｎｍ、２００～６００ｎｍ、４５０～５５０ｎｍの範囲にあるリポソームである。また、本発明のマンノース被覆リポソームは、粒度分布指数（Ｐｏｌｙｄｉｓｐｅｒｓｉｔｙ ｉｎｄｅｘ：ＰＤＩ）が、０．３以下であってもよい。

本発明のマンノース被覆リポソームとして、好ましくは、マンノビオース被覆リポソーム、マンノトリオース被覆リポソーム、マンノテトラオース被覆リポソーム、マンノペンタオース被覆リポソーム、マンノヘキサオース被覆リポソーム、又は、マンノペンタオース被覆リポソームであり、より好ましくは、マンノトリオース被覆リポソームである。

[0018] 本明細書において、「リポソーム」とは、内部に水性媒体を包含する脂質二重膜で形成された小胞体を意味し、脂質二重膜は単層であっても多層であってもよい。リポソームを構成する脂質は、親水基及び疎水基を備え、小胞体を構成することが可能な脂質であれば特に限定されないが、例えば、コレステロール（Ｃｈｏｌ）、３β－［Ｎ－（ジメチルアミノエタン）カルバモイル］コレステロール（ＤＣ－Ｃｈｏｌ）、Ｎ－（トリメチルアンモニオエチル）カルバモイルコレステロール（ＴＣ－Ｃｈｏｌ）等のステロール類；

ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン（ＤＰＰＥ）、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン（ＤＳＰＥ）等のフォスファチジルエタノールアミン類；ジパルミトイルフォスファチジルコリン（ＤＰＰＣ）、ジステアロイルホスファチジルコリン（ＤＳＰＣ）等のホスファチジルコリン類；ジパルミトイルホスファチジルセリン（ＤＰＰＳ）、ジステアロイルホスファチジルセリン（ＤＳＰＳ）等のホスファチジルセリン類；ジパルミトイルホスファチジン酸（ＤＰＰＡ）、ジステアロイルホスファチジン酸（ＤＳＰＡ）等のホスファチジン酸類等又は２以上のこれらの脂質の組み合わせを挙げることができる。

[0019] 本明細書において、「医療用組成物」とは、対象に投与することにより、対象の疾病の治療又は予防の効果を奏する組成物をいう。ここで、治療又は予防の効果を奏するとは、完全な治療又は予防効果のみならず、当該疾患の重症度を軽減し又は罹患可能性を低減させる効果をも含む。一の態様において、医療用組成物は、ワクチンであり、より好ましくは、がん又は感染性疾患の治療用又は予防用ワクチンである。ワクチンは、添加物として、エデト酸ナトリウム、ポリミキシンＢ、ネオマイシン又はチメロサール等の保存剤、アルミニウム塩又は軽質流動パラフィン等のアジュバント、ソルビタンモノオレエート等の乳化剤、及び、ポリソルベート８０等の界面活性剤、ホルムアルデヒド等の不活化剤を含有していてもよい。また、別の態様において、医療用組成物は、抗原特異的ＣＴＬｓを有効成分として含有する細胞組成物であり、より好ましくは、がん又は感染性疾患の治療用又は予防用として対象の体内に投与するための細胞組成物である。前記細胞組成物が含有する抗原特異的ＣＴＬｓとしては、例えば、サバイビン２Ｂペプチド、ヒトパピローマウイルスタイプ１６由来ペプチド（好ましくは、ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番

号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド）、又は、サイトメガロウイルス由来ペプチド（好ましくは、サイトメガロウイルス　ｐｐ６５　４９５－５０３ペプチド（配列番号２６））を認識するＣＴＬｓ（好ましくは、前記ペプチドを特異的に認識するＣＴＬｓ）を挙げることができる。また、抗原特異的ＣＴＬｓは、哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、及び、前記リンパ球に抗原性物質（例えば、ＨＰＶＥ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子）を封入したマンノース被覆リポソームと接触させることを備える方法により調製したＣＴＬｓを含む。

[0020] 上記において、治療又は予防しようとするがんの種類は特に限定されず、例えば、肺がん、頭頸部がん、食道がん、肝臓がん、膵臓がん、子宮頚がん、胆道がん、乳がん、口腔がん、悪性黒色腫、悪性リンパ腫、大腸がん等の悪性腫瘍を挙げることができる。このようながんの一例として、感染により引き起こされるがんを挙げることができる。例えば、ＥＢウイルス由来の抗原性物質を使用する場合、対象となるがんとして、バーキットリンパ腫、上咽頭がん、胃がんを挙げることができ；Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス由来の抗原性物質を使用する場合、対象となるがんとして肝がんを挙げることができ；ヒトパピローマウイルス由来の抗原性物質を使用する場合、対象となるがんとして子宮頸がんを挙げることができ；ヒトＴ細胞白血病ウイルス（ＨＴＬＶ）由来の抗原性物質を使用する場合、対象となるがんとしてヒト成人Ｔ細胞性白血病、ヘアリー細胞白血病を挙げることができる。また、治療又は予防しようとする感染性疾患は、細菌、真菌、ウイルス等の感染に基づく疾患であれば限定されない。

発明の効果

[0021] 本発明のマンノース被覆リポソーム封入抗原を利用したｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるＣＴＬｓ誘導方法は、短時間かつ／又は少ない抗原量で効率的にＣＴＬｓを誘導することができる。そのため、対象のＰＢＭＣｓの候補抗原に対するＣＴＬｓ誘導能を短時間でを測定することができ、対象の当該抗原を用いた治療又は予防の有効性を早期に検出することができる。よって、本発

明の方法は、短時間で安定にＣＴＬｓを誘導することができることから、例えば、候補ペプチド抗原の患者におけるＣＴＬｓに基づく奏効性を早期に判断することができ、ペプチドワクチンによる治療開始判断を早めることができる。また、候補抗原が複数ある場合、本発明のマンノース被覆リポソーム封入抗原を利用したスクリーニング方法を行うことにより、対象のＰＢＭＣｓの各候補抗原に対するＣＴＬｓ誘導能を短時間で測定することができ、当該対象に対して最も効果の高い抗原を早期に選択することできる。更に、本発明のマンノース被覆リポソーム封入抗原を利用したｉｎ　ｖｉｔｒｏにおけるＣＴＬｓ調製方法を用いることにより、ＣＴＬ移入細胞治療（養子免疫療法）において使用する抗原特異的なＣＴＬｓを短時間で調整することができ、治療時間を短縮させることができる。

また、本発明のマンノース被覆リポソーム封入ＨＰＶＥ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子抗原は効率よくＨＰＶ１６を特異的に認識するＣＴＬｓを誘導することができる。更に、本発明のＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチドは、ＨＬＡ－Ａ２４遺伝子を有しＨＰＶ１６感染に基づく疾患の患者において高い免疫原性を示す。

図面の簡単な説明

[0022] [図1]マンノース被覆リポソームに封入したサバイビン２Ｂで刺激したヒト末梢血リンパ球の特性をテトラマー法によりＦＡＣＳ解析した結果を示す図である。図中、上段の３つの図において、横軸はＨＩＶへの特異性を、縦軸はサバイビン２Ｂへの特異性を表す。また、図中、下段の３つの図において、横軸はＣＤ８の発現の程度を、縦軸はサバイビン２Ｂへの特異性を表す。

[図2]ｐＣＡＧＧＳ－Ｅ５Ｅ６Ｅ７を形質導入した２９３Ｔ細胞によるＥ５Ｅ

６Ｅ７タンパク質の発現をウエスタンブロットにより検出した結果を示す図である。図中、「ＦＬＡＧ　Ｅ５Ｅ６Ｅ７」は、ｐＣＡＧＧＳ－Ｅ５Ｅ６Ｅ７を形質導入した２９３Ｔ細胞を示し、「Ｍｏｃｋ」は、ネガティブコントロールである２９３Ｔ細胞を示す。また、図中の矢印は、ＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７タンパク質を示す。

[図3]ＰＢＭＣｓにおける、Ｅ５Ｅ６Ｅ７タンパク質の発現をウエスタンブロットにより検出した結果を示す図である。図中、「ＰＢＭＣ　ａｌｏｎｅ」は、形質導入していないＰＢＭＣｓを示し、「ＰＢＭＣ＋ＯＭＬ－ＨＰＶ」は、ＯＭＬ－ＨＰＶで形質導入したＰＢＭＣｓを示し、「２９３Ｔ／Ｅ５Ｅ６Ｅ７」は、ｐＣＡＧＧＳ－Ｅ５Ｅ６Ｅ７を形質導入した２９３Ｔ細胞を示す。「ＰＢＭＣ＋ＯＭＬ－ＨＰＶ」における数値は、使用したＯＭＬ－ＨＰＶの量（μｇ／ｍＬ）を示す。また、図中の矢印は、ＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７タンパク質を示す。「β－ａｃｔｉｎ」は、インターナルコントロールとして測定したベータアクチンの発現を示す。

[図4]ＨＬＡ－Ａ２４結合モチーフを有するＨＰＶ１６Ｅ６及びＥ７由来ペプチドのＨＬＡ－Ａ２４結合性試験の結果を示す図である。縦軸の「ｐｅｐｔｉｄｅ」は、使用したペプチドを示し、「ｐｅｐｔｉｄｅ（－）」はペプチドを添加していないコントロールを示す。

[図5]ＯＭＬ－ＨＰＶとリポフェクトアミン２０００とのＣＴＬ誘導能比較試験の結果を示す図である。図中、横軸はＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより得られたスポットの数を示す。縦軸の「Ｔ２Ａ２４　ａｌｏｎｅ」は、ＨＰＶ１６由来合成ペプチドを加えていないコントロールを示し、その他はＥＬＩＳＰＯＴアッセイにおいて添加した、ＨＰＶ１６由来合成ペプチドを示す。

[図6]ケース番号１、６、１６及び１８の患者由来のＰＢＭＣｓを用いたＣＴＬ誘導試験の結果を示す図である。図中、横軸はＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより得られたスポットの数を示す。縦軸の「Ｔ２Ａ２４　ａｌｏｎｅ」は、ＨＰＶ１６由来合成ペプチドを加えていないコントロールを示し、その他はＥＬＩＳＰＯＴアッセイにおいて添加した、ＨＰＶ１６由来合成ペプチドを

示す。

[図7]ＨＬＡ－Ａ２４陽性、ＨＰＶ１６陽性子宮頸がん患者由来ＰＢＭＣｓから誘導したペプチド特異的ＣＴＬｓの細胞傷害活性試験の結果を示す図である。図中、丸印はＨＰＶ１６Ｅ７　８３－９３でパルスしたＴ２－Ａ２４細胞を、四角印は、ペプチドでパルスしていないＴ２－Ａ２４細胞を、三角印は、ＨＩＶ－ｅｎｖでパルスしたＴ２－Ａ２４細胞を、ひし形印は、Ｋ５６２細胞を用いた結果を示す。また、縦軸は、（%細胞傷害性）を示す。横軸におけるＥ／Ｔは、エフェクター細胞と標的細胞の比率を示す。

[図8]ＣＭＶｐｐ６５エピトープペプチドによるＣＴＬｓ誘導能をテトラマー解析により測定した結果を示す図である。左図はＣＭＶｐｐ６５エピトープペチド抗原単独刺激の際の抗原特異的ＣＴＬの誘導結果を示し、右図はマンノース被覆リポソーム封入ＣＭＶｐｐ６５エピトープペチド抗原での刺激をした際のＣＭＶｐｐ６５を用いた抗原特異的ＣＴＬの誘導結果を示す。また、図中、縦軸は、ＣＤ８陽性の蛍光強度を示し、横軸はＣＭＶｐｐ６５・ＭＨＣテトラマー陽性の蛍光強度を示す。

発明を実施するための形態

[0023] 一の態様において、本発明は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおけるＰＢＭＣの抗原に対するＣＴＬｓ誘導能の測定方法であって：（ａ’）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ’）前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、及び、（ｃ’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓを検出することを備える方法に関する。ある態様において、本発明は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおけるＰＢＭＣの抗原に対するＣＴＬｓ誘導能の測定方法であって：（ａ’）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ’）前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、（ｃ’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓを検出すること、及び、（ｄ’）インターロイキン２（ＩＬ－２）の存在下で細胞を増殖させることを備える方法に関する。本方法において、（ａ’）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製するステップは、上述の本発明の製造方法に記載した方法に従うことにより行う

ことができる。また、本方法において、（ｂ’）前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させるステップは、抗原として、当該抗原刺激による被験ＰＢＭＣのＣＴＬｓ誘導能を測定しようとする所望の抗原を用いて、上述の本発明の製造方法に記載した方法に従うことにより行うことができる。

