

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-505636
(P2008-505636A)

(43) 公表日 平成20年2月28日(2008.2.28)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	A 4 B 02 4
C 07 K 14/18 (2006.01)	C 07 K 14/18	Z N A 4 C 08 4
A 61 K 39/00 (2006.01)	A 61 K 39/00	H 4 C 08 5
A 61 K 48/00 (2006.01)	A 61 K 48/00	4 H 04 5
A 61 P 1/16 (2006.01)	A 61 P 1/16	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く

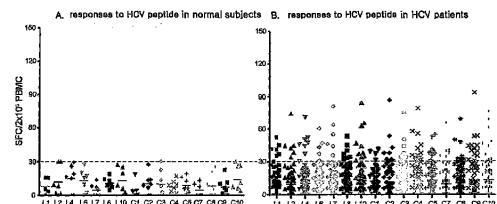
(21) 出願番号	特願2007-520225 (P2007-520225)	(71) 出願人	504385351 モガム バイオテクノロジー リサーチ インスティチュート 大韓民国 449-910 キョンギド、ヨン インシ、ギヒュンギ、ポジュンドン 341 番
(86) (22) 出願日	平成17年7月4日 (2005.7.4)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成19年3月5日 (2007.3.5)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(86) 國際出願番号	PCT/KR2005/002111	(74) 代理人	100116311 弁理士 元山 忠行
(87) 國際公開番号	W02006/004362	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 國際公開日	平成18年1月12日 (2006.1.12)		
(31) 優先権主張番号	10-2004-0051782		
(32) 優先日	平成16年7月3日 (2004.7.3)		
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HCV に有効な CTL 反応を誘導するスーパータイプのエピトープ、これをコードするオリゴヌクレオチド並びにそれらの用途

(57) 【要約】

本発明では、HCV に特異的な細胞傷害性 T リンパ球を効果的に誘導し、HCV のポリプロテインの保存領域に由来したスーパータイプのエピトープ、前記スーパータイプのエピトープをコードするオリゴヌクレオチドを含む発現ベクター、前記スーパータイプのエピトープまたは前記発現ベクターを含むワクチン組成物及び C 型肝炎の治療のためのその用途を提供する。本発明のスーパータイプのエピトープは多様な HLA 分子に結合して抗原特異的免疫反応を誘導することができるため、多様な対象に適用することができ、C 型肝炎ウイルスによる C 型肝炎の治療剤及びこれに係る肝疾患に対するワクチン開発のための強力で、且つ、効果的な道具として用いられることができる。また、HCV スーパータイプのエピトープをコードするオリゴヌクレオチドを含む発現ベクター及びこれを含む DNA ワクチンは肝炎及びこれに係る疾患に対する抑制された免疫反応に対して、強力且つ効果的な手段として用いられる。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

多様な HLA - A 及び HLA - B スーパータイプと反応することによって、細胞媒介性免疫反応を誘導する HCV スーパータイプのエピトープ。

【請求項 2】

前記エピトープが HCV のポリプロテイン (polyprotein) の保存的配列からなる請求項 1 に記載の HCV スーパータイプのエピトープ。

【請求項 3】

前記保存的配列が配列番号 1 ~ 16 のアミノ酸配列からなる群から選ばれるアミノ酸配列を有する請求項 2 に記載の HCV スーパータイプのエピトープ。

10

【請求項 4】

前記請求項 1 のスーパータイプのエピトープを含むワクチン組成物。

【請求項 5】

補因子 (cofactors) を更に含む請求項 4 に記載のワクチン組成物。

【請求項 6】

前記補因子が CD40LT、4-1BB、IL-15、FLT-3L、B7-1、B7-2 及び熱ショックタンパク質 (Heat shock protein) からなる群から選ばれる請求項 5 に記載のワクチン組成物。

【請求項 7】

前記請求項 1 のスーパータイプのエピトープを投与する段階を含む、C 型肝炎またはそのウイルスによって罹る肝疾患の予防及び治療方法。

20

【請求項 8】

前記請求項 1 に記載の HCV スーパータイプのエピトープをコードするオリゴヌクレオチド。

【請求項 9】

配列番号 17 ~ 32 に示されるヌクレオチド配列からなる群から選ばれるヌクレオチド配列を有する請求項 8 に記載のオリゴヌクレオチド。

30

【請求項 10】

前記請求項 8 のオリゴヌクレオチドを含むワクチン組成物。

【請求項 11】

前記請求項 8 のオリゴヌクレオチドを投与する段階を含む、C 型肝炎またはそのウイルスによって罹る肝疾患の予防及び治療方法。

【請求項 12】

前記請求項 8 のオリゴヌクレオチドを含む真核細胞発現ベクター。

【請求項 13】

補因子をコードする遺伝子を更に含む請求項 12 に記載の真核細胞発現ベクター。

【請求項 14】

前記補因子が CD40LT、4-1BB、IL-15、FLT-3L、B7-1、B7-2 及び熱ショックタンパク質からなる群から選ばれる請求項 13 に記載の真核細胞発現ベクター。

40

【請求項 15】

前記請求項 12 の発現ベクターを含むワクチン組成物。

【請求項 16】

前記請求項 12 の発現ベクターを投与する段階を含む、C 型肝炎またはそのウイルスによって罹る肝疾患の予防及び治療方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、細胞免疫性反応を効果的に誘導する HCV のスーパータイプのエピトープ及びその用途に関する。より詳しくは、HCV 特異的細胞傷害性 T リンパ球 (cytotoxic

50

T lymphocytes、CTL)によって媒介される免疫反応を効率的に誘導し、HCVのポリプロテイン(polyprotein)の保存領域に由来したスーパータイプ(supertype)のエピトープ、それをコード化するオリゴヌクレオチド、及びC型肝炎の治療及び予防のためのそれらの用途に関する。

【背景技術】

【0002】

C型肝炎ウイルス(hepatitis C virus、HCV)は、慢性肝疾患、肝硬変及び肝細胞癌の主要原因である。HCVに感染した患者の大半が慢性肝炎にかかり、これらは大体致命的な肝硬変や肝癌に発展する。全世界人口の3%以上、約1億7千万名がHCVに感染していると推定されている(Miller and Purcell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2057-2061, 2000)。HCV感染患者に対する従来の治療法はインターフェロン- (interferon-) あるいはリバビリン(ribavirin)を投与することである。しかし、インターフェロンの投与に対して効果的な患者の割合は約50%程度であり、これらの患者のうち50%はC型肝炎ウイルスが再発すると報告されている(Hino et al., J. Med. Virol. 42(3):299-305, 1994; Tsubota et al., Hepatology. 19(5):1088-94, 1994)。しかもインターフェロンは高価で入院治療が要求されるという短所がある。また、リバビリンは核酸誘導体であって、急性肝炎患者の場合は40~70%程度有効であるが、HCV感染による慢性肝炎患者には有効でない。

【0003】

これまで、HCVまたはHCV感染による慢性肝疾患に有効な治療法はまだ開発されていないため、HCV特異的抗ウイルス剤の開発が強く求められている。

【0004】

HCVは非A、非B型肝炎を引き起こすフラビ・ウイルス科(Flaviviridae)に属するウイルスである。HCVゲノムは約3,010個のアミノ酸からなるポリプロテイン(polyprotein)を発現する一本鎖RNAで構成されている(Choo et al., Science, 244:359-362, 1989)。HCVによって発現されるポリプロテインは宿主細胞とウイルスのプロテアーゼとによって相異する機能を有する10個のタンパク質に切断される。HCVはNH2-C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B-COOHの一連のタンパク質に相当する遺伝子から構成されている(Steven Rosenberg, J. Mol. Biol., 313:451-464, 2001)。前記タンパク質は、C(Core)、E1、E2及びp7を含む構造タンパク質と、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A及びNS5Bを含む非構造タンパク質とに分けられる。

【0005】

HCVのコア(C)タンパク質は、HCVゲノムRNAを取り巻く構造的役割を果し、また宿主細胞の遺伝子転写、成長及び増殖を調節することにより肝癌への進展に寄与すると思われている。E1及びE2タンパク質はタイプ1膜貫通タンパク質であって、細胞感染に深く関与しているウイルスエンベロープタンパク質である。E1タンパク質は抗体の無効化を誘導できなかったために、あまり注目されなかった。しかし、最近ベルギーのInogenetics社でE1タンパク質を治療用ワクチンとして開発し、チンパンジーを用いたこのワクチンの第1次臨床試験が成功的であったため、第2次臨床試験が行われている。E1タンパク質がアルファインターフェロンによっては非効果的である1bタイプのHCV感染にも有効であるということは有用な発現である。E2タンパク質はウイルスの主要外膜(envelope)タンパク質の一種であって、細胞受容体と推定されるCD81と結合し、宿主の免疫システム及びインターフェロン媒介抗ウイルス反応からの回避を可能にし、腫瘍発生(oncogenesis)あるいは自己免疫肝疾患(autoimmune liver disease)を引き起こす。従って、E2はHCVワクチン開発のための重要な抗原だけでなく、抗HCV薬剤開発のためにも主な標的である。P7タンパク質の機能はまだ知られていない。NS2タンパク質は金属プロテアーゼ(metallo-protease)の一部であり、NS3はウイルスのセリンプロテアーゼドメインをN-末端に、RNAヘリカーゼ(helicase)ドメインをC-末端に有している。NS4Aはウイルスプロテアーゼの補助因子(cofactor)であり、NS4Bは潜在的な腫瘍発生能を有することが本研究チームによって明らかになった。NS5AはHCV

10

20

30

40

50

に抗インターフェロン性を与える機能及び抗アポトーシス(antiapoptotic)機能を有する。N S 5 B はウイルスのRNA依存的RNAポリメラーゼとして機能する。N S 2 ~ N S 5 B を含む非構造タンパク質はウイルス複製を阻害する抗ウイルス剤の開発において主な標的になっている。

【0006】

一方、細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocytes, CTL)は感染された患者からウイルスを除去するための重要な役割を果たす。H B V に感染すると急性肝炎に進行するが、急性B型肝炎患者の大部分は強力な多クローン性CTL反応の誘導によって自然に治る。一方、慢性B型患者においてはCTL反応が起きない。

