

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4976294号  
(P4976294)

(45) 発行日 平成24年7月18日 (2012. 7. 18)

(24) 登録日 平成24年4月20日 (2012. 4. 20)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 0 7 K 7/06 (2006. 01)

C 0 7 K 7/06

A 6 1 K 38/00 (2006. 01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 39/235 (2006. 01)

A 6 1 K 39/235

A 6 1 P 31/20 (2006. 01)

A 6 1 P 31/20

請求項の数 14 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-529522 (P2007-529522)  
 (86) (22) 出願日 平成18年8月3日 (2006. 8. 3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2006/315376  
 (87) 国際公開番号 W02007/015540  
 (87) 国際公開日 平成19年2月8日 (2007. 2. 8)  
 審査請求日 平成21年7月27日 (2009. 7. 27)  
 (31) 優先権主張番号 特願2005-226033 (P2005-226033)  
 (32) 優先日 平成17年8月3日 (2005. 8. 3)  
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 390004097  
 株式会社医学生物学研究所  
 愛知県名古屋市中区栄四丁目5番3号  
 (74) 代理人 100102978  
 弁理士 清水 初志  
 (74) 代理人 100119507  
 弁理士 刑部 俊  
 (74) 代理人 100128048  
 弁理士 新見 浩一  
 (74) 代理人 100129506  
 弁理士 小林 智彦  
 (74) 代理人 100130845  
 弁理士 渡邊 伸一  
 (74) 代理人 100142929  
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞傷害性T細胞エピトープペプチド及びその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アデノウイルスサブグループBに対する細胞傷害性T細胞を誘導するための、HLA-A24分子拘束性のペプチドであって、該ペプチドはアデノウイルスサブグループCと交差反応せず、さらに該ペプチドが、配列番号：4または配列番号：3に記載のアミノ酸配列を含むものである、ペプチド。

【請求項 2】

請求項1に記載のペプチドをコードする核酸。

【請求項 3】

請求項1に記載のペプチドを有効成分として含む、アデノウイルスの感染を治療又は予防するためのワクチン。

【請求項 4】

請求項2に記載の核酸を有効成分として含む、アデノウイルスの感染を治療又は予防するためのワクチン。

【請求項 5】

請求項1に記載のペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞を有効成分として含む、アデノウイルスの感染を治療又は予防するためのワクチン。

【請求項 6】

請求項1に記載のペプチドもしくは該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞により末梢血リンパ球を刺激して得られるアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞を有効成分と

10

20

して含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤。

【請求項 7】

請求項 1 に記載のペプチドから調製した主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血リンパ球とを反応させ、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞傷害性 T 細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性 T 細胞を有効成分として含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤。

【請求項 8】

請求項 1 に記載のペプチドで単離された末梢血を刺激し、該ウイルスに特異的な細胞傷害性 T 細胞を取得し、単離された細胞傷害性 T 細胞が産生するサイトカイン及び／又はケモカイン及び／又は細胞表面分子を測定することを特徴とする、アデノウイルスに特異的な細胞傷害性 T 細胞の定量方法。

10

【請求項 9】

請求項 1 に記載のペプチドから主要組織適合性抗原複合体-テトラマーを調製し、主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと単離された末梢血とを反応させることを特徴とする、該末梢血中のアデノウイルスに特異的な細胞傷害性 T 細胞の定量方法。

【請求項 10】

請求項 1 に記載のペプチドを用いて被検者から単離された末梢血において細胞傷害性 T 細胞を誘導することを特徴とする、細胞傷害性 T 細胞の誘導方法。

【請求項 11】

20

請求項 1 に記載のペプチドと、末梢血単核球を血漿を含む培地中で接触させることにより、アデノウイルス特異的な細胞傷害性 T 細胞を誘導する、請求項 10 に記載の誘導方法。

【請求項 12】

請求項 1 に記載のペプチドもしくは該ペプチドを HLA に提示した抗原提示細胞により単離された末梢血リンパ球を刺激してアデノウイルス特異的な細胞傷害性 T 細胞を取得する工程を含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤の製造方法。

【請求項 13】

請求項 1 に記載のペプチドから調製した主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと単離された末梢血リンパ球とを反応させ、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞傷害性 T 細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性 T 細胞を取得する工程を含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤の製造方法。

30

【請求項 14】

請求項 1 に記載のペプチドを使用し作製される主要組織適合性抗原複合体-テトラマー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アデノウイルスに特異的な細胞傷害性 T 細胞エピトープペプチド、該ペプチドを用いたアデノウイルスの感染を治療又は予防するワクチン、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤に関する。

40

【背景技術】

【0002】

アデノウイルスは、肺炎を代表とする呼吸器感染症、プール熱や流行性角結膜炎を代表とする眼感染症、胃腸炎などの腸管感染症、出血性膀胱炎や尿道炎等の泌尿生殖器感染症などの原因ウイルスで、新生児では重篤な症状を起こす場合もある。しかし成人に対しては適切な治療が施される限り、重症化することは稀で、比較的安全なウイルスベクターとして、遺伝子治療やワクチン開発の研究に用いられている。ところが、先天性免疫不全、HIV (human immunodeficiency virus) 感染や移植等により免疫的に無防備状態の場合は、肝炎、肺炎、脳炎、出血性膀胱炎を引き起こし、患者の予後と死亡率に多大な影響を与

50

えている（非特許文献1～3参照）。

#### 【0003】

近年、骨髄バンクと臍帯血バンクの拡充により、非血縁者間あるいは臍帯血を利用した造血幹細胞移植が著しく増加している。例えば移植後1ヶ月以内は、細菌や真菌による敗血症、単純ヘルペスウイルス（herpes simplex virus；HSV）による口内炎が生じやすい。移植後1～6ヶ月頃には、ヒトサイトメガロウイルス（human cytomegalovirus；HCMV）による間質性肺炎や肝炎、アデノウイルスによる出血性膀胱炎、水痘带状疱疹ウイルス（varicella-zoster virus；VZV）による带状疱疹、エプスタイン-バーウイルス（Epstein-Barr virus；EBV）によるBリンパ球増殖性疾患（B-cell lymphoproliferative disorder；BLPD）などを発症する危険性が高い。このような感染症を如何に制御するかという問題が移植の成功を左右しており、移植現場では感染症に対する対策は最重要課題と言える。細菌や真菌に対しては抗生物質の投与により、HSV、HCMV、VZVは効果的な抗ウイルス薬を前処置として投与することでかなりの部分で解決が見られる。しかし、抗ウイルス薬耐性のHCMV感染症やBリンパ球増殖性疾患、アデノウイルスによる感染症に対しては長らく有効な治療法が存在しなかった。

10

#### 【0004】

最近になって、抗ウイルス薬耐性のHCMV感染症やBLPDに対して、原因となるウイルス感染細胞を排除し得る免疫担当細胞を患者体内に輸注する、いわゆる細胞免疫療法の試みが始まり効果を上げつつある（非特許文献4～6参照）。しかしながら依然としてアデノウイルス感染症に対しては有効な治療法が存在せず、対症かつ支持的な治療に留まっており、一部でドナーリンパ球輸注療法が試み始められているだけである（非特許文献7及び8参照）。

20

#### 【0005】

このような医療事情と社会的背景において、アデノウイルスを安全にかつ有効に制御する新しい方法が強く望まれている。

【非特許文献1】Flomenberg P, 外3名著、「Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus.」、J Infect Dis.、1995年、Vol.171、p.1090-1096

【非特許文献2】Hale GA, 外6名著、「Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation.」、Bone Marrow Transplant.、1999年、Vol.23、p.277-282

【非特許文献3】Howard DS, 外7名著、「Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients.」、Clin Infect Dis.、1999年、Vol.29、p.1494-1501

30

【非特許文献4】Einsele H, 外13名著、「Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy.」、Blood.、2002年、Vol.99、p.3916-3922

【非特許文献5】Heslop HE, 及びRooney CM.著、「Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease.」、Immunol Rev.、1997年、Vol.157、p.217-222

【非特許文献6】Walter EA, 外6名著、「Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor.」、N Engl J Med.、1995年、Vol.333、p.1038-1044

【非特許文献7】Hromas R, 外4名著、「Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation.」、Blood.、1994年、Vol.84、p.1689-1690

40

【非特許文献8】Chakrabarti S, 外4名著、「Adenovirus infections following hematopoietic cell transplantation: is there a role for adoptive immunotherapy?」、Bone Marrow Transplant.、2000年、Vol.26、p.305-307

#### 【発明の開示】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

本発明はこのような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、アデノウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞エピトープペプチド、該ペプチドを用いたアデノウイルスの感

50

染を治療又は予防するワクチン、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤、及びアデノウイルスに特異的なCTLの定量方法の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは上記課題を解決するため鋭意研究を行った。

アデノウイルス感染細胞の活動を制御している主な免疫担当細胞は細胞傷害性T細胞 (Cytotoxic T cell ; CTL、以下CTLと称する) である。CTLはアデノウイルス感染細胞を発見し、それを破壊する能力を持っているため、その機能を有効に活用すれば、アデノウイルス関連疾患の新しい診断と治療法の開発につながる可能性が高いと考え本発明技術の開発の糸口とした。

10

【0008】

アデノウイルスは、51タイプの血清型が報告されており、6種類のサブグループ (A～F) に分類される。病原性が高いのはサブグループA、B及びCに分類されるタイプのウイルスである (Flomenberg P, Piaskowski V, Truitt RL, Casper JT., Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus., J Infect Dis., 1995;171:1090-1096, Carrigan DR., Adenovirus infections in immunocompromised patients., Am J Med., 1997;102:71-74)。

【0009】

先天性免疫不全、エイズ患者、移植後の免疫抑制剤の作用により免疫無防備状態にある人において、肝炎、肺炎、脳炎、出血性膀胱炎等を引き起こし、患者の予後と死亡率に多大な影響を与えているアデノウイルスは、サブグループBに分類されるタイプが最も多く報告されている。

20

【0010】

本発明者らはアデノウイルス遺伝子の中で最も相同性の高いヘキソン蛋白質を用いて、サブグループBに属するアデノウイルス特異的なエピトープペプチドと、アデノウイルス全般に特異性を示すエピトープペプチドを同定することに成功し、本発明を完成させた。

【0011】

本発明者らによって同定されたエピトープペプチドは、アデノウイルス特異的なCTLを効率的に誘導させる機能を有し、該ペプチド及び該ペプチドをコードする核酸は、アデノウイルスの感染を治療又は予防するためのワクチン (能動免疫療法剤) として有用である。

30

【0012】

また、本発明のこれらのエピトープペプチドによって誘導されるCTLは、アデノウイルス感染細胞を特異的に破壊する機能を有し、受動免疫療法剤の成分として非常に有用である。

【0013】

さらに、該エピトープペプチドを用いることにより、アデノウイルスに特異的なCTLを定量することが可能である。アデノウイルスに特異的なCTLが、ハイリスクの患者の末梢血に存在するか否かを知ることは、抗ウイルス剤や免疫抑制剤の適正な使用を含め、これらの感染症管理の上で重要な情報である。本発明者らによって、エピトープペプチドを利用したCTLの定量方法が提供された。

40

【0014】

また、本発明者らによって同定されたエピトープペプチドのアミノ酸配列を基に、所望の機能 (例えば、アデノウイルス特異的なCTL誘導能) を保持する範囲内で、適宜、該ペプチドを改変させることが可能である。本願によって具体的に開示されたペプチドに対して、一般的な遺伝子工学技術を用いて、適宜アミノ酸を改変することは容易である。また、本願のペプチドに対して改変されたペプチドの中から、所望の機能を有するペプチドあるいは該ペプチドを提示する細胞を選択することは、当業者においては通常の試行の範囲内である。即ち、本願によって具体的に開示されたペプチドの構造を基に、アデノウイルス特異的なCTL誘導能を保持する種々の形態の分子 (ペプチド等) を作製することが可能

50

である。さらに、該ペプチドを適宜改変することにより、よりCTL誘導能が強い、あるいはよりアデノウイルス感染細胞に対する特異性の高いCTLを誘導可能な分子を作出することも可能である。

【0015】

即ち本発明は、アデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞エピトープペプチド、該ペプチドを用いたアデノウイルスの感染を治療又は予防するワクチン、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤、及びアデノウイルスに特異的なCTLの定量方法に関し、より詳しくは、

- 〔1〕 アデノウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞エピトープペプチド、
- 〔2〕 アデノウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞エピトープペプチドが配列番号：1 10  
～6からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むものである、〔1〕  
に記載のペプチド、
- 〔3〕 配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数の  
アミノ酸が置換、欠失、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであっ  
て、アデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し得る機能を有することを特徴とす  
る、〔1〕に記載のペプチド、
- 〔4〕 HLA-A\*2402分子、HLA-Cw\*0401分子あるいはHLA-Cw\*0702分子の拘束性抗原ペプチ  
ドであって、HLA-A\*2402分子、HLA-Cw\*0401分子あるいはHLA-Cw\*0702分子との複合体を細胞  
表面に提示する細胞を特異的に認識しうるT細胞レセプターを有する細胞傷害性T細胞  
を誘導し得る機能を有することを特徴とする、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載のペプチ  
ド、 20
- 〔5〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドをコードする核酸、
- 〔6〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む、アデノウイル  
スの感染を治療又は予防するためのワクチン、
- 〔7〕 〔5〕に記載の核酸を有効成分として含む、アデノウイルスの感染を治療又は予  
防するためのワクチン、
- 〔8〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞を有  
効成分として含む、アデノウイルスの感染を治療又は予防するためのワクチン、
- 〔9〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドもしくは該ペプチドをHLAに提示し  
た抗原提示細胞により末梢血リンパ球を刺激して得られるアデノウイルス特異的な細胞傷  
害性T細胞を有効成分として含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤、 30
- 〔10〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドから調製した主要組織適合性抗原  
複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血リンパ球とを反応させ  
、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞  
傷害性T細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性T  
細胞を有効成分として含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤、
- 〔11〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドで末梢血を刺激し、該ウイルスに  
特異的な細胞傷害性T細胞を取得し、細胞傷害性T細胞が産生するサイトカイン及び／又  
はケモカイン及び／又は細胞表面分子を測定することを特徴とする、アデノウイルスに特  
異的な細胞傷害性T細胞の定量方法、 40
- 〔12〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドから主要組織適合性抗原複合体-  
テトラマーを調製し、主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血とを反応させるこ  
とを特徴とする、該末梢血中のアデノウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞の定量方法、
- 〔13〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドを用いて細胞傷害性T細胞を誘導  
することを特徴とする、細胞傷害性T細胞の誘導方法、
- 〔14〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドと、末梢血単核球を血漿を含む培  
地中で接触させることにより、アデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞を誘導する、〔1  
3〕に記載の誘導方法、
- 〔15〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドもしくは該ペプチドをHLAに提示  
した抗原提示細胞により末梢血リンパ球を刺激してアデノウイルス特異的な細胞傷害性T 50

細胞を取得する工程を含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤の製造方法、  
〔16〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のペプチドから調製した主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血リンパ球とを反応させ、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞傷害性T細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性T細胞を取得する工程を含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤の製造方法、を提供するものである。

#### 【0016】

さらに本発明は、本発明に記載のペプチド、該ペプチドをコードする核酸、該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞、該ペプチドもしくは該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞により末梢血リンパ球を刺激して得られるアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞、または該ペプチドから調製した主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血リンパ球とを反応させ、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞傷害性T細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性T細胞のいずれかを投与する工程を含む、アデノウイルスの感染を治療または予防する方法に関する。あるいは本発明は、本発明に記載のペプチド、該ペプチドをコードする核酸、該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞、該ペプチドもしくは該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞により末梢血リンパ球を刺激して得られるアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞、または該ペプチドから調製した主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血リンパ球とを反応させ、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞傷害性T細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性T細胞のいずれかの、アデノウイルスの感染を治療または予防するためのワクチンまたはアデノウイルスに対する受動免疫療法剤（免疫治療剤）の製造における使用に関する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0017】

【図1】抗HLA抗体を用いてHLA型を判定した結果の一例を示す図である。左からHLA型の判定結果、その判定結果の根拠となる抗HLA-A\*24抗体で染色した結果のヒストグラム展開図、抗HLA-A\*2抗体で染色した結果のヒストグラム展開図を示した。また、解析した細胞の領域（R1）を、X軸にFSC（前方散乱光）、Y軸にSSC（側方散乱光）にて展開したドットプロットで示した。ヒストグラム展開図では、X軸にFITCの蛍光強度をlogスケールで、Y軸は細胞数を示した。黒い塗りつぶしが特異抗体を用いた染色結果で、白抜きがアイソタイプコントロールIgGで染色した結果である。例えば、HLA型A\*24<sup>+</sup>/A\*2<sup>-</sup>は、抗HLA-A\*24抗体に反応性を示し、抗HLA-A\*2抗体に反応性を示さなかった場合の判定結果を示す。なお左側2列の各ヒストグラム展開図のX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについては図下部左側に、右側1列の各ドットプロットのX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについては図下部右側に別途示した。

【図2】コントロールペプチドを用いた細胞内IFN $\gamma$ 産生細胞定量法の検討を示した図である。Donor ID\*24-2のPBMCをEBV BRLF1(a,b)またはCMV pp65(c,d)のHLA-A\*2402拘束性エпитープペプチドで13日間刺激後、陰性コントロール（HIV）ペプチド（a,c）と、刺激に用いたそれぞれのペプチド(b,d)で刺激し、テトラマー（Tetramer）陽性細胞が、特異的ペプチドに応答し、IFN $\gamma$ を産生する事を示した図である。なお各列（左側、中央、右側）のドットプロットにおけるX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについて、図下部に別途示した。