[0024] 本発明において使用する抗原に特異的なＣＴＬｓの検出は、抗原に特異的なＣＴＬｓを検出可能な方法であれば特に限定されず、例えば、クロミウムリリースアッセイ（ＣＴＬアッセイ）（Ｍａｔｓｕｅｄａ Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ，５３，４７９－４８９（２００４））又はテトラマー法（Ａｌｔｍａｎ Ｊ．Ｄ.ら，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２７４，９４－９６（１９９６）；Ｌｅｃｈｎｅｒ Ｆ．ら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．，１９１（９），１４９９－１５１２（２０００））を用いて行うことができる。例えば、テトラマー法を用いて検出する場合、分子量４４ｋＤの膜結合型タンパク質のα鎖、分子量１１ｋＤａのβ２ミオグロブリン（β２ｍ）、及び、８～１０アミノ酸からなる目的の抗原ペプチドの複合体であるヒト白血球抗原（ＨＬＡ）分子をビオチン修飾し、当該ＨＬＡをビオチンを介してラベル化されたストレプトアビジンに結合させた四量体（テトラマー）を使用する。ストレプトアビジンのラベルは、当業者周知のラベルを使用することができ、例えば、その後のＦＡＣＳ解析に使用できる、フルオレセインイソシアネート（ＦＩＴＣ）、フィコエリスリン（ＰＥ）、ペリオジニン クロロフィル プロテイン（ＰｅｒＣＰ）、カルボシアニン（Ｃｙ３、Ｃｙ５、ＰＥ－Ｃｙ５）等の蛍光標識を使用することができる。テトラマーを細胞と反応させた後、細胞に結合したテトラマーの蛍光標識をＦＡＣＳ等を用いて検出することにより、目的の抗原に特異的なＣＴＬｓを確認することができる。ＣＴＬｓ誘導能の判定は、上記方法により測定された目的の抗原に特異的なＣＴＬｓ数が多い抗原を、ＣＴＬｓ誘導能が高い抗原として判定することにより行うことができる。または、ＣＴＬｓ誘導能の判定は、上記方法により目的の抗原に特異的なＣＴＬｓの存在が確認で

きた場合、当該抗原をＣＴＬｓ誘導能を有する抗原として判定することにより行うことができる。

[0025] すなわち、ある態様において、本発明は、ｅｘ ｖｉｖｏにおけるＰＢＭＣの抗原に対するＣＴＬｓ誘導能の測定方法であって、（ａ’）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ’）前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、（ｃ’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓ数を検出すること、及び、（ｄ’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓ数が多い抗原をＣＴＬｓ誘導能が高い抗原と判定することを備える方法に関する。あるいは、本発明は、ｅｘ ｖｉｖｏにおけるＰＢＭＣの抗原に対するＣＴＬｓ誘導能の測定方法であって：（ａ’）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ’）前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、（ｃ’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓ数を検出すること、及び、（ｄ’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓ数が少ない抗原をＣＴＬｓ誘導能が低い抗原と判定することを備える方法に関する。本発明のｅｘ ｖｉｖｏにおけるＰＢＭＣの抗原に対するＣＴＬｓ誘導能の測定方法は、前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させると同時に、又は、接触させた後にインターロイキン２（ＩＬ－２）の存在下で細胞を増殖させることを含んでいてもよい。

[0026] 本発明のｅｘ ｖｉｖｏにおけるＰＢＭＣの抗原に対するＣＴＬｓ誘導能の測定方法は、必要に応じて、更に、ＣＴＬｓの機能解析を備えていてもよい。測定するＣＴＬｓの機能は、測定の目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ＥＬＩＳＰＯＴ法等を利用したインターフェロンγ（ＩＦＮγ）産生能解析を挙げることができる。

[0027] 本発明のｅｘ ｖｉｖｏにおけるＰＢＭＣの抗原に対するＣＴＬｓ誘導能の測定方法は、ＣＴＬｓ誘導機能の診断方法として利用することもできる。即ち、本発明は、ｅｘ ｖｉｖｏで行われることを特徴とするＣＴＬｓ誘導機能不全の診断方法であって、（ａ’）被験者由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ’）前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣ

を接触させること、（ｃ’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓを検出すること、及び、（ｄ’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓが検出されない場合又は検出数が少ない場合、当該被験者がＣＴＬｓ誘導機能不全の状態であると判定することを備える方法に関する。本診断方法において用いる場合、抗原としては、比較的幅広い対象においてＣＴＬｓの誘導が認められている抗原を使用し、及び／又は、複数種類の抗原を用いることが好ましい。

[0028] 別の態様において、本発明は、ｅｘ ｖｉｖｏにおける、抗原性物質の抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能の測定方法であって、（ａ’’）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ’’）前記抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、（ｃ’’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓを検出すること、及び、（ｄ’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓが検出された抗原をＣＴＬｓ誘導能を有する抗原と判定することを備える方法に関する。あるいは、本発明は、ｅｘ ｖｉｖｏにおける、抗原性物質の抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能の測定方法であって：（ａ’’）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ’’）前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、（ｃ’’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓを検出すること、及び、（ｄ’’）前記抗原に特異的なＣＴＬｓ数が検出されない抗原をＣＴＬｓ誘導能が低い若しくはＣＴＬｓ誘導能を有しない抗原と判定することを備える方法に関する。本発明のｅｘ ｖｉｖｏにおける、抗原性物質の抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能の測定方法は、前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させると同時に、又は、接触させた後にインターロイキン２（ＩＬ－２）の存在下で細胞を増殖させることを含んでいてもよい。

[0029] 更に別の態様において、本発明は、ｅｘ ｖｉｖｏにおける、ＣＴＬｓ誘導能が高いワクチン抗原のスクリーニング方法であって、（ａ）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ）被験物質を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、（ｃ）前記被験物質に特異的なＣＴＬｓを検出すること、及び、（ｄ）検出されたＣＴＬｓが多い被験物質

を前記哺乳動物に対してＣＴＬｓ誘導能が高いワクチン抗原として選択することを備える方法に関する。本方法において、（ａ）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製するステップは、上述の本発明の製造方法に記載した方法に従うことにより行うことができる。また、本方法において、（ｂ）前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させるステップは、抗原として、スクリーニングの対象となるワクチン抗原、即ち、当該抗原刺激による被験ＰＢＭＣのＣＴＬｓ誘導能を測定しようとする１種類以上の所望のワクチン抗原を用いて、上述の本発明の製造方法に記載した方法に従うことにより行うことができる。更に、（ｃ）前記被験物質に特異的なＣＴＬｓを検出するステップは、上述の本発明の測定方法に記載した方法に従うことにより行うことができる。本発明のスクリーニング方法においては、検出されたＣＴＬｓが多い被験物質を前記哺乳動物に対してＣＴＬｓ誘導能が高いワクチン抗原として判定することができ、特には、検出された当該抗原に特異的なＣＴＬｓが多い被験物質を前記哺乳動物に対してＣＴＬｓ誘導能が高いワクチン抗原として判定することができる。本発明のｅｘ　ｖｉｖｏにおける、ＣＴＬｓ誘導能が高いワクチン抗原のスクリーニング方法は、前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させると同時に、又は、接触させた後にインターロイキン２（ＩＬ－２）の存在下で細胞を増殖させることを含んでいてもよい。

[0030] または、本発明のスクリーニング方法においては、検出されたＣＴＬｓが存在する被験物質を前記哺乳動物に対してＣＴＬｓ誘導能を有するワクチン抗原として判定することができる。即ち、本発明は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおける、ＣＴＬｓ誘導能を有するワクチン抗原のスクリーニング方法であって、（ａ’’）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ’’）被験物質を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、（ｃ’’）前記被験物質に特異的なＣＴＬｓを検出すること、及び、（ｄ’’）ＣＴＬｓが検出された被験物質を前記哺乳動物に対してＣＴＬｓ誘導能を有するワクチン抗原として選択することを備える方法に関する。

[0031] 上記の測定方法、診断方法、スクリーニング方法における判定は、例えば、既に免疫学的に効果があることが報告されている例を参照し、又は、一般的な被験者又は被験動物について誘導されるＣＴＬｓ数から閾値レベルを設定し、被験者由来のＰＢＭＣから誘導されたＣＴＬｓの数を、閾値レベルと比較することにより行ってもよい。判定における統計学的有意性は、２以上の集団を比較し、信頼区間及び／又はｐ値を決定することにより決定される（Ｄｏｗｄｙ ａｎｄ Ｗｅａｒｄｅｎ，Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ ｆｏｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｅｌｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮｅｗＹｏｒｄ，１９８３）。本発明の信頼区間は、例えば、９０％、９５％、９８％、９９％、９９．５％、９９．９％又は９９．９９％であってもよい。また、本発明のｐ値は、例えば、０．１、０．０５、０．０２５、０．０２、０．０１、０．００５、０．００１、０．０００５、０．０００２又は０．０００１であってもよい。

[0032] 一の態様において、本発明はｅｘ ｖｉｖｏにおけるＣＴＬｓの製造方法であって、（ａ）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、及び、（ｂ）抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させることを備える方法に関する。ある態様において、本発明は、ｅｘ ｖｉｖｏにおけるＣＴＬｓの製造方法であって、（ａ）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ）抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、及び、（ｃ）インターロイキン２（ＩＬ－２）の存在下で細胞を増殖させることを備える方法であってもよい。更なる態様において、本発明は、ｅｘ ｖｉｖｏにおけるＣＴＬｓの製造方法であって、（ａ）哺乳動物由来のＰＢＭＣを調製すること、（ｂ）抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣを接触させること、（ｃ）インターロイキン２（ＩＬ－２）の存在下で細胞を増殖させること、及び、（ｄ）抗原に特異的なＣＴＬｓを選択することを備える方法であってもよい。

哺乳動物由来のＰＢＭＣは、ＰＢＭＣを採取する方法として当業者周知の方法を用いることにより調製することができる。例えば、哺乳動物から採取

した血液として又は当該血液からＰＢＭＣ成分を分離することにより調製してもよいし、あるいは、ＰＢＭＣ分離採取によりＰＢＭＣのみを直接哺乳動物から採取してもよい。また、ＰＢＭＣは、凍結保存されたものを適宜解凍・培養して使用してもよく、又は、前記方法により調製されたＰＢＭＣを更に培養により増殖させて使用してもよい。ＰＢＭＣは、例えば、５％CO_2、３７℃の条件下で、ＩＬ－２及び１０％ＦＣＳ含有ＲＰＭＩ１６４０培地、又は、ＡＩＭ（インビトロゲン社）等の無血清培地（適宜１０％ヒト血清及びＩＬ－２等のサイトカインを添加してもよい）を用いて培養することができる。また、更に、抗ＣＤ３モノクローナル抗体を培地に添加することにより拡大培養を行うこともできる。

[0033] また、本発明の方法において用いる「抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソーム」は、上述のリポソームを構成する脂質を原料として、抗原封入リポソームの製造方法として公知の方法、例えば、国際公開公報ＷＯ９５／１１７０４、ＷＯ２００５／０８７１９６、ＷＯ２００６／１０４１９９、ＷＯ２００７／１２２７５６、又は、日本国特許出願公開公報第２００１－０８１０４４号に記載の方法、を用いることにより製造することができる。具体的には、リポソームは、リン脂質等の脂質に物理的あるいは化学的処理、例えば、Ｂａｎｇｈａｍ法（薄膜法ともいう）、逆相蒸発法、超音波法、エクストルージョン法、フレンチプレス法、ホモジナイゼーション法、エタノール注入法、脱水－再水和法等を施すことにより調製することができる。

[0034] マンノースのリポソームへの結合は、マンノースと脂質の結合物（例えば、マンノペンタオースとＤＰＰＥとの結合物、又は、マンノトリオースとＤＰＰＥの結合物）を予め調製し、当該結合物を用いて上述の方法に準じてリポソームを製造することにより得ることができる。又は、マンノースと脂質の結合物をリポソームと混合し、４℃～室温下、２４～１２０時間静置することにより、マンノースをリポソーム表面へ導入することができる。あるいは、リポソームをマンノースと直接結合させることによってマンノース結合リポソームを得ることもできる。

リポソームへの抗原の封入は、リポソームの製造において使用する水溶性溶媒中に抗原を溶解又は懸濁させ、又は、抗原含有水性溶媒中にリポソームを懸濁させたリポソーム懸濁液を繰り返し凍結融解させることにより実施してもよい。リポソームに封入する抗原の量は、リポソームを構成する脂質１ｍｇ当たり、通常１～１００μｇであり、より好ましくは、１０～５０μｇである。また、抗原を封入したマンノース被覆リポソームは、上記方法により製造された後、遠心分離等により、抗原が封入されたリポソームの濃度が高くなるよう調製してもよい。

[0035] 本発明の方法において、抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームとＰＢＭＣとの接触は、生体外において上記に従って調製したＰＢＭＣと抗原を封入したマンノース被覆リポソームとが接触可能な方法であれば、いかなる方法を用いてもよい。一般的には、フラスコ、シャーレ又はプレート（例えば、２４穴プレート）中にＰＢＭＣを含有する培地又は生理食塩水を加え、更に、培地又は生理食塩水中に懸濁された抗原を封入したマンノース被覆リポソームを添加することにより行われる。好ましくは、接触は、３７℃、５％CO_2の条件下で、３～３０日間（好ましくは、５～１５日間、より好ましくは、７～１３日間、更に好ましくは、８～１３日間、より更に好ましくは、９～１３日間）行われる。また、接触期間は、接触開始から一定期間後に、接触させているＰＢＭＣの一部を採取してＣＴＬｓの誘導を確認することにより決定してもよい。ＣＴＬｓの誘導の確認は、後述するＣＴＬｓを検出するステップに準じて行うことができる。

また、抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームと前記ＰＢＭＣとの接触中又は接触後に当該ＰＢＭＣをＩＬ－２の存在下で培養してもよく、その他、ＣＴＬｓの増殖に有効な方法を適宜組み合わせて使用することができる（Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎｓ、３６（１）、８５－１０４（２０）、（２００７））。

[0036] また、別の態様において、本発明は抗原性ペプチド、抗原性物質（抗原性ペプチド又はＨＰＶＥ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子）を封入したマンノース被覆リ