【0007】

持続的な慢性感染でもH C V 感染患者の肝及び末梢血内において、ウイルス特異的CTL反応が起きると知られているが、このようなCTL反応はウイルスを効果的に除去するにはかなり低い水準である。それにもかかわらず、ウイルス力価(titer)を分析してみると、H C V 特異的CTL反応がH C V 感染を調節することができ、H C V 特異的CTL反応を増幅させることにより効果的な抗ウイルス治療方法が開発可能であると思われる。

【0008】

CTL反応を誘導するエピトープ(epitope)に基づいたワクチンは、疾病の予防及び治療に有効な細胞性免疫反応を誘導することができる。抗原特異的エピトープあるいはこれをコードするDNA構造体を用いたワクチンは既存のワクチンよりも多くのメリットがある。第一に安全である、第二に全ウイルスまたはタンパク質抗原自体の使用に起因する突然変異による免疫反応の低下可能性はほとんどなく、第三に生産が容易であり、最後に病原体の多重抗原から由来したエピトープをワクチン組成物に含ませて多価ワクチンを作ることが可能である。

【0009】

しかし、H L A (human leukocyte antigen)に結合するエピトープの多様性及びH L A そのものの多型性(polymorphism)のため、前述したエピトープを用いたワクチン及び/または治療法の使用は制限されている。現在までウイルスの抗原特異的CD8+T細胞反応に関する研究は大体H L A - A 2陽性である患者に対して行われ、その分析もH L A - A 2から発見されるウイルスエピトープに限られた。

【0010】

細胞媒介性免疫反応を誘導するためにエピトープペプチドは抗原提示細胞(antigen presenting cell, APC)の表面上に主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex, MHC)と複合体を形成したまま露出していなければならぬ。このようなM H C - ペプチド複合体の構造をT細胞表面のT細胞受容体(T cell receptor, TCR)が認識してから初めてT細胞内部へ抗原認識に関する情報が伝達される。T細胞は抗原提示細胞の表面でCD40のリガンドであるCD40LとCD40との結合によって活性化される。CD40 - CD40Lを介した信号伝達は順次に抗原提示細胞に刺激を与えることでB7-1、B7-2等の共刺激分子(co-stimulatory molecule)を発現させる。その結果、T細胞もCD28、4-1BB、CD25等の活性分子を有するエフェクターT細胞(effector T cell)として機能するようになる。

【0011】

慢性肝炎患者の場合いくつかの免疫抑制が報告された。細胞媒介性免疫反応を促進することで知られている共刺激分子(co-stimulatory molecule)の発現が減少し、抗原提示細胞として知られている樹状細胞が未熟であり、ナチュラルキラー細胞(natural killer cell)の機能及び個数が減少する。従って、このような共刺激分子(co-stimulatory molecule)の投与によって細胞性免疫機能を高める方法を開発する方が効果的であるかもしれない。

【0012】

本発明者らは、樹状細胞の成熟を誘導すると知られているCD40Lの三量体(trimer)

10

20

30

40

50

形態であるCD40LT、CD8+T細胞の密度を増加させて記憶T細胞(memory T cell)の機能を高める4-1BBL、HCV患者に特に欠けている樹状細胞の成熟を誘導し、ナチュラルキラー細胞の機能を促進させるIL-15及びFLT-3L、エピトープ抗原を認識するに当たって重要な役割を果たすB7-1及びB7-2、並びにエピトープ提示過程を改善させる熱ショックタンパク質(Heat shock protein, HSP)のような補因子を用いることにより細胞性免疫機能を増大させようとした。

【0013】

抗原としてペプチドを利用する方法は全タンパク抗原を利用するよりも非常に安全で且つ効果的であるが、ここにはいくつかの制限がある。すなわち、ペプチドの合成及び精製費用が高く、特殊な抗原輸送機構が求められる。外因性ペプチド抗原は腫瘍抗原またはウイルス抗原のような内因性抗原からエピトープの発生過程全体を反映することができない。これらの抗原性はペプチドの物理的な性質によって左右される。一方、DNA抗原はペプチド抗原に比べて低コストであり、取り扱いが容易であり、特に抗原提示機構がなくても細胞内エピトープの発生、腫瘍抗原またはウイルス抗原の提示並びに認識過程を反映するというなどのメリットを有する。エピトープ抗原をオリゴヌクレオチド形態で真核細胞発現ベクターに挿入することで十分な細胞性免疫反応が誘導できるということは既に立証された(Cara C Wilson et al. J. Immunol., 171:5611-5623, 2003)。

10

【0014】

さらに、本発明者らは、前記免疫治療に基づいてエピトープの限界を克服し、HCV特異的CTL反応を誘導するために、モチーフ(motif)検索でHCVのポリプロテインの保存領域からスーパータイプのエピトープを考案し、前記スーパータイプのエピトープがHLA-A2型だけでなく他の種類のHLA-A及びHLA-B型にも結合して抗原特異的免疫反応を誘導することができることを確認した。また、本発明者らは前記スーパータイプのエピトープをコードするオリゴヌクレオチドを真核細胞発現ベクターに挿入することによってDNAワクチンを生産した。本発明者らは前記DNAワクチンがエピトープ抗原異の細胞媒介性免疫反応を増加させることを確認し、本発明を完成するに至った。

20

【非特許文献1】Miller and Purcell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 2057-2061, 2000

【非特許文献2】Hino et al., J. Med. Virol. 42(3):299-305, 1994; Tsubota et al., Hepatology. 19(5):1088-94, 1994

30

【非特許文献3】Choo et al., Science, 244:359-362, 1989

【非特許文献4】Steven Rosenberg, J. Mol. Biol., 313:451-464, 2001

【非特許文献5】Cara C Wilson et al. J. Immunol., 171:5611-5623, 2003

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0015】

本発明の目的は、HCVのポリプロテインの保存領域から由来し、多様なHLA型に対してHCV特異的細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocytes、CTL)によって媒介される細胞免疫反応を誘導するスーパータイプのエピトープを提供することである。本発明の他の目的は、前記スーパータイプのエピトープをコードする発現ベクターを用いてC型肝炎及び他の肝疾患の予防及び治療方法を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0016】

用語

ここで、本発明で用いられる用語の定義は下記の通りである。

エピトープ(epitope)：抗体、T細胞受容体(TCR)または主要組織適合性複合体(MHC)に結合する特定領域を意味する。抗原決定基(antigenic determinant)とも呼ばれる。

【0017】

スーパータイプのエピトープ(supertype epitope)：HLAサブタイプにかかわらず広

50

範囲な免疫反応を誘導する、すなわち H L A サブタイプに特異的なエピトープではないエピトープを意味する。

【 0 0 1 8 】

末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) : 末梢血単核細胞とは一つの核を有する血流内の細胞を指し、例えば、リンパ球やマクロファージがここに含まれる。

【 0 0 1 9 】

E L I S P O T 法 : E L I S A (enzyme-linked immunosorbent assay) に基づく免疫学的分析法である。しかし、両者には相違点がある。E L I S A はタンパク質に対する抗体を用いてタンパク質を定量する方法であるが、これに対し、E L I S P O T は、サイトカイン特異的抗体でコーティングされたニトロセルロースウェルで細胞を培養し、細胞から分泌されたウェルの底面のサイトカインを染色した後、細胞から分泌されたサイトカインスポット (spot) の数を測定することによってサイトカインを分泌する細胞の数を測定する方法である。E L I S P O T 法は主に免疫化された動物から得られた脾臓細胞の試料で活性化された抗原特異的細胞傷害性 T 細胞の量を測定するために用いられる。

10

【 0 0 2 0 】

樹状細胞 (dendritic cell) : 特徴的に神経細胞のような樹状突起を有し、T 細胞に抗原を効果的に輸送する専門的な抗原提示細胞である。肌で発見されるランゲルハンス細胞及びリンパ節の組織で発見される樹状顆粒細胞がこれに含まれる。

20

【 0 0 2 1 】

抗原提示細胞 (antigen-presenting cell, APC) : 外来抗原を提示する細胞である。これらは先天免疫 (innate immunity) 及び適応免疫 (adaptive immunity) を仲介する。抗原提示は抗原提示細胞の M H C 分子によって行われる。A P C の種類にはマクロファージ (macrophage)、B 細胞 (B cell)、樹状細胞 (dendritic cell)、ケラチノサイト (keratinocyte) などがある。

30

【 0 0 2 2 】

F A C S (flourescent activated cell sorting) : フローサイトメトリー (flow cytometry) とも呼ばれる。蛍光物質で標識した細胞を通しながら表光蛍光の強度を測定する方法であって、特定波長の蛍光を放出する細胞の数を正確に測定できる分析方法であり、これによって全細胞のうち特定細胞の割合を正確に測定することができる。

30

【 0 0 2 3 】

細胞内サイトカインの染色法 (intracellular cytokines staining, ICS) : 特定の刺激に対する反応時、T 細胞のサイトカイン生産能の分析方法である。通常のサイトカイン分泌経路が遮られ、サイトカインの細胞内蓄積が細胞内染色及び F A C S 分析によって測定される。

【 0 0 2 4 】

プロテアソーム (proteasome) : A T P 反応によってタンパク質を短いポリペプチド及びアミノ酸に切断できるポリプロテイン複合体であって、内部にタンパク質を切断のために取り込む空間である空洞 (cavity) と、両末端に標的タンパク質の導入のための入口とを有する。

40

【 0 0 2 5 】

抗原プロセッシング関連輸送タンパク (transporter associated with antigen processing; TAP) : プロテアソームで切断した抗原ペプチドをサイトゾルから E R へ移動させる膜貫通タンパク質である。抗原ペプチドは T A P によって E R に移動した後、M H C クラス I 分子に結合する。

【 0 0 2 6 】

T A P ツール (TAP tool) : T A P に係る過程を予測するための道具である。具体的には、特定抗原の処理結果及びそれから導出されるエピトープの配列の予測に用いられる道具である。T A P ツールは統計学的分析によるアルゴリズムによって、コンピューターソフトウェアで具現され、広義では T A P 結合予測道具、プロテアソームによるプロセッシ

50

グ予測道具及びE R内のアミノペプチダーゼによるフィニッシング(finishing)に対する予測道具を含み、狭義では、プロテアソームの関連過程の予測道具を意味する。本発明における前記道具はプロテアソームの関連過程の予測道具及びT A P結合予測道具を意味する。