【図3 a-d】細胞内IFN $\gamma$ 産生細胞定量法による特異的CTL誘導の確認（Donor ID \*24-8）を示す図である。X軸にCD8、Y軸にIFN $\gamma$ に対する蛍光強度をlogスケールで示したドットプロット展開図で、a、cは誘導に用いたペプチドと同じペプチドを用いて再刺激した結果を、b、dは陰性コントロールのHIVペプチドを用いて再刺激した結果を示し、URにCD8陽性IFN $\gamma$ 陽性細胞数がPBMCに占める割合（％）を数値で示した。なおaおよびbのドット

10

20

30

40

50

プロットにおけるX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについて、bの下部に別途示した。同じくcおよびdのドットプロットにおけるX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについて、dの下部に別途示した。

【図3 e-h】細胞内IFN $\gamma$ 産生細胞定量法による特異的CTL誘導の確認 (Donor ID \*24-12) を示す図である。X軸にCD8、Y軸にIFN $\gamma$  に対する蛍光強度をlogスケールで示したドットプロット展開図で、e、gは誘導に用いたペプチドと同じペプチドを用いて再刺激した結果を、f、hは陰性コントロールのHIVペプチドを用いて再刺激した結果を示し、URにCD8陽性IFN $\gamma$  陽性細胞数がPBMCに占める割合(%)を数値で示した。なおeおよびfのドットプロットにおけるX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについて、fの下部に別途示した。同じくgおよびhのドットプロットにおけるX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについて、hの下部に別途示した。

10

【図4】エリスポットアッセイにより特異的CTLを検出した例を示す図である。

【図5】作製したMHC-テトラマー試薬を用いて染色した結果を示す図である。なおドットプロットにおけるX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについて、図下部に別途示した。

【図6】Donor ID\*24-14のPBMCを24日間LYAにて刺激後、LYA-TetおよびCD4、CD3、CD8にて染色した。また陰性コントロールとして Negativeテトラマー試薬と反応性を比較した図である。

【図7】短期間培養によるAdV特異的CTL誘導の有効性を示す図である。Donor ID\*24-8のPBMCを単離直後に各テトラマー試薬で染色した図である。bは10日間、ペプチドを加えて培養後、各テトラマー試薬を用いて特異的CTLが誘導されたことを確認した図である。各ドットプロットにおけるX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについて下部に別途示した。

20

【図8】アデノウイルス特異的CTLの機能性評価を示す図である。abはDonor ID\*24-8のPBMCを用いて誘導したTYF特異的CTLの機能性評価、cdはDonor ID\*24-2のPBMCを用いて誘導したVYS特異的CTLの機能性評価を示す図である。なおこれら各ドットプロットのX軸タイトルについては各ドットプロット中に記載したが、X軸の目盛りおよびY軸の目盛りおよびタイトルについてはdの下部に別途記載した。

【図9】MHC-テトラマー試薬を用いてCTLを精製した例を示す図である。

【図10】Donor ID\*24-8のPBMCを用いて誘導したTYF特異的CTLは、サブグループCのエピトープペプチドとは交差反応しないことを示す図である。なお、左側の各ドットプロットのX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについては左側のドットプロットの下部に、中央の各ドットプロットのX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについては中央のドットプロットの下部に、右側の各ドットプロットのX軸およびY軸の目盛りおよびタイトルについては右側のドットプロットの下部に別途記載した。

30

【図11-1】アミノ酸相同配列解析による反応性を検討した図である。配列番号：1のサブグループ間の相同性を示す。

【図11-2】アミノ酸相同配列解析による反応性を検討した図である。配列番号：2のサブグループ間の相同性を示す。

【図11-3】アミノ酸相同配列解析による反応性を検討した図である。配列番号：3のサブグループ間の相同性を示す。

40

【図11-4】アミノ酸相同配列解析による反応性を検討した図である。配列番号：4のサブグループ間の相同性を示す。

【図11-5】アミノ酸相同配列解析による反応性を検討した図である。配列番号：5のサブグループ間の相同性を示す。

【図11-6】アミノ酸相同配列解析による反応性を検討した図である。配列番号：6のサブグループ間の相同性を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

本発明は、アデノウイルスに特異的に細胞傷害性T細胞を誘導し得る機能を有するT細胞

50

胞エピトープペプチドに関する。従って本発明は、アデノウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞エピトープペプチドを提供する。該エピトープペプチドは、本明細書において「エピトープペプチド」、あるいは単に「本発明のペプチド」と記載する場合がある。

#### 【0019】

本発明のペプチドは、生理活性を有し、隣接するアミノ酸残基の $\alpha$ -アミノ基とカルボキシル基間のペプチド結合により相互に結合した線状のアミノ酸の分子鎖を意味する。ペプチドは特定長のものを意味するものではなく、種々の長さであり得る。従って、本発明のペプチドには、所謂「オリゴペプチド」、「ポリペプチド」も含まれる。

#### 【0020】

また、無電荷又は塩の形態であってもよく、場合によっては、グリコシル化、アミド化、ホスホリル化、カルボキシル化、リン酸化等により修飾されていてもよい。

以下に、エピトープの候補ペプチドの選択方法についてその一例を記載する。

#### 【0021】

##### 1. コンピュータを用いた解析

本発明のアデノウイルスに特異的なCTLエピトープペプチドは、アデノウイルスタンパク質のアミノ酸配列について、目的とするHLA分子の各結合モチーフを有する8~10個のアミノ酸よりなるエピトープペプチドを検索し得る、インターネット上に公開されている複数のソフトウェア (Pingping Guan, Irini A. Doytchinova, Christianna Zygouri, and Darren R. Flower, MHCpred: a server for quantitative prediction of peptide-MHC binding, *Nucleic Acids Res.*, 2003;31:3621-3624) に照合してCTLエピトープの候補ペ

#### 【0022】

##### 2. アンカーモチーフを用いた検討

HLAクラスI分子は、主としてHLA-A、HLA-B、HLA-Cがあり、これらに結合して提示されるエピトープペプチドは、8~10個のアミノ酸からなる。エピトープペプチドのN末端側から2番目と、9あるいは10番目のアミノ酸はHLA分子との結合に対して最も重要なアミノ酸であり、アンカーモチーフと呼ばれている。このアンカーモチーフは、各々のHLA分子の種類によって異なることが報告されている。例えば、世界的に最も頻度の高いHLA-A2分子に結合するペプチドとしては、N末端より2番目の位置にLeuが配置され、9あるいは10番目の位置にLeu又はValが配置されたペプチドであって、9~10個のアミノ酸残基からなるペプチドが最も良く知られている (T Sudo, N Kamikawaji, A Kimura, Y Date, CJ Savaio, H Nakashima, E Furuichi, S Kuhara, and T Sasazuki, Differences in MHC class I self peptide repertoires among HLA-A2 subtypes, *J. Immunol.*, 1995;155:4749-4756)。また、日本人を含むアジアの人種に多いHLA-A24に結合するペプチドとしては、N末端より2番目の位置にTyr、Phe、Met又はTrpのいずれかが配置され、9あるいは10番目の位置にLeu、Ile、Trp又はPheのいずれかが配置されたペプチドであって、9~10個のアミノ酸からなるペプチドが最もよく知られている (A Kondo, J Sidney, S Southwood, MF del Guercio, E Appella, H Sakamoto, E Celis, HM Grey, RW Chesnut, and RT Kubo, Prominent roles of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A24 human class I molecules, *J. Immunol.*, 1995;155:4307-4312)。蛋白質のアミノ酸配列中からこのアンカーモチーフを有する配列を検索し、CTLエピトープの候補ペプチドを選択する事ができる。

#### 【0023】

##### 3. ペプチドライブラリーの作製

アデノウイルス蛋白質の蛋白質全体を網羅する20個前後のアミノ酸よりなるペプチドライブラリーを合成する。20個前後のアミノ酸のうち、前後10個程度のアミノ酸は、前後のペプチド配列と重複するようにライブラリーを作製する。これによって、蛋白質全体を網羅的に検索する事ができ、一度ライブラリーを作製すればHLA拘束性も網羅的に検討する事が可能になる。

#### 【0024】

なお、前述の方法にて選択されたエピトープ候補ペプチドは必ずしもCTLエピトープになり得る訳ではなく、以下に示す検討を経て初めてアデノウイルス特異的CTLエピトープになり得る。以下に、エピトープペプチドの検討方法について記載する。

#### 【0025】

##### (1) エピトープペプチド決定方法1

アデノウイルス感染歴がある人から分離した末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells; PBMC)、あるいはPBMCから分離したT細胞を適切な培地に $0.1 \sim 2 \times 10^6$ /mL の細胞濃度で浮遊させる。これに同じ人からあらかじめ分離培養しておいたアデノウイルス感染細胞 $1 \times 10^5$ /mLを加え、5% 炭酸ガス (CO<sub>2</sub>) 恒温槽にて37℃で7日間培養する。培養7日後にアデノウイルス感染細胞とインターロイキン2 (IL-2) を添加し、以後、アデノウイルス感染細胞とIL-2による刺激を毎週繰返すことによりCTLを誘導する。このようにして誘導したCTLがエピトープ候補ペプチドに対して特異性があるかどうかの検討は、MHC-テトラマー法、エリスポットアッセイ、クロムリリースアッセイ、細胞内サイトカイン染色法等で判定する (Current Protocols in Immunology, Edited by: John E. Coligan, Ada M. Kruisbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober, 6.19 ELISPOT Assay to Detect Cytokine-Secreting Murine and Human Cells, 6.24 Detection of Intracellular Cytokines by Flow Cytometry, published by John Wiley & Sons, Inc.)。

10

#### 【0026】

##### (2) エピトープペプチド決定方法2

アデノウイルス感染歴がある人から分離したPBMCを適切な培地に $0.1 \sim 2 \times 10^6$ /mL の細胞濃度で浮遊させ、これにエピトープ候補ペプチドの任意の1種を $0.01 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で加える。5% CO<sub>2</sub> 恒温槽にて37℃で培養し、2日後にIL-2を添加する。以後、前記ペプチドとIL-2による刺激を週に1度あるいは2週間に1度繰返すことによりCTLを誘導する。このようにして誘導したCTLがエピトープ候補ペプチドに対して特異性があるかどうかの検討は、MHC-テトラマー法、エリスポットアッセイ、クロムリリースアッセイ、細胞内サイトカイン染色法等で判定する。

20

#### 【0027】

##### (3) エピトープペプチド決定方法3

アデノウイルス感染歴がある人から分離したPBMCを適切な培地に $0.1 \sim 2 \times 10^6$ /mL の細胞濃度で浮遊させ、これに合成したペプチドライブラリーを適当な数 (例えば10種類ずつ) にプールした物を加える。5% CO<sub>2</sub> 恒温槽にて37℃で培養し、2日後にIL-2を添加する。以後、プールペプチドとIL-2による刺激を週に1度あるいは2週間に1度繰返すことにより、CTLを誘導する。このようにして誘導したCTLがエピトープ候補ペプチドに対して特異性があるかどうかの検討は、エリスポットアッセイ、クロムリリースアッセイ、細胞内サイトカイン染色法等で判定する。良好な結果を示したプールペプチドに対しては、1種類ずつペプチドを加えて上記実験を繰返せば、CTL誘導能を有するペプチドを選択する事が可能である。反応したペプチドについて順次短くし、基幹のペプチドを得て本発明のエピトープペプチドとする。一般的に、エピトープペプチドは最終的に8~10個のアミノ酸までに短くすることができる。

30

40

#### 【0028】

本発明のペプチドとして具体的には、配列番号：1~6のいずれかに記載のアミノ酸配列からなるペプチドを例示することができる。

また本発明のペプチドは、配列番号：1~6のいずれかに記載のアミノ酸領域を含むペプチドであってもよい。即ち、本発明のペプチドの好ましい態様としては、アデノウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞エピトープペプチドが配列番号：1~6からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含むペプチドである。

#### 【0029】

さらに、本発明のエピトープペプチドは、生理活性及び免疫活性を実質的に改変せず、投与した場合に有害な活性を有するものでない限り、上記のペプチドの改変体であっても

50

よい。

即ち本発明の好ましい態様としては、配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列において、1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチドであって、改変前の配列番号：1～6のいずれかに記載のペプチドと同等の機能を有するペプチドを挙げることができる。

#### 【0030】

上記「同等の機能」とは、例えば、(1) アデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し得る機能、(2) ヒト主要組織適合性抗原(HLA)-A24分子等、特にHLA-A\*2402、またはHLA-Cw\*0401分子もしくはCw\*0702との複合体を細胞表面に提示する細胞を特異的に認識しうるT細胞レセプターを有する細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導し得る機能、等を言う。

10

(上記(2)の機能を有するペプチドは、本明細書において、HLA-A24等拘束性抗原ペプチドと表現する場合がある。)

#### 【0031】

改変されたペプチドが、上記の機能を有するか否かは、例えば、後述の実施例に記載の方法、あるいは該方法を適宜改変した方法によって、評価することが可能である。

#### 【0032】

本発明のペプチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、及び修飾されているものの双方を含む。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質又は脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、メチル化、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、γ-カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介付加、ユビキチン化等が含まれる。

20

#### 【0033】

また、本発明のペプチドは、N末端又はC末端に付加的アミノ酸配列が介在するものであってもよい。また、本発明のペプチドは、糖類、ポリエチレングリコール、脂質等が付加された複合体、放射性同位元素等による誘導体、あるいは重合体等の形態として用いることができる。また、本発明におけるアミノ酸には、所謂「アミノ酸アナログ」が含まれる。該アミノ酸アナログとしては、例えば、種々のアミノ酸のN-アシル化物、O-アシル化物、エステル化物、酸アミド化物、アルキル化物等が挙げられる。

30

#### 【0034】

また、本発明のペプチドと該HLA-A24等の分子との複合体が、該複合体を細胞表面に提示する細胞を特異的に認識しうるTCRを有するCTLによって認識されるものである限り、本発明のペプチドのN末端や遊離のアミノ基には、ホルミル基、アセチル基、t-ブトキシカルボニル(t-Boc)基等が結合していてもよく、本発明のペプチドのC末端や遊離のカルボキシル基には、メチル基、エチル基、t-ブチル基、ベンジル基等が結合していてもよい。

#### 【0035】

40

また、本発明のペプチド(例えば、HLA-A24等拘束性抗原ペプチド)は、生体内への導入を容易にしうる各種修飾を施されたものであってもよい。生体内への導入を容易にしうる各種修飾の例としては、PT(Protein Transduction)ドメインが有名である。HIV(human immunodeficiency virus)のPTドメインは、Tatタンパク質の49～57番目のアミノ酸(Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg/配列番号：26)で構成されたペプチドで、このペプチド配列を目的とするタンパク質あるいはペプチド配列の前後、又はいずれかに付加することで、容易に細胞内に導入できることが報告されている(Ryu J, Han K, Park J, Choi SY., Enhanced uptake of a heterologous protein with an HIV-1 Tat protein transduction domains (PTD) at both termini., Mol Cells., 2003;16:385-391, Kim DT, Mitchell DJ, Brockstedt DG, Fong L, Nolan GP, Fathman CG, Engleman EG, Rothbar

50

d JB., Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide., J Immunol., 1997;159:1666-1668)。

#### 【0036】

MHCクラス I 分子を介して提示されるほとんどの抗原は、細胞質内のプロテアソームにより分解された後、TAP (transporter in antigen processing) へと移送され、粗面小胞体内においてTAPに会合しているMHCクラスI分子と $\beta$ 2-ミクログロブリンの複合体と結合し、ゴルジ装置を経てエクソサイトーシスにより細胞表面へと運搬される。これら一連の抗原提示経路にて作用するシャペロンであるHSP (heart shock prtein) 70やHSP90、又はgp96と目的とするペプチドやタンパク質を融合させることで、効果的な抗原提示がなされることが報告されており (Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK., CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin., Immunity., 2001;14:303-313)、本発明のペプチドに上記PTドメインまたはシャペロンを融合させたタンパクは本発明の一態様を成す。

10

#### 【0037】

また、本発明のペプチドは、従来の各種のペプチド合成方法によって調製され得る。例えば、固相ペプチド合成法等の有機化学的合成法、あるいは、ペプチドをコードする核酸を調製し、組換えDNA技術を用いて調製することも可能である。また、市販の化学合成装置 (例えば、アプライドバイオシステムズ社のペプチド合成装置) による合成も可能である。

#### 【0038】

即ち本発明のペプチドは、そのアミノ酸配列に従って、一般的な化学合成法により製造することが可能であり、該方法には、通常の液相法及び固相法によるペプチド合成法が含まれる。該ペプチド合成法は、より詳しくはアミノ酸配列の情報に基づいて、各アミノ酸を1個ずつ逐次合成させて鎖を延長していくステップワイズエロンゲーション法と、アミノ酸数個からなるフラグメントを予め合成し、次いで各フラグメントをカップリング反応させるフラグメント・コンデンセーション法を包含し、本発明のペプチドの合成は、いずれの方法を用いてもよい。

20

#### 【0039】

このようなペプチド合成法にて用いられる縮合法も、各種方法に従って行うことができる。その具体例としては、例えばアジド法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、酸化還元法、DPPA (ジフェニルホスホリルアジド) 法、ウッドワード法等を例示できる。