ポソーム、又は当該ペプチド若しくはリポソームを含有する医薬組成物に関する。本発明の医療用組成物が含有する抗原性ペプチドは、アミノ酸合成に用いられる当業者周知の方法を用いて製造することができ、例えば、Ｆｍｏｃ法またはＢｏｃ法等を用いて化学合成により作製できることができる。例えば、サバイビン２Ｂ８０－８８ペプチドのＣ末端のアミノ酸をポリスチレン担体に固定化し、９－フルオレニルメチルオキシカルボニル基（Ｆｍｏｃ基）またはｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基（Ｂｏｃ基）で保護されたアミノ酸を、ジイソプロピルカルボジイミド（ＤＩＣ）等の縮合剤を用いて反応させることにより結合させ、洗浄、脱保護の工程を繰り返すことにより、所望のアミノ酸配列を有するペプチドを得ることができる。

また、本発明の抗原性ペプチドは、自動ペプチド合成機を用いて合成することもできる。このようなペプチド合成機としては、例えば、ＰＳＳＭ－８（島津製作所）；モデル４３３Ａペプチドシンセサイザ（アプライドバイオシステムズ社（Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ, Ｉｎｃ.））；ＡＣＴ３９６Ａｐｅｘ（アドバンストケムテック社（Ａｄｖａｎｃｅｄ ＣｈｅｍＴｅｃｈ Ｉｎｃ.））等が挙げられる。

[0037] 本発明の医療用組成物が含有する、抗原性物質（抗原性ペプチド又はＨＰＶＥ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子）を封入したマンノース被覆リポソームは、上述のｅｘ ｖｉｖｏにおけるＣＴＬｓの製造方法において用いる「抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソーム」の製造方法と同様にして製造することができる。

[0038] リポソームへの抗原性物質の封入は、リポソームの製造において使用する水溶性溶媒中に抗原を溶解又は懸濁させ、又は、抗原含有水性溶媒中にリポソームを懸濁させたリポソーム懸濁液を繰り返し凍結融解させることにより実施してもよい。リポソームに封入する抗原性物質の量は、リポソームを構成する脂質１ｍｇ当たり、通常１～１００μｇであり、より好ましくは、１０～５０μｇである。また、抗原を封入したマンノース被覆リポソームは、上記方法により製造された後、遠心分離等により、抗原が封入されたリポソ

ームの濃度が高くなるよう調製してもよい。

[0039] 本発明の医療用組成物を使用する予防方法又は治療方法における投与部位としては、経口投与、口腔内投与、鼻腔内投与、気道内投与、皮下投与、経皮投与、筋肉内投与、血管内（静脈内）投与等を挙げることができる。また、製剤としては、例えば、注射剤、カプセル剤、錠剤、シロップ剤、顆粒剤、貼布剤、軟膏、粉霧剤等を挙げることができる。本発明の抗体は、単独で投与しても良いし、薬理学的に許容される単体（「医薬品添加物事典」薬事日報社、「Ｈａｎｄｂｏｏｋ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ」ＡＰｈＡ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ社参照）と共に投与されてもよい。また、本発明の治療薬を注射剤として使用する場合、保存容器としては、アンプル、バイアル、プレフィルドシリンジ、ペン型注射器用カートリッジ、及び、点滴用バッグ等を挙げることができる。

[0040] 本発明の医療用組成物の投与方法は、所望の治療効果又は予防効果が得られる方法であれば特に限定はなく、好ましくは、皮下または筋肉内投与する。本発明の医療用組成物の投与方法としては、注射又は経口、経鼻、経皮投与等も各種非観血的投与方法を選択することができる。また、本発明の医療用組成物は、一時的に投与してもよいし、持続的又は断続的に投与してもよい。例えば、本発明の医療用組成物の投与頻度として、好ましくは、単回投与、１週間に１～４回投与であり、より好ましくは、単回または１週間に１回投与である。また、１か月～３か月毎に１回などの間歇的投与も選択できる。また、本発明のＣＴＬｓを有効成分として含有する医療用組成物は、感染症又は癌の治療又は予防のために行われる、Ｔ細胞を用いた免疫療法として一般に知られている方法に準じて投与することができる。

[0041] 本発明の医療用組成物の投与量は、所望の治療効果又は予防効果が得られる投与量であれば特に限定は無く、症状、性別、年齢等により適宜決定することができる。本発明の医療用組成物を用いたがんの治療方法又は予防方法（例えば、再発予防方法）における投与量は、例えば、がんの治療効果若しくは予防効果、又はがん転移の抑制、あるいは患者の血中の抗原に特異的な

細胞障害性Ｔ細胞の数を指標として決定することができる。本発明の治療薬又は予防薬の１回の抗原の投与量として０．０１ｎｇ／ｋｇ～１０ｍｇ／ｋｇであり、より好ましくは、０．１ｎｇ／ｋｇ～１ｍｇ／ｋｇであり、更に好ましくは、０．５ｎｇ～１００μｇ／ｋｇであり、最も好ましいのは、１ｎｇ～１０μｇ／ｋｇである。

[0042] 以下、本発明をより詳細に説明するため実施例を示すが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、本願全体を通して引用される全文献は参照によりそのまま本願に組み込まれる。

[0043] 実施例１．抗原（サバイビン２Ｂペプチド）封入マンノース被覆リポソームの調製

（１）マンノース被覆空リポソームの調製

マンノース被覆空リポソームは、常法に従って調製した。クロロホルム：メタノール＝２：１（ｖ／ｖ）に溶解したＤＰＰＣ、コレステロールおよびマンノトリオース結合ＤＰＰＥをモル比で１０：１０：１となるようにナシ型フラスコに加え、ロータリーエバポレータで減圧乾固して脂質フィルムを調製した。この脂質フィルムにリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）を添加し激しくボルテックスを行い白濁したマンノース被覆リポソーム懸濁液が得た。生じたリポソーム懸濁液はエクストルーダー（Ｎｏｒｔｈｅｒｎ Ｌｉｐｉｄｓ Ｉｎｃ．）を用い、チッソガスで加圧して孔径１μｍのポリカーボネート膜を２５℃で１０回通過させた。ポリカーボネート膜を通過したリポソーム懸濁液を再びエクストルーダーに投入し、加圧して押し出した。この操作を繰り返し、合計５回ポリカーボネート膜を通過させることでリポソームを整粒した。

[0044] （２）サバイビン２Ｂペプチドのマンノース被覆リポソームへの封入

上記（１）で作製した空リポソーム懸濁液をコレステロール量で１５ｍｇとなるよう２ｍＬのポリチューブに加え、４℃、１５０００ｒｐｍで１０分間遠心後、上清を除去した。沈殿したマンノース被覆リポソームに、生理食塩水に溶解した１ｍｇ／ｍＬのサバイビン２Ｂペプチド溶液を０．５ｍＬ添

加後、ピペッティングによりマンノース被覆リポソームを懸濁させた。調製した懸濁液を－８０℃のエタノールバス中で１０分間凍結させた後、２５℃のウオータバス中で融解させた。同様の凍結融解操作をさらに９回繰り返し、合計１０回の凍結融解を行った。凍結融解を行ったマンノース被覆リポソーム懸濁液を４℃、１５０００ｒｐｍで１０分間遠心して沈殿させ、上清を除去後、ＰＢＳに再懸濁させ、１５ｍＬポリチューブに移した後、最終容積が８ｍＬとなるようＰＢＳを加えた。調製したマンノース被覆リポソーム懸濁液を上記（１）に記載の方法に従い、孔径１μｍのポリカーボネート膜をセットしたエクストルーダーを用いて合計１０回のエクストルードを行った。エクストルードによって整粒したマンノース被覆リポソーム懸濁液は、終容量が１０ｍＬとなるようＰＢＳを加え、室温、３５００ｒｐｍで１０分間遠心後、上清を除去する操作を３回繰り返すことにより、マンノース被覆リポソーム懸濁液に含まれる未封入のサバイビン２Ｂペプチドを除去した。得られた沈殿物を終容量が５ｍＬとなるようＰＢＳで懸濁し、サバイビン２Ｂペプチド封入マンノース被覆リポソーム懸濁液を調製した。懸濁液の一部を分取してＰＢＳで希釈後、コレステロール定量を行った。コレステロール定量の結果に基づき、コレステロール濃度が４ｍｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳを添加し、４℃で保存した。

[0045] （３）マンノース被覆リポソーム封入サバイビンの定量

マンノース被覆リポソームへ封入されたサバイビン２Ｂペプチドの量は、以下の手順に従い測定した。

１．５ｍＬチューブに（２）で調製した１００μＬのマンノース被覆リポソーム懸濁液及び１００μＬのＳＤＳ溶液を加え、リポソームを溶解させた。ついで、２５℃、１５０００ｒｐｍで５分間遠心し、上清約１５０μＬを採取した。採取した上清を、ＨＰＬＣシステム（Ｓｅｐａｒａｔｉｏｎｓ Ｍｏｄｕｌｅ ２６９５－２４８９、Ｗａｔｅｒｓ社）、カラム（１８６００２６８４、ＳｕｎＦｉｒｅ、Ｃ１８ ５μｍ、４．６×２５０ｍｍ、Ｗａｔｅｒｓ社）、及び、ガードカラム（１８６００２６８４、ＳｕｎＦｉｒｅ

、Ｃ１８　５μｍ、４．６×２０ｍｍ、Ｗａｔｅｒｓ社）を使用し、移動相として水（０．１％ＴＦＡ（２０８－０２７４１、Ｗａｋｏ社））及びＡｃＣＮ（０．１％ＴＦＡ（２０８－０２７４１、Ｗａｋｏ社））を使用して、ＨＰＬＣにかけ、波長２１５ｎｍを検出することにより、サバイビン２Ｂペプチドの量を測定した。

[0046] （４）結果

ＨＰＬＣによって定量され、マンノース被覆リポソームを構成するコレステロール１ｍｇ当たりのサバイビン２Ｂペプチドの封入量は１２．５μｇであった。

[0047] 実施例２．末梢血ＰＢＭＣのＣＴＬｓ誘導能測定

（１）末梢血ＰＢＭＣの調製

末梢血ＰＢＭＣは札幌医科大学病院においてサバイビン２Bペプチドワクチンの接種を受けた癌患者末梢血からＬｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（登録商標）（Ｎｙｃｏｍｅｄ社、オスロ、ノルウェー）を用いて、常法の密度勾配遠心分離法により分離した。ＰＢＭＣはセルバンカー（三菱化学メディエンス社）に浮遊させて－８０℃に冷凍保存され、抗原刺激を加える直前に解凍された。

（２）末梢血ＰＢＭＣの抗原刺激

２４穴プレートに１０％ヒト血清含有ＡＩＭ　Ｖ培地で懸濁した末梢血ＰＢＭＣ（１×１０^{6}細胞／ｗｅｌｌ）培養液を１ｍＬ加え、抗原として、サバイビン２Ｂペプチド（４０μｇ／ｍＬ）、実施例１で作製したサバイビン２Ｂペプチド封入マンノース被覆リポソーム（１μｇ／ｍＬ）、又は、実施例１（１）で作製したマンノース被覆空リポソームを添加し、室温で３０分間培養した。その後、ＩＬ－２を５０Ｕ含む１０％ヒト血清含有ＡＩＭ　Ｖ培地を１ｍＬ添加し、５％CO_2、３７℃で培養した。抗原刺激から２日後、４日後、６日後に培地の半分をＩＬ－２を５０Ｕ含む１０％ヒト血清含有ＡＩＭ　Ｖ培地と交換した。抗原刺激から７日または９日後にサバイビン２Ｂ及びコントロールとしてＨＩＶ抗原についてテトラマー法（Ａｌｔｍａｎ　Ｊ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２７４，９４－９６（１９９６））

を用いてＦＡＣＳ解析することにより、抗原特異的ＣＴＬｓ誘導能を測定した。また、ＣＤ８に対する抗体を利用して、末梢血ＰＢＭＣ中のＣＤ８陽性Ｔ細胞をＦＡＣＳ解析により測定した。

[0048] （３）結果

結果を図１に示す。図に示すとおり、抗原刺激から９日後において、サバイビン２Ｂペプチドを単独で使用した場合、サバイビン２Ｂ特異的リンパ球の誘導率が０．３６％であることから、ほとんど誘導できなかったのに対し、マンノース被覆リポソームにサバイビン２Ｂを封入することにより、サバイビン２Ｂ特異的リンパ球が３．６２％誘導された。また、マンノース被覆空リポソームによる刺激は、抗原単独の刺激と同様ほとんどサバイビン２Ｂ特異的リンパ球を誘導しなかった。全ての種類の刺激について、ＨＩＶ抗原特異的リンパ球はほとんど確認されなかった。また、ＣＤ８陽性細胞の解析結果から、抗原単独及びマンノース被覆リポソーム封入抗原の両方でＣＴＬｓが誘導されていることが確認され、特に、マンノース被覆リポソーム封入抗原において、サバイビン２Ｂ特異的ＣＴＬｓが誘導されていることが確認された。

このことから、マンノース被覆リポソームに抗原ペプチドを封入することにより、ｅｘ　ｖｉｖｏにおける抗原刺激から９日で抗原特異的ＣＴＬｓの誘導能を測定することが可能であることが示された。

なお、ＨＬＡ－Ａ２結合性ＣＭＶｐｐ６５ペプチド（ＢＬＯＯＤ　１９９７；９０（５）：１７５１－６７）を使用した同様な系においては、抗原刺激後５日目においてテトラマーポジティブＣＴＬ数の有意な上昇が認められ、その後、日を追って同ＣＴＬ数は対数的に増加し、１４日目前後で最大に達した（～５０％）それに対し、マンノース被覆リポソームを非添加（抗原刺激のみ）のものは、１４日目に初めて有意なＣＴＬ数の上昇が認められたが、その値は２～３％以下であった。