【0027】

免疫学的有効量(immunologically effective amount)：免疫学的有効量とはH C Vに対する細胞媒介性免疫反応を誘導する量を意味する。具体的には、患者からH C V感染が撲滅できるか、又は、敏感性個体(sensitive individual)にとってH C V感染を予防できる量である。

【0028】

発明の概要

本発明の上記目的を達成するために、本発明は、多様なH L A - A及びH L A - Bスーパー・タイプと反応することにより細胞媒介性免疫反応を誘導するH C Vスーパー・タイプのエピトープを提供する。

【0029】

また本発明は、C型肝炎の予防および治療のためのH C Vペプチドエピトープの使用を提供する。

【0030】

さらに本発明は、有効量のスーパー・タイプのエピトープを患者に投与する工程を含む、H C V感染患者の治療方法あるいはH C V感染の予防方法を提供する。

【0031】

本発明は、H C Vエピトープをコードするオリゴヌクレオチド配列および該配列を含む発現ベクターも提供する。

【0032】

本発明は、C型肝炎の予防および治療のための、H C Vエピトープをコードするオリゴヌクレオチドを発現する発現ベクターの使用も提供する。

【0033】

本発明は、免疫学的に有効量の上記発現ベクターを投与する工程を含む、H C V感染患者の治療方法あるいはH C V感染の予防方法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0034】

発明の詳細な記載

これより本発明を詳細に説明する

本発明によれば、多様なH L A - A及びH L A - Bスーパー・タイプと反応することにより細胞媒介性免疫反応を誘導するH C Vスーパー・タイプのエピトープを提供する。

【0035】

本発明はまた、配列番号1～16のH C Vスーパー・タイプのエピトープを提供する。

【0036】

本発明はまた、配列番号17～32に示される前記H C Vスーパー・タイプのエピトープをコードする遺伝子を提供する。

【0037】

さらに本発明は、前記遺伝子を含むD N A発現ベクターを提供する。

【0038】

本発明者らは既存のエピトープ系の免疫治療の限界を乗り越え、H C V特異的細胞傷害性T細胞(C T L)の免疫反応を誘導するために、モチーフ(motif)検索によってH C Vのポリプロテイン(polyprotein)の保存領域からスーパー・タイプのエピトープを製造した。商業的に利用可能で、且つ、広範囲な人々に適用できるワクチンを開発するためには、多様な多型性H L A対立遺伝子に結合可能なスーパー・タイプのエピトープの使用が必須である。

【0039】

10

20

30

40

50

広範囲な効果のあるエピトープを用いる免疫治療剤の開発における最大の障害要因はH L A分子の多型性(polymorphism)である。エピトープが有用な免疫治療剤として用いられるためには、様々な種類のH L A分子と特異的に結合するか、あるいは、多様な人種集団に対して効果を奏しなければならない。これまで免疫治療剤の開発のために多数のエピトープを用いなければならなかったが、このような問題を解決するために、本発明者らは、エピトープ原ワクチンの開発に有用な多重H L A抗原分子に結合するスーパー・タイプのエピトープを開発した。エピトープを用いたワクチンが種々のH L A分子に結合すれば、ワクチンの効果はより広くて高くなる。本発明のスーパー・タイプのエピトープは多様なH L A分子と結合できることにより、大体の標的集団で完全な免疫反応を誘導する。

【0040】

10

細胞傷害性T細胞(C T L)が一般的にM H Cと結合した短い8～11個アミノ酸からなる短いペプチドを認識するという点で、本発明のスーパー・タイプのエピトープはH C Vに対する細胞媒介性免疫反応を増幅することのできる9個のアミノ酸からなる、配列番号1～16に示される16個のエピトープで構成される。

【0041】

本発明のスーパー・タイプのエピトープは、H C Vのポリプロテイン(polyprotein)の保存領域から由来し、A 1、A 2、A 2 4、A 2 6、A 3等のH L A - A分子及び、B 7、B 8、B 1 5、B 2 7、B 4 4、B 5 1等のH L A - B分子に対して高い結合能を有する。

【0042】

20

なお、本発明の配列番号1～16に示されるスーパー・タイプのエピトープは配列番号17～32に示される遺伝子配列によってコードされる。

【0043】

また、本発明のスーパー・タイプのエピトープはE L I S P O T分析法によって末梢血単核細胞(P B M C)で細胞傷害性T細胞の免疫反応を誘導することが確認された。

【0044】

一般に、活性化されたT細胞は、精巧な調節システムによってI L(インターロイキン)-2、I L - 4、I L - 5、I L - 1 0またはインターフェロン-(I F N -)を含む多数のサイトカインを分泌する。特異的抗原に対する細胞傷害性Tリンパ球の反応に関する最近の研究はE L I S P O T分析法(enzyme-linked immunosorbent spot assay)を用いて行われているが、この技術は単一細胞レベルでサイトカインの分泌を分析する方法であって、敏感性(sensitivity)及び特異性(specificity)の面において最も認められている方法の一つである。本発明ではサイトカインI F N - の分泌を促進する細胞媒介性免疫を調査するE L I S P O T分析法をペプチド特異的T細胞性免疫反応を調査するのに利用した。

30

【0045】

本発明では、サイトカインI F N - の分泌を促進するペプチド特異的T細胞媒介性免疫反応を調査するために、本発明のスーパー・タイプのエピトープを用いてE L I S P O T分析を行った。具体的には、健康な対照群から抽出した 2×10^5 個のP B M Cの分析を行った。その結果、陽性反応の平均値は12であった。本発明者らは前記平均値12の2倍の標準偏差を勘案し、陽性反応を示す下限値(cutting value)を30と規定した(図1参照)。

40

【0046】

H C Vに対するC T L活性化実験を通じてエピトープによってC T L反応が誘導されることが確認され、これはC T L媒介性免疫反応がエピトープによっても誘導され得ることを示す。E L I S P O T分析において、活性化の程度は一般的にエピトープを処理しなかった対照群の値を差し引くことによって算出する。しかし、患者によって対照群の値が相異するため、活性化された免疫反応の前記算出法は不正確な場合もある。本発明者らはエピトープによって誘導されるC T L媒介性免疫反応をより正確に測定するために、個別的にエピトープで処理した場合の値からエピトープで処理しなかった値を差し引くことによ

50

り活性化の程度を測定した。HCV患者の活性化の程度を健康な人の活性化の程度と比較した。ELISPOT分析を行い、免疫反応の活性化に対する更なる測定のために結果値を対照群として用いた(Heiner Wedemeyer et al., J. Immunol. 169;3447-3458, 2002)。すなわち、前記対照群の平均値を求め、平均値の2倍の標準偏差を勘案した上、陽性反応を示す下限値(cutting value)を決めた。

【0047】

実験に参加したHCV感染患者数は99人であった。前記算出法によって54人の患者が本発明のスーパータイプのエピトープの少なくとも一つに対して、陽性反応を示した(図1参照)。

【0048】

即ち、本発明の配列番号1～16に示されるスーパータイプのエピトープは多様なMHCと結合して多様な患者群から免疫反応を誘導することができ、誘導された免疫反応はHCV感染患者の治療に非常に有用である。

【0049】

また、本発明は、C型肝炎を予防及び治療に利用するHCVスーパータイプのエピトープの用途を提供する。

【0050】

本発明は、配列番号1～16に示されるスーパータイプのエピトープからなる群から選ばれる一つ以上のスーパータイプのエピトープを含むワクチン組成物を提供する。

【0051】

本発明のスーパータイプのエピトープは、DNAワクチン、治療タンパク質、組み換えウイルスワクチン及び樹状細胞(dendritic cells)と結合して、適切な免疫反応を効果的に誘導することで、ウイルスによるC型肝炎及び他の肝疾患の治療剤の開発に効果的に用いることができる。

【0052】

下記表1は全患者に対し、本発明の16個のスーパータイプのエピトープワクチンによって誘導される陽性免疫反応の割合を示す。

【表1】

スーパータイプのエピトープのMHC型別免疫反応の誘導頻度(n=99)(%)

	L1	L2	L4	L6	L7	L8	L10	C1	C2	C3	C4	C5	C7	C8	C9	C10	Ave.
HLA-A																	
A2	11.5	15.3	15.3	15.3	15.2	3.9	34.6	11.5	26.9	23.0	26.3	23.0	15.3	30.7	36.6	42.3	23.26
A24	8.8	12.5	16.6	8.3	12.5	2.6	20.8	4.16	33.3	35.0	28.1	28.1	16.6	32.1	28.1	25.0	20.0
A26	0	0	0	0	0	10.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6.25
A3	10.0	13.3	10.0	10.0	10.0	10.0	16.6	10.0	45.5	33.3	28.1	36.6	15.3	23.3	33.3	33.3	16.66
HLA-B																	
B7	11.7	5.3	23.5	11.7	17.5	11.5	23.5	11.7	17.6	22.4	22.4	22.4	11.5	35.2	23.5	23.5	20.54
B15	0	22.2	0	11.1	22.2	11.1	11.1	0	44.4	33.3	44.4	22.2	11.1	22.2	33.3	33.3	22.2
B27	0	25.0	0	0	25.0	25.0	0	0	0	0	0	0	0	25.0	25.0	25.0	23.7
B44	33.3	11.1	22.2	11.1	11.1	22	11.1	22.2	22.2	22.2	44.4	11.1	22.2	22.2	11.1	22.2	20.1
B51	10.0	2.8	30.0	30.0	20.0	3.0	20.0	30.0	30.0	40.0	50.0	60.0	40.0	50.0	30.0	50.0	35.6

10

20

30

40

50

【0053】

99人の患者を16個のエピトープを用いて治療した結果、HLA-A2型の患者の場合は23.26%、HLA-A24型の患者の場合は20.0%、HLA-A26型の患者の場合は6.25%、HLA-A3型の患者の場合は19.35%が陽性反応を示した。HLA-B型の患者のうち、HLA-B7型の患者の場合は20.54%、HLA-B15型の患者の場合は22.2%、HLA-B27型の患者の場合は9.97%、HLA-B44型の患者の場合は20.1%、B51型の患者の場合は35.6%が陽性反応を示した。前記結果は本発明の各スーパーイプのエピトープが多様なHLA型の他の患者群から前記の割合(%)で陽性免疫反応を誘導することができることを示す。