30

#### 【0040】

これら各種方法に利用できる溶媒もまた、一般的に使用されるものを適宜利用することができる。その例としては、例えばジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ヘキサホスホアミド、ジオキサン、テトラヒドロフラン (THF)、酢酸エチル等及びこれらの混合溶媒等を挙げることができる。なお、上記ペプチド合成反応に際して、反応に関与しないアミノ酸及びペプチドにおけるカルボキシル基は、一般にはエステル化により、例えばメチルエステル、エチルエステル、第三級ブチルエステル等の低級アルキルエステル、例えばベンジルエステル、P-メトキシベンジルエステル、P-ニトロベンジルエステルアルキルエステル等として保護することができる。また、側鎖に官能基を有するアミノ酸、例えばTyrの水酸基は、アセチル基、ベンジル基、ベンジルオキシカルボニル基、第三級ブチル基等で保護されてもよいが、必ずしもかかる保護は必須ではない。また、例えば、Argのグアニジノ基は、ニトロ基、トシル基、2-メトキシベンゼンスルホニル基、メチシレン-2-スルホニル基、ベンジルオキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、アダマンチルオキシカルボニル基等の適当な保護基により保護することも可能である。

40

#### 【0041】

上記のようにして得ることが可能な本発明のペプチドは、通常の方法に従って、例えばイオン交換樹脂、分配クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、向流分配法等のペプチド化学

50

の分野で汎用されている方法に従って、適宜、精製を行うことができる。

#### 【0042】

本発明のペプチドは、本発明のペプチドをコードするDNA核酸分子を合成し、適当な発現ベクターへ導入した後、宿主細胞内において発現させる遺伝子工学的手法によっても取得することができる。

#### 【0043】

一例を示せば、まず配列番号：1～6のいずれかに記載されたアミノ酸配列をコードする核酸を合成する。該方法としては、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法などの化学合成手段〔J. Am. Chem. Soc., 89, 4801 (1967); 同 91, 3350 (1969); Science, 150, 178 (1968); Tetrahedron Lett., 22, 1859 (1981); 同 24, 245 (1983)〕及びそれらの組合せ方法などが例示できる。より具体的には、DNAの合成は、ホスホルアミダイト法又はトリエステル法による化学合成により行うこともでき、市販されている自動ポリヌクレオチド合成装置上で行うこともできる。二本鎖断片は、相補鎖を合成し、適当な条件下で該鎖を共にアニーリングさせるか、又は適当なプライマー配列と共にDNAポリメラーゼを用い相補鎖を付加するかによって、化学合成した一本鎖生成物から得ることもできる。

#### 【0044】

本発明のペプチドには、上述のように、本発明者らによって同定されたエピトープペプチド（配列番号：1～6）と機能的に同等なペプチドが含まれる。

#### 【0045】

あるペプチドと機能的に同等なペプチドを調製するための、当業者によく知られた方法としては、例えばペプチド中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。具体的には当業者であれば部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene. 152, 271-275; Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer W, and Fritz HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367; Kunkel, TA (1985) Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492; Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) などを用いて、配列番号：1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列に適宜変異を導入することにより、該ペプチドと機能的に同等なペプチドを調製することができる。また、ペプチド中のアミノ酸の変異は自然に生じることもある。このように、人工的か自然に生じたものかを問わず、本発明者らにより同定されたエピトープペプチド（配列番号：1～6）のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸配列が変異したアミノ酸配列を有し、該ペプチドと機能的に同等なペプチドは、本発明のペプチドに含まれる。

#### 【0046】

上述のようなアミノ酸の変更（改変）目的は、例えば、

1. HLAとの親和性を高める為の変更 (Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Dudley ME, Schwarz SL, Spiess PJ, Wunderlich JR, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE., Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma., Nat Med. 1998;4:321-327; Berzofsky JA, Ahlers JD, Belyakov IM., Strategies for designing and optimizing new generation vaccines., Nat Rev Immunol. 2001;1:209-219) 、
2. TCRの認識性を向上させる為の変更 (Fong L, Hou Y, Rivas A, Benike C, Yuen A, Fisher GA, Davis MM, Engleman EG., Altered peptide ligand vaccination with Flt3 ligand expanded dendritic cells for tumor immunotherapy., Proc Natl Acad Sci U S A., 2001;98:8809-8814; Rivoltini L, Squarcina P, Loftus DJ, Castelli C, Tarsini P, Mazzocchi A, Rini F, Viggiano V, Belli F, Parmiani G., A superagonist variant of peptide MART1/Melan A27-35 elicits anti-melanoma CD8+ T cells with enhanced functional characteristics: implication for more effective immunotherapy., Cancer Res., 1999;59:301-306) 、
3. 血清中のペプチド分解酵素等による代謝を回避する為の変更 (Berzofsky JA, Ahlers

JD, Belyakov IM., Strategies for designing and optimizing new generation vaccine s., Nat Rev Immunol., 2001;1:209-219, Parmiani G, Castelli C, Dalerba P, Mortarini R, Rivoltini L, Marincola FM, Anichini A., Cancer immunotherapy with peptide-based vaccines: what have we achieved? Where are we going?, J Natl Cancer Inst., 2002;94:805-818, Brinckerhoff LH, Kalashnikov VV, Thompson LW, Yamshchikov GV, Pierce RA, Galavotti HS, Engelhard VH, Slingluff CL Jr., Terminal modifications inhibit proteolytic degradation of an immunogenic MART-1(27-35) peptide: implications for peptide vaccines., Int J Cancer. 1999;83:326-334)  
 等が挙げられる。

#### 【0047】

10

上記変異体における、変異（置換、挿入、欠失等）するアミノ酸数は、本発明のペプチドの有する機能が保持される限り制限はないが、通常5アミノ酸以内であり、好ましくは4アミノ酸以内であり、より好ましくは3アミノ酸以内であり、さらに好ましくは1~2アミノ酸である。また、上記改変が、例えば、配列番号：1~6のいずれかに記載のペプチドの末端へのアミノ酸残基の付加である場合には、付加されるアミノ酸数は本発明のペプチドの有する機能が保持される限り制限はないが、通常、20アミノ酸以内であり、好ましくは10アミノ酸以内であり、より好ましくは5アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内であり、最も好ましくは1~2アミノ酸である。

#### 【0048】

20

変異するアミノ酸残基の種類としては、改変前のアミノ酸の性質が保存されている他のアミノ酸（改変前のアミノ酸と類似のアミノ酸）に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R、K、H）、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）を挙げることができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一字表記を表す）。

#### 【0049】

30

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するペプチドがその生物学的機能（活性）を維持し得ることはすでに知られている（Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413）。

#### 【0050】

40

本発明のペプチドのアミノ酸配列に複数個のアミノ酸残基が付加されたペプチドには、これらペプチドを含む融合ペプチドが含まれる。融合ペプチドは、本発明のペプチドと他のペプチドとが融合したものである。融合ペプチドを作製する方法は、本発明のペプチド（例えば、配列番号：1~6に記載のペプチド）をコードするポリヌクレオチドと他のペプチドをコードするポリヌクレオチドをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明のペプチドとの融合に付される他のペプチドは、特に制限されないが、例えば、 $\beta$ 2-ミクログロブリンを挙げることができる。即ち、本発明のペプチドと $\beta$ 2-ミクログロブリンとの融合ペプチドもまた、本発明に含まれる。

#### 【0051】

本発明のペプチドとの融合に付される他のペプチドは、CTLの誘導目的以外にも、例えば、該ペプチドの単離・精製、あるいは応用研究等の種々の目的に応じて、適宜選択することができる。例えばFLAG（Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210）、6個のHis（ヒスチジン）残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素（HA）、ヒトc-mycの断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV40T抗

50

原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulinの断片、B-tag、Protein Cの断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明のペプチドとの融合に付される他のタンパク質としては、例えば、GST（グルタチオン-S-トランスフェラーゼ）、HA（インフルエンザ凝集素）、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP（マルトース結合タンパク質）等が挙げられる。市販されているこれらペプチド又はペプチドをコードするポリヌクレオチドを本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドと融合させ、これにより調製された融合ポリヌクレオチドを発現させることにより、融合ペプチドを調製することができる。

#### 【0052】

また、本発明のペプチドの融合体作製する場合、融合箇所にFactorXa、エンテロキナーゼまたはトロンبینのようなプロテアーゼ切断部位ペプチド配列を挿入することもできる。このような場合、上記GST、MBP、あるいはFLAGタグのような精製用タグを付加させたペプチド融合体として発現させ、精製した後、必要に応じてペプチド融合体のうち、本発明の目的のペプチド以外の領域を、対応するFactorXa、エンテロキナーゼまたはトロンبینのようなプロテアーゼなどにより切断、除去することも可能であり、有用である。

#### 【0053】

また、あるペプチドと機能的に同等なペプチドを調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術（Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989）を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその一部をもとに、種々の生物由来（例えば、アデノウイルス由来）のポリヌクレオチド試料、あるいは人工的に合成されたペプチドライブラリー等から、これと相同性の高いポリヌクレオチドを単離して、該ポリヌクレオチドから本発明のペプチドと機能的に同等なペプチドを単離することも通常行いうることである。

#### 【0054】

本発明には、本発明の配列番号：1～6に記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドによってコードされるペプチドであって、配列番号：1～6に記載のペプチドと機能的に同等なペプチドが含まれる。

#### 【0055】

配列番号：1～6に記載のペプチドと機能的に同等なペプチドをコードするポリヌクレオチドを単離するためのハイブリダイゼーションの条件は、当業者であれば適宜選択することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、例えば、低ストリンジェントな条件が挙げられる。低ストリンジェントな条件とは、ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば42℃、0.1×SSC、0.1% SDSの条件であり、好ましくは50℃、0.1×SSC、0.1% SDSの条件である。より好ましいハイブリダイゼーションの条件としては、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば65℃、5×SSC及び0.1% SDSの条件である。これらの条件において、温度を上げる程に高い相同性を有するDNAが効率的に得られることが期待できる。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響を及ぼす要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

#### 【0056】

また、ハイブリダイゼーションにかえて、遺伝子増幅技術（PCR）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley&Sons Section 6.1-6.4）を用いて、本発明のペプチド（配列番号：1～6）をコードするポリヌクレオチドの一部を基にプライマーを設計し、本発明者らにより同定されたペプチドをコードするポリヌクレオチドと相同性の高いポリヌクレオチド断片を単離し、該ポリヌクレオチドを基に本発明者らにより同定されたペプチドと機能的に同等なペプチドを取得することも可能である。

#### 【0057】

上述のハイブリダイゼーション技術や遺伝子増幅技術により単離されるポリヌクレオチドがコードする、配列番号：1～6に記載のペプチドと機能的に同等なペプチドは、通常、該ペプチドとアミノ酸配列において、通常高い相同性を有する。本発明のペプチドには、配列番号：1～6に記載のペプチドと機能的に同等であり、かつ該ペプチドのアミノ酸配列と高い相同性を有するペプチドも含まれる。高い相同性とは、アミノ酸レベルにおいて、通常、少なくとも50%以上の同一性、好ましくは75%以上の同一性、さらに好ましくは85%以上の同一性、さらに好ましくは95%以上（例えば、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上）の同一性を指す。ペプチドの相同性を決定するには、文献（Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730）に記載のアルゴリズムに従えばよい。

10

**【0058】**

アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol.215: 403-410, 1990)。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えば、score = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

**【0059】**

20

本発明のペプチドは、当業者に公知の方法により、組み換えペプチドとして、また天然のペプチドとして調製することが可能である。組み換えペプチドであれば、例えば、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のペプチドに対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにかけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

**【0060】**

精製用タグ（例えばヒスチジンタグ）を融合させた組み換えペプチドとして宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させた場合には、発現させた融合ペプチドは、市販の、融合したタグに対応した精製カラム（ヒスチジンタグの場合ニッケルカラム）を用いて精製することができる。

30

**【0061】**

天然のペプチドであれば、当業者に周知の方法、例えば本発明のペプチドを発現している組織や細胞の抽出物に対し、本発明のペプチドに結合する抗体が結合したアフィニティークラムを作用させて精製することにより単離することができる。抗体はポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。

本発明のペプチドをコードする上記核酸もしくはベクターもまた、本発明に含まれる。

**【0062】**

本発明の核酸（ポリヌクレオチド）は、本発明のペプチドをコードし得るものであればいかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明のペプチドをコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。

40

**【0063】**

本発明の核酸（ポリヌクレオチド）は、当業者に公知の方法により取得することができる。例えば、市販の核酸合成装置を用いて、適宜作製することができる。作製したポリヌクレオチドの塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認することができる。

**【0064】**

本発明のペプチドをコードする核酸は、例えば、遺伝子組換え技術を用いて、本発明の

50

ペプチドを宿主内で産生させる為に重要である。この場合、宿主間でアミノ酸コドンの使用頻度 (codon usage) が異なる為、産生させる宿主のcodon usageに適合するようアミノ酸のコドンを変更することが望ましい。本発明のペプチドをコードする核酸は、ワクチンとしても利用可能で、むき出しの核酸として移送することもできるし、または適切なウイルスもしくは細菌ベクターを用いて移送することもできる (Berzofsky JA, Ahlers JD, Janik J, Morris J, Oh S, Terabe M, Belyakov IM, Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections., J Clin Invest., 2004;114:450-462, Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC., Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer., J Clin Invest., 2004;113:1515-1525)。適切な細菌ベクターとしては、サルモネラ属亜種の細菌ベクターを挙げることができる。適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクター、レンチウイルスベクター、ワクシニアベクター等を例示することができる。適切なワクシニアベクターの1例は、改変ワクシニア・アンカラベクターである。

10

**【0065】**

本発明の核酸の好ましい態様としては、本発明のペプチドを発現し得るベクターを例示することができる。該ベクターは、通常、プロモーターの下流に本発明の核酸が機能的に連結された構造のDNA構築物を担持するベクターである。該ベクターとしては、通常、プラスミドもしくはウイルスベクター等が一般的である。

20

**【0066】**

当業者においては、所望のDNAを有するベクターを、一般的な遺伝子工学技術によって、適宜、作製することが可能である。通常、市販の種々の発現ベクターを利用することができる。

**【0067】**

本発明のベクターは、宿主細胞内において本発明のポリヌクレオチドを保持したり、本発明のペプチドを発現させるためにも有用である。本発明の核酸 (ポリヌクレオチド) は、通常、適当なベクターへ担持 (挿入) され、宿主細胞へ導入される。該ベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてpBluescriptベクター (Stratagene社製) などが好ましいが、市販の種々のベクターを利用することができる。本発明のペプチドを生産する目的としてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター (プロメガ社製)、大腸菌であればpETベクター (Invitrogen社製)、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター (GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であればpME18Sベクター (Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)) などを例示することができる。ベクターへの本発明の核酸の挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる。

30

**【0068】**

上記宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞 (例: ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、昆虫細胞 (例: ドロソフィラS2、スボドプテラSF9)、動物細胞 (例: CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞) 及び植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法 (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクション法 (GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

40

**【0069】**

宿主細胞において発現させたペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外

50

の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

#### 【0070】

上記製造方法におけるペプチドの回収は、本発明のペプチドが培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のペプチドが細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にペプチドを回収する。

#### 【0071】

組換え細胞培養物から本発明のペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウム又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

#### 【0072】

また、動物の生体内で本発明のポリヌクレオチド(核酸)を発現させる方法としては、本発明の核酸を適当なベクターに組み込み、例えば、レトロウィルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウィルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、免疫療法を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、レトロウィルスベクターなどが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である(Molecular Cloning ,5.61-5.63)。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

#### 【0073】

本発明のペプチド(アデノウィルス特異的CTLエピトープペプチド)は、能動免疫療法においてペプチドワクチンとして用いることができる。即ち、本発明のCTLエピトープペプチドを含んでなるワクチンを健常人あるいは患者に投与し、アデノウィルスに特異的なCTLを体内で増殖させ、疾患に対する予防あるいは治療に役立てることができる。使用するエピトープペプチドは1種のみを使用であっても、あるいはワクチンの使用目的に応じて2種以上のペプチドを組み合わせ、混合して使用することもできる。

#### 【0074】

従って本発明は、本発明のペプチドもしくは本発明の核酸を有効成分として含む、アデノウィルスの感染を治療又は予防するためのワクチンを提供する。

#### 【0075】

なお、本発明の「ワクチン」は、「能動免疫療法剤」、「免疫治療剤」、「アデノウィルス関連疾患治療剤」と表現することも可能である。また、本発明において「治療剤」は、「医薬品」、「医薬組成物」、「治療用医薬」等と表現することもできる。

#### 【0076】

さらに、本発明のCTLエピトープペプチドが提示された抗原提示細胞は、能動免疫療法においてワクチンとして用いることができる。CTLエピトープペプチドが提示された抗原提示細胞とは、

1. 適当な培養液中で、抗原提示細胞とCTLエピトープペプチドを30分から1時間混合したエピトープペプチドパルス抗原提示細胞、
2. CTLエピトープペプチドをコードする核酸を用い、遺伝子導入等で抗原提示細胞にCTLエピトープペプチドを提示された細胞、
3. 人工的に作製した抗原提示能を有する人工抗原提示細胞、等を意味する。

#### 【0077】

抗原提示細胞とは、例えば、樹状細胞、B細胞、マクロファージ、ある種のT細胞等を示すが、該ペプチドが結合し得るHLAをその表面上に発現する細胞であって、CTL刺激能を有するものを意味する。人工的に作製した抗原提示能を有する人工抗原提示細胞とは、例えば脂質2重膜やプラスチックあるいはラテックス等のビーズにHLAとCTLエピトープペ