[0049] 実施例３．抗原（ＨＰＶ１６遺伝子）封入マンノース被覆リポソームの調製

（１）ＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子発現プラスミドの構築

ＦＬＡＧ－タグが付いたＨＰＶ１６Ｅ５（配列番号１）、Ｅ６（配列番号３）、及びＥ７（配列番号５）の融合遺伝子を、ｐｃＤＮＡ３．１発現ベクター（インビトロゲン社）に挿入して構築した。Ｅ５、Ｅ６及びＥ７遺伝子は、Ｃａｓｋｉ　ＨＰＶ１６陽性子宮頸がん細胞株から増幅させた。ＲＴ－ＰＣＲに使用するプライマー対を表１に示す。

[0050] [表1]

HPVタイプ及びタンパク質	プライマー配列	プライマー配列長 (bp)	配列番号
HPV16E5	Fw: 5'-CGCGGATCCGCCACCATGACAAATCTTGATACTGCA-3'	36	7
	Rv: 5'-CGCGAATTCCATGTAATTAAAAAGCGTGCA-3'	30	8
HPV16E6	Fw: 5'-CGCGAATTCTGCCACCATGCACCAAAAGAGAACTGCA-3'	37	9
	Rv: 5'-CGCGATATCCAGCTGGGTTTCTCTATGGAA-3'	30	10
HPV16E7	Fw: 5'-CGCGATATCGCCACCATGCATGGAGATACACCTACA-3'	36	11
	Rv: 5'-ATAAGAATGCGGCCGCCTGGTTTCTGGGAACAGATGGG-3'	38	12

[0051] 精製したＰＣＲ産物のうち、Ｅ５を制限酵素ＢａｍＨＩ及びＥｃｏＲＩで、Ｅ６を制限酵素ＥｃｏＲＩ及びＥｃｏＲＶで、Ｅ７を制限酵素ＥｃｏＲＶ及びＮｏｔＩで消化し、その後、各産物をｐｃＤＮＡ３．１プラスミド中にライゲートした。ｃＤＮＡ配列は、ＡＢＩ　Ｇｅｎｅｔｉｃ　ａｎａｌｙｚｅｒ　ＰＲＩＭ３１００（パーキンエルマー社）を用いて確認した。その後、ＦＬＡＧ－タグ融合Ｅ５Ｅ６Ｅ７遺伝子をｐＣＡＧＧＳ発現ベクター（Ｍｉｙａｚａｋｉ，Ｊら、Ｇｅｎｅ、７９：２６９－２７７（１９８９））にサブクローンした。

[0052] （２）ｐＣＡＧＧＳ－Ｅ５Ｅ６Ｅ７発現確認

作製したｐＣＡＧＧＳ－Ｅ５Ｅ６Ｅ７の発現を確認するため、ＦｕＧＥＮＥ（登録商標）　ＨＤ試薬（ロシュアプライドサイエンス社）を用いてｐＣＡＧＧＳ－Ｅ５Ｅ６Ｅ７をヒト胎仔腎臓細胞である２９３Ｔ細胞に形質導入した。２９３Ｔ細胞は、１０％のウシ胎仔血清を加えたＤＭＥＭ培地（ＳＩＧＭＡ社、セントルイス、ミズーリ州）中で培養した。Ｅ５Ｅ６Ｅ７タンパク質の発現は、抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロットにより解析した。

培養細胞を氷冷ＰＢＳで洗浄し、溶解バッファー（５０ｍｍｏｌ／Ｌ　Ｔ

ｒｉｓ－ＨＣｌ［ｐＨ８．０］、１５０ｍｍｏｌ／Ｌ　ＮａＣｌ、１％　ＮＰ４０（プロテアーゼインヒビターカクテル；完全；ロシュダイアグノスティックス、バーゼル、スイス）中で氷冷することにより溶解させた。細胞溶解物全体を１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥに分散させ電気泳動的にニトロセルロース膜（バイオラッド社）に移動させた。ノンファットドライミルクでブロッキング後、膜を抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体（シグマ社）と共に静置し、３回洗浄後、アフィニティ精製抗体ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスＩｇＧ＋ＩｇＭ（Ｈ＋Ｌ）ヒト血清吸収ペルオキシダーゼ（２０００×）（ＫＰＬ社、ゲイサーズバーグ、メリーランド州）を加えて静置した。最後に、ＥＣＬ（登録商標）ウェスタンブロッティング検出試薬（アマシャムバイオサイエンス社、ピスカタウェイ、ニュージャージー州）を用いて、添付のプロトコルに従って膜を可視化した。

[0053] 結果を図２に示す。ｐＣＡＧＧＳ－Ｅ５Ｅ６Ｅ７を導入した細胞において、ＦＡＬＧ－タグと融合したＥ５Ｅ６Ｅ７タンパク質に特的なバンドが、抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体により検出された。

[0054] （３）ＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子発現プラスミドのマンノース被覆リポソーム（ＭＣＬ）への封入

上述の実施例１（１）及び（２）と同様の方法により、空リポソーム懸濁液を作製し、ＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子発現プラスミドを封入した。

作製したＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子封入マンノース被覆リポソーム（以下、「ＭＣＬ－ＨＰＶ」という）による、ＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子のヒトＰＢＭＣｓへの導入を確認するため、健常人由来のＰＢＭＣｓを０．１、０．５、１．０及び２．０μｇ／ｍＬのＭＣＬ－ＨＰＶでそれぞれ形質導入させ、ウエスタンブロットで解析した。本試験において、ｐＣＡＧＧＳ－Ｅ５Ｅ６Ｅ７で形質転換した２９３Ｔ細胞をポジティブコントロールとして使用した。Ｅ５Ｅ６Ｅ７タンパク質の発現は、抗ＦＬＡＧモノクローナル抗体により検出した。また、インターナルコントロールとして、β

アクチンについても検出した。

[0055] 結果を図３に示す。ＦＡＬＧ－タグと融合したＥ５Ｅ６Ｅ７タンパク質に特的なバンドは、０．１～２．０μｇ／ｍＬのいずれの量を用いた形質転換体からも検出された。特に、１．０μｇ／ｍＬを用いた場合には、安定的にＥ５Ｅ６Ｅ７タンパク質の発現を確認できたことから、以下のＣＴＬ誘導実験においてはこの濃度を採用することとした。

[0056] 実施例４．抗原ペプチドのＨＬＡ－Ａ２４結合試験

（１）ＨＬＡ－Ａ２４結合ペプチド候補の作製

ＨＬＡ－Ａ２４特異的結合モチーフとして、２番目にチロシン（Ｙ）、フェニルアラニン（Ｆ）、メチオニン（Ｍ）、又はトリプトファン（Ｗ）を有し、Ｃ末残基にロイシン（Ｌ）、イソロイシン（Ｉ）、フェニルアラニン（Ｆ）、又はメチオニン（Ｍ）を有するモチーフが報告されている（Ｋｏｎｄｏ，Ａら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１５５：４３０７－４３１２（１９９５））。本モチーフに基づき、ＨＰＶワクチンとして使用可能なＨＬＡ－Ａ２４結合ペプチドの候補として、ＨＰＶ１６－Ｅ６又はＨＰＶ１６－Ｅ７のアミノ酸配列から、９～１２ｍｅｒからなる以下に記載の９種類のペプチドを設計した：ＨＰＶ１６Ｅ６　８－１９（ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ：配列番号１３）、ＨＰＶ１６Ｅ６　４９－５７（ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ：配列番号１４）、ＨＰＶ１６Ｅ６　６６－７４（ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ：配列番号１５）、ＨＰＶ１６Ｅ６　８２－９０（ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ：配列番号１６）、ＨＰＶ１６Ｅ６　８７－９５（ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ：配列番号１７）、ＨＰＶ１６Ｅ６　９８－１０６（ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ：配列番号１８）、ＨＰＶ１６Ｅ７　１０－２０（ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ：配列番号１９）、ＨＰＶ１６Ｅ７　５１－６０（ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ：配列番号２０）、及び、ＨＰＶ１６Ｅ７　８３－９３（ＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ：配列番号２１）。各配列の由来する遺伝子、当該遺伝子における位置、ペプチド名、配列、配列番号、及びＮＩＨのＢｉｏＩｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　ａｎｄ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ａｎａｌｙｓｉｓ　Ｓｅｃｔｉｏｎ（ＢＩＭＡＳ）（ｈｔｔｐ：／／

ｗｗｗ－ｂｉｍａｓ．ｃｉｔ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｍｏｌｂｉｏ／ｈｌａ＿ｂｉｎｄ／）により解析を行ったスコアを表２に示す。

[0057] [表2]

遺伝子	位置	ペプチド	配列	配列番号	BIMAS Score
E6	8-19	HPV16E6 8-19	MFQDPQERPRKL	13	n.d.*
E6	49-57	HPV16E6 49-57	VYDFAFRDL	14	240
E6	66-74	HPV16E6 66-74	PYAVCDKCL	15	20
E6	82-90	HPV16E6 82-90	EYRHYCYSL	16	200
E6	87-95	HPV16E6 87-95	CYSLYGTTL	17	200
E6	98-106	HPV16E6 98-106	QYNKPLCDL	18	300
E7	10-20	HPV16E7 10-20	IVLHLEPQNEI	19	n.d.*
E7	51-60	HPV16E7 51-60	HYNIVTFCCK	20	0.9
E7	83-93	HPV16E7 83-93	LMGTLGIVCPI	21	n.d.*

* BIMAS 解析は8merから10merまでのペプチドについてのみ可能

[0058] （２）Ｔ２－Ａ２４０２細胞の調製

抗原処理に関連するトランスポータ（ＴＡＰ）陰性Ｂ／Ｔハイブリッド細胞株１７４ＣＥＭ．Ｔ２（以下、「Ｔ２」という）細胞を、ＨＬＡ－Ａ２４０２　ｃＤＮＡをコードするプラスミドで安定的に形質転換させた。形質転換させたＴ２－Ａ２４０２細胞（愛知がん研究センター提供）は、１０％のウシ胎仔血清及び０．８μｇ／ｍＬのＧ４１８（インヴィトロゲン　ライフテクノロジーズ社）を加えたＲＰＭＩ１６４０培地中で培養した。

[0059] （３）ペプチド結合試験

作製した各ペプチドについて、Ｔ２－Ａ２４０２細胞を用いてＨＬＡ－Ａ２４結合能を測定した。ＨＬＡ－Ａ２４へのペプチドの結合能は、従前に報告された方法（Ｎａｋａｏ　Ｍら、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ、１６４：２５６５－２５７４（２０００））に従ってＨＬＡ－Ａ２４安定化試験により行った。ＨＩＶ　ｅｎｖ由来ペプチド（以下、「ＨＩＶ－ｅｎｖ」という）（ＲＹＬＲＤＱＱＬＬＧＩ：配列番号２２）（Ｓｉｇｍａ　Ｇｅｎｏｓｉｓ社、石狩、北海道、日本）、及び、ＨＬＡ－Ａ２４拘束性ＥＢＶ　ＬＭＰ２由来ペプチド（以下、「ＥＢＶ－ＬＭＰ２」という）（ＴＹＧＰＶＦＭＳＬ：配列番号２３）（Ｓｉｇｍａ　Ｇｅｎｏｓｉｓ社、石狩、北海道、日本）を、Ｈ

ＬＡ－Ａ２４結合試験のポジティブコントロールとして使用した。Ｈ２－Ｋｄ拘束性オブアルブミン（ＯＶＡ）由来ＳＬ－８ペプチド（以下、「ＳＬ－８」という）（ＳＩＩＮＦＥＫＬ：配列番号２４）（Ｓｉｇｍａ　Ｇｅｎｏｓｉｓ社、石狩、北海道、日本）、及び、ＨＬＡ－Ａ６８拘束性ＥＢＶペプチド（以下、「ＥＢＶ－Ａ６８」という）（ＦＴＡＳＶＳＴＶＶ：配列番号２５）（Ｓｉｇｍａ　Ｇｅｎｏｓｉｓ社、石狩、北海道、日本）を、ＨＬＡ－Ａ２４結合試験のネガティブコントロールとして使用した。各ペプチドは、使用するまでＤＭＳＯに溶解し、－８０℃で保存した。

[0060] 本試験方法は、ＭＨＣクラスＩ分子が結合ペプチドの存在下で細胞表面に安定化されることの発見に基づく。Ｔ２－Ａ２４０２細胞を培地中、２６℃で１８時間培養後、各々２×１０^{5}細胞となるように分取し、ＰＢＳで洗浄後、１００μｇのペプチドを添加した又はペプチドを添加していない、１ｍＬのＯｐｔｉ－ＭＥＭ培地（インビトロゲン社）に懸濁させた。その後、２６℃で３時間培養し、更に３７℃で２．５時間培養した。氷冷ＰＢＳで洗浄後、細胞を抗ＨＬＡ－Ａ２４モノクローナル抗体と４℃で１時間接触させ、ＦＩＴＣ融合ウサギ抗マウスＩｇＧを加え４℃で３０分間静置した。その後、細胞を１％ホルムアルデヒド含有ＰＢＳ１ｍＬに懸濁し、ＦＡＣＳ　Ｃａｌｉｂｅｒ（登録商標）（ベクトンディッキンソン社）により分析した。結合能は、各ペプチドでパルスされたＴ２－Ａ２４０２細胞表面上のＨＬＡ－２４分子による蛍光強度の中間値（ＭＦＩ）を比較することにより評価した。