【0054】

また、前記結果は本発明のスーパーイプのエピトープが多様なHLA型を有する患者からHCV特異的な細胞性免疫を誘導することができるため、HLA-A2にのみ限られたエピトープを用いることで排除された他の種類のHLA型の治療にも用いられることを示している。

【0055】

本発明のスーパーイプのエピトープは、複数のコピーを含むホモポリマーまたは多様なペプチドのヘテロポリマーとしてワクチン組成物に個別的に含まれ得る。このポリマーは免疫反応を増加させて病原体の抗原決定基または免疫反応に係る標的エピトープに対するCTL反応を誘導する。前記ワクチン組成物は抗原の天然発生領域から製造されるか、組み換えまたは化学的合成によって製造することができる。また、本発明によるワクチン組成物は補因子(cofactor)を更に含むことができる。前記補因子は特に制限されないが、樹状細胞の成熟を促進すると知られているCD40Lの三量体(trimer)形態であるCD40LT、CD8+T細胞の個数を増加させ、特に記憶T細胞の機能を向上させると知られている4-1BB-L、HCV患者に特に欠けている樹状細胞の成熟及びナチュラルキラー細胞の機能を増進させるIL-15及びFLT-3L、エピトープ抗原を認識するにあたって重要な役割を果たすB7-1及びB7-2、並びにエピトープ提示を促進させるHSP(heat shock protein)が好ましい。

【0056】

本発明のワクチンとともに用いられ得る担体の例としては、通常の担体、例えばサイログロブリン、ヒト血清アルブミン、破傷風トキソイド、及びポリ-L-リジン、ポリ-L-グルタミン酸のようなポリアミノ酸などが挙げられる。ワクチンは水や食塩水のように生理学的に許容可能な希釈剤を含み、好ましくはリン酸緩衝生理食塩水を更に含むことができる。また、通常的にワクチンはフロイント不完全アジュvant、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウムまたはミョウバンのような通常的なアジュvant(adjuvant)を含む。

【0057】

本発明によるエピトープワクチン組成物は皮内、表皮、皮下、腹腔内または筋肉内注射、経口投与または鼻腔接種などの様々な経路を通じて投与されることにより、大量の抗原特異的CTLを生成する。その後、宿主は感染及び慢性感染への進展が抑制できる免疫反応を示すようになる。

【0058】

また、本発明のワクチンはエピトープ担体として樹状細胞(DC)を含む。まず、樹状細胞は本発明のエピトープをコードするDNAトランスフェクション(transfection)させるか、各エピトープペプチドでパルス処理する。その後、生体内免疫反応を誘導するために抗原の内在された樹状細胞を患者に投与する。

【0059】

また、DNAあるいはペプチドを含むワクチン組成物の投与によって樹状細胞の生体内負荷/loading)が可能である。

【0060】

本発明のワクチン組成物はIFN-などのような免疫調節物質あるいは慢性ウイルス感染に用いられる他の治療剤と組み合わせて用いることができる。

10

20

30

40

50

【0061】

さらに、本発明のスーパー・タイプのエピトープをコードするオリゴヌクレオチドを含む本発明のワクチンは、抗原誘導細胞媒介性免疫反応を提供することができる。抗原がオリゴヌクレオチド形態である場合には、細胞内で合成されたポリペプチドは本発明によるエピトープの形態で処理されなければならない。細胞質内で合成されたポリペプチドはプロテアーゼ複合体であるプロテアソーム(proteosome)によって8～11個のアミノ酸からなる小ペプチドに切られる。これらが主要組織適合性複合体に担持されて細胞表面に露出されることによって、エピトープとしての役割を果たすようになる。少なくとも一つ以上のエピトープがオリゴヌクレオチドを介して生体内で合成される際、適当な細胞内プロセシングのためにアミノ酸をコードする一つ以上のコドンを5末端に挿入することができる。適切に切断できるか否かは下記ウェブサイトにより提供される予測プログラムを用いて予測可能である：

10

NetChop:<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetChop/>

ParProc:<http://www.paprocc2.de/paprocc1/paprocc1.html>

FragPredict:<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/MAPPP/expertquery.html>.

【0062】

一つ以上のエピトープをコードするオリゴヌクレオチドは真核細胞発現ベクターに挿入し、細胞内で抗原として用いられ得る。遺伝子を発現するためのベクターとしてはよく周知の真核細胞発現ベクターを使用でき、プロモーターとしては周知のCMVプロモーター、P_ff-1プロモーターまたはSV40プロモーターなどを使用できる。エピトープを含む発現ベクターを動物に注射した時、各エピトープに対する個別的な免疫反応が成功的に誘導されることは既に立証されている(Cara C. Wilson et al., J. Immunol., 171;56 11-5623, 2003)。

20

【0063】

また、本発明の発現ベクターには前記補因子をコードする遺伝子を更に含むことができる。前記補因子は樹状細胞の成熟を促進すると知られているCD40Lの三量体(trimer)形態であるCD40LT、CD8+Tの細胞数を増加させ、特に記憶T細胞の機能を亢進させると知られている4-1BBL、HCV患者に特に欠けている樹状細胞の成熟及びナチュラルキラー細胞の機能を向上させるIL-15及びFLT-3L、エピトープ抗原を認識するにあたって重要な役割を果たすB7-1及びB7-2、及びエピトープ提示を促進させるHSP(heat shock protein)であることが好ましい。前記補因子をコードする遺伝子は前記スーパー・タイプのエピトープをコードするオリゴヌクレオチドを含む発現ベクター内に挿入することができ、別途の発現ベクターを介しての同時接種も(co-vaccination)可能である。

30

【0064】

本発明のワクチンの免疫学的有効量を患者に投与することができる。具体的に、前記ワクチンは患者一人当たりに1回以上の投与が可能であり、単回投与量は好ましくはスーパー・タイプのエピトープの含有量が1～250μgであり、より好ましくは5～50μgである。一方、本発明のスーパー・タイプのエピトープがこれをコードするオリゴヌクレオチドを含む発現ベクターとして投与される場合、好ましくはエピトープの含有量が100ng～100μgであり、より好ましくは1～50μgが有効量として含まれる。

40

【0065】

ベストモード

以下の実施例に示されるように、本発明の好ましい実施態様を説明する。

しかしながら、当業者は、本開示を考慮して、本発明の精神および範囲において変更および改良を行うことができる。

【実施例1】

【0066】

細胞媒介性免疫反応を促進するHCVのスーパー・タイプのエピトープの製造

本発明者らは細胞傷害性T細胞(CTL)が一般にMHCと結合した8～11個のアミ

50

ノ酸からなる短ペプチドを認識するという点に基づいて、HCVに対する細胞媒介性免疫反応が促進できるそれぞれ9個のアミノ酸からなる16個のペプチドを用いてスーパー タイプのエピトープを製造した。

【0067】

具体的に、周知のMHC結合モチーフに基づいて、HCVのポリプロテイン(polyprotein)の保存的領域から由来し、A1、A2、A24、A26及びA3の5種類のHLA-A分子、及びB7、B8、B15、B27、B44及びB51の6種類のHLA-B分子に対して特に高い結合力を示す、配列番号1～16の16個のエピトープを製造した。Peptron社(Peptron Inc., 韓国)が合成した前記各ペプチドのアミノ酸配列はHCV1a及びbサブタイプ内の配列と一致した。これらの合成されたペプチドは各々逆相HPLCによって95%まで精製し、100%のDMSOに20mg/mlの濃度で溶解し、その溶液を細胞培養のために更にRPMI1640培地で1mg/mlまでに希釈した。

10

【0068】

また、本発明者らは前記HCVペプチドエピトープをコードする配列番号17～32に示される遺伝子配列を調査して確認した。

【実施例2】

【0069】

HCV患者における多様なMHCタイプに対するスーパー タイプのエピトープの結合能抗原を提供する細胞表面のHLA分子とペプチドとの結合はT細胞活性のために必須的である。従って、前記実施例1で製造した16個のペプチドが実際に多様なMHCと結合して免疫反応を誘導することができるか否かを確認するために、ヨンセー医療院(Yonsei University Medical Center, ソウル, 韓国)のHCVに感染された患者99人を対象として実験を行った。これらの患者の抗HCV抗体を含むセロコンバージョン(seroconversion)はHCV ELLISAテストシステムによって確認され、HCV RNAの存在をRT-PCRで確認した。その結果、感染患者のALT(alanine aminotransferase)活性が6倍もより高く、他の原因によって慢性肝疾患を患う可能性のある患者を排除した。対照群としてはHCVあるいはHBVに感染していない8人の健康な人から採取した血液を用いた。すべての実験群及び対照群のHLAクラスIタピングはSSP HLA DNAタピングトレイ(One Lambda社製)を用いて行われた。

20

【0070】

HCV患者から血液を採取して末梢血単核細胞(peripheral blood mononuclear cells、PBMC)をFicoll-Histopaque密度勾配遠心分離法(Sigma, St. Louis, Mo)で分離し、分離された細胞をHBSS(Life technologies社製、Grand Island, NY)で3回洗浄した後、直ちに実験に用いるか、90%FCS(Life technologies社製)と10%DMSO(Sigma)とを添加して液体窒素タンク内に保管した。