プチドと $\beta$ 2-ミクログロブリンとの3者複合体を固定し、CTLを刺激し得るCD80、CD83、CD86等の共刺激分子を固定するか、もしくは、共刺激分子と結合するT細胞側のリガンドであるCD28に対してアゴニスティックに作用する抗体等を固定することで作製可能である (Oelke M, Maus MV, Didiano D, June CH, Mackensen A, Schneck JP., Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells., Nat Med. 2003;9:619-624, Walter S, Herrgen L, Schörr O, Jung G, Wernet D, Bühring HJ, Rammensee HG, Stevanovic S., Cutting edge: predetermined avidity of human CD8 T cells expanded on calibrated MHC/anti-CD28-coated microspheres., J Immunol. 2003;171:4974-4978, Oosten LE, Blokland E, van Halteren AG, Curtsinger J, Mescher MF, Falkenburg JH, Mutis T, Goulmy E., Artificial antigen-presenting constructs efficiently stimulate minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocytes., Blood. 2004;104:224-226)。

10

#### 【0078】

従って本発明の好ましい態様としては、本発明のペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞を有効成分とするワクチンを提供する。

#### 【0079】

本発明の核酸は、能動免疫療法においてDNAワクチンや組換えウイルスベクターワクチン等に用いる事ができる。この場合、CTLエピトープペプチドの核酸配列は、組換えワクチンや、組換えウイルスワクチンを産生させる宿主に適合したcodon usageに変更する事が望ましい (Casimiro, D.R. et al., Comparative Immunogenicity in Rhesus Monkeys of DNA Plasmid, Recombinant Vaccinia Virus, and Replication-Defective Adenovirus Vectors Expressing a Human Immunodeficiency Virus Type 1 gag Gene, J. Virol., 2003;77:6305-6313, Berzofsky JA, Ahlers JD, Janik J, Morris J, Oh S, Terabe M, Belyakov IM., Progress on new vaccine strategies against chronic viral infections., J Clin Invest., 2004;114:450-462)。

20

#### 【0080】

本発明のペプチド、又は本発明のペプチドが提示された抗原提示細胞を含んでなるワクチンは、当分野において公知の方法を用いて調製することができる。例えば、かかるワクチンの一例としては、本発明のペプチドを有効成分として含有する注射剤又は固形剤等の薬剤が挙げられる。

30

#### 【0081】

本発明のペプチドは、アデノウイルスに対する受動免疫治療剤の調製に用いることができる。下記のようにして得られたアデノウイルスに特異的なCTLはヒトアルブミン含有PBS等に懸濁させて、アデノウイルスに対する受動免疫治療剤とすることができる。受動免疫治療剤に含まれるアデノウイルスに特異的なCTLは、以下のような調製方法によって得ることができ、CTLの純度を高める為に精製して用いる事も可能である。

以下にCTLの調製方法の具体例を記載するが、必ずしもこれらの方法に制限されない。

#### 【0082】

##### (a) CTL調製方法1

PBMCと、適当な濃度のアデノウイルス特異的MHC-テトラマー試薬を反応させる。MHC-テトラマー試薬と結合したアデノウイルス特異的CTLは標識色素により染色されるので、セルソーター、顕微鏡などを用いて染色されたCTLのみを単離する。このようにして単離されたアデノウイルスに特異的なCTLは、抗CD3抗体、PHA、IL-2等のT細胞刺激薬剤や、X線照射あるいはマイトマイシン処理等で増殖能を損失させた抗原提示細胞で刺激増殖させ、受動免疫療法に必要な細胞数を確保する。

40

#### 【0083】

##### (b) CTL調製方法2

アデノウイルス特異的MHC-モノマー及び／又はMHC-テトラマー試薬を無菌プレートなどに固相化し、PBMCを固相化プレートで培養する。プレートに固相化されたMHC-モノマー及び／又はMHC-テトラマーに結合したアデノウイルス特異的CTLを単離するためには、

50

結合せずに浮遊している他の細胞を洗い流した後に、プレート上に残った抗原特異的CTLだけを新しい培地に懸濁する。このようにして単離されたアデノウイルス特異的CTLは、抗CD3抗体、PHA、IL-2等のT細胞刺激薬剤や、X線照射あるいはマイトマイシン処理等で増殖能を損失させた抗原提示細胞で刺激増殖させ、受動免疫療法に必要な細胞数を確保する。

#### 【0084】

##### (c) CTL調製方法3

アデノウイルス特異的MHCーモノマー及び／又はMHCーテトラマー試薬と、CD80、CD83、CD86等の共刺激分子か、もしくは、共刺激分子と結合するT細胞側のリガンドであるCD28 10  
に対してアゴニスティックに作用する抗体等を無菌プレートなどに固相化し、PBMCを固相化プレートで培養する。2日後にIL-2を培地に添加し5% CO<sub>2</sub>恒温槽にて37℃で7～10日培養する。培養した細胞を回収し新たな固相化プレート上で培養を続ける。この操作を繰り返す事で受動免疫療法に必要な細胞数のCTLを確保する。

#### 【0085】

##### (d) CTL調製方法4

PBMCあるいはT細胞を本発明のCTLエピトープペプチドで直接刺激するか、該ペプチドをパルスした抗原提示細胞、遺伝子導入した抗原提示細胞、又は人工的に作製した抗原提示能を有する人工抗原提示細胞で刺激する。刺激によって誘導されたCTLを5% CO<sub>2</sub>恒温槽に 20  
て37℃で7～10日培養する。CTLエピトープペプチドとIL-2、又は抗原提示細胞とIL-2による刺激を週に1度繰り返す事で受動免疫療法に必要な細胞数のCTLを確保する。

#### 【0086】

なお、本発明のペプチド（アデノウイルス特異的CTLエピトープペプチド）を使用したMHCーモノマー及びMHCーテトラマーは、公知の方法（US Patent Number 5,635,363, Inventors : J. D. Altman, M. G. McHeyzer-Williams, Mark M. Davis, Compositions and methods for the detection, quantitation and purification of antigen-specific T cells, French Application Number FR9911133, Inventor : M. Bonneville, et al., Means for detecting and for purifying CD8+ T-lymphocyte populations specific for peptides presented in the HLA context）により調製することができる。タンパク質発現用の遺伝子組換え宿主から精製したHLAクラスI分子、β2ーミクログロブリン及び本発明のCTLエピトープペプチドの複合体である、MHCーモノマーをバッファー内で形成させる。組 30  
換えHLAクラスI分子のC末端には予めビオチン結合部位を付加しておき、MHCーモノマー形成後この部位にビオチンを付加する。市販の色素標識されたストレプトアビジンとビオチン化MHCーモノマーをモル比1：4で混合することによってMHCーテトラマーを作製することができる。

#### 【0087】

また、CTL調製方法において、特異的CTLの割合が低い場合は、随時以下の方法を用いる事でCTLを高純度で回収する事が可能である。

#### 【0088】

##### (a) MHCーテトラマー試薬による精製

アデノウイルス特異的MHCーテトラマー試薬と、CTL調製方法にて誘導されたCTLを反応 40  
させ、MHCーテトラマーを標識している標識色素に対する抗体等を磁気標識した2次抗体を用いて分離する事が可能である。このような磁気標識した2次抗体と、磁気細胞分離装置は例えば、DynaI社やMiltenyi Biotec GmbH社から入手可能である。このようにして単離されたアデノウイルス特異的CTLは、抗CD3抗体、PHA、IL-2等のT細胞刺激薬剤で刺激増殖させ、受動免疫療法に必要な細胞数を確保する。

#### 【0089】

##### (b) 分泌されるサイトカインによる精製

アデノウイルス特異的CTLが、放出するサイトカイン等を利用して、アデノウイルスに特異的なCTLを精製する事ができる。例えば、Miltenyi Biotec GmbH社から入手可能なキットを用いる事で、CTLから放出されるサイトカインを細胞表面で特異抗体により補足し 50

、サイトカイン特異的な標識抗体で染色し、続いて磁気標識した標識物質特異的な抗体で染色後、磁気標識細胞分離装置を用いて精製する事も可能である。このようにして単離されたアデノウイルス特異的CTLは、抗CD3抗体、PHA、IL-2等のT細胞刺激薬剤で刺激増殖させ、受動免疫療法に必要な細胞数を確保する。

#### 【0090】

(c) 細胞表面蛋白質特異的抗体を用いた精製

特異的CTLの細胞表面では、特異的なペプチドの刺激により発現が増強する細胞表面蛋白質（例えばCD107a、CD107b、CD63、CD69など）が報告されている（Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA., Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation., J Immunol Methods., 2003;281:65-78, Trimble LA, Shankar P, Patterson M, Daily JP, Lieberman J., Human immunodeficiency virus-specific circulating CD8 T lymphocytes have down-modulated CD3zeta and CD28, key signaling molecules for T-cell activation., J Virol., 2000;74:7320-7330）。このような蛋白質の特異抗体を磁気標識する事で、磁気分離装置等を用いてCTLを精製する事が可能である。また、このような特異抗体に対する抗IgG抗体等を磁気標識する事でも同様にCTLの精製が可能である。あるいは、これら抗体を培養用のプラスチックプレートにコートし、このプレートを用いて刺激を加えたPBMCを培養し、プレートに結合しなかった細胞集団を洗い流す事で特異的なCTLを精製することも可能である。このようにして単離されたアデノウイルス特異的CTLは、抗CD3抗体、PHA、IL-2等のT細胞刺激薬剤で刺激増殖させ、受動免疫療法に必要な細胞数を確保する。

#### 【0091】

本発明は、上述のようにして取得・精製された細胞傷害性T細胞(CTL)を有効成分として含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤（免疫治療剤）を提供する。

なお、本発明の「受動免疫療法剤」は、「免疫治療剤」、「アデノウイルス関連疾患治療剤」、又は「CTL誘導剤」と表現することも可能である。

#### 【0092】

本発明の受動免疫療法剤の好ましい態様としては、本発明のペプチド、もしくは該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞により末梢血リンパ球を刺激して得られるアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞を有効成分として含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤である。

#### 【0093】

また、別の態様としては、本発明のペプチドから調製した主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血リンパ球とを反応させ、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞傷害性T細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性T細胞を有効成分として含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤である。

#### 【0094】

本発明の薬剤（本発明のワクチンもしくは受動免疫療法剤等）は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合し、医薬組成物として経口、あるいは非経口的に投与することができる。経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型とすることができる。非経口剤としては、注射剤、点滴剤、外用薬剤、あるいは座剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。外用薬剤には、経鼻投与剤、あるいは軟膏剤等を示すことができる。主成分である本発明の薬剤を含むように、上記の剤型とする製剤技術は公知である。

#### 【0095】

例えば、経口投与用の錠剤は、本発明の薬剤に賦形剤、崩壊剤、結合剤、及び滑沢剤等を加えて混合し、圧縮整形することにより製造することができる。

#### 【0096】

例えば、本発明のペプチドが提示された抗原提示細胞は、製薬上許容され、該ペプチド又は該細胞の活性と相容性を有する賦形剤、例えば、水、食塩水、デキストロース、エタノール、グリセロール、DMSO (dimethyl sulphoxide)、及びその他のアジュバント等、又はこれらの組み合わせと混合して用いることができる。さらに、必要に応じて、アルブミン、湿潤剤、乳化剤等の補助剤を添加してもよい。崩壊剤としては、炭酸カルシウムやカルボキシメチルセルロースカルシウム等が一般的に用いられる。結合剤には、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、あるいはポリビニルピロリドンが用いられる。滑沢剤としては、タルクやステアリン酸マグネシウム等が公知である。

#### 【0097】

本発明の薬剤を含む錠剤は、マスキングや、腸溶性製剤とするために、公知のコーティングを施すことができる。コーティング剤には、エチルセルロースやポリオキシエチレングリコール等を用いることができる。

10

#### 【0098】

また注射剤は、主成分である本発明の薬剤を適当な分散剤とともに溶解、分散媒に溶解、あるいは分散させることにより得ることができる。分散媒の選択により、水性溶剤と油性溶剤のいずれの剤型とすることもできる。水性溶剤とするには、蒸留水、生理食塩水、あるいはリンゲル液等を分散媒とする。油性溶剤では、各種植物油やプロピレングリコール等を分散媒に利用する。このとき、必要に応じてパラベン等の保存剤を添加することもできる。また注射剤中には、塩化ナトリウムやブドウ糖等の公知の等張化剤を加えることができる。更に、塩化ベンザルコニウムや塩酸プロカインのような無痛化剤を添加すること

20

#### 【0099】

また、本発明の薬剤を固形、液状、あるいは半固形状の組成物とすることにより外用剤とすることができる。固形、あるいは液状の組成物については、先に述べたものと同様の組成物とすることで外用剤とすることができる。半固形状の組成物は、適当な溶剤に必要なに応じて増粘剤を加えて調製することができる。溶剤には、水、エチルアルコール、あるいはポリエチレングリコール等を用いることができる。増粘剤には、一般にベントナイト、ポリビニルアルコール、アクリル酸、メタクリル酸、あるいはポリビニルピロリドン等が用いられる。この組成物には、塩化ベンザルコニウム等の保存剤を加えることができる。また、担体としてカカオ脂のような油性基材、あるいはセルロース誘導体のような水性ゲル基材を組み合わせることにより、座剤とすることもできる。

30

#### 【0100】

また、本発明のペプチドは、中性又は塩の形態で処方することができ、例えば、薬学上許容され得る塩としては、塩酸、リン酸などの無機塩、又は、酢酸、酒石酸などの有機酸が挙げられる。

#### 【0101】

本発明の薬剤を遺伝子治療剤として使用する場合は、本発明の薬剤を注射により直接投与する方法のほか、核酸が組込まれたベクターを投与する方法が挙げられる。上記ベクターとしては、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター等が挙げられ、これらのウイルスベクターを用いることにより効率よく投与することができる。

40

#### 【0102】

また、本発明の薬剤をリポソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。例えば、本発明のペプチドもしくはベクターを保持させた小胞体をリポフェクション法により所定の細胞に導入する。そして、得られる細胞を例えば静脈内、動脈内等に全身投与する。

#### 【0103】

本発明の薬剤は、非経口投与及び経口投与により投与することができるが、該薬剤がペプチドを主成分とする場合には、一般的に非経口投与が好ましい。非経口投与としては経

50

鼻投与や皮下注射、筋肉内注射、静脈内注射等の注射剤、座薬等がある。また、経口投与としては、スターチ、マンニトール、ラクトース、ステアリン酸マグネシウム、セルロース等の賦形剤との混合物として調製することができる。

#### 【0104】

本発明のワクチンは、治療上有効な量で投与する。投与される量は、治療対象、免疫系に依存し、必要とする投与量は臨床医の判断により決定される。通常、適当な投与量は、患者一人当たり、本発明のペプチド（エピトープペプチド）では1~100 mg、エピトープペプチドパルス細胞では $10^6 \sim 10^9$ 個の含有量とする。また、投与間隔は、対象、目的により設定することができる。

#### 【0105】

また本発明の薬剤によって予防もしくは治療効果が期待されるアデノウイルス関連疾患としては、例えば、肺炎を代表とする呼吸器感染症、プール熱や流行性角結膜炎を代表とする眼感染症、胃腸炎などの腸管感染症、出血性膀胱炎や尿道炎等の泌尿生殖器感染症等を挙げることができる。

#### 【0106】

本発明の薬剤（ワクチン等）が接種可能な動物としては、免疫系を有し、かつアデノウイルスに感染し得る生物であれば特に制限されないが、好ましくは、ヒトである。

#### 【0107】

本発明の更なる一局面として、本発明のペプチドを利用したアデノウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞の定量（検出・測定）方法を提供する。

#### 【0108】

アデノウイルスに特異的なCTLが、ハイリスクの患者（何らかの原因により免疫能が低下した人、先天性免疫不全症患者、又は骨髄移植、造血幹細胞移植、臍帯血移植、固形臓器移植を受けて拒絶予防のために免疫抑制剤の投与を受けている患者、慢性ウイルス感染症患者、エイズ患者、高齢者、幼小児、妊婦等）の末梢血に存在するか否かを知ることは、抗ウイルス剤や免疫抑制剤の適正な使用を含め、これらの感染症管理の上で重要な情報である。アデノウイルスに特異的なCTLの定量は、例えば、本発明のペプチド（CTLエピトープペプチド）を用いた以下の3つの方法によって行うことができるが、必ずしもこれらの方法に制限されない。

#### 【0109】

##### （a）定量方法1

本発明のCTLエピトープペプチドを使用して作製したMHC-テトラマー試薬を用いて、末梢血中のアデノウイルスに特異的なCTLを定量することができる。定量は、例えば、以下のようにして実施することができる。末梢血あるいはPBMCを、適当な濃度のMHC-テトラマー試薬と反応させる。該MHC-テトラマー試薬と結合したCTLは標識色素により染色されるので、フローサイトメーター、顕微鏡等を用いてカウントする。MHC-テトラマー試薬と反応させる時に、MHC-テトラマー試薬と異なる色素で標識された抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体等を反応させる事で、アデノウイルスに特異的なCTLのT細胞サブセットも同時に判定できる。

#### 【0110】

##### （b）定量方法2

PBMCを本発明のCTLエピトープペプチドで刺激することによってCTLが産生するIFN  $\gamma$ （interferon gamma）、TNF（tumor necrosis factor）、インターロイキン等のサイトカイン及び／又はケモカインを定量する方法である。以下にIFN  $\gamma$ を例にとり具体的に方法を示す。

#### 【0111】

##### b-1 サイトカイン定量による方法1（細胞内IFN $\gamma$ 産生細胞定量）

PBMCを適当な培地におよそ $2 \times 10^6$ /mLの細胞濃度で浮遊させ、本発明のCTLエピトープペプチドを加える。さらに細胞内蛋白輸送阻止剤（例えば、Brefeldin AやMonensin等）を加え、5% CO<sub>2</sub>恒温槽にて37℃で5~16時間培養する。培養後、T細胞マーカー抗体（抗CD3