[0061] 結果を図４に示す。Ｔ２－Ａ２４０２細胞表面上のＨＬＡ－Ａ２４のレベルは、二つのポジティブコントロールペプチドＨＩＶ－ｅｎｖ及びＥＢＶ－ＬＭＰ２の存在下で増強されていた。一方で、ネガティブコントロールペプチドであるＳＬ－８及びＥＢＶ－Ａ６８はＨＬＡ－Ａ２４の発現に影響を与えなかった。合成ペプチドＨＰＶ１６Ｅ６　４９－５７、ＨＰＶ１６Ｅ６　６６－７４、ＨＰＶ１６Ｅ６　８２－９０、ＨＰＶ１６Ｅ６　８７－９５、ＨＰＶ１６Ｅ６　９８－１０６、及びＨＰＶ１６Ｅ７　８３－９３は、ＨＬＡのレベルをＨＩＶ－ｅｎｖ又はＥＢＶ－ＬＭＰ２とほぼ同等のレベルまで

上昇させた。よって、これらの５つのＨＰＶ１６Ｅ６及びＥ７由来の合成ペプチドがＨＬＡ－Ａ２４との結合親和性が高いことが示された。

[0062] 実施例５．ＭＣＬ－ＨＰＶとリポフェクトアミン２０００とのＰＢＭＣのＨＰＶ１６認識ＣＴＬｓ誘導能比較

（１）ＰＢＭＣの調製

札幌医科大学病院婦人科において、組織学的にＣＩＮＩＩＩ、又は浸潤子宮頸がんと診断されたＨＬＡ－Ａ２４０２陽性患者２９人由来の末梢血を使用した。全ての患者からインフォームドコンセントを取得している。また、全ての患者について、ＨＰＶを検出するため、子宮頸部細胞診を行った。ＨＰＶの遺伝子型はマルチプレックスＰＣＲ法により株式会社ＧＬａｂ病理解析センターにおいて行った。ＨＰＶ１６陽性の子宮頸がん患者のＰＢＭＣｓを、Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（登録商標）（Ｎｙｃｏｍｅｄ社、オスロ、ノルウェー）で、常法の密度勾配遠心分離法により分離した。

[0063] （２）ＣＴＬ誘導

ＨＰＶ１６陽性、ＨＬＡ－Ａ２４陽性の子宮頸がん患者（ケース＃１８）から分離したＰＢＭＣｓを、１×１０^{7}ＰＢＭＣｓ／ウェルとなるように播種し、１０％のプールヒトＡＢ血清を含むＡＩＭ培地（ライフテクノロジーズ社）で培養した。１日目に、１０μｇ／ｍＬの実施例３で作製したｐＣＡＧＧＳ／Ｅ５Ｅ６Ｅ７封入マンノース被覆リポソーム、又はＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７とリポフェクトアミン２０００（ライフテクノロジーズ社、ロックビル、メリーランド州）でパルスした。３日目に、ヒト組換ＩＬ－２（武田薬品工業提供）を終濃度１００ＩＵ／ｍＬとなるように各ウェルに添加した。ＣＴＬ誘導の間、３～４日おきにＩＬ－２（１００ＵＩ／ｍＬ）を添加した１０％のプールヒトＡＢ血清を含む新鮮なＡＩＭ培地（ライフテクノロジーズ社）を用いて培地交換を行った。１０日目にエンザイムリンクトエリスポット（以下、「ＥＬＩＳＰＯＴ」という）アッセイによりＨＰＶ１６特異的ＣＴＬｓを検出した。

[0064] （３）ＥＬＩＳＰＯＴアッセイ

ＣＴＬｓのＨＰＶ１６のＥ６及びＥ７ペプチドへの特異性を、既に報告されている方法（Ｔｓｕｒｕｍａ，Ｔら、Ｊ．Ｔｒａｎｓｌ．Ｍｅｄ．，６：２４（２００８））に従って、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより判定した。マルチスクリーン９６ウェルプレート（ミリポア社、ベッドフォード、マサチューセッツ州）に、ＰＢＳ中の５μｇ／ｍＬの抗ＩＦＮγ捕捉抗体（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ社、サンディエゴ、カリフォルニア州）を１００μＬ／ウェルで添加し、４℃で一晩静置した。プレートを完全ＲＰＭＩ１６４０培地２００μＬ／ウェルで一回洗浄し、完全ＲＰＭＩ１６４０培地２００μＬ／ウェルを用いて室温で２時間ブロッキングした。その後、６×１０^{4}個のＣＴＬsを、５×１０^{4}個の抗原提示細胞Ｔ２－Ａ２４０２細胞と共培養し、各５μｇ／ｍＬの合成ペプチドＨＰＶ１６Ｅ６　６６－７４、ＨＰＶ１６Ｅ６　８７－９５、若しくはＨＰＶ１６Ｅ７　８３－９３でパルスした。３７℃で４０時間培養後、形成されたＩＦＮγスポットを製品のプロトコルに従ってカウントした。

[0065] 結果を図５に示す。ＭＣＬ－ＨＰＶで刺激したＰＢＭＣｓは、ＨＰＶ１６Ｅ６　６６－７４ペプチド特異的な反応性を示したが、リポフェクトアミン２０００で刺激したＰＢＭＣｓにはこの反応性は見られなかった。この観察結果から、マンノース被覆リポソームを用いたＣＴＬ誘導がリポフェクトアミン２０００よりも優れて効率的であることが示された。

[0066] 実施例６．ＭＣＬ－ＨＰＶによるＨＰＶ１６認識ＣＴＬｓ誘導

ＭＣＬ－ＨＰＶ　ＤＮＡワクチンによるＣＴＬ誘導能を確認し、より抗原性の高いＨＬＡ－Ａ２４拘束性ペプチドを同定するため、ＣＩＮ３及び子宮頸がん患者由来のＰＢＭＣｓからのＣＴＬ誘導試験を行った。

実施例５（１）と同様にして、ＨＬＡ－Ａ２４陽性、ＨＰＶ１６陽性患者４人から採取したＰＢＭＣｓ、及び、ＨＬＡ－Ａ２４０２陽性、ＨＰＶ１６陰性患者６人から採取したＰＢＭＣｓを用いて、ＣＴＬ誘導試験を行った。患者のプロファイルは以下の表３に示す。患者由来のＰＢＭＣｓをｉｎ　ｖｉｔｒｏでＭＣＬ－ＨＰＶにより刺激した。６×１０^{4}個のＣＴＬｓを、合成

ペプチドの存在下又は非存在下で５×１０^{4}個のＴ２－Ａ２４０２細胞に反応させた後、ＩＦＮγ　ＥＬＩＳＰＯＴアッセイを行うことにより反応性ＣＴＬｓを検出した。

[0067] 結果を図６及び表３に示す。ケース番号１、６、１６及び１８の全てのＨＰＶ１６陽性患者から採取したＰＢＭＣｓから、ＨＰＶ１６Ｅ６　６６－７４ペプチドを認識するＣＴＬｓが誘導された。一方で、ＨＰＶ１６陰性患者由来のＰＢＭＣｓにおいては、ＨＰＶ１６Ｅ６　６６－７４ペプチド特異的反応性は検出されなかった。このことは、ＨＰＶ１６Ｅ６　６６－７４ペプチド特異的なＣＴＬｓがｉｎ　ｖｉｖｏで拡大することを示している。また、ケース番号１はＨＰＶ１６Ｅ６　８２－９０ペプチド、ケース番号６は全てのＨＰＶ１６Ｅ６又はＥ７由来ペプチド、ケース番号１６はＨＰＶ１６Ｅ６　４９－５７ペプチド及びＨＰＶ１６Ｅ７　８３－９３ペプチド、ケース番号１８はＨＰＶ１６Ｅ６　９８－１０６ペプチドへの反応性をそれぞれ示した。一方で、ＨＰＶ１６陰性のケースでは、いかなるＨＰＶ１６由来ペプチドとも反応性を示さなかった。このことは、当該ペプチドがＨＰＶ１６感染と関連することを示している。これらの結果から、これらのエピトープが、ＨＬＡ－Ａ２４陽性、ＨＰＶ１６陽性患者の抗がん免疫反応誘発に有用であることを示している。特に、ＨＰＶ１６Ｅ６　６６－７４ペプチドは、ＨＰＶＥ６及びＥ７タンパク質由来のペプチドの中でもＨＬＡ－Ａ２４で免疫原性が非常に高いペプチドであることから、ＨＬＡ－Ａ２４陽性、ＨＰＶ１６陽性患者の抗がん免疫反応誘発に優れて有用であることが示された。

[0068]

[表3]

ケース番号	年齢	HPV ゲノタイプ	HLA-*A2402	診断†	ペプチド特異性*					
					E6 ペプチド					E7 ペプチド
					49-57	66-84	82-90	87-95	98-106	83-93
1	41	16	+	Cx.Ca Ib1	-	+	+	-	-	-
6	37	16	+	CIN3	+	+	+	+	+	+
16	39	16	+	Cx.Ca Ib1	+	+	-	-	-	+
18§	46	16	+	Cx.Ca Ib2	-	+	-	-	+	-
2	35	66	+	Cx.Ca Ia1	-	-	-	-	-	-
3	33	18	+	Cx.Ca Ib1	-	-	-	-	-	-
9	29	18	+	Cx.Ca Ib1	-	-	-	-	-	-
13	37	58	+	CIN3	-	-	-	-	-	-
14	44	52	+	Cx.Ca 0	-	-	-	-	-	-
17	27	51	+	CIN3	-	-	-	-	-	-

*ペプチド特異性は、T2-A24細胞をパルスしたペプチドを用いたELISPOTアッセイにより評価した
†CxCa：子宮頸癌; CIN：子宮頸部上皮内腫瘍
§ケース番号18：放射線治療後

[0069] 実施例７．ＭＣＬ－ＨＰＶ誘導ＣＴＬｓの^{51}Ｃｒ放出アッセイ

ＨＰＶ１６陽性、ＨＬＡ－Ａ２４陽性子宮頸がん患者（ケース番号６）由来のＰＢＭＣｓをＭＣＬ－ＨＰＶで刺激して、ＨＰＶ１６に特異的なＣＴＬｓを生成した。ＭＣＬ－ＨＰＶによる刺激開始から１４日後、ＣＴＬｓを介する細胞傷害性を、既に報告されている方法（Ｓａｔｏ，Ｔら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ，４６：４３８４－４３８９（１９８６））に従って、^{51}Ｃｒ放出アッセイにより測定した。標的細胞として、Ｔ２－Ａ２４細胞又はＫ５６２細胞を用いた。Ｋ５６２細胞は、ナチュラルキラー細胞の活性、及びリンホカインにより活性化された非特異的細胞傷害性をモニターするために使用した。Ｔ２－Ａ２４０２細胞は、^{51}Ｃｒ放出アッセイ前に１μｇ／ｍＬのＨＰＶ１６Ｅ７　８３－９３ペプチド若しくはＨＩＶ－ｅｎｖの存在下又は非存在下、室温で１時間培養した。標的細胞を１００μＣｉの^{51}Ｃｒを用いて３７℃で１時間ラベルし、５回洗浄後、ＲＰＭＩ１６４０培地に再懸濁させた。その後、^{51}Ｃｒでラベルされた標的細胞（２０００細胞／ウェル）とエフェクター細胞を、エフェクター細胞と標的細胞の比率（エフェクター細胞／標的細胞：Ｅ／Ｔ）が１、３又は１０となるように、Ｖ底９６ウェルマイクロタイタープレートに加え、３７℃で４時間共培養した。培養上清の放射能をがんマカウンターで測定した。細胞傷害性は、以下の式により計算した

：（%細胞傷害性）＝（ｃｐｍ実験的放出－ｃｐｍ自然放出）×１００。

[0070] 結果を図７に示す。ケース番号１８の患者由来のＣＴＬｓは、ＨＰＶ１６Ｅ７　８３－９３ペプチドでパルスしたＴ２－Ａ２４細胞に対する細胞傷害性を示した。一方で、当該ＣＴＬｓは、ネガティブコントロールペプチド（ＨＩＶ－ｅｎｖ）でパルスしたＴ２－Ａ２４細胞、又はＫ５６２　ＮＫ標的細胞に対しては細胞傷害性を示さなかった。このことから、このＣＴＬｓが、ＨＰＶ１６Ｅ７　８３－９３に特異的な溶解作用を有することが示された。

[0071] 実施例８．マンノース被覆リポソームＣＭＶによる抗原特異的ＣＴＬｓ誘導

（１）ＰＢＭＣｓの調製

ＰＢＭＣｓはＨＬＡ－Ａ２陽性健常人末梢血よりヘパリン採血したものを使用した。採血した血液から血漿を分離した。分離して得た血漿５%を含む、ペニシリン、ストレプトマイシン、及びＬ－グルタミンを加えたＲＰＭＩ１６４０培地を培養培地として使用した。ＰＢＭＣｓは、Ｆｉｃｏｌｌ　Ｐａｑｕｅ（ＧＥヘルスケア社）を用いて製造者のプロトコルに従って分離した。

（２）マンノース被覆リポソーム封入抗原の作製

抗原としてＣＭＶｐｐ６５エピトープペプチドＮＬＶＰＭＶＡＴＶ（配列番号２６）を用いた。最終抗原濃度の１００倍濃度の抗原溶液０．１ｍＬを精製水で調製した。調製した抗原溶液０．１ｍＬを、実施例１（１）に準じて作製し凍結乾燥したマンノース被覆リポソームに添加した。５回ピペッティングを行って攪拌後、室温で３０分間反応させ、９００μＬの培養培地を加えた。

（３）ＩＬ－２溶液の作製

５%血漿含有ＲＰＭＩ１６４０培養培地に２００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２を加え、ＩＬ－２溶液とした。