30

【0071】

前記HCV患者の末梢血単核細胞を用いて本発明のスーパー タイプのエピトープとHLA-A及びHLA-B分子との結合を調査、その結果を表2に示した。

【表2】

PCV感染患者のPBMC及び陽性反応を示すペプチドエピトープの頻度

ID	配列	HCVタンパク質	位置	陽性反応患者数／特定MHCタイプの保有患者数									
				HLA-A分子				HLA-B分子					
				A2	A1	A24	A26	A3	B7	B8	B15	B27	
L1	KLQKWKDIL	Core	118	3/26		2/24	0/1	3/30	2/17	0/9	0/4	3/9	1/10
L2	YVQGQVHRL	E2	632	4/26		3/24	0/1	4/30	1/17	2/9	1/4	1/9	2/10
L4	YAAQGQYKVL	NS3	1244	4/26		4/24	0/1	3/30	4/17	0/9	0/4	2/9	3/10
L6	KVRQHYYGVGV	E2	628	4/26		2/24	0/1	3/30	2/17	1/9	0/4	1/9	3/10
L7	ELIFDQTKL	NS2	883	5/26		3/24	0/1	3/30	3/17	2/9	1/4	1/9	2/10
L8	ALPQRAYAN	E2	802	7/26		5/24	1/1	3/30	3/17	1/9	1/4	2/9	2/10
L10	LLILAKGPL	NS2	891	9/26		5/24	0/1	6/30	4/17	1/9	0/4	1/9	2/10
C1	TAGARLWVL	NS3	1338	3/26		1/24	0/1	3/30	2/17	0/9	0/4	2/9	2/10
C2	KCDELRAAKL	NS3	1399	7/26		3/24	0/1	7/30	3/17	4/9	0/4	2/9	3/10
C3	AQBYKVLVVL	NS3	1246	6/26		6/24	0/1	10/30	5/17	5/9	0/4	2/9	4/10
C4	AIEGPLMVF	NS2	894	7/26		7/24	0/1	7/30	5/17	4/9	0/4	2/9	5/10
C5	TILQIGTYL	NS3	1326	6/26		7/24	0/1	11/30	5/17	3/9	0/4	4/9	6/10
C7	YVQGQVHNL	NS2	933	4/26		4/24	0/1	4/30	3/17	1/9	0/4	1/9	4/10
C8	MALHKKLAAL	NS2	936	5/26		7/24	0/1	7/30	6/17	2/9	1/4	2/9	5/10
C9	AA8C660AVF	NS2	816	9/26		7/24	0/1	10/30	4/17	3/9	1/4	2/9	7/10
C10	FVBLALLTL	NS2	823	11/26		6/24	0/1	10/30	4/17	3/9	1/4	1/9	6/10

【0072】

エピトープとHLA分子との結合を測定するために、最近多用されているMHC安定化分析法(stabilization assay)を用いた。具体的に、エピトープとHLA-A-Aとの結合を調査するために、27で12時間以上本発明のスーパータイプのエピトープをT2及びRMA-s細胞株で処理した結果、MHC分子とエピトープとの結合が安定化した。その後、37で3時間の間さらに反応させた結果、本発明のスーパータイプのエピトープで処理された実験群が対照群に比べてより安定なエピトープとMHC分子との結合を示した。しかし、エピトープが添加されていない場合、または結合力の弱いエピトープで処理した場合は、MHC分子との結合が容易に消滅した。また、エピトープとMHC分子との完全な複合体を認識する抗体を用いてFACS(fluorescent activated cell sorting)分析を行った結果、高い結合能を有する本発明のエピトープがHLA分子との結合によって免疫反応を誘導すると判断された。

【0073】

本発明のスーパータイプのエピトープはA1、A2、A24、A26及びA3の5種類のHLA-A分子及び、B7、B8、B15、B27、B44及びB51の6種類のHLA-B分子に対して高い免疫誘導能を有するものを選別して製造した。しかし、HCV患者99人のMHC型を分析した結果A1またはB8型を有する患者は存在しなかった。9種類のMHC型の中で配列番号1のL1は7個、配列番号2のL2は8個、配列番号3のL4は6個、配列番号4のL6は7個、配列番号5のL7は8個、配列番号6のL8は8個、配列番号7のL10は7個、配列番号8のC1は6個、配列番号9のC2は7個、配列番号10のC3は7個、配列番号11のC4は7個、配列番号12のC5は7個、配列番号13のC7は7個、配列番号14のC8は8個、配列番号15のC9は8個、そして配列番号16のC10は8個のMHC型でそれぞれ陽性反応を示した。患者一人に少なくとも2個～4個の異なるHLA型が存在し得るという事実を考慮するとき、生体内(in vivo)で発生する多様なHLA型に対するスーパータイプのエピトープの反応頻度は、一つのMHC型に対して反応するエピトープの頻度に比べて遥かに高い。

【0074】

10

20

30

40

50

前記実験結果は本発明のスーパー・タイプのエピトープが多様なタイプのMHCと結合することができるため、多様なHCV感染患者内で細胞媒介性免疫反応を誘導することができることを示す。

【実施例3】

【0075】

末梢血単核細胞(PBMC)を用いたELISPOT分析方法によるT細胞の免疫反応の調査

一般的に、活性化されたT細胞は精密制御システムにより多様なサイトカインの分泌を誘導する。特異的抗原に対するCTL反応は、酵素結合免疫スポット(enzyme-linked immunosorbent spot, ELISPOT)法でモニターするが、この方法は単一細胞レベルにおいて生産されるサイトカインの測定において最も敏感で且つ特異的な方法である。本発明ではペプチド特異的T細胞免疫反応を調査するに効果的なサイトカインインターフェロンガンマ- (interferon-, IFN-) の分泌を促進する細胞免疫を測定するためにELISPOT分析を用いた。

【0076】

具体的に、前記実施例2と同様な方法で分離して格納したPBMCを解凍し、R-10培地(10%FCS、2mM L-グルタミン、50U/mlペニシリン及び50μg/mlストレプトマイシンを含むRPMI1640培地)で37℃で一晩中常温処理した。また、96ウェルニトロセルロースプレート(Millipore社製、USA)の表面に5μg/mlのヒト組み換え抗IFN-α抗体(BD pharmingen)をロードし、PBS(phosphate-buffered saline)内で4℃で一晩中常温処理した。PBSでプレートを洗浄し、各ウェルに5%のFCSが含まれたPBSを加えて常温で2時間放置してプロッキングした。本発明のスーパー・タイプのエピトープの最終濃度が10μg/mlになるようにR-10培地で希釈した後、各ウェルに100μlずつ添加した。PBMCはR-10培地で2×10⁶cells/mlに再懸濁して各ウェルに100μlずつ分株した。37℃で24時間プレートを常温処理し0.05%のトウイーン20を含むPBSで洗浄した。各ウェルにヒトIFN-α(BD Pharmingen)に特異的なビオチンが結合されたmAbを3μg/ml濃度で100μlずつ添加し、プレートを常温で2時間放置させた。前記プレートをさらに洗浄し、ストレプトアビシン-ペルオキシダーゼ複合体(Streptavidin-peroxidase complex, Kirkegaard & Perry Laboratories社製)を添加し、常温で放置した。反応終了後、AEC(3-amino-9-ethyl carbazole)基質溶液を用いて着色を誘導させた。適当なサイズのスポット(spot)が観察された後、水道水を用いて着色反応を終了させた。常温で96ウェルプレートを乾燥した後、顕微鏡でIFN-αを分泌する細胞数を測定した。前記プレートを一晩中乾燥した後、ELISPOTリーダー(AID)で細胞数を測定した。ペプチド特異的なIFN-αのスポット(spot)の数はその合計から対照群のIFN-αのスポット(spot)の数を差し引いて決定した。各実験は3回行った。

【0077】

前記サイトカインIFN-αを促進するペプチド特異的T細胞活性化に対するELISPOT分析結果、健康な人を対象とした対照群では反応を示した平均値が12であった。本発明者らは前記平均値12の2倍の標準偏差を勘案した上、このように計算された30を陽性反応を示す下限値(cutting value)として規定した(図1)。例えば、2×10⁵個のPBMCでELISPOT分析を行った時、30個以上のSFCs(spot producing cells)を示す結果のみを陽性と見なした。

【0078】

図1に示すように、テストした総患者数は99名であり、全患者のうち54名が本発明のスーパー・タイプのエピトープの少なくとも一つに対して陽性反応を示した。図1Aは正常対照群において各スーパー・タイプのエピトープに対する反応を示したグラフであり、図1Bは患者79名が各エピトープタイプに対する陽性免疫反応を示したグラフである。

【実施例4】

【0079】

10

20

30

40

50

P B M C の I C S (intracellular cytokine staining) 分析方法を用いた記憶 T 細胞(memory T cell) の免疫反応の調査

一般的にウイルス性疾患を患う慢性患者の血液内に存在する活性 T 細胞の活性度を測定するのは難しい。そのため、本発明のスーパー・タイプのエピトープが患者の血液内で記憶 T 細胞(memory T cell) の反応を誘導できるか否かは非常に重要な問題である。従って、本発明者らは本発明のスーパー・タイプのエピトープに対する記憶 T 細胞の活性を測定した。

【 0 0 8 0 】

具体的には、前記実施例 2 と同様な方法で分離して格納した P B M C を解凍し、R - 10 培地 (10% F C S、2 mM L - グルタミン、50 U / m l ペニシリン及び 50 μ g / m l ストレプトマイシンを含む R P M I 1 6 4 0 培地) を用いて 37^o で再懸濁した。96 ウェルプレート (Millipore社製) に 5×10^5 c e l l / 1 0 0 μ l の濃度になるよう 10 に細胞を分株した。本発明のスーパー・タイプのエピトープの最終濃度が 20 μ g / m l になるよう R - 10 培地で希釈した後、各ウェルに 1 0 0 μ l ずつ分株し、各ウェルごと 20 に組み換えされた I L - 1 5 (recombinant human IL-15, R&D) を 1 0 n g / m l の濃度で加えた。プレートを 37^o で 5 日間常温処理した後、I F N - 1 5 を細胞内に封入するため 20 に最後の 6 時間は分泌抑制剤 (Golgi-Stop, BD Pharmingen) で処理し、さらにスーパー・タイプのエピトープを添加して培養した。細胞を収集してから、特異的で且つ F I T C (Fluorescence Isothiocyanate) が結合されたヒト C D 8 抗体を、1% F B S (Gibco社製) を含む P B S で 1 0 0 倍に希釈して 4^o で 30 分間反応させた。反応終了後の細胞を前記緩衝液で洗浄し、ホルムアルデヒド (formaldehyde) を含む固定液 (Cytofix/Cytoperm, BD Pharmingen) で 4^o で 30 分間固定し、洗浄用緩衝液 (Perm/Washbuffer, BD Pharmingen) で 2 回洗浄した。ヒト I F N - 1 5 (BD Pharmingen) に特異的で且つ R - P E (R-pyroerythrin) が結合されたモノクローナル抗体を 2 0 0 倍希釈して各ウェルに 1 0 0 μ l ずつ添加し、4^o で 30 分間懸濁させた。反応終了後、得られた細胞をさらに洗浄し、フローサイトメーター (FACS caliber, Becton Dnckinson社製) を用いて 3 万個の細胞を測定し、ソフトウェア (CellQuest, Becton Dnckinson社製) を用いて分析した。対照群としては従来用いられたペプチドを用いて正常人の血液からの記憶 C T L 反応を調査した (図 2)。