10

20

30

40

50

抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体)あるいは／または、MHC-テトラマー試薬と反応させ、細胞を固定後、膜透過処理を行い、色素標識抗IFN $\gamma$ 抗体を反応させる。フローサイトメーター等を用いて解析し、全細胞中、T細胞中あるいはMHC-テトラマー陽性細胞中のIFN $\gamma$ 陽性細胞率を定量する。

#### 【0112】

b-2 サイトカイン定量による方法2 (エリスポットアッセイ)

抗IFN $\gamma$ 抗体を固相化した96穴MultiScreen-HAプレート (Millipore社)にPBMCをまく。エピトープペプチドを各穴に入れ37℃の5% CO<sub>2</sub>恒温槽培養器にて20時間培養する。翌日、プレートを洗浄し、抗IFN $\gamma$ 抗体、ペルオキシダーゼ標識抗IgG抗体の順で反応させる。さらにペルオキシダーゼの基質を加え、発色によりIFN $\gamma$ スポットを可視化し、実体顕微鏡でカウントする。

10

#### 【0113】

b-3 サイトカイン定量による方法3 (培養上清中に分泌されたIFN $\gamma$ を定量する方法)

PBMCを適当な培地におよそ $2 \times 10^6$ /mLの細胞濃度で浮遊させ、本発明のCTLエピトープペプチドを加える。5% CO<sub>2</sub>恒温槽にて37℃で24~48時間培養する。培養後、上清を回収し、その中に含まれるIFN $\gamma$ 濃度を市販のELISAキット (例えばMBL社のHUMAN IFN gamma ELISA) を使用して定量する。

#### 【0114】

(c) 定量方法3

20

細胞表面蛋白質特異的抗体を用いて定量を行う。特異的CTLは、特異的なペプチドの刺激により細胞表面に発現が増強する細胞表面蛋白質 (例えばCD107a、CD107b、CD63、CD69など) が報告されている。このような蛋白質を特異的に認識する標識抗体と、ペプチド刺激したPBMC等を混合する事で、標識抗体と結合したCTLは標識色素により染色されるので、フローサイトメーター、顕微鏡等を用いてカウントする。標識抗体と反応させる時に、同時にあるいは、順番に、標識抗体と異なる色素で標識された抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体等を反応させる事で、アデノウイルスに特異的なCTLのT細胞サブセットも同時に判定できる。

#### 【0115】

本発明の定量方法の好ましい態様として、具体的には、上述の(a)~(c)の定量方法を挙げることができる。

30

#### 【0116】

従って本発明の定量方法の好ましい態様は、本発明のペプチドで末梢血を刺激し、該ウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞を取得し、細胞傷害性T細胞が産生するサイトカイン及び／又はケモカイン及び／又は細胞表面分子を測定することを特徴とする、アデノウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞の定量方法に関する。

#### 【0117】

また、MHC-テトラマー (またはモノマーもしくは多量体) 試薬は、前述のように特異的なCTLの分離精製特異的なCTLの定量だけでなく、特異的なCTLの定量に用いる事ができ、別の態様としては、本発明のペプチドからMHC-テトラマー試薬を調製し、MHC-テトラマー試薬と末梢血とを反応させることを特徴とする、該末梢血中のアデノウイルスに特異的な細胞傷害性T細胞の定量方法に関する。

40

上記方法においては、被検者から予め取得・単離された末梢血試料を用いることができる。

#### 【0118】

さらに本発明は、本発明のペプチドを用いて、細胞傷害性T細胞を誘導することを特徴とする、細胞傷害性T細胞の誘導 (活性化) 方法を提供する。

#### 【0119】

本発明の誘導方法の好ましい態様としては、本発明のペプチド (例えば、HLA-A24等拘束性抗原ペプチド) と、末梢血単核球を血漿を含む培地中で接触させることにより、アデ

50

ノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導する方法に関する。

また、上記方法によって誘導されたアデノウイルス特異的CTLを検出及び定量する方法もまた本発明に含まれる。

また、上述の方法によって誘導されたアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞は、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤の成分となり得る。従って、上述の方法によってアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞を誘導し、該T細胞を取得することによって、受動免疫療法剤を製造することが可能である。

#### 【0120】

本発明は、本発明のアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞の誘導方法を用いた受動免疫療法剤の製造方法を提供する。

10

#### 【0121】

本製造方法の好ましい態様としては、本発明のペプチドもしくは該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞によって末梢血リンパ球を刺激してアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞を取得する工程を含む方法である。

#### 【0122】

また好ましい別の態様においては、本発明のペプチドから調製した主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血リンパ球とを反応させ、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞傷害性T細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性T細胞を取得する工程を含む、アデノウイルスに対する受動免疫療法剤の製造方法である。

20

上記製造方法には、上述の工程に加えて、必要に応じて、「取得される細胞傷害性T細胞へ薬学的に許容される担体を混合する工程」を含んでいてもよい。

#### 【0123】

さらに本発明のペプチドを用い作製した、MHC-テトラマー試薬は、特異的なCTLの定量だけでなく細胞内サイトカイン産生細胞定量法や細胞表面蛋白質に対する特異抗体と組み合わせることで、特異的CTLの分化段階や機能性も同時に判定する事が可能である。

#### 【0124】

さらに本発明は、本発明に記載のペプチド、該ペプチドをコードする核酸、該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞、該ペプチドもしくは該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞により末梢血リンパ球を刺激して得られるアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞、または該ペプチドから調製した主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血リンパ球とを反応させ、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞傷害性T細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性T細胞のいずれかを、個体（例えば患者等）へ投与する工程を含む、アデノウイルスの感染を治療または予防する方法に関する。本発明の予防もしくは治療する方法における個体とは、免疫系を有し、かつアデノウイルスに感染し得る生物であれば特に制限されないが、好ましくはヒトである。個体への投与については、上記本発明の薬剤の投与にならうことができる。

30

#### 【0125】

さらに本発明は、本発明に記載のペプチド、該ペプチドをコードする核酸、該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞、該ペプチドもしくは該ペプチドをHLAに提示した抗原提示細胞により末梢血リンパ球を刺激して得られるアデノウイルス特異的な細胞傷害性T細胞、または該ペプチドから調製した主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーと末梢血リンパ球とを反応させ、該主要組織適合性抗原複合体及び／又は主要組織適合性抗原複合体-テトラマーに細胞傷害性T細胞が結合した結合体を形成させ、該結合体から単離して得られる細胞傷害性T細胞のいずれかの、アデノウイルスの感染を治療または予防するためのワクチンまたはアデノウイルスに対する受動免疫療法剤（免疫治療剤）の製造における使用に関する。

40

#### 【0126】

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入

50

れられる。

# 【実施例】

## 【0127】

以下に実施例を示し、本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。特に断りがない限り、実験法は、下記の成書を参考に行った（免疫実験操作法、右田俊介、紺田進、本庶佑、濱岡利之、南江堂）。

## 【0128】

〔実施例1〕 アデノウイルス特異的CTLエピトープ候補ペプチドの選択

アデノウイルスは、51タイプの血清型が報告されており、6種類のサブグループ（A～F）に分類される。移植後の感染症で特に問題となるサブグループBの11型を特異的に認識するエピトープペプチド、及びサブグループBだけでなくアデノウイルス全般に特異的なエピトープペプチドを発明する為に、51タイプの血清型の中で、最も相同性の高い蛋白質であるヘキソンに関して解析を行った。アデノウイルス粒子は直径80～90 nmのエンベロープをもたない正20面体構造をしている。正20面体の20個の三角形の面と稜を形づくるのがヘキソンである。

## 【0129】

本発明のアデノウイルスのヘキソンに特異的なエピトープ候補ペプチドの選択は、日本人の約60%が保持するHLA-A\*24分子に対して実施した。具体的には、HLA-A\*24分子に対して結合モチーフを有する8～10個のアミノ酸よりなるエピトープ候補ペプチドを検索し得る、インターネット上に公開されている複数のソフトウェアに照合して実施した。

## 【0130】

その結果、アデノウイルス11型ヘキシソンのアミノ酸配列よりHLA-A\*24分子の結合モチーフを有する9個のアミノ酸よりなるCTLエピトープ候補ペプチドを10種類選択しペプチドを合成した。以下に合成したCTLエピトープ候補ペプチドを示す。陽性コントロール用のペプチドとしてEBVのBRLF1蛋白質のHLA-A\*2402拘束性エピトープペプチド（TYPVLEEMF（配列番号：11））とHCMVのpp65蛋白質のHLA-A\*2402拘束性エピトープペプチド（QYDPVALF（配列番号：12））を合成した。陰性コントロール用のペプチドとしては、HIVのエンベロープ(envelope)蛋白質のHLA-A\*2402拘束性ペプチド（RYLRDQQLL（配列番号：13））を合成した（Kuzushima K, Hayashi N, Kudoh A, Akatsuka Y, Tsujimura K, Morishima Y, Tsurumi T. Tetramer-assisted identification and characterization of epitopes recognized by HLA A\*2402-restricted Epstein-Barr virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells . Blood. 2003;101 :1460-1468）。

## 【0131】

合成したアデノウイルス11型ヘキシソンのHLA-A\*24結合性ペプチド

Lys Tyr Thr Pro Ser Asn Val Thr Leu (KYT) (配列番号：7)

Asp Tyr Leu Ser Ala Ala Asn Met Leu (DYL) (配列番号：1)

Leu Tyr Ala Asn Ser Ala His Ala Leu (LYA) (配列番号：2)

Val Tyr Ser Gly Ser Ile Pro Tyr Leu (VYS) (配列番号：3)

Thr Tyr Phe Asn Leu Gly Asn Lys Phe (TYF) (配列番号：4)

Ser Tyr Gln Leu Leu Leu Asp Ser Leu (SYQ) (配列番号：8)

Leu Tyr Ser Asn Val Ala Leu Tyr Leu (LYS) (配列番号：5)

Asn Tyr Asn Ile Gly Tyr Gln Gly Phe (NYN) (配列番号：9)

Asn Tyr Ile Gly Phe Arg Asp Asn Phe (NYI) (配列番号：10)

Gly Tyr Lys Asp Arg Met Tyr Ser Phe (GYK) (配列番号：6)

## 【0132】

表1に合成したアデノウイルス11型ヘキシソンのHLA-A\*24結合性ペプチドの特徴を示す。合成したペプチドのN末端側から3つのアミノ酸配列をペプチド名とした略号で示す。左から、ペプチド名、アミノ酸配列、アデノウイルス11型ヘキシソンのアミノ酸配列上の位置、アミノ酸数、解析に用いたBIMAS (BioInformatics & Molecular Analysis Section/ <http://thr.cit.nih.gov/index.shtml>) のHLA Peptide Binding Predictions (<http://thr.c>

it.nih.gov/molbio/hla\_bind/) で算出されたスコアを示した。このスコアは、HLA-A\*24とペプチドとの親和性を予測する数値で、スコアが高い程、HLAとペプチドが安定した複合体を形成する可能性がある事を意味する。

【0133】

【表1】

| ペプチド名 | アミノ酸<br>配列 <sup>a</sup> | 位置      | アミノ酸数 | スコア <sup>b</sup> |
|-------|-------------------------|---------|-------|------------------|
| KYT   | KYTPSNVTL<br>(配列番号:7)   | 482-490 | 9     | 480              |
| SYQ   | SYQLLLDSL<br>(配列番号:8)   | 366-374 | 9     | 360              |
| DYL   | DYLSAANML<br>(配列番号:1)   | 641-649 | 9     | 360              |
| LYS   | LYSNVALYL<br>(配列番号:5)   | 469-477 | 9     | 280              |
| VYS   | VYSGSIPYL<br>(配列番号:3)   | 696-704 | 9     | 200              |
| LYA   | LYANSAHAL<br>(配列番号:5)   | 889-897 | 9     | 200              |
| NYN   | NYNIGYQGF<br>(配列番号:9)   | 769-777 | 9     | 180              |
| TYF   | TYFNLGNKF<br>(配列番号:4)   | 37-45   | 9     | 158              |
| NYI   | NYIGFRDNF<br>(配列番号:10)  | 322-330 | 9     | 150              |
| GYK   | GYKDRMYSF<br>(配列番号:6)   | 782-790 | 9     | 120              |

【0134】

上記表1中のaおよびbの記号の説明を以下に示す。

a アンカーモチーフは、太字のアミノ酸で示されている。

b 算出されたHLA-A\*24から解離する半分の時間は、コンピュータープログラム(BioInformatics & Molecular Analysis Section(BIMAS) HLA Peptide Binding Predictionsのウェブ

【0135】

〔実施例2〕 アデノウイルス特異的CTLエピートープペプチドの同定-HLA型の選定

アデノウイルス特異的CTLエピートープ候補ペプチドは、HLA-A\*24分子に対して結合モチーフを有する。したがって、HLA-A\*24分子保持者由来の末梢血を用いてエピートープペプチドを同定する事が望ましい。最初に、供血者がHLA-A\*24あるいはHLA-A\*2分子保持者であるかどうかの判定を血清法にて実施した。具体的には、健康成人末梢血100 $\mu$ L、あるいは末梢血から分離したPBMC 2 $\sim$ 10 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞に対して抗HLA-A\*24抗体（クローン名 22E1、MBL社）あるいは抗HLA-A\*2抗体（クローン名 BB7.2、MBL社）を1 $\mu$ gあるいは10 $\mu$ g/mLの濃度でそれぞれ加えた。それぞれの陰性コントロールとしてアイソタイプ抗体を同様に加え、室温にて15 $\sim$ 30分反応後、FITC (fluorescein isothiocyanate) 標識抗マウスIgG抗体を反応させた。末梢血を用いた場合は、溶血固定試薬 (OptiLyse B、Beckman Coulter社) の手法に従い、PBMCの場合は洗浄後、それぞれフローサイトメーターFACSCalibur (BECTON DICKINSON社) にて反応性を検討した。図1にHLA型の判定例を示す。以降の検討は、抗HLA-A\*24抗体に反応性を示した10名の健康成人のPBMCを用いて行った。

【0136】

〔実施例3〕 アデノウイルス特異的CTLエピートープペプチドの同定-抗原提示細胞の調製  
(1)EBV感染B細胞株の調製

定法(Kuzushima K, Yamamoto M, Kimura H, Ando Y, Kudo T, Tsuge I, Morishima T. Establishment of anti-Epstein-Barr virus (EBV) cellular immunity by adoptive tra

nsfer of virus-specific cytotoxic T lymphocytes from an HLA-matched sibling to a patient with severe chronic active EBV infection. Clin Exp Immunol. 1996;103:192-198)に従い、EBV産生細胞株であるB95-8細胞(JCRB Cell Bankより入手)の上清(生EBVウイルスを含む)とPBMCを混合培養し、EBV感染B細胞株(Lymphoblastoid cell line、以下、EBV感染LCLと称する)を樹立した。約2週間後にHLA分子の発現、CD80、CD83とCD86の発現を確認した。

#### 【0137】

##### (2)CD40-B細胞の調製

ヒトCD40Lを遺伝子導入し、安定的に発現させたNIH3T3細胞(NIH-CD40L)とPBMCを、IL-4存在下で共培養した。NIH-CD40Lは96 GyのX線照射により増殖阻害し、3~4日毎に共培養を繰り返した(Kondo E, Topp MS, Kiem HP, Obata Y, Morishima Y, Kuzushima K, Tanimoto M, Harada M, Takahashi T, Akatsuka Y. Efficient generation of antigen-specific cytotoxic T cells using retrovirally transduced CD40-activated B cells. J Immunol. 2002;169:2164-2171)。約2週間後にHLA分子の発現、CD80、CD83とCD86の発現を確認した。

#### 【0138】

##### (3)樹状細胞の調製

PBMCをプラスチック製の培養皿で37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温槽内にて2時間培養し、培養皿に接着しなかった細胞を軽く洗い流した。これにGM-CSFとIL-4を加え24時間培養後、続けてTNFαとIL-1βおよびPGE2 (Prostaglandin E2)を加え、24~48時間培養した。適当な培地等で軽く洗い流して回収できた細胞を樹状細胞とした(Dauer M, Obermaier B, Herten J, Haerle C, Pohl K, Rothenfusser S, Schnurr M, Endres S, Eigler A. Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. J Immunol. 2003;170:4069-4076)。48時間後にHLA分子の発現、CD80、CD83とCD86の発現を確認した。

#### 【0139】

〔実施例4〕 アデノウイルス特異的CTLエピトープペプチドの同定-アデノウイルス特異的CTLの誘導

##### (1)抗原提示細胞を利用した誘導

抗HLA-A\*24抗体に反応性を示した健康成人のPBMCより、前述の抗原提示細胞(EBV感染LCL、CD40-B細胞、樹状細胞)を予め調製した。抗原提示細胞をパルス用培地(0.1% 人血清アルブミン/55 μM 2-メルカプトエタノール/RPMI 1640)あるいは、AIM-V medium (Invitrogen社)に浮遊させ、10 μg/mLの濃度でCTLエピトープ候補ペプチドを加え、およそ15分間隔で穏やかに混合させながら室温にて30~60分間放置後、過剰量の洗浄液(2% ウシ胎児血清(FCS)/PBS)にて3回洗浄し、HLA分子に未結合のペプチドを洗い流した。この操作を行う事で、抗原提示細胞上のHLA分子にCTLエピトープ候補ペプチドが結合すると考えられる。この操作を行った抗原提示細胞をペプチドパルス抗原提示細胞と呼ぶ。ペプチドパルス抗原提示細胞は、増殖能を失わせる為に、致死量のX線照射、またはマイトマイシンC処理を行った。これを同一人物から分離したPBMC、あるいはCD8陽性またはCD4陽性のT細胞と混和し37℃、5% CO<sub>2</sub> 恒温槽にて培養を行った。用いる培地は、10%FCS含有RPMI 1640培地、あるいは10%ヒト血清含有RPMI1640培地、または、1~10%のヒト血漿含有RPMI 1640培地等の検討を行ったが、本方法においては、10%ヒト血清含有RPMI1640培地で良好な結果が得られた。T細胞の生存の維持と、増殖を補助する目的でIL-2(シオノギ製薬社)を添加したが、そのタイミングは通常混合培養開始後7~10日目とする報告が多く、本発明ではIL-2は培養開始時、培養開始2日後、6日後等の検討を行ったが培養開始2日後に投与した場合に良好な結果が得られた為、培養開始2日後に50 U/mLの濃度で加えた。培養開始7日後に再度ペプチドパルス抗原提示細胞を用いて刺激を加えた。1週間毎にペプチドパルス抗原提示細胞を用いて刺激を加え、CTL誘導の評価は、およそ2週間後と4週間後に実施した。アデノウイルス特異的CTLの誘導が確認できた場合は、更にペプチドパルス抗原提示細胞を用いて刺激を加えCTLラインを樹立した。