（４）ＣＴＬ誘導

１２又は２４ウェルプレートの各ウェルに、２．０×１０^{6}細胞のＰＢＭＣｓを含む９００μＬの培養培地を加えた。各ウェルに、（２）で作製したマンノース被覆リポソーム封入抗原、又は、抗原のみを、それぞれ１００μＬ添加し、４８時間培養後、（３）で作製したＩＬ－２溶液を１ｍＬ／ウェルで加えた。培地の色が変化したら、１００ＩＵ／ｍＬ　ＩＬ－２を含む培養培地を用いて、培地交換を行った。培養開始から１４日後にサンプリングし、ＭＨＣ－テトラマー陽性率を測定した。

[0072] 結果を図８に示す。ペプチドのみでの刺激の場合、テトラマー陽性細胞率が５．００％であったのに対し、マンノース被覆リポソーム封入抗原では、３７．０２％と約７倍の抗原特異的ＣＴＬｓを誘導していることが示された。

産業上の利用可能性

[0073] 本発明のマンノース被覆リポソーム封入抗原を利用したＣＴＬｓ誘導方法は、短時間でＣＴＬｓを誘導することができる。そのため、短時間で哺乳動物のＰＢＭＣのＣＴＬｓ誘導能を測定することや、抗原特異的なＣＴＬｓを誘導可能な抗原性物質のスクリーニングを行うことができる。

また、本発明のマンノース被覆リポソーム封入ＨＰＶＥ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子抗原は効率よくＨＰＶ１６を特異的に認識するＣＴＬｓを誘導することができる。よって、マンノース被覆リポソーム封入ＨＰＶＥ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子抗原をワクチンとして、ＨＰＶ１６の感染に基づく疾患用の医療用組成物として用いることが可能である。また、ｅｘ　ｖｉｖｏでマンノース被覆リポソーム封入ＨＰＶＥ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子抗原を用いてＣＴＬｓを誘導した後、当該ＣＴＬｓを患者の体内に戻すことにより、がん又は感染性疾患を治療又は予防することができる。

更に、本発明のＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１

９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチドは、ＨＬＡ－Ａ２４遺伝子を有しＨＰＶ１６感染に基づく疾患の患者において免疫原性が高いことから、当該患者の治療用又は予防用ワクチンとして用いることができる。また、ｅｘ　ｖｉｖｏでこれらの抗原ペプチドを用いてＣＴＬｓを誘導した後、当該ＣＴＬｓを患者の体内に戻すことにより、がん又は感染性疾患を治療又は予防することができる。

請求の範囲

[請求項1] ｅｘ　ｖｉｖｏにおける、抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞誘導能が高い抗原性物質のスクリーニング方法であって、

哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、

前記リンパ球と被験物質を封入したマンノース被覆リポソームとを接触させること、

前記被験物質又は抗原に特異的な細胞傷害性Ｔ細胞を検出すること、及び、

検出された抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞が多い被験物質を、前記哺乳動物に対して抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞誘導能が高い抗原性物質として選択することを備える方法。

[請求項2] 前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記リンパ球を接触させることが、５～３０日間行われることを特徴とする、請求項１に記載の方法。

[請求項3] ｅｘ　ｖｉｖｏにおける、リンパ球の抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞誘導能の測定方法であって、

哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、

前記リンパ球と抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームとを接触させること、及び、

前記抗原に特異的な細胞傷害性Ｔ細胞を検出することを備える方法。

[請求項4] 前記抗原を封入したマンノース被覆リポソームと前記リンパ球を接触させることが、５～３０日間行われることを特徴とする、請求項３に記載の方法。

[請求項5] ｅｘ　ｖｉｖｏにおける抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞の製造方法であって、

哺乳動物由来のリンパ球を調製すること、及び、

前記リンパ球に抗原性物質を封入したマンノース被覆リポソームと接触させることを備える方法。

[請求項6] 前記抗原性物質が、以下から選択される少なくとも１の物質である、請求項５に記載の製造方法：

サバイビン２Ｂペプチド；

ヒトパピローマウイルスタイプ１６のＥ５、Ｅ６及びＥ７の融合遺伝子；

サイトメガロウイルス　ｐｐ６５由来ペプチド；又は

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド、

ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）若しくはＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列をコードするＤＮＡを含む核酸。

[請求項7] 請求項５又は請求項６に記載の方法により製造された抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞を含有する、感染性疾患又はがんの治療又は予防用医療用組成物。

[請求項8] ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）、又は、Ｌ

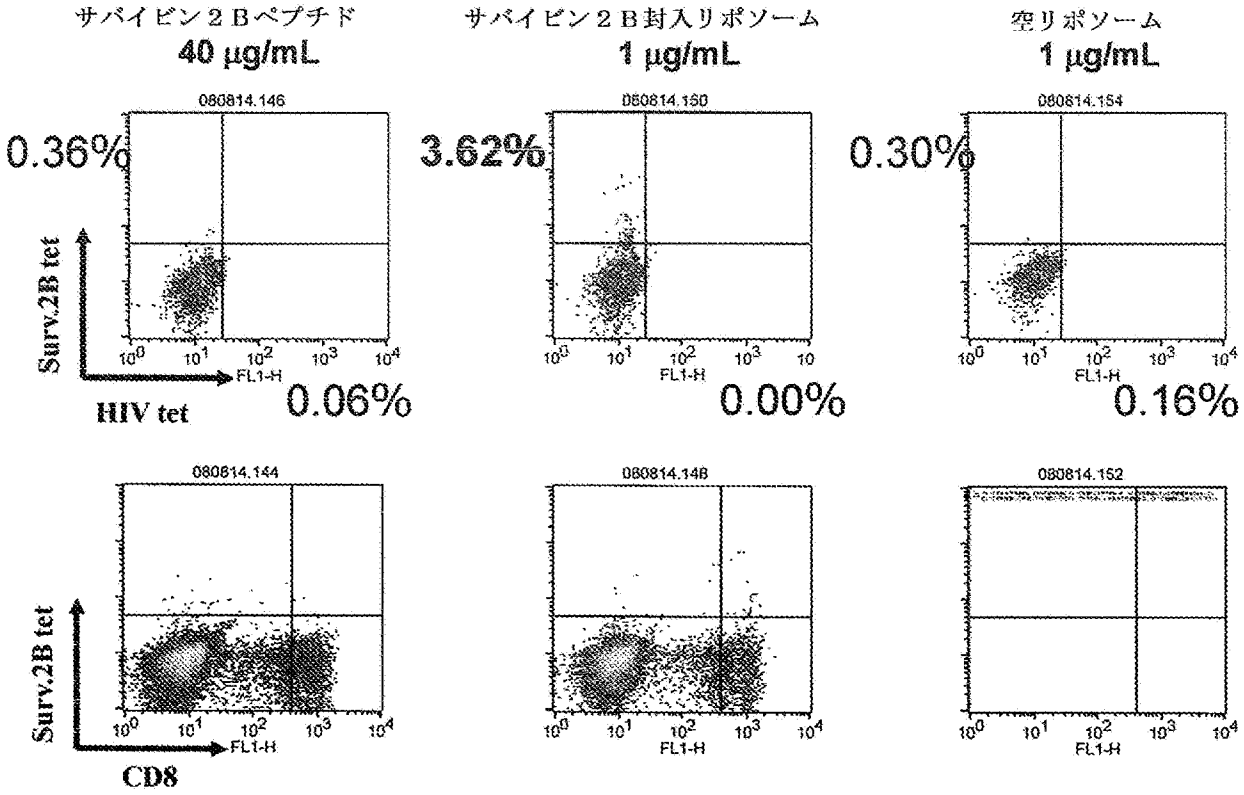
ＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列を含むペプチド。

[請求項9] ＭＦＱＤＰＱＥＲＰＲＫＬ（配列番号１３）、ＶＹＤＦＡＦＲＤＬ（配列番号１４）、ＰＹＡＶＣＤＫＣＬ（配列番号１５）、ＥＹＲＨＹＣＹＳＬ（配列番号１６）、ＣＹＳＬＹＧＴＴＬ（配列番号１７）、ＱＹＮＫＰＬＣＤＬ（配列番号１８）、ＩＶＬＨＬＥＰＱＮＥＩ（配列番号１９）、ＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫ（配列番号２０）、又は、ＬＭＧＴＬＧＩＶＣＰＩ（配列番号２１）からなるアミノ酸配列をコードするＤＮＡを含む核酸。

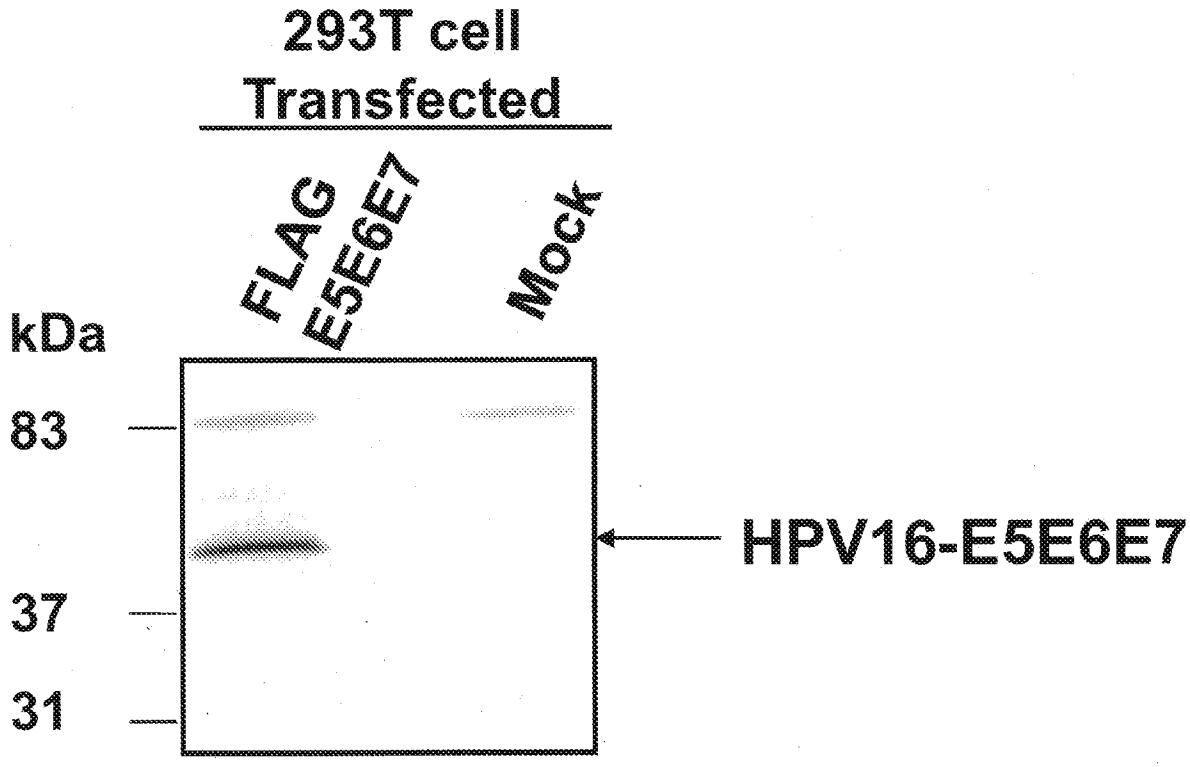
[請求項10] ＨＰＶ１６Ｅ５Ｅ６Ｅ７融合遺伝子を含む核酸。

[請求項11] 請求項８に記載のペプチド、又は、請求項９若しくは請求項１０に記載の核酸を抗原性物質として含有する、ヒトパピローマウイルスタイプ１６の感染に基づく疾患の治療又は予防のための医療用組成物。

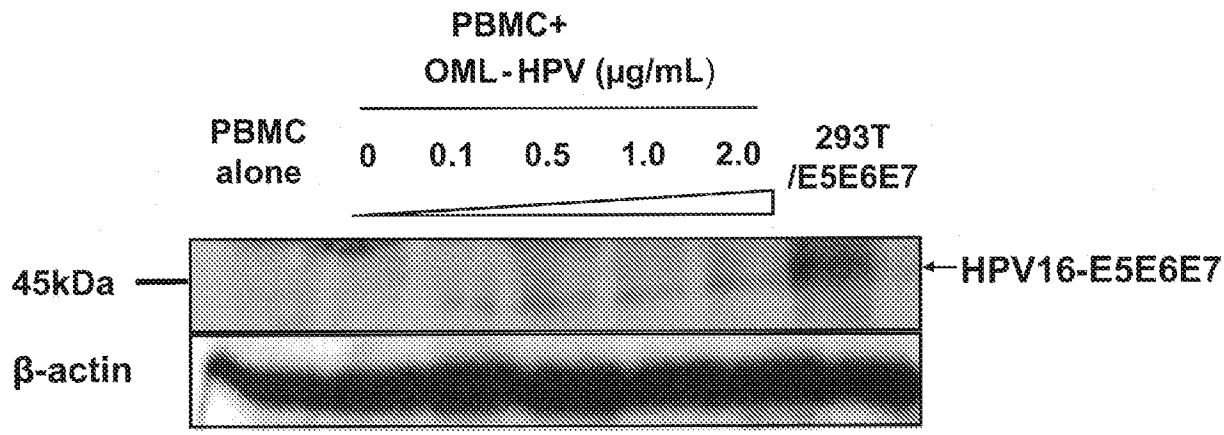
[図1]


サバイビン２Ｂペプチド
40 μg/mL
サバイビン２Ｂ封入リポソーム
1 μg/mL
空リポソーム
1 μg/mL
080814.146
080814.150
080814.154
0.36%
3.62%
0.30%
Surv.2B tet
HIV tet
0.06%
0.00%
0.16%
080814.144
080814.148
080814.152
Surv.2B tet
CD8
FL1-H