【 0 0 8 1 】

図 2 に示すように、前記記憶 T 細胞の I F N - 1 5 分泌を促進するペプチド特異的 T 細胞活性化に対する I C S 分析結果、対照群の C D 8 + 細胞のうち I F N - 1 5 を分泌する細胞が平均 0.47% であり、本発明者らは前記平均値 (0.47%) の 2 倍の標準偏差を勘案して陽性反応を示す下限値 (cutting value) を 1% に決めた。

【 0 0 8 2 】

前記結果から、本発明のスーパー・タイプのエピトープは従来の H C V 特異的エピトープよりも更に効果的に記憶 T 細胞を活性化させ得ることを確認した。

【 実施例 5 】

【 0 0 8 3 】

スーパー・タイプのエピトープをコードする発現ベクターの作製

プロセッシング順序を決めるために、スーパー・タイプのエピトープのオリゴヌクレオチド配列である配列番号 1 7 ~ 3 2 のうち 1 0 個の配列をプロテアソーム (ParProc: <http://www.paprocc2.de/paprocc1/paprocc1.html>) 及び T A P ツール (TAPPred, <http://www.imtech.res.in/raghava/tappred/>) を用いて選別した。このようにして決定したプロセッシング順序を図 3 に示す。本発明者らは、図 3 に示すように細胞内で前記エピトープが切断されるように、5' 末端に 2 個のアミノ酸をコードするコドンを挿入した。前記決定された抗原配列順に P T D S (PCR-based Two-steps DNA synthesis) 方法でオリゴヌクレオチドを合成した。この時、図 3 に示した手順に沿って 1 0 個のオリゴヌクレオチド (配列番号 3 3 ~ 4 2) を合成した後、第 1 正方向のオリゴヌクレオチド (配列番号 3 3) と第 5 逆方向のオリゴヌクレオチド (配列番号 4 2) を各々 4 0 p m o l e 、及び残り 8 個のオリゴヌクレオチド (配列番号 3 4 ~ 4 1) 1 p m o l e を混合した後、M g S O 4 (2 mM) 40 を加え、50 37^o で 10 分間 PCR した。

、d N T P (各0.2mM)、10×P C R緩衝液(1×)、白金T a gポリメラーゼ(Gibco-BRL)2Uを添加してP C Rを行った。P C Rは94℃で2分間予備変性させた後、更に94℃で15秒間変性、50℃で30秒間アニーリング(annealing)、68℃で1分間重合する段階を29回繰り返し、最後の伸長反応は68℃で5分間行った。P C R産物は4℃で保管した。得られた二本鎖のP C R産物1μlは配列番号33の第1正方向プライマーと配列番号42の第5逆方向プライマーとからなるプライマーセットと共に2次P C Rに用いられ、具体的には40pmolの各プライマーを1次P C Rと同様に、M g S O₄、d N T P、白金T a gポリメラーゼと混合した。2次P C Rは94℃で2分間予備変性させた後、更に94℃で15秒間変性、55℃で30秒間アニーリング(annealing)、68℃で1分間重合する段階を24回繰り返し、最終の伸長反応は68℃で5分間行い、得られたP C R産物は4℃で保管した。D N A配列分析を通じて最終P C R産物が図3に示されている配列(配列番号43)を有することを確認した。前記P C R産物をp c D N A3.1/V5-H i s T O P O発現ベクターにクローニングした。下記表3は合成に用いられたオリゴヌクレオチドの配列を整理したものである。

【表3】

スーパータイプのエピトープをコードするオリゴヌクレオチドの合成に用いられたプライマー

オリゴヌクレオチドの番号	配列	長さ
1(第1正方向)	5'-gtttaaacgcgcaccatggaaatgcaggtgcagatccaga gcctgttttctctctctgt-3'	配列番号33
2(第1逆方向)	5'-ggcaggaaaggcggccttcctctggacccggcaccacag gaggaggcagaaacaggc-3'	配列番号34
3(第2正方向)	5'-gaaaggccgccttcctgcctccgacttcttccccagctga aggcccagggtacaagggtgtgggtgtgaagctg-3'	配列番号35
4(第2逆方向)	5'-cagcttggccgcagctcgactgcgttgcgttgcggggcc caggatggccagcagcgttcagcaccagcacct-3'	配列番号36
5(第3正方向)	5'-acgagctggccccaagctaaacatggccctgtgaagctgg ccgcccgtgaacttcgtggcctggccctgtgacc-3'	配列番号37
6(第3逆方向)	5'-cacctttagccctggcggcgtagttcatggcttagccct ggggggcaggcccttcagggtcagcaggccaggccca-3'	配列番号38
7(第4の正方向)	5'-ccgcccagggtacaagggtgtgaacgcgccttcgtggcg gcgcgttgtcaaggccgcatactgcagatggcc-3'	配列番号39
8(第4逆方向)	5'-cagggaggccttcagcacgtgcgtgcggatggc cttcagcttcatcagggccatctgcacgttaggcgg-3'	配列番号40
9(第5正方向)	5'-accgtgtgaaggccctccctgtatggcccttcaccgcgcgtg aaggacctgtggctacatccccctgtgacgcgttgagttaaac-3'	配列番号41
10(第5逆方向)	5'-gtttaaacactcaacgcgtcaccag-3'	配列番号42

【0084】

慢性肝炎患者において細胞媒介性免疫反応によって感染したウイルスを殺すのは非常に難しい。このような慢性肝炎患者においては細胞性免疫反応を促進することで知られている補因子の発現が非常に低く、これは抗原提示細胞として知られている樹状細胞が未成熟である原因の一つである。また、このような患者にはナチュラルキラー細胞(natural killer cell)の数も少なく、その細胞機能が抑制されている。そのため、補因子をコードする遺伝子と共にトランスフェクションして細胞媒介性免疫機能を高めようとする研究が試みられてきた。従って、本発明では樹状細胞の成熟を促進すると知られているC D 4 0 Lの三量体(trimmer)形態であるC D 4 0 L T、C D 8 + T細胞数を増加させ、特に記憶T細

10

20

30

40

50

胞の機能を高めると知られている 4 - 1 B B L、H C V 患者に特に欠けている樹状細胞の成熟及びナチュラルキラー細胞の機能を増強させる I L - 1 5 及び F L T - 3 L、エピトープ抗原を認識するにあたって重要な役割を果たす B 7 - 1 及び B 7 - 2、並びにエピトープ提示を促進させる H S P (heat shock protein) 分子を補因子として用いた。また、前記補因子をコードする遺伝子と前記合成された D N A 断片とをそれぞれ真核細胞発現ベクターである p c D N A 3 . 1 に挿入し、その結果得られた産物を大量生産して精製した上、実験に用いた(図 3 参照)。このような補因子のクローニングのためにマウス樹状細胞及びマウス脾細胞(splenocyte)から R N A を分離し、これを鑄型としてプライマーセットを用いた R T - P C R を行った。具体的には、前記 P C R は各 4 0 p m o l e の正方向プライマーと逆方向プライマー、c D N A 2 μ g、5 0 m M M g S O ₄ 2 μ l (最終濃度 2 m M)、1 0 m M d N T P 1 μ l (それぞれ 0 . 2 m M)、及び 5 U / μ l 白金 T a g ポリメラーゼ 0 . 4 μ l (2 U) を混ぜて、最終体積を 5 0 μ l にした。P C R は、9 4 で 2 分間予備変性させた後、更に 9 4 で 1 5 秒間変性、表 4 に示されている温度で 3 0 秒間アニーリング(annealing)、6 8 で 1 分間重合する段階を 2 9 回繰り返し、最終の伸長反応は 6 8 で 5 分間行った。得られた P C R 産物は 4 で保管した。

【表 4】

補因子のクローニングに用いられたプライマー及びアニーリング温度

補因子	プライマー	プライマーの配列	アニーリング温度
ELT3L	Forward	5'-gagtttaaacggccaccatgacagtgtggccacaggcttgg-3'	55°C
	Backward	5'-tcgtttaaacttacctggccggggctctggagctccg-3'	
4-1BBL	Forward	5'-gagtttaaacggccaccatggaccaggcacacacttgatgtgg-3'	50°C
	Backward	5'-tcgtttaaactcattccatgggttgtcggtttcaca-3'	
IL-15	Forward	5'-gagtttaaacggccaccatgaaaatttgaaaccatataatggaaaata-3'	50°C
	Backward	5'-tcgtttaaactcaggacgtttgatgaacatttggacaa-3'	
CD80	Forward	5'-gagtttaaacggccaccatggcttgcatttgtcaattgtgg-3'	55°C
	Backward	5'-tcgtttaaacctaaggaaagacggctgttcagctaatg-3'	

【0085】

C D 4 0 L 三量体は 4 回連続 P C R を通じてクローニングした。表 5 に示されたように、全体 C D 4 0 L を p c D N A 3 . 1 / V 5 - H i s T O P O 発現ベクターにクローニングし、これを細胞外ドメイン(extracellular domain)にあたるアミノ酸 1 1 1 ~ 2 6 0 のクローニングのための 2 次 P C R における鑄型として用いた。三量体を作るために I L - 7 リーダー配列(leader sequence)とロイシンジッパー モチーフ(leucine zipper motif)とを有する配列を 3 次 P C R を行ってクローニングした後、2 次 P C R 産物と 3 次 P C R 産物とを結合するために 4 次 P C R を行った。P C R 条件は前記補因子のクローニング条件と同様で、プライマーの濃度及びアニーリングの温度は用いた一対のプライマーを考慮して調整した。P C R 産物は p c D N A 3 . 1 / V 5 - H i s T O P O 発現ベクターにクローニングし、D N A 配列分析を通じて塩基配列を確認した。