## 【0140】

## (2) 抗原提示細胞を利用しない誘導法

本誘導法は、PBMC培養液中にペプチドを投入してCTLを誘導する方法である。PBMC中に存在する抗原提示細胞、例えば、樹状細胞、B細胞、マクロファージ、ある種のT細胞にペプチドが提示され、PBMCに含まれるCTL前駆細胞が刺激を受け増殖すると考えられる。前述の抗原提示細胞を利用した誘導法と異なり、前もって抗原提示細胞を調製する必要が無い点で区別され、簡便に実施できる事が利点である。

## 【0141】

抗HLA-A\*24抗体に反応性を示した健康成人より採血した末梢血を3,000 rpmで5～10分間遠心処理し、上清の血漿部分を回収した。血漿部分以外は従来法に従いPBMCを分離した。誘導に用いる培地に数%の血漿を加える事が特徴である。本発明では5%の血漿を加えた場合に良好な結果が得られた。培地は一般に細胞培養に用いる培地に適切な添加物と抗生物質を加えた。本発明に用いたCTL誘導培地は、RPMI1640 Hepes modify(Sigma社)に2-メルカプトエタノール、L-グルタミン、抗生物質としてストレプトマイシンとペニシリンを加えた培地を使用した。これ以外にインスリン、トランスフェリン、亜セレン酸、ピルビン酸、人血清アルブミン、非必須アミノ酸溶液等を加える事もできる。PBMC 1～3×10<sup>6</sup>個を培地1～2.5 mLに浮遊させた。これに1～20 μg/mLの濃度で候補ペプチドを加えた。ペプチドの濃度は、ペプチドの溶解度に応じて変更できる。本発明では10 μg/mLにて実施した。2日後に20～100 U/mLの最終濃度でIL-2の添加を行った。PBMCとペプチドの混合培養は、炭酸ガス交換可能な丸底の培養皿を用いる事が望ましく、本発明においては、ポリプロピレン製14 mLの丸底チューブ(Becton Dickinson社)または、96 穴 U底細胞培養用マイクロテストプレート(Becton Dickinson社)を用いた。アデノウイルス特異的CTLの確認は、培養2週間および4週間後を目処に実施した。培養2週間後を目処に、再度10 μg/mLのペプチドで刺激した。アデノウイルス特異的CTLの誘導が確認できた場合は、ペプチドパルス抗原提示細胞を用いて刺激を加えCTLラインを樹立した。

## 【0142】

〔実施例5〕 アデノウイルス特異的CTLエピトープペプチドの同定-アデノウイルス特異的CTLの確認

前述の方法で培養した細胞集団にアデノウイルス特異的なCTLが存在するかどうかの検討は、細胞内IFN γ 産生細胞定量法、MHC-テトラマー法、エリスロットアッセイ、膜表面蛋白質の発現検討により実施した。

## 【0143】

## 1. 細胞内IFN γ 産生細胞定量法による特異的CTL誘導の確認

前述の方法で誘導した細胞集団の約1/10～全量を96穴U底細胞培養用マイクロテストプレートに移し、誘導に用いたペプチドを最終0.01～0.05 μg/mLの濃度で加えた。さらに細胞内蛋白輸送阻止剤(例えば、Brefeldin AやMonensin等)を加え、5% CO<sub>2</sub>恒温槽にて37℃で5～16時間培養した。培養後、細胞を洗浄し、PE(phycoerythrin)標識MHC-テトラマー試薬とPC5(phycoerythrin-Cy5)標識CD8抗体(Beckman Coulter社)を加え、室温にて15～30分放置した。洗浄後、4%ホルムアルデヒドにて、4℃、15分固定後、過剰量の洗浄液にて洗った。0.1%サポニンにて膜透過処理後、FITC標識抗IFN γ 抗体(Beckman Coulter社)を加え、室温にて15～30分反応させた。洗浄後、フローサイトメーターを用いて、T細胞中のIFN γ 陽性細胞率あるいはMHC-テトラマー試薬陽性細胞中のIFN γ 陽性細胞率を定量した。

## 【0144】

図2に既知陽性コントロールペプチドを用いて、抗原提示細胞を利用しない誘導法にて特異的CTLを誘導し、細胞内IFN γ 産生細胞定量法にて検討した結果を示す。Donor ID \*24-2のPBMCをEBV BRLF1(a, b)またはCMV pp65(c, d)のHLA-A\*2402拘束性エピトープペプチドで13日間刺激後、陰性コントロール(HIV)ペプチド(a, c)と、刺激に用いたそれぞれのペプチド(b, d)でMonensin存在下14時間刺激した。これを、PE標識MHC-テトラマー試薬(MBL社)、PC5標識CD8抗体、FITC標識IFN γ 抗体で3重染色しフローサイトメ

ターを用いて解析した結果を示す。ドットプロット展開図中の数字は、四分割した領域に存在する細胞が全細胞に占める割合(%)を示す。四分割した領域は今後、UL(左上)、UR(右上)、LL(左下)、LR(右下)と表記する。X軸にCD8、Y軸にIFN $\gamma$ に対する蛍光強度をlogスケールで示したドットプロット展開図(左列)では、EBV BRLF1とCMV pp65はそれぞれの特異的ペプチド(b, d)で再刺激された場合にのみURにIFN $\gamma$ 陽性CD8陽性細胞が出現し、HIVペプチドを加えた場合(a, c)は殆ど出現しない。しかしながらHIVあるいは陽性コントロールペプチドを加えたどちらの細胞集団にも、EBV BRLF1やCMV pp65特異的CTLが存在している事は、X軸にCD8、Y軸にMHC-テトラマー試薬に対する蛍光強度をlogスケールで示したドットプロット展開図(中央列)でURにCD8陽性MHC-テトラマー試薬陽性細胞集団を見れば明らかである。すなわち、HIVペプチドを加えたEBV BRLF1では13.0%の、CMV pp65では28.8%の特異的CTLが存在するが、特異的なペプチド刺激が加えられない限りこれらのCTLはIFN $\gamma$ を産生しない事が明らかになった。更に、X軸にIFN $\gamma$ 、Y軸にMHC-テトラマー試薬に対する蛍光強度をlogスケールで示したドットプロット展開図(右列)では、HIVペプチドを加えた場合(a, c)、MHC-テトラマー試薬陽性の細胞集団(ULとUR)の殆どはIFN $\gamma$ を産生せずULに存在しているが、特異的ペプチド(b, d)の刺激により、その半分以上の細胞がURに移動し、IFN $\gamma$ を産生した。

#### 【0145】

この結果より、CTLエピトープペプチドを加えて培養したPBMC中には、再刺激によりIFN $\gamma$ を産生する細胞が誘導され、この細胞はMHC-テトラマー試薬で染色される事から特異的なCTLであることが明らかになった。すなわち特異的なCTLが誘導されているか否かは、細胞内IFN $\gamma$ 産生細胞定量法にて判断できると考えられた。同様にアデノウイルス特異的CTLエピトープ候補ペプチドを用いて特異的なCTLが誘導されるか否かの検討を10名の健康成人PBMCを用いて実施した。図3a-dおよび図3e-hに代表的な2名(Donor ID\*24-8および\*24-12)の細胞内IFN $\gamma$ 産生細胞を定量した結果を示す。

#### 【0146】

陽性コントロールのEBV BRLF1では、多量のCD8陽性IFN $\gamma$ 陽性(産生)細胞(\*24-8では24.9%、\*24-12では9.57%)がURに出現する。しかし陰性コントロールのHIVペプチドを再刺激で加えた場合は、殆どURに出現しない(\*24-8では0.62%、\*24-12では0.18%)。このようにHIVペプチドを加えた場合のCD8陽性IFN $\gamma$ 陽性細胞(UR)とアデノウイルス特異的CTLエピトープ候補ペプチドで再刺激した場合のCD8陽性IFN $\gamma$ 陽性細胞(UR)の割合を比較した結果、Donor ID \*24-8(図3a-d)では、VYS、LYA、TYFとGYKで特異的なCTLの誘導が確認された。LYAのように、HIVペプチドを加えた場合と比較して余り差が無くても、LYAペプチドを再刺激に用いた場合に蛍光強度の強いIFN $\gamma$ 産生細胞がURにドットして確認されたため、特異的CTLが誘導されたと考えられた。同様にDonor ID \*24-12(図3e-h)では、DYLとLYSで特異的CTLの誘導が確認された。

#### 【0147】

### 2. エリスポットアッセイによるCTLの確認

エリスポットアッセイは市販のキット(例えばMABTECH社等)を購入し、その能書に従い実施する事ができる。また以下のように実施する事もできる。96穴MultiScreen-HAプレート(Millipore社)を抗IFN $\gamma$ モノクローナル抗体(R&D Systems社)で一晩、4℃にてコーティングした。各穴をPBSで洗浄後、標的細胞を各穴にまいた。標的細胞はHLA-A\*24分子を細胞表面に発現している細胞であれば使用する事ができ、例えば174CEM.T2細胞にHLA-A\*24分子の遺伝子を導入した培養細胞T2-A24を使用する事ができる。またHLA-A\*24分子を細胞表面に発現しているEBV感染LCLも標的細胞として用いる事ができる。これら標的細胞と、アデノウイルス特異的なCTLエピトープ候補ペプチド、あるいは陰性コントロール(HIV)ペプチドを各穴に入れて、30分室温で静置した後、適当な数のCTLを添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>培養器にて20時間培養した。エピトープ候補ペプチドに反応したCTLはこの培養期間にIFN $\gamma$ を分泌し、このIFN $\gamma$ はプレートにコーティングした抗IFN $\gamma$ モノクローナル抗体と結合した。培養後、0.05% Tween-20添加PBSでプレートを洗浄し、抗IFN $\gamma$ ポリクローナル抗体(Genzyme社)、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGヤギ血清の順で各々90分ずつ室温

にて反応させた。さらにペルオキシダーゼの基質である3-amino-9-ethylcarbasole (Sigma社)と0.015%のH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む0.1M sodium acetate buffer (pH 5.0)を各穴に入れ、室温で40分反応させ、IFN $\gamma$ スポットを可視化した。スポットは実体顕微鏡でカウントした。

#### 【0148】

図4は、エリスロットアッセイにより特異的CTLを検出した例を示す図である。アデノウイルス特異的なCTLエピトープ候補ペプチドLYA、VYS、TYFとLYSで陰性コントロール (HIV) ペプチドと比較してIFN $\gamma$ スポットが観察された。これを実体顕微鏡下でカウントし、グラフ化した。

#### 【0149】

### 3. 膜表面蛋白質の発現によるCTLの確認

CTLは、その特異的刺激により細胞表面蛋白質 (例えばCD107a、CD107b、CD63、CD69など) の発現が増強する事が報告されている。前述の方法で誘導した細胞集団の約1/10～全量を96穴U底細胞培養用マイクロテストプレートに移し、誘導に用いたペプチドを最終0.01～0.05  $\mu$ g/mLの濃度で加え、5% CO<sub>2</sub>恒温槽にて37°Cで5～16時間培養した。培養後、細胞を洗浄し、各種標識された細胞表面蛋白質抗体等とMHC-テトラマー試薬あるいはCD8抗体を加え穏やかに攪拌後、室温にて15～30分間放置した。洗浄後、フローサイトメーターを用いて、CD8陽性細胞あるいはMHC-テトラマー陽性細胞中の各種膜表面蛋白質発現細胞数を検討した。

#### 【0150】

サイトカインの定量法を用いたエピトープ候補ペプチドの評価結果を表2に示す。表中の「○」は候補ペプチドを用いて、特異的CTLが誘導できたことを意味し、「×」は特異的CTLを誘導できなかった事を意味する。10名のHLA-A\*24分子保持者由来のPBMCに対して10種類のペプチドを用いて検討した結果、6種類のエピトープ候補ペプチドDYL、VYS、LYA、TYF、LYSとGYKにおいて、ペプチド特異的なサイトカインの産生が確認された。従ってこれら6種類のエピトープ候補ペプチドは、アデノウイルス特異的なCTLエピトープペプチドである。アデノウイルス特異的なCTLエピトープペプチドはHLA-A\*24結合モチーフを有する為、日本人の60%以上の人があるHLA-A\*2402拘束性のエピトープペプチドである可能性が高い。これらの結果を元に、5種類のエピトープペプチドを用いてMHC-テトラマー試薬を合成し、その有用性に関する検討を実施した。

#### 【0151】

#### 【表2】

| Donor ID | EBV   | アデノウイルス 11 型ヘキソンエピトープ候補ペプチド |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------|-------|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|          | BRLF1 | KYT                         | DYL | VYS | LYA | TYF | SYQ | LYS | NYN | NYI | GYK |
| *24-1    | ○     | ×                           | ○   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   |
| *24-2    | ○     | ×                           | ○   | ○   | ×   | ○   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   |
| *24-3    | ○     | ×                           | ×   | ×   | ○   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   |
| *24-5    | ×     | ×                           | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   |
| *24-8    | ○     | ×                           | ×   | ○   | ○   | ○   | ×   | ×   | ×   | ×   | ○   |
| *24-10   | ○     | ×                           | ○   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   |
| *24-11   | ○     | ×                           | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   |
| *24-12   | ○     | ×                           | ○   | ×   | ×   | ×   | ×   | ○   | ×   | ×   | ×   |
| *24-13   | ○     | ×                           | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ○   | ×   | ×   | ×   |
| *24-14   | ○     | ×                           | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   | ×   |

#### 【0152】

〔実施例6〕 アデノウイルス特異的MHC-テトラマー試薬を用いた検討

[MHC-テトラマー試薬の合成]

本発明者らの所属するMBL社は、MHC-テトラマー試薬に関する特許 (US Patent No. 5,635,363とFrench Application No. FR9911133および、U.S. Patent Numbers. 5,723,584;

10

20

30

40

50

5,874,239; 5,932,433; 6,265,552.) を有するBeckman Coulter社より、日本国内における独占的な特許使用許諾権を得ている。これら特許に基づきアデノウイルス特異的なCTLエピトープペプチドとHLA-A\*2402分子を用いてPE標識MHC-テトラマー試薬を作製した。本発明で作製したMHC-テトラマー試薬は例えば、TYF-Tetと略号で示すが、これは、HLA-A\*2402分子とペプチドTYF (TYFNLGNKF/配列番号：4) とβ2-ミクログロブリンの3者複合体を用いて合成されたものを示す。

#### 【0153】

[MHC-テトラマー試薬を用いた定量法]

本発明のCTLエピトープペプチドを使用して作製したMHC-テトラマー試薬を用いて、末梢血、末梢血から分離したPBMC、CTLエピトープペプチドを使用して誘導したCTLラインを試料として、アデノウイルス特異的なCTLの定量を行った。以下にPE標識MHC-テトラマー試薬を用いた場合を例に実施例を示す。用いるフローサイトメーターの機種に合わせ標識色素は適切な組合せで用いれば良く、下記に限定される物ではない。

#### 【0154】

<末梢血の場合>

採血した末梢血200 μLに対して、10 μLのPE標識MHC-テトラマー試薬と、20 μLのFITC標識T細胞表面抗体（例えばCD8, CD4, CD3）等を加えた。さらに、混入した赤血球による非特異的な蛍光を除外するために、PC5等で標識されたCD45抗体を加えても良い。穏やかに混合し室温にて30分間放置した。OptiLyse Bを加え能書に従い溶血固定処理を行った。2 mLのPBSを加え攪拌後、400 x gで5分間遠心分離した。上澄みを吸引廃棄後、細胞を500 μLのPBSに再懸濁し、24時間以内にフローサイトメーターにて解析した。

#### 【0155】

<PBMCまたはCTLエピトープペプチドを使用して誘導したCTLラインの場合>

適量のPBMC (10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup>個) または、CTLエピトープペプチドを使用して誘導した適量のCTLラインに対して10 μLのPE標識MHC-テトラマー試薬と、20 μLのFITC標識T細胞表面抗体（例えばCD8, CD4, CD3）等を加えた。さらに、混入した赤血球による非特異的な蛍光を除外するために、PC5等で標識されたCD45抗体を加えても良い。穏やかに混合し室温にて30分間放置した。3 mLのPBSを加え攪拌後、400 x gで5分間遠心分離した。上澄みを吸引廃棄後、細胞を500 μLのPBSに再懸濁した。CTLラインの場合は、死細胞による非特異的な蛍光を除外するために、7-AAD viability Dye (死細胞検出試薬、MBL社) を加えてもよい。24時間以内にフローサイトメーターにて解析した。