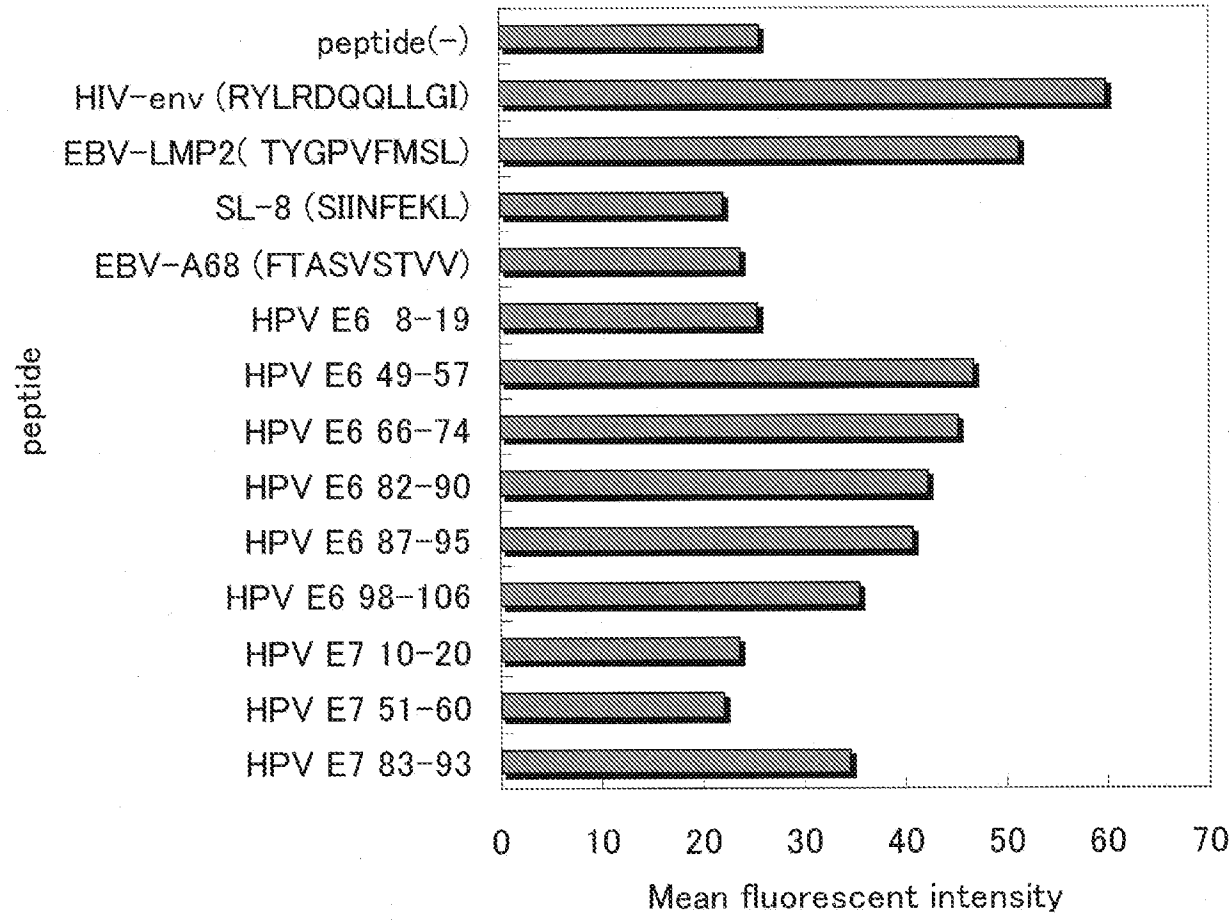
[図2]


293T cell
Transfected
FLAG E5E6E7
Mock
kDa
83
37
31
HPV16-E5E6E7

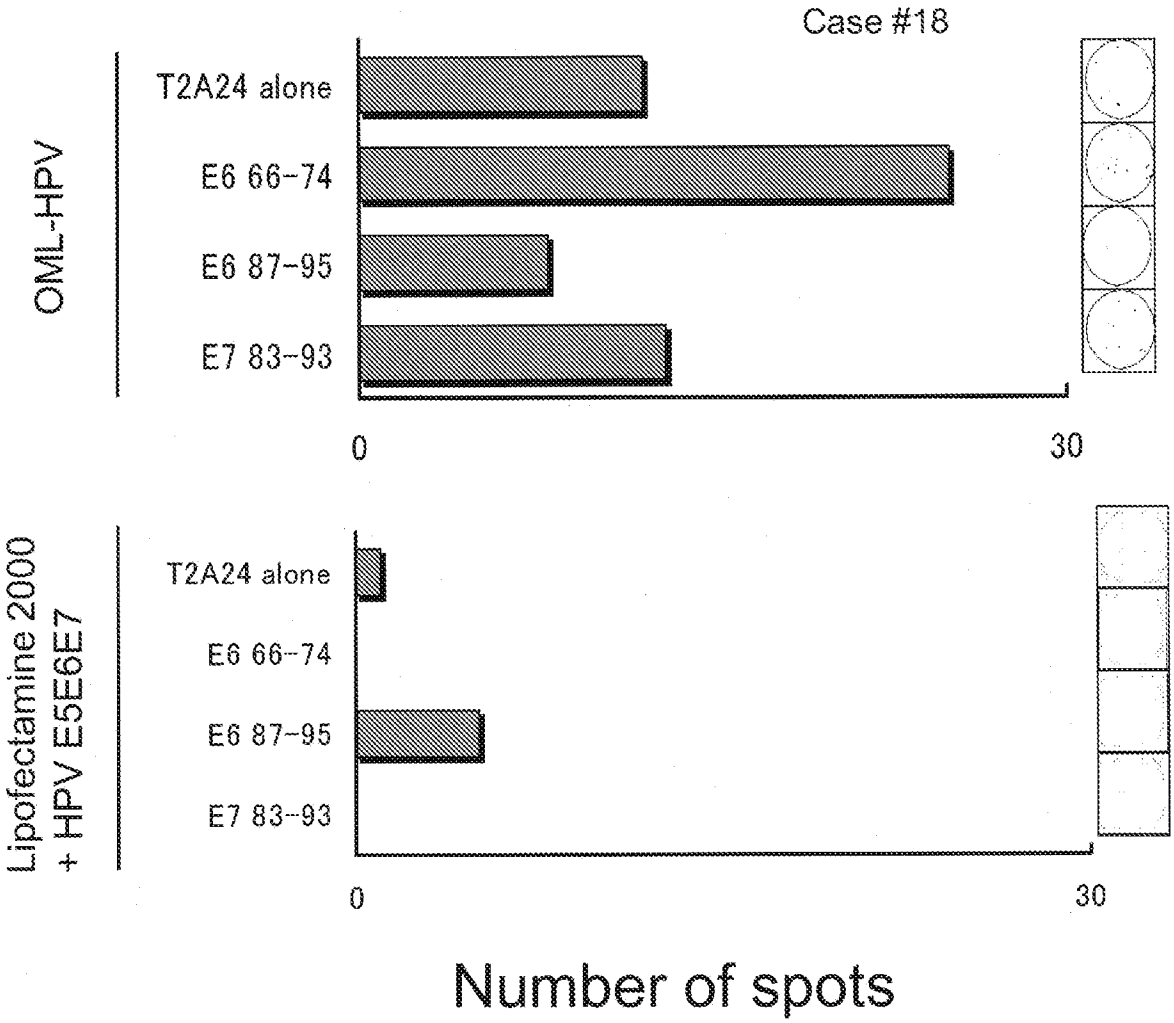
[図3]


PBMC+
OML-HPV (μg/mL)
PBMC alone
0
0.1
0.5
1.0
2.0
293T /E5E6E7
45kDa
HPV16-E5E6E7
β-actin

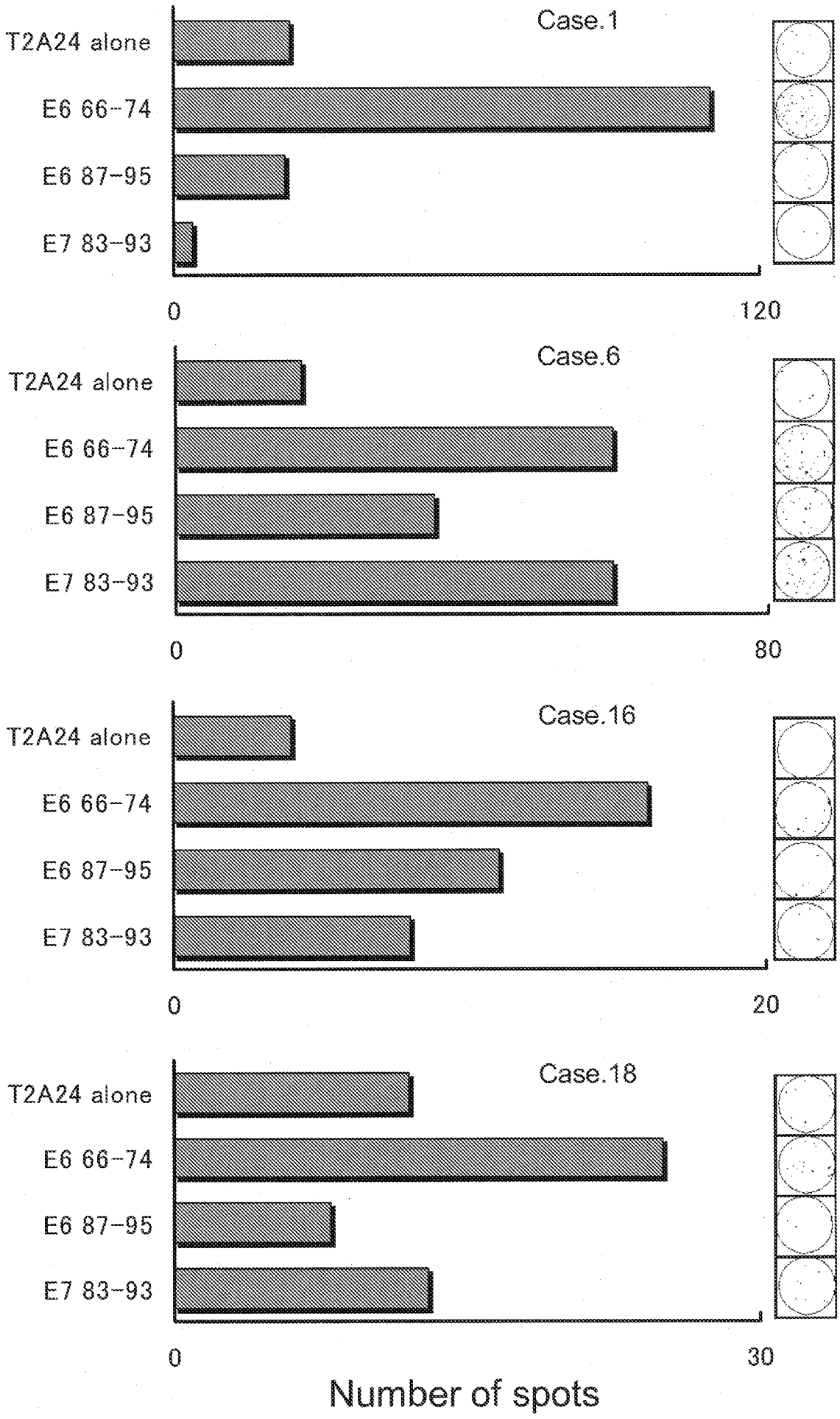
[図4]


peptide(-)
HIV-env (RYLRDQQLLGI)
EBV-LMP2(TYGPVFMSL)
SL-8 (SIINFEKL)
EBV-A68 (FTASVSTVV)
HPV E6 8-19
HPV E6 49-57
HPV E6 66-74
HPV E6 82-90
HPV E6 87-95
HPV E6 98-106
HPV E7 10-20
HPV E7 51-60
HPV E7 83-93
peptide
0
10
20
30
40
50
60
70
Mean fluorescent intensity