10

20

30

40

【表5】

CD三量体のクローニングに用いられたプライマー

オリゴヌクレオチドの番号	配列	長さ
1 (第1正方向)	5'-gagtttaaacgcccaccatgttccatgtttcttttagatatac tttggaaattccctccactga-3'	65 mer
2 (第1逆方向)	5'-gtcgctgttgttagatgtgtgacaggcagcagaacaaggatcagt ggaggaattccaaagatatactta-3'	70 mer
3 (第2正方向)	5'-gtcacatcatctaccaggcagcagcaggatgaaggatcgaggaca agatcgaggagatcctgagcaag-3'	69 mer
4 (第2逆方向)	5'-gccgatcagcttcttgcgttgcgttgcgttgcgttgtgttag atcttgtcaggatctccctcgatctt-3'	72 mer
5 (第3正方向)	5'-gccaggatcaagaagctgatggcgagaggctgctggaaatgcaaa gaggtgatgaggatcctcaa-3'	66 mer
6 (第3逆方向)	5'-tcgtttaaaccttagatgtttagtaagccaaaagatgagaagcc-3'	43 mer
7 (第4正方向)	5'-gagtttaaacgcccaccatgtatagaaacatacagccaaacctcc -3'	46 mer

10

20

30

40

【表6】

CD40LTのPCR反応条件

回次	プライマー	配列	プライマー濃度	アニーリング温度
第1次 PCR	第4正方向	5'-gattttaaacgcccaccatgtatagaaacatacagccaaacctcc ttcc-3'	50 pmole	55°C
	第3逆方向	5'-tcgtttaaaccttagatgtttagtaagccaaaagatgagaagcc -3'	50 pmole	
第2次 PCR	第3正方向	5'-gccaggatcaagaagctgatggcgagaggctgctggaaatgcaaa caaaagatgtgaggatcctcaa-3'	20 pmole	60°C
	第3逆方向	5'-tcgtttaaaccttagatgtttagtaagccaaaagatgagaagcc -3'	20 pmole	
第3次 PCR	第1正方向	5'-gattttaaacgcccaccatgttccatgttttttagata tatctttggaaattccctccactga-3'	40 pmole	60°C
	第1逆方向	5'-gtcgctgttgttagatgtgtgacaggcagcagaacaaggat caggatggaaattccaaagatatactta-3'	1 pmole	
	第2正方向	5'-gtcacatcatctaccaggcagcagcaggatgaaggatcgaggaca gagatcgaggagatcctgagcaag-3'	1 pmole	
	第2逆方向	5'-gccgatcagcttcttgcgttgcgttgcgttgtgttag atcttgtcaggatctccctcgatctt-3'	40 pmole	
第4次 PCR	第1正方向	5'-gattttaaacgcccaccatgttccatgttttttagata tatctttggaaattccctccactga-3'	20 pmole	60°C
	第3逆方向	5'-tcgtttaaaccttagatgtttagtaagccaaaagatgagaagcc -3'	20 pmole	

【実施例6】

【0086】

エピトープをコードするDNAが導入された樹状細胞を用いたT細胞の免疫反応の調査
生体内でT細胞が外来抗原を認識するにあたっては抗原提示細胞(antigen presenting cell, APC)の役割が非常に重要である。抗原提示細胞として働く細胞には、B細胞、マクロファージ(macrophage)、樹状細胞(dendritic cell)などがある。特に、樹状細胞は最も代表的なAPCである。本発明では、試験管内で成熟させた樹状細胞を作った。エピトープ発現ベクターを大腸菌(E. coli)で増幅した後、エンドトキシンフリーキット(endotoxin free kit, Qiagene)を用いて精製してから、1 μg / μlとなるように濃度を調節し

50

て実験に用いた。

【0087】

電磁ビーズ(magnetic beads)を用いてウイルス感染患者の血液からCD14陽性単核細胞(monocyte)を分離し、分離された単核細胞を 1×10^6 細胞/ウェルの濃度で6ウェルプレートに加えて、ヒト組み換えIL-4(1000U/ml)とヒト組み換えGM-CSF(1000U/ml)を添加して37℃で8日間培養した。3日目に細胞培養液の50%をサイトカインと共に置換し、6日目にはサイトカインを含む単球ならし培地(monocyte conditioned medium)を加えて樹状細胞の成熟を誘導した。8日目に細胞の一部を採取し、成熟樹状細胞の細胞表現型(CD14⁻, CD80⁺, CD86⁺, CD83⁺, CD1a⁺, Class I^{high}, Class II^{high})を確認した上で実験に用いた。

10

【0088】

遺伝子導入(gene transfection)に用いられるエピトープ発現ベクターは分光光度計(spectrophotometer)によって A_{260} / A_{280} の比率が1.6以上の高純度であることを確認した。 1×10^6 個の細胞に4μgの発現ベクターをエレクトロポレーター(electroporator, NucleofectorTM, Amaxa社製)を用いてトランスフェクションし、収率は共に導入された緑色蛍光タンパク質GFP(green fluorescence protein)を発現する細胞数の測定によって60%以上であることを確認した。

【0089】

エピトープ発現ベクターによってトランスフェクションされた樹状細胞と、同一患者のPBMCとを1:10の比率で混ぜて37℃で培養してから5日後に細胞を採取し、ELISPOT分析法を用いてT細胞の免疫活性を測定した(図4)。DNAがポリペプチドの形態で細胞質内で発現されれば、TAPによって単一エピトープペプチドに切断され、抗原提示細胞(Antigen presenting cell)は各エピトープペプチドを認識するようになる。そのため、各個別エピトープを提示する標的細胞は、全DNAによって体外免疫(in vitro vaccination)された血液によっても各エピトープによる免疫活性を測定するのに非常に有用である。

20

【実施例7】

【0090】

動物モデルにおける共刺激分子による免疫増大効果の確認

共刺激分子を本発明のスーパータイプのエピトープとともに動物に導入した時、細胞媒介性免疫反応が増加するか否かを確認するために、HLA-A2.1遺伝子導入マウスを用いてDNA免疫を行った。前記実施例5で製造したスーパータイプのエピトープ発現ベクター及び補因子発現ベクターをPBSで1μg/μlの濃度に再懸濁し、50:50の割合で混合した。免疫効果の増大のため、8週齢のマウスの前脛骨筋(tibialis anterior)に10uM/100μlの心臓毒性(cardiotoxin)を注射し、2日後に前記スーパータイプのエピトープ発現ベクターと補因子発現ベクターとを50:50の比率で混合して製造したDNA混合物を同じ部位に100μgずつ注射した。7日後、同量のDNAで追加免疫(boosting)し、追加免疫してから14日後に各マウスから脾細胞(splenocyte)を分離して 1×10^7 細胞/ウェルの濃度で12ウェルプレートに加えた後、RPMI-10培地で培養した。各エピトープペプチドを10μg/mlずつ各ウェルに添加してから3日に組み換えマウスIL-2(Calbiochem社製、ドイツ)を10ng/mlの濃度で添加した。培養5日目には全細胞を採取して 1×10^5 cells/100μlの濃度でRPMI-10培地で再懸濁し、抗マウスIFN- γ がコーティングされた96ウェルプレートの各ウェルに分株した。A2.1形質転換マウスから分離した脾臓細胞を3000rad放射線で照射し、各スーパータイプのエピトープ50μg/mlを37℃で1時間の間パルス(pulsing)した。その結果得られた細胞を 3×10^5 個ずつ各ウェルに分株した。実施例3と同様な方法でELISPOT分析を行った。この際、ウェルをコーティングするのに用いられる抗体はラット抗マウスIFN- γ 抗体(BD Pharmingen, CA)、ビオチン化した抗マウスIFN- γ 抗体(BD Pharmingen, CA)及びストレプトアビジン(streptavidin)-HRPO(BD Pharmingen, CA)であった。

30

40

50

【0091】

図5に示すように、エピトープDNAのみを注射した場合に比べて、補因子と共に注射した場合がより強い細胞媒介性免疫反応を示し、特にCD40LT、IL-15、4-1BBL、CD80などを同時に投与した場合に免疫効果が増大した。

【0092】

本発明の配列番号1～16のスーパータイプのエピトープは、多様なMHCと結合して多様な患者群から免疫反応を誘導することができ、エピトープ抗原がオリゴヌクレオチド形態で提供されても十分な免疫反応を誘導すると結論づけられる。本発明のスーパータイプのエピトープによって誘導された免疫反応は、HCVに感染した患者を治療できるほど十分に効果的であることが立証された。

10

【0093】

配列の説明

配列番号1～16は、それぞれL1,L2,L4,L6,L7,L8,L10,C1,C2,C3,C4,C5,C7,C8,C9,C10のペプチド配列であり、

配列番号17～32は、それぞれL1,L2,L4,L6,L7,L8,L10,C1,C2,C3,C4,C5,C7,C8,C9,C10のDNA配列であり、

配列番号33～42は、スーパータイプのエピトープをコードするオリゴヌクレオチドの合成に用いられたプライマー配列であり、

配列番号43は、スーパータイプのエピトープの配列であり、

配列番号44～51は、補因子のクローニングに用いられたプライマー配列であり、

配列番号52～58は、CD40三量体クローニングに用いられたプライマー配列であり、

20

配列番号59～68は、CD40LTクローニングに用いられたプライマー配列である。

【産業上の利用可能性】

【0094】

前述したように、本発明はHCV特異的な細胞傷害性Tリンパ球(cytotoxic T lymphocytes, CTL)によって媒介される細胞性免疫反応を誘導し、HCVのポリプロテイン(polyprotein)の保存領域から由來したスーパータイプのエピトープに関する。本発明のスーパータイプのエピトープは、多様なHLA分子に結合して抗原特異的な免疫反応を誘導することができ、多型のHLAを有する多様な患者に効果的である。また、前記エピトープをコードする発現ベクターも細胞媒介性免疫反応を誘導することができ、HCVによる肝炎及びこれに係る肝疾患に対するワクチンを含む治療剤の開発にも有用である。

30

【図面の簡単な説明】

【0095】

【図1】正常群及びHCV患者群からサイトカインIFN- γ 分泌を促進するペプチド特異的T細胞活性化に対する本発明のスーパータイプのエピトープの効果をELISPOTで分析した結果を示すグラフである。

30

【図2】正常群及びHCV患者群からサイトカインIFN- γ 分泌を促進するペプチド特異的記憶T細胞活性化に対する本発明のスーパータイプのエピトープの効果を示すICS分析結果である。