#### 【0156】

図5にペプチドにて誘導したCTLラインを作製した5種類のMHC-テトラマー試薬を用いて染色した結果を示す。X軸にCD8、Y軸にMHC-テトラマー試薬に対する蛍光強度をlogスケールで解析したドットプロット展開図で示す。

#### 【0157】

(1) HLA-A\*2402 TYFNLGNKF (配列番号：4) テトラマー試薬 (TYF-Tet) の反応性について

TYF-Tetは、Donor ID\*24-2と\*24-8で明らかなCD8陽性TYF-Tet陽性の細胞集団がURに検出された。この事は、TYFがHLA-A\*2402拘束性を示すアデノウイルスヘキソン特異的なCTLEピトープペプチドである事を証明している。

#### 【0158】

(2) HLA-A\*2402 VYSGSIPYL (配列番号：3) テトラマー試薬 (VYS-Tet) の反応性について

VYS-Tetは、Donor ID\*24-2と\*24-8で明らかなCD8陽性VYS-Tet陽性の細胞集団がURに検出された。この事は、VYSがHLA-A\*2402拘束性を示すアデノウイルスヘキソン特異的なCTLEピトープペプチドである事を証明している。またVYS-TetではULにCD8陰性VYS-Tet陽性の細胞集団がDonor ID \*24-1、\*24-3、\*24-11、\*24-12、\*24-14で検出された。これは、VYSがCD8陽性のCTLだけでなく、CD8陰性のCTLも誘導する事が可能なエピトープペプチドである事を示している。

10

20

30

40

50

## 【0159】

(3) HLA-A\*2402 LYANSAHAL (配列番号: 2) テトラマー試薬 (LYA-Tet) の反応性について

LYA-Tetでは、ULにCD8陰性テトラマー試薬陽性の細胞集団が検出された。この事は、CD8陰性LYA-Tet陽性のCTLが存在する事を示唆しており、更に詳細な検討結果を図6に示す。Donor ID\*24-14のPBMCを24日間LYAにて刺激後、LYA-TetおよびCD4、CD3、CD8にて染色した。また陰性コントロールとしてNegativeテトラマー試薬 (MBL社) と反応性を比較した。その結果、CD4陽性LYA-Tet陽性細胞が0.09%、CD8陽性LYA-Tet陽性細胞が0.18%存在し、かつCD3陽性細胞LYA-Tet陽性細胞の比率 (1.13%) が最も高い事が判明した。従って、CD4陰性CD8陰性CD3陽性のHLAクラスI拘束性のCTLが存在し、アデノウイルス感染細胞の排除に参与している可能性が示された。

10

## 【0160】

(4) HLA-A\*2402 LYSNVALYL (配列番号: 5) テトラマー試薬 (LYS-Tet) とHLA-A\*2402 DYLSAANML (配列番号: 1) テトラマー試薬 (DYL-Tet) の反応性について

LYSでは、表2に示した通り、検討した10名中2名で、ペプチド特異的なIFN $\gamma$ の産生が確認され、図3e-hに示した通りDonor ID \*24-12のLYSでは2.95%ものIFN $\gamma$ 産生細胞が存在していたにも関わらず、相応のLYS-Tet陽性の細胞像は得られなかった。またDYLでも、表2に示した通り、検討した10名中4名で、ペプチド特異的なIFN $\gamma$ の産生が確認され、図3e-hに示した通り、DYLでも0.49%のIFN $\gamma$ 産生細胞存在していたにも関わらず、相応のDYL-Tet陽性の細胞像は得られなかった。この事は、LYSとDYLがHLA-A\*2402拘束性を受けず、別のHLA分子の拘束性を受けている事を強く示唆している。LYSの場合、Donor ID\*24-12と\*24-13の2名のHLAジェノタイプを解析し、その2名にHLA-A\*24以外で共通のHLAを検索する事でHLA拘束性は明らかにできると考えられる。DYLの場合は、Donor ID\*24-1、\*24-2、\*24-10と\*24-12の4名のHLAジェノタイプを解析し、その4名にHLA-A\*24以外で共通のHLAを検索する事でHLA拘束性は明らかにできると考えられる。最近報告された論文では、HCMVのpp65蛋白質のHLA-A\*2402拘束性のエピトープペプチドであるQYDPVAALF (配列番号: 12、アミノ酸番号341-349) は同時にHLA-Cw\*0401の拘束性を受ける事が報告された (Kondo E, Akatsuka Y, Kuzushima K, Tsujimura K, Asakura S, Tajima K, Kagami Y, Koderia Y, Tanimoto M, Morishima Y, Takahashi T. Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. Blood. 2004;103:630-638.)。HLA-A\*24拘束性ペプチドは、N末端より2番目の位置にTyr、Phe、Met又はTrpのいずれかが配置され、9あるいは10番目の位置にLeu、Ile、Trp又はPheのいずれかが配置されたペプチドである。HLA-Cw\*0401拘束性ペプチドは、N末端より2番目の位置にTyr、Phe又はProのいずれかが配置され、9あるいは10番目の位置にLeu又はPheのいずれかが配置されたペプチドであり、両者は良く似ている。実際BIMASにて算出されたスコアは、LYSはA\*24の場合は280で、Cw\*0401で200であった。また同様にDYLはA\*24の場合は360で、Cw\*0401で220であった。LYSとDYLに関して日本人で頻度の高いHLA-A、BおよびCに関して同様の検索を実施したが、このような高いスコアを示すHLAはHLA-Cw\*0401以外には存在しなかった。これらのことから、LYS、およびDYLのHLA拘束性に関してHLA-Cw\*0401の可能性が示唆された。

20

30

40

## 【0161】

〔実施例7〕 MHC-テトラマー試薬による健康成人末梢血中のアデノウイルス特異的CTLの検出

何らかの原因により免疫能が低下した人、先天性免疫不全症患者、または骨髄移植、造血幹細胞移植、臍帯血移植、固形臓器移植を受けて拒絶予防のために免疫抑制剤の投与を受けている患者、慢性ウイルス感染症患者、エイズ患者、高齢者、幼小児、妊婦等のハイリスクの患者、または移植ドナーの末梢血中にアデノウイルス特異的CTLが存在するか否かを知ることは、抗ウイルス剤や免疫抑制剤の適正な使用を含めた感染症管理の上で重要である。アデノウイルス特異的MHC-テトラマー試薬を用いれば、採血から1時間程度でアデノウイルス特異的CTLの存在を判定できる。

50

## 【0162】

そこで本発明者らは、健康成人末梢血を用いてアデノウイルス特異的CTLが検出できるか検討した。その結果を図7-aに示す。Donor ID\*24-8の末梢血を用いて4種類のアデノウイルス特異的MHC-テトラマー試薬とEBV BRLF1およびCMV pp65 MHC-テトラマー試薬（MBL社）にて染色した。X軸にCD8、Y軸にINF $\gamma$ に対する蛍光強度をlogスケールで解析したドットプロット展開図にて示した。ドットプロット展開図中の数値は、CD8陽性MHC-テトラマー試薬陽性細胞が生細胞中に占める割合を陽性率（％）として示した。

## 【0163】

その結果、採血直後（day 0）においてCD8陽性MHC-テトラマー試薬陽性の細胞集団が明確に検出されたのは、EBV BRLF1（UR：0.03％）のみであった。他9名でもアデノウイルス特異的MHC-テトラマー試薬を用いて明確な陽性細胞集団は得られなかった。これは、用いた末梢血がいずれも健康成人で、アデノウイルスに感染あるいはアデノウイルス感染症を発症している可能性が低かった事が原因として挙げられる。

## 【0164】

それに対してEBVは成人の90％以上が感染しており、表2に示したように、本発明で検討した10名中9名でEBV BRLF1特異的CTLの誘導に成功した。従って、アデノウイルスに感染している事が明らかな場合や、感染の可能性が高い場合には容易にday 0でも検出できる可能性は高い。続けて、PBMCをそれぞれのエピトープペプチドで10日間刺激培養後（day 10）、同様にMHC-テトラマー試薬にて染色した（図7-b）。

## 【0165】

その結果、10日間の培養で、EBV BRLF1は0.03％から15.6％と約520倍もの陽性率の増加が観察された。TYF-TetとVYS-TetでNegativeテトラマー試薬（MBL社）と比較して明らかなCD8陽性MHC-テトラマー陽性像が得られた。アデノウイルス特異的CTLは、TYFでは153倍（0.01％から1.53％）、VYSでも15倍（0.01％から0.15％）の陽性率の増加が観察された。

## 【0166】

これらの結果から、EBV特異的CTLと比較して陽性率は低い、アデノウイルス特異的CTLは健康成人末梢血中に存在し、10日間の培養でCTL存在の有無を判定できる程度の増殖が可能である事が明らかになった。この事は、本発明で実施した、抗原提示細胞を利用しない誘導法がアデノウイルス特異的CTLの検出の為の簡便で短期間の培養に有効である事を意味している。

## 【0167】

〔実施例8〕 MHC-テトラマー試薬を用いたCTLの機能性評価

MHC-テトラマー試薬は、特異的なCTLの定量だけでなく細胞内サイトカイン産生細胞定量法や細胞表面蛋白質に対する特異抗体と組み合わせることで、特異的CTLの分化段階や機能性も同時に判定する事が可能である。本発明で提供されるCTLエピトープペプチドを用いて合成されたMHC-テトラマー試薬がアデノウイルス特異的CTLの定量と機能解析に有効であるか検討した。その結果を図8に示した。

## 【0168】

図8abは、Donor ID\*24-8のPBMCにTYFペプチドを加えて10日間刺激後、細胞内INF $\gamma$ 産生細胞定量法にて解析した結果である。図8cdは、Donor ID\*24-2のPBMCにVYSペプチドを加えて27日間刺激後、細胞内INF $\gamma$ 産生細胞定量法にて解析した結果である。aとcは、陰性コントロール（HIV）ペプチドにて、bとdは特異的ペプチドにて再刺激した結果である。左側はX軸にCD8、Y軸にMHC-テトラマー試薬に対する蛍光強度をlogスケールで解析したドットプロット展開図で、CTLの定量結果を示す。右側は、X軸にINF $\gamma$ 、Y軸にMHC-テトラマー試薬に対する蛍光強度をlogスケールで解析したドットプロット展開図で、CTLの定性結果を示す。ドットプロット展開図中の数値は、四分割した場合の各細胞が全生細胞中に占める割合（％）を示す。

## 【0169】

特異的CTLを定量した結果から、HIVペプチドで刺激した場合と比較して特異的ペプチド

で刺激した場合では、TYF特異的CTLでは1.67%対0.80%、VYS特異的CTLでは8.33%対5.07%と特異的CTL量が低下する事が明らかになった。

#### 【0170】

これは特異的CTLでは特異的刺激により細胞表面上でTCRの発現レベルが低下するからである (Valitutti S, Muller S, Dessing M, Lanzavecchia A. Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. J Exp Med. 1996 ;183 : 1917-1921. Betts MR, Price DA, Brenchley JM, Lore K, Guenaga FJ, Smed-Sorensen A, Ambrozak DR, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA. The functional profile of primary human antiviral CD8<sup>+</sup> T cell effector activity is dictated by cognate peptide concentration. J Immunol. 2004 ; 172 : 6407-6417)。URの細胞集団が特異的ペプチドを加えた場合、HIVペプチドの場合と比較してX軸側に移動していることからMHC-テトラマー試薬に対する反応性の低下、すなわちMHC-テトラマー試薬と結合するTCRの発現レベルが特異的に低下していることが明らかである。これは言い換えればアデノウイルス特異的CTLが存在している事を意味している。特異的CTLの定性結果からは、HIVペプチドを加えた場合は、MHC-テトラマー試薬陽性細胞 (ULとUR) は、TYF特異的CTL (1.76%) もVYS特異的CTL (8.24%) でも殆どIFN  $\gamma$  を産生する細胞は存在しない。しかしながら特異的ペプチド刺激によりURやLRに細胞集団が移動しIFN  $\gamma$  を産生している事が明らかである。

10

#### 【0171】

この結果から、生体外でペプチド刺激によりIFN  $\gamma$  を産生するアデノウイルス特異的CTLを効率的に誘導できる事が示された。

20

#### 【0172】

〔実施例9〕 MHC-テトラマー試薬によるCTLの精製

PE標識したアデノウイルス特異的MHC-テトラマー試薬と、CTL調製方法にて誘導されたCTLを混合し、室温にて30分間放置した。過剰量の洗浄液で1回洗い、磁気標識抗PEマイクロビーズ (Miltenyi Biotec GmbH社) を加え、4~8°Cで15分間静置した。過剰量の洗浄液で1回洗い、細胞を1 mLの洗浄液に希釈後、自動磁気細胞分離装置 (AutoMACS、Miltenyi Biotec GmbH社) を用いて、MHC-テトラマー陽性細胞、すなわちアデノウイルス特異的CTLを精製した。

#### 【0173】

結果の一例を図9に示す。X軸にアデノウイルス特異的MHC-テトラマー試薬に対する蛍光強度をlogスケールで、Y軸に細胞数で解析したヒストグラム展開図で示す。上段は精製前のCTLを含む細胞集団で、下段は精製後の細胞集団を解析した結果である。精製前後の細胞集団に含まれる特異的CTLの割合を数値で示した。アデノウイルス特異的CTLはいずれも90%以上の純度で本方法にて回収された。この事は、アデノウイルス特異的MHC-テトラマー試薬を用いて、アデノウイルス特異的CTLを高純度で精製できる事を示している。精製したアデノウイルス特異的CTLは、抗CD3抗体とIL-2、X照射し増殖能を損失させた抗原提示細胞で刺激増殖し、受動免疫療法に必要な細胞数を確保した。

30

#### 【0174】

〔実施例10〕 アデノウイルス サブグループ間の反応性の検討

[CTLエпитープTYFに関するサブグループCとの反応性検討]

本発明にて同定されたTYFは、図11-4に示すようにサブグループC特異的なCTLエピトープと4番目と6番目の2箇所でアミノ酸変異が存在する。そこで、TYFにて誘導したCTLラインを用いてサブグループC特異的なCTLエピトープ (TYFSLNNKF (配列番号: 14)、下線は変異アミノ酸を示す) (Leen AM, Sili U, Vanin EF, Jewell AM, Xie W, Vignali D, Piedra PA, Brenner MK, Rooney CM. Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8<sup>+</sup> T cells. Blood. 2004;104:2432-2440.) との交差反応性を検討した。

40

#### 【0175】

ID\*24-8から調製したPBMCを13日間TYFにて刺激後、TYFあるいは、TYFSLNNKF (配列番号

50

：14)にて再刺激し、CTLラインがIFN $\gamma$ を産生するか否か検討した。その結果を図10に示す。X軸にCD8、Y軸にTYF-Tetに対する蛍光強度をlogスケールで解析したドットプロット展開図より、TYF特異的CTLラインでは、TYFの再刺激によりTCRの発現抑制が生じ、CD8陽性TYF-Tet陽性細胞数はTYFを加えた場合に1.22%で、TYFSLNKF(配列番号：14)を加えた場合(1.97%)と比較して若干の低下が観察された。X軸にIFN $\gamma$ 、Y軸にTYF-Tetに対する蛍光強度をlogスケールで解析したドットプロット展開図より、TYFSLNKF(配列番号：14)を加えた場合TYF-Tet陽性細胞(ULとUR)は殆どULに存在しIFN $\gamma$ 産生細胞は存在しないが、TYFを加えた場合は、IFN $\gamma$ 産生細胞がURとLRに観察された。X軸にCD8、Y軸にIFN $\gamma$ に対する蛍光強度をlogスケールで解析したドットプロット展開図より、TYFを加えた場合は多数のIFN $\gamma$ 産生細胞がURに出現するが、TYFSLNKF(配列番号：14)を加えた場合は殆ど出現しない。TYFにて誘導したCTLラインはTYF特異的にIFN $\gamma$ を産生し、2箇所

10

#### 【0176】

従って、本発明にて同定されたTYF CTLエピトープペプチドは、サブグループCと交差反応性を示さない事が明らかになった。

#### 【0177】

〔実施例11〕 アデノウイルス ヘキソン蛋白質のアミノ酸相同配列解析による反応性の検討

アデノウイルスのサブグループ間で、本発明で得られたCTLエピトープペプチドの反応性を検討するためにNCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)より50タイプのアデノウイルス ヘキソンのアミノ酸配列を入手し(Accession Numberの一覧を表3に示す)、アミノ酸相同配列解析を行った。最近、CTLエピトープC末端側のアンカーモチーフ直後のアミノ酸に変異が生じる事で、細胞内蛋白質分解経路にて分解される場所が変化し、結果としてCTLエピトープペプチドが生じなくなる事が報告されている(Beekman NJ, van Veelen PA, van Hall T, Neisig A, Sijts A, Camps M, Kloetzel PM, Neefjes JJ, Melief CJ, Ossendorp F. Abrogation of CTL epitope processing by single amino acid substitution flanking the C-terminal proteasome cleavage site. J Immunol. 2000;164:1898-1905.)。これは、HIVやHCVのような慢性ウイルス疾患において、ウイルス感染細胞がCTLの標的からエスケープし、持続感染が継続する原因の1つと考えられている(Furutsuki T, Hosoya N, Kawana-Tachikawa A, Tomizawa M, Odawara T, Goto M, Kitamura Y, Nakamura T, Kelleher AD, Cooper DA, Iwamoto A. Frequent transmission of cytotoxic-T-lymphocyte escape mutants of human immunodeficiency virus type 1 in the highly HLA-A24-positive Japanese population. J Virol. 2004;78:8437-8445.)。