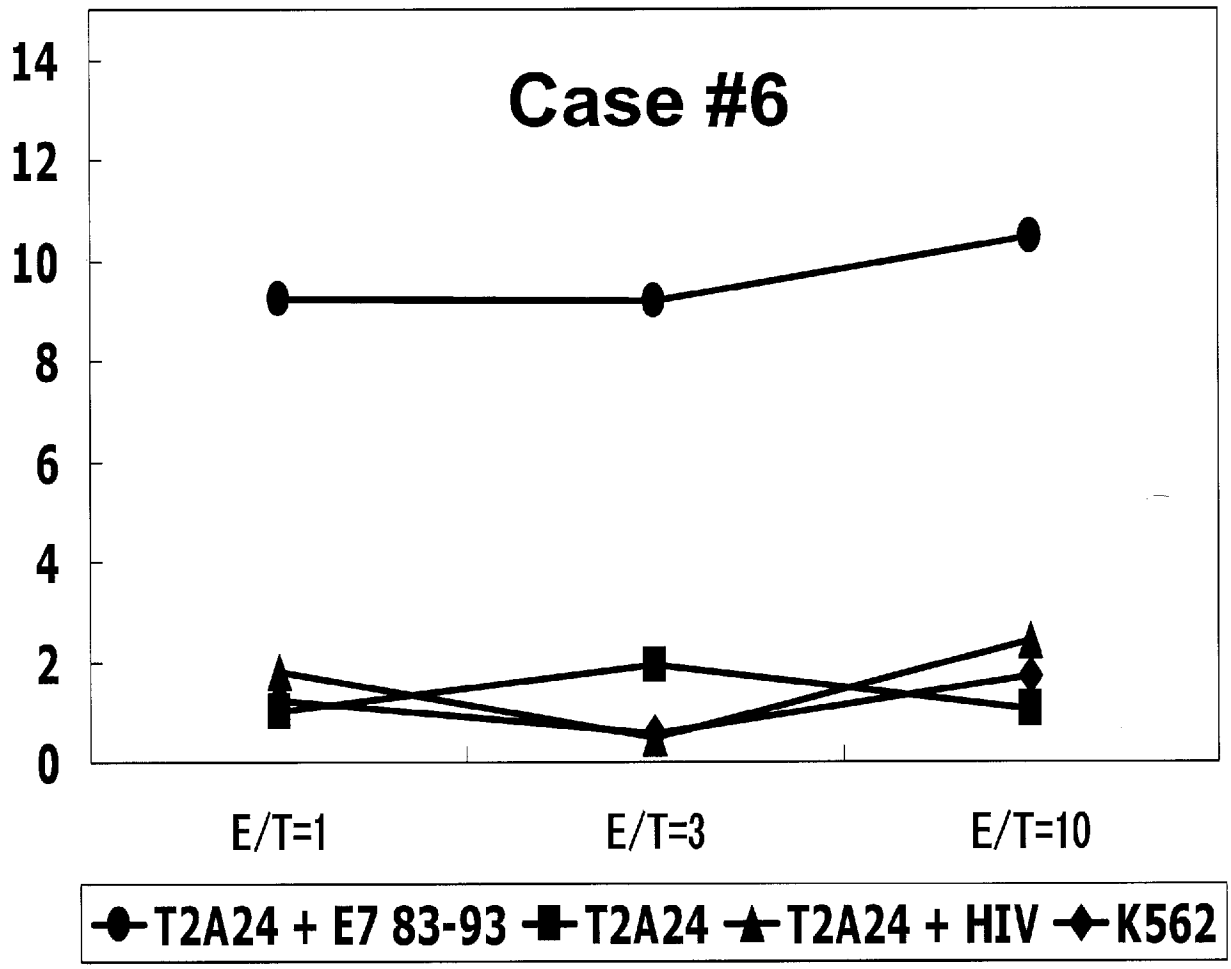
[図5]


Case #18
OML-HPV
T2A24 alone
E6 66-74
E6 87-95
E7 83-93
0
30
Lipofectamine 2000
+ HPV E5E6E7
T2A24 alone
E6 66-74
E6 87-95
E7 83-93
0
30
Number of spots

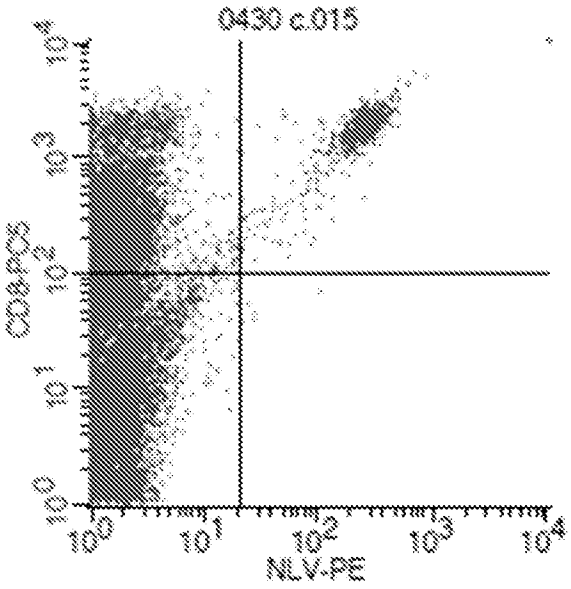
[図6]


Case.1
T2A24 alone
E6 66-74
E6 87-95
E7 83-93
0
120
Case.6
T2A24 alone
E6 66-74
E6 87-95
E7 83-93
0
80
Case.16
T2A24 alone
E6 66-74
E6 87-95
E7 83-93
0
20
Case.18
T2A24 alone
E6 66-74
E6 87-95
E7 83-93
0
30
Number of spots

[図7]

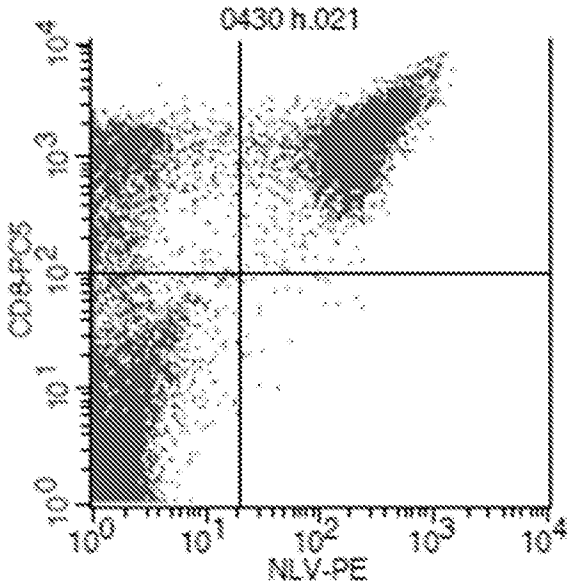

Case #6
14
12
10
8
6
4
2
0
E/T=1
E/T=3
E/T=10
T2A24 + E7 83-93
T2A24
T2A24 + HIV
K562

[図8]



Gated Events: 30245
Total Events: 35873

Quad	Events	% Gated
UL	10770	35.61
UR	1511	5.00
LL	17948	59.34
LR	16	0.05



Gated Events: 30453
Total Events: 37714

Quad	Events	% Gated
UL	4083	13.41
UR	11275	37.02
LL	15033	49.36
LR	62	0.20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/005326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
See extra sheet.

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)
C12N5/0783, A61K35/26, A61P31/04, A61P31/12, A61P31/14, A61P31/18, A61P31/20, A61P35/00, A61P35/02, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/04, G01N33/53, G01N33/544, C07K7/06, C07K7/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), CAplus(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2005/089164 A2 (EPIMMUNE INC., et al), 29 September 2005 (29.09.2005), & EP 1732598 A2 & US 2007/014810 A1	7-9,11/1-11
X/Y	TSUKUI T, et al, Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. Cancer Res., 1996, Vol.56, No.17, p.3967-74.	7-9,11/1-11
X/Y	WO 2006/104199 A1 (Tokai University), 05 October 2006 (05.10.2006), & EP 1870091 A1 & US 2009/238863 A1 & JP 2007-510561 A	1-5/1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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	Date of mailing of the international search report
24 November, 2010 (24.11.10)	07 December, 2010 (07.12.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/005326

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	MURAKAMI M, et al, Induction of specific CD8+ T-lymphocyte responses using a human papillomavirus-16 E6/E7 fusion protein and autologous dendritic cells. Cancer Res., 1999, Vol.59, No.6, p.1184-7.	10,11/1-11
Y	JP 2005-504733 A (The Research Council of the Queensland Institute of Medical Research), 17 February 2005 (17.02.2005), & WO 2004/067234 A1 & EP 1409527 A1 & US 2005/019344 A1	1-11
Y	JP 2006-511221 A (Vical Inc.), 06 April 2006 (06.04.2006), & WO 2004/058166 A2 & EP 1587816 A2 & US 2004/209241 A1	1-11
Y	Tetsuhiro TSURUMA et al., "Survivin-2B Peptide ni yoru Gan Peptide Vaccine Ryoho", Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy, 2004, vol.31, no.11, p.1634-36	1-11
Y	FUKASAWA M, et al, Liposome oligomannose-coated with neoglycolipid, a new candidate for a safe adjuvant for induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. FEBS Lett., 1998, Vol.441, No.3, p.353-356	1-11
A	Hiroki NABETA et al., "Akusei Kotsu Nanbu Shuyo ni Taisuru Men'eki Ryoho no Kaihatsu: Shuyo Kogen no Dotei", The Hokkaido Journal of Orthopaedics and Traumatology, 2006, vol.47, no.2, pages 18 to 21	1-11
A	HATTORI Y, et al, Enhancement of immune responses by DNA vaccination through targeted gene delivery using mannosylated cationic liposome formulations following intravenous administration in mice Biochem Biophys Res Commun., 2004, Vol.317, No.4, p.992-999	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/005326

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C12N5/0783(2010.01)i, *A61K35/26*(2006.01)i, *A61P31/04*(2006.01)i, *A61P31/12*(2006.01)i, *A61P31/14*(2006.01)i, *A61P31/18*(2006.01)i, *A61P31/20*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P35/02*(2006.01)i, *C12N5/10*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i, *C12Q1/04*(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i, *G01N33/544*(2006.01)i, *C07K7/06*(2006.01)n, *C07K7/08*(2006.01)n

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/005326

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ 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:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Only a common matter among the peptides and DNA molecules encoding the peptides all recited in claim 8 is a peptide derived from a cancer antigen. However, a peptide derived from a cancer antigen is known, and therefore the matter cannot be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence. Further, there is no other common matter that can be regarded as a special technical feature in the meaning within PCT Rule 13.2, second sentence among the inventions respectively relating to the 12 peptides and nucleic acids encoding the peptides all recited in claim 8.

Consequently, the group of inventions cannot be regarded as a group of

(continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ 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.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

inventions so linked as to form a single general inventive concept, and are considered as an invention group consisting of 12 inventions respectively relating to different 12 peptides or nucleic acids. Similar comments apply to claim 9 and claims which refer to claim 9.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／００５３２６

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　特別ページ参照

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.　C12N5/0783, A61K35/26, A61P31/04, A61P31/12, A61P31/14, A61P31/18, A61P31/20, A61P35/00, A61P35/02, C12N5/10, C12N15/09, C12Q1/04, G01N33/53, G01N33/544, C07K7/06, C07K7/08

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)、CAplus(STN)

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	関連する請求項の番号
X / Y	WO 2005/089164 A2　（EPIMMUNE INC, et al,）　2005.09.29 & EP 1732598 A2　& US 2007/014810 A1	7-9, 11 / 1-11
X / Y	TSUKUI T, et al, Interleukin 2 production in vitro by peripheral lymphocytes in response to human papillomavirus-derived peptides: correlation with cervical pathology. Cancer Res., 1996, Vol.56, No.17, p.3967-74.	7-9, 11 / 1-11

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　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 ２４．１１．２０１０	国際調査報告の発送日 ０７．１２．２０１０
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）　４Ｂ　３７６４ 横田　倫子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

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	関連する請求項の番号
X / Y	WO2006/104199 A1　（学校法人東海大学）　2006.10.05 ＆ EP 1870091 A1　＆ US 2009/238863 A1　＆ JP 2007-510561 A	1-5 / 1-11
X / Y	MURAKAMI M, et al, Induction of specific CD8+ T-lymphocyte responses using a human papillomavirus-16 E6/E7 fusion protein and autologous dendritic cells. Cancer Res., 1999, Vol.59, No.6, p.1184-7.	10, 11 / 1-11
Y	JP 2005-504733 A　（ザ　カウンシル　オブ　ザ　クイーンズランド　インスティチュート　オブ　メディカル　リサーチ）　2005.02.17 ＆ WO 2004/067234 A1　＆ EP 1409527 A1　＆ US 2005/019344 A1	1-11
Y	JP 2006-511221 A　（バイカル　インコーポレイテッド）　2006.04.06 ＆ WO 2004/058166 A2　＆ EP 1587816 A2　＆ US 2004/209241 A1	1-11
Y	鶴間哲弘　他、 Survivin-2B ペプチドによる癌ペプチドワクチン療法 癌と化学療法, 2004, Vol.31, No.11, p.1634-36	1-11
Y	FUKASAWA M, et al, Liposome oligomannose-coated with neoglycolipid, a new candidate for a safe adjuvant for induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes. FEBS Lett., 1998, Vol.441, No.3, p.353-356	1-11
A	鍋田裕樹　他、 悪性骨軟部腫ように対する免疫療法の開発:腫よう抗原の同定 北海道整形災害外科学会雑誌, 2006, Vol.47, No.2, p.18-21	1-11
A	HATTORI Y, et al, Enhancement of immune responses by DNA vaccination through targeted gene delivery using mannosylated cationic liposome formulations following intravenous administration in mice Biochem Biophys Res Commun., 2004, Vol.317, No.4, p.992-999	1-11

発明の属する分野の分類
C12N5/0783(2010.01)i, A61K35/26(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P31/14(2006.01)i, A61P31/18(2006.01)i, A61P31/20(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P35/02(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/04(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/544(2006.01)i, C07K7/06(2006.01)n, C07K7/08(2006.01)n

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／００５３２６

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．☐ 請求項 ＿＿＿＿＿＿＿＿ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

２．☐ 請求項 ＿＿＿＿＿＿＿＿ 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．☐ 請求項 ＿＿＿＿＿＿＿＿ 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。

請求項８に記載されるペプチド及びそれらをコードするＤＮＡについて、癌抗原に由来するペプチドという点においてのみ共通する。しかしながら、癌抗原に由来するペプチドは公知であるから、当該事項はPCT規則13.2の第２文の意味において特別な技術的特徴ではない。そして、請求項８に記載されている１２のペプチド及びそれらをコードする核酸に関する発明の間には、PCT規則13.2の第２文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通事項は存在しない。

よって、これら一群の発明は、単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとはいえず、異なった１２のペプチド又は核酸に関する１２の発明からなる発明群であると認める。同様の理由が請求項９及びそれらを引用する請求項にも存在する。

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項について作成した。

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項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ので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項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ので、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項について作成した。

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はあったが、異議申立てはなかった。