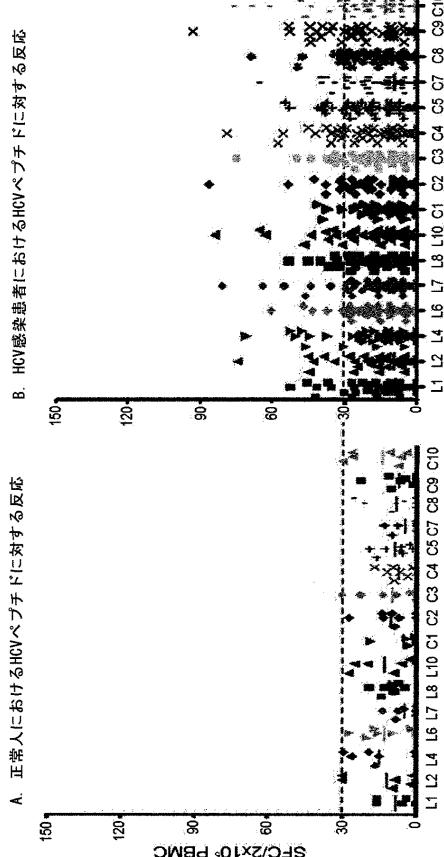
40

【図3】本発明のスーパータイプのエピトープ及び補因子をコードするそれぞれのオリゴヌクレオチド配列が導入された本発明の発現ベクターを示す概略図である。

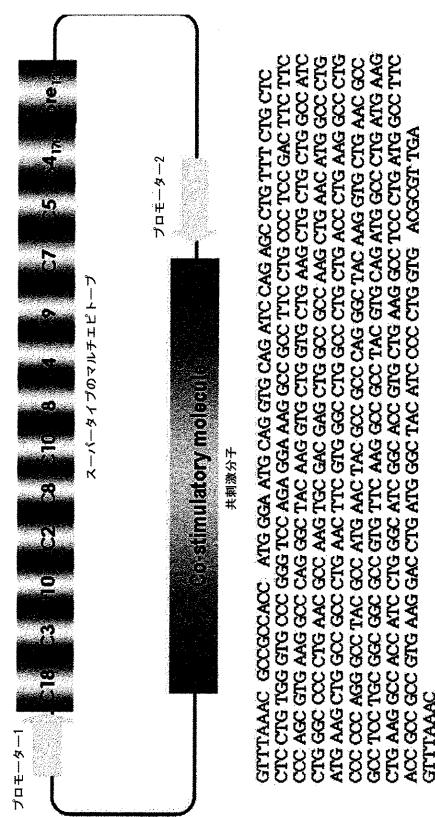
【図4】図3の発現ベクターを患者血液から分離した樹状細胞にトランスフェクションしてエピトープ抗原を提供することによってHCV患者においてサイトカインIFN- γ 分泌を促進するペプチド特異的T細胞活性化を示すELISPOT分析結果である。

【図5】A2.1でトランスフェクションしたマウスに図3の発現ベクターを注入することによって誘導される免疫反応の程度を、脾臓細胞から分泌されるIFN- γ 濃度と比較したELISPOT分析結果を示すグラフである。

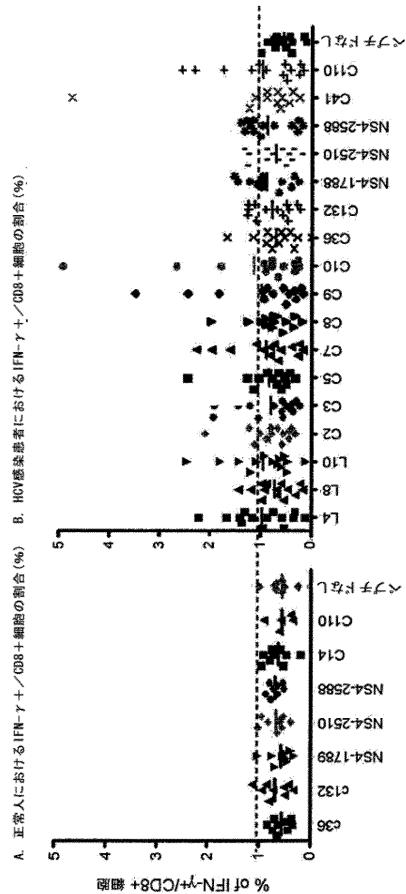
【図1】



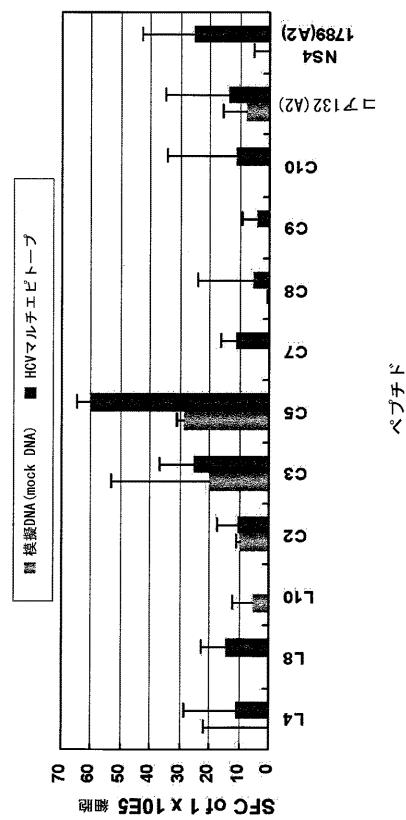
【 図 3 】



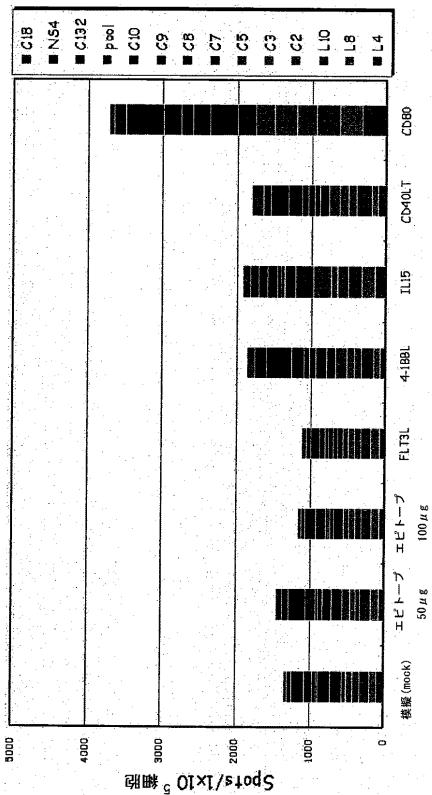
【図2】



【 図 4 】



【図5】



【配列表】

2008505636000001.xml

【手続補正書】

【提出日】平成19年3月5日(2007.3.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008505636000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2005/002111
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC7 C07K 7/06		
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)		
IPC7 C07K 7/06		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Korean Patents and applications for invention since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
eKIPASS, NCBI PubMed database, Delphion Research Intellectual Property Network database		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kyong-Mi Chang, et al. 'Identification of HLA-A3 and -B7-restricted CTL response to Hepatitis C Virus in patients with acute and chronic hepatitis C' <i>Journal of Immunology</i> , Vol. 162(2): 1156-1164 (15. Jan. 1999), See the whole document.	1 - 4, 8, 9
Y	Ke JS, et al. 'Enhancement of cellular immune response to DNA vaccine encoding hepatitis C virus core and envelope 2 fusion antigen by murine Fms-like tyrosine kinase 3 ligand' <i>Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao</i> . Vol. 19(2): 158 - 162 (Mar. 2003), See the whole document.	5, 6, 12 - 15
A	Jong, J. Kim, et al. 'Engineering DNA vaccines via co-delivery of co-stimulatory molecule genes' <i>Vaccine</i> , Vol. 16(19): 1828 - 1835 (1998), See the whole document.	5, 6, 12 - 15
A	Ken-ya Murata, et al. 'Expression of the co-stimulatory molecule BB1, the ligands CTLA-4 and CD28 and their mRNAs in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy' <i>Brain</i> , Vol. 123:1660 - 1666 (2000), See the whole document.	5, 6, 12 - 15
A	Cara C. Wilson, et al. 'Development of a DNA vaccine designed to induce cytotoxic T lymphocyte responses to multiple conserved epitopes in HIV-1' <i>The Journal of Immunology</i> , Vol. 171:5611 - 5623 (2003), See the whole document.	1 - 4, 8, 9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 14 OCTOBER 2005 (14.10.2005)	Date of mailing of the international search report 18 OCTOBER 2005 (18.10.2005)	
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer JEONG Eui Jun Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2005/002111

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of :
- a. type of material
- a sequence listing
 table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- on paper
 in electronic form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the international application as filed
 filed together with the international application in electronic form
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2005/002111

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.: 7, 11, 16
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 7, 11 and 16 relate to a method for prevention and treatment of hepatitis C or liver disease related to the virus. The subject-matter of claims 7, 11 and 16 do not require an international search with respect to industrial applicability as it is directed to a method of treatment of the human body(Article 17(2)(a)(i), Rule 39.1(iv)).
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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 31/14 (2006.01) A 6 1 P 31/14

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KZ,LC,LK,LR,LS,L,T,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ファン・ユキヨン

大韓民国 135-941ソウル、カンナムク、イルウォンボンドン 739番、チョンソル・ビル
 ジ・ナンバー 107-304

(72) 発明者 キム・ナムキュン

大韓民国 330-814キュンギド、ヨンインシ、キフンウプ、シンアルリ、セチョンニヨン・グ
 リーンビル・5ダンジ・ナンバー 504-1002

(72) 発明者 パク・ジュンミン

大韓民国 449-160キョンギド、ヨンインシ、ジュクジヨンドン 513-12番、パークビル
 ・ナンバー 203

(72) 発明者 リム・オクジェ

大韓民国 140-902ソウル、ヨンサンク、ファムドン 290-2番

(72) 発明者 パク・マーンフン

大韓民国 449-150キョンギド、ヨンインシ、サムスン・チェルビル・シンボンドン・ナンバ
 -202-501番

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA33 CA02 HA17

4C084 AA13 NA14 ZA752 ZB332

4C085 AA03 BB07 DD62

4H045 AA11 AA30 BA09 CA02 DA86 EA31 FA10