20

30

#### 【0178】

本発明にて同定された6種類のエピトープペプチドについて、エピトープ領域だけでなくC末端側のアンカーモチーフ直後のアミノ酸についても相同性を検索した。

#### 【0179】

その結果、配列番号：1(DYL)は、サブグループB、C、DおよびEに属する型のアデノウイルスと100%の相同性を示した(図11-1)。配列番号：2(LYA)は、全てのサブグループに属する型のアデノウイルスと100%の相同性を示した(図11-2)。配列番号：3(VYS)は、サブグループB、DおよびEに属する型のアデノウイルスと100%の相同性を示した(図11-3)。配列番号：4(TYF)は、サブグループBに属する11, 21, 34と35型のみと100%の相同性を示した(図11-4)。配列番号：5(LYS)は、サブグループB、DおよびFに属するアデノウイルスと100%の相同性を示した(図11-5)。配列番号：6(GYK)は、サブグループAに属する18型、DおよびEに属するアデノウイルスと100%の相同性を示した(図11-6)。いずれのエピトープペプチドも、そのC末端側直後のアミノ酸に変異は認められなかった。これらの結果を表4にまとめた。配列番号：4(TYF)はサブグループBに特異性の高いCTLエピトープペプチドと考えられた。それ以外

40

50

ペプチドはサブグループBだけでなく、サブグループ間で広範に特異性を示すCTLエピトープペプチドと考えられた。

【0180】

この事は、本発明のCTLエピトープペプチドを単独、あるいは組み合わせて用いる事で広範なアデノウイルスに対する免疫力の診断情報を提供できる事を意味する。さらにアデノウイルスに感染する事無く、広範な反応性を示すアデノウイルス特異的なCTLを誘導できる事から、養子免疫療法に有効であることが示された。

【0181】

【表 3】

| ウイルス<br>血清型 | サブグループ | ACCESSION<br>Number | アミノ酸数<br>(aa) | comment |
|-------------|--------|---------------------|---------------|---------|
| 1           | C      | AP000512            | 964           |         |
| 2           | C      | AP000175            | 968           |         |
| 3           | B      | AAO24104            | 944           | full    |
| 4           | E      | AAS16286            | 936           |         |
| 5           | C      | AP000211            | 952           |         |
| 6           | C      | Q04966              | 465           | partial |
| 7           | B      | AP000548            | 934           |         |
| 8           | D      | P36852              | 517           | partial |
| 9           | D      | CAI05969            | 953           |         |
| 10          | D      | BAA84982            | 383           | partial |
| 11          | B      | AP000452            | 948           | full    |
| 12          | A      | AP000121            | 919           |         |
| 13          | D      | BAD15125            | 305           | partial |
| 14          | B      | BAA76594            | 425           | partial |
| 15          | D      | S37277              | 509           | partial |
| 16          | B      | S37216              | 940           | full    |
| 17          | D      | BAA84983            | 378           | partial |
| 18          | A      | CAA76709            | 318           | partial |
| 19          | D      | BAA84984            | 519           | partial |
| 20          | D      | BAD15129            | 305           | partial |
| 21          | B      | AAG21823            | 949           | full    |
| 22          | D      | BAA84985            | 399           | partial |
| 23          | D      | BAA84986            | 404           | partial |
| 24          | D      | BAA84987            | 363           | partial |
| 25          | D      | BAD15133            | 305           | partial |
| 26          | D      | BAA84988            | 376           | partial |
| 27          | D      | BAD15135            | 305           | partial |
| 28          | D      | BAD15136            | 305           | partial |
| 29          | D      | BAD15137            | 305           | partial |
| 30          | D      | BAD15138            | 305           | partial |
| 31          | A      | P36855              | 468           | partial |
| 32          | D      | BAD15139            | 305           | partial |
| 33          | D      | BAD15140            | 305           | partial |
| 34          | B      | BAB20014            | 951           | full    |
| 35          | B      | AP_000585           | 952           | full    |
| 36          | D      | BAD15141            | 305           | partial |
| 37          | D      | BAA84989            | 507           | partial |
| 38          | D      | BAD15143            | 305           | partial |
| 39          | D      | BAD15144            | 305           | partial |
| 40          | F      | P11819              | 923           | full    |
| 41          | F      | P11820              | 925           | full    |
| 42          | D      | BAD15145            | 305           | partial |
| 43          | D      | BAD15146            | 305           | partial |
| 44          | D      | BAD15147            | 305           | partial |
| 45          | D      | BAA84990            | 376           | partial |
| 46          | D      | BAA84991            | 364           | partial |
| 47          | D      | BAA84992            | 373           | partial |
| 48          | D      | AAB17439            | 947           | partial |
| 49          | D      | BAD15152            | 305           | partial |
| 50          | B      | BAD15153            | 305           | partial |
| 51          | D      | 登録無し                |               |         |

【 0 1 8 2 】

10

20

30

40

【表 4】

|       |           | サブグループ |   |   |   |   |   |
|-------|-----------|--------|---|---|---|---|---|
|       | ペプチド配列    | A      | B | C | D | E | F |
| 配列番号1 | DYLSAANML |        | ○ | ○ | ○ | ○ |   |
| 配列番号2 | LYANSAHAL | ○      | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |
| 配列番号3 | VYSGSIPYL |        | ○ |   | ○ | ○ |   |
| 配列番号4 | TYFNLGNKF |        | ○ |   |   |   |   |
| 配列番号5 | LYSNVALYL |        | ○ |   | ○ |   | ○ |
| 配列番号6 | GYKDRMYSF | ○      | ○ |   | ○ | ○ |   |

## 【0183】

〔実施例12〕 ワクチン注射剤

DMSOに、配列番号：1～6のペプチドを最終濃度20 mg/mlとなるように各々溶解し、ろ過滅菌した。得られたペプチド含有溶液を滅菌バイアル瓶に1mLずつ分注密栓し、ワクチン注射剤とした。

【産業上の利用可能性】

## 【0184】

CTLがウイルス感染細胞を認識する際、以下のような特徴がある。

- (1)CTLはウイルス粒子そのものを直接認識することはできない。
- (2)CTLはウイルスタンパク質中の8～10個のアミノ酸からなるペプチド（以下、エピトープペプチドと称する）を認識して感染細胞を破壊する。
- (3)このエピトープペプチドは、ウイルス感染細胞表面にあるヒト白血球抗原（human leucocyte antigen、以下、HLAと称する）とβ2-ミクログロブリンの複合体に結合して提示され、これにCTL細胞表面上のT細胞受容体（T cell receptor；TCR）が結合する事でCTLはウイルス感染細胞を認識し破壊する。
- (4)HLAは人種間、個人間によって異なり、HLAが異なると同じウイルスでもエピトープペプチドが異なる（これをエピトープペプチドのHLA拘束性と称する）。

## 【0185】

(1)から(4)で述べたことから明らかなように、アデノウイルスに特異的なエピトープペプチドはHLA型によって異なることから、HLA拘束性を受ける。本発明者らは、日本人の約60%が保有し、かつ世界的にも頻度の高いHLA-A24型等について、アデノウイルスに特異的なCTLエピトープペプチドを解析する事で、アデノウイルス感染症に対して有効な免疫があるか否かの診断、アデノウイルスの感染を治療又は予防するために有用なエピトープペプチドの提供に成功した。

## 【0186】

本発明のCTLとは、ヒトT細胞上に存在する表面抗原分子の1つであるCD8又は、CD4を発現し、かつHLAクラスI拘束性を示す細胞傷害性T細胞を意味する。また本発明のアデノウイルス特異的CTLとは、アデノウイルス感染細胞の細胞膜表面上に発現するHLAクラスI分子とβ2-ミクログロブリン及びアデノウイルスに特異的なHLAクラスI拘束性エピトープペプチドとの3者複合体を、CTL膜表面に発現しているT細胞受容体（T cell receptor、以

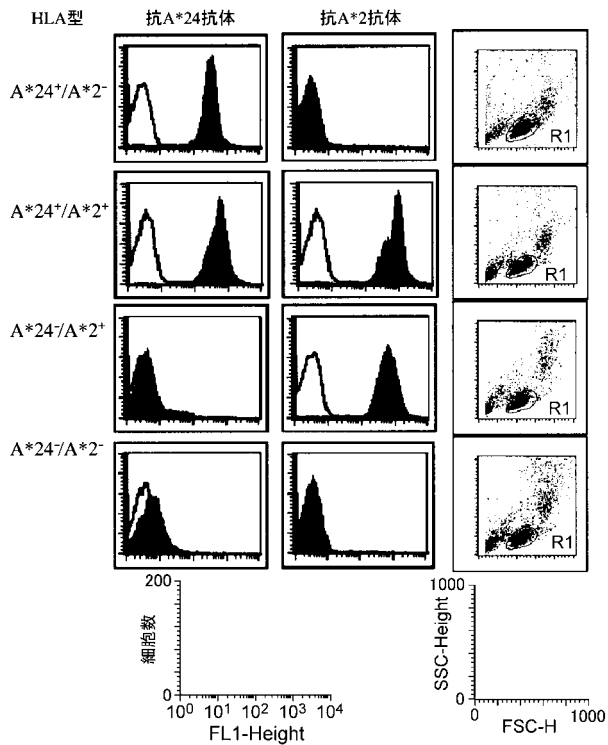
下TCR)で認識する事で、アデノウイルス感染細胞を直接的に傷害し、アデノウイルス感染細胞を排除し得るT細胞を示す。また、アデノウイルスに特異的なHLAクラスI拘束性エピトープペプチドとは、CTLに認識され得るアデノウイルスタンパク質中の特定部位にある8~10個のアミノ酸配列からなるペプチドであって、HLAクラスI分子と $\beta$ 2-ミクログロブリンとの3者複合体を形成し、CTL膜表面上のTCRが免疫的に認識して結合する事が可能なアデノウイルスの構造部分である。

### 【0187】

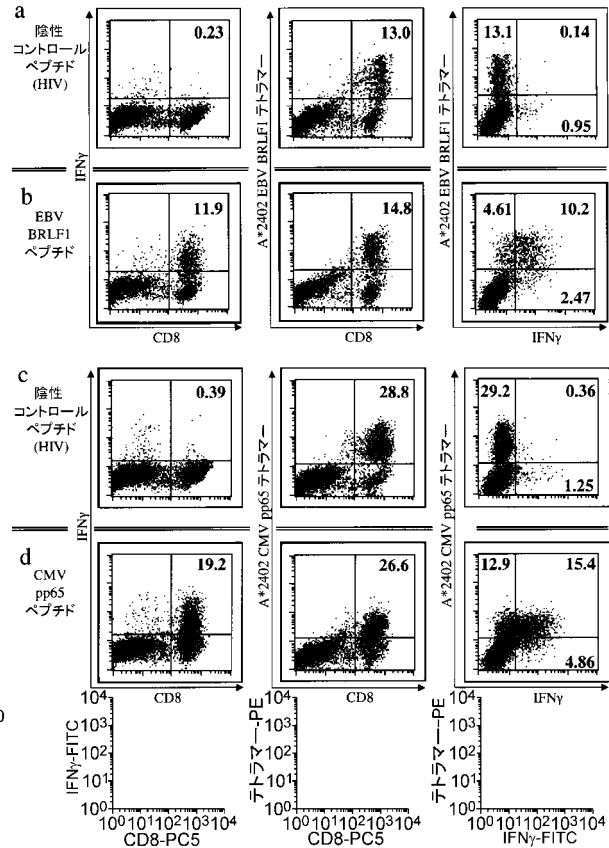
本発明で提供されるエピトープペプチドは、ワクチンとして用いる事で、アデノウイルス特異的CTLを生体内で誘導し、アデノウイルス感染に対して免疫力を保持させることができる。生体外にて末梢血等の生体試料に対してもアデノウイルスを感染させる事無く、安全かつ効率的にアデノウイルス特異的CTLを人為的に誘導増殖させ細胞免疫療法に用いる事ができる。さらに、アデノウイルスに対する免疫力の有無の診断に用いる事ができ、アデノウイルス感染症に対して有効な治療法と診断方法を提供する。

10

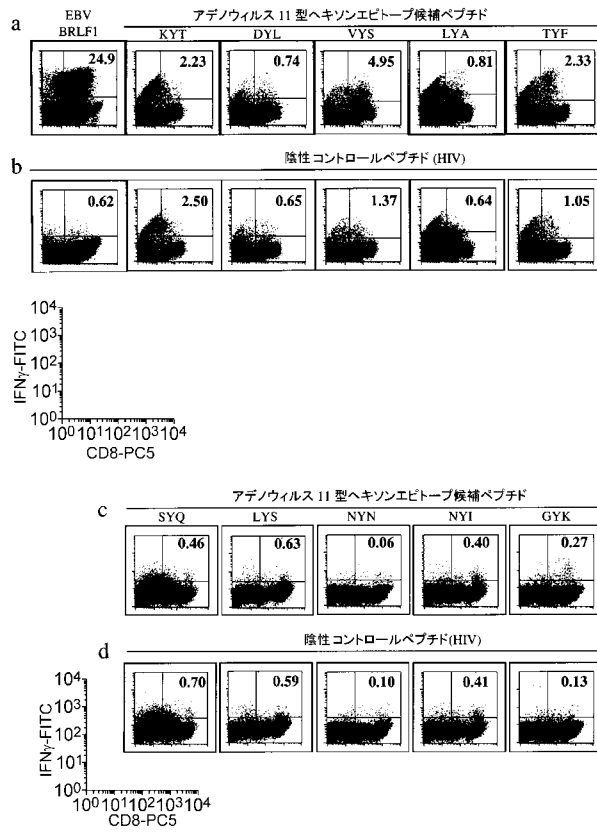
【図1】



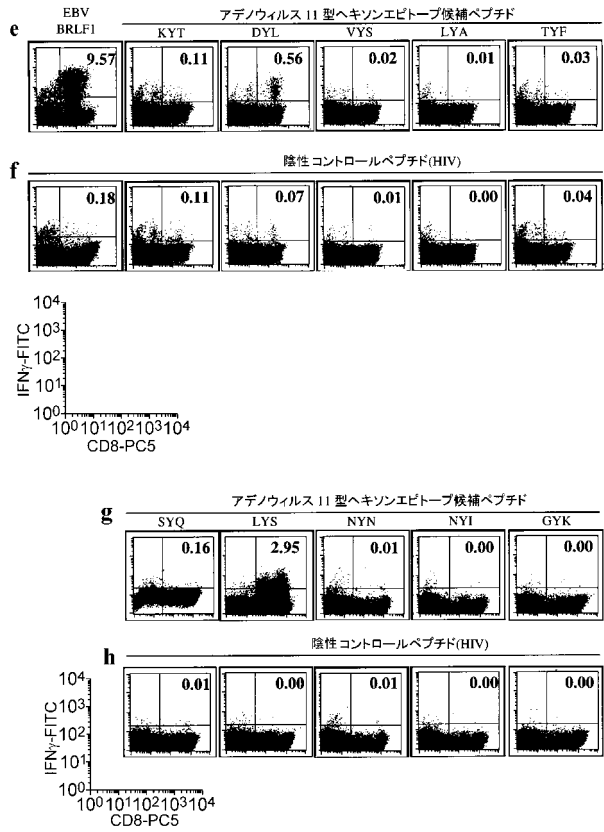
【図2】



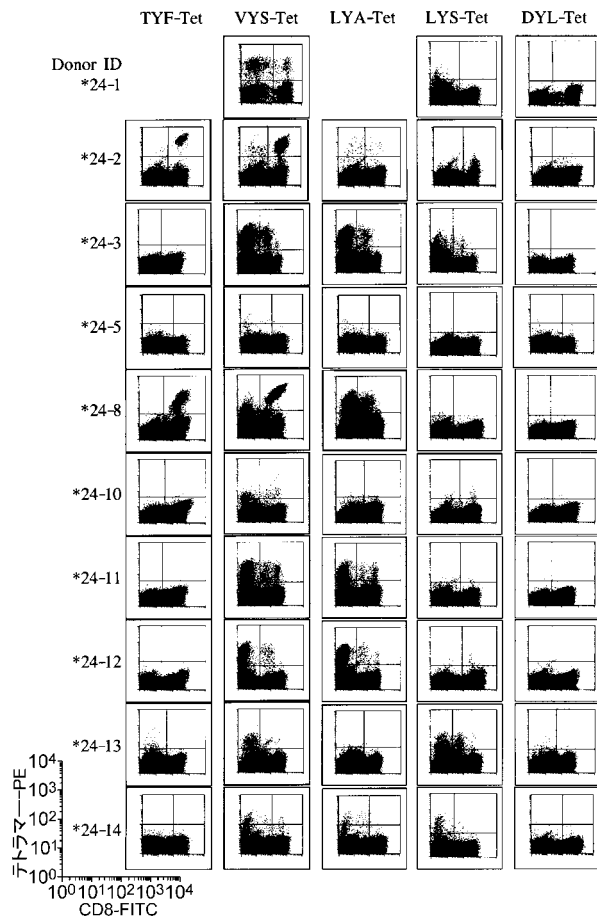
【図 3 a - d】



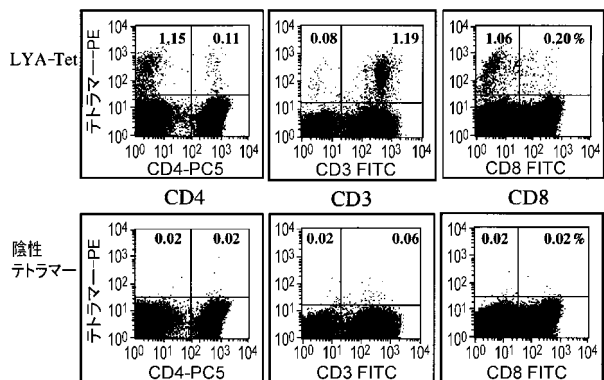
【図 3 e - h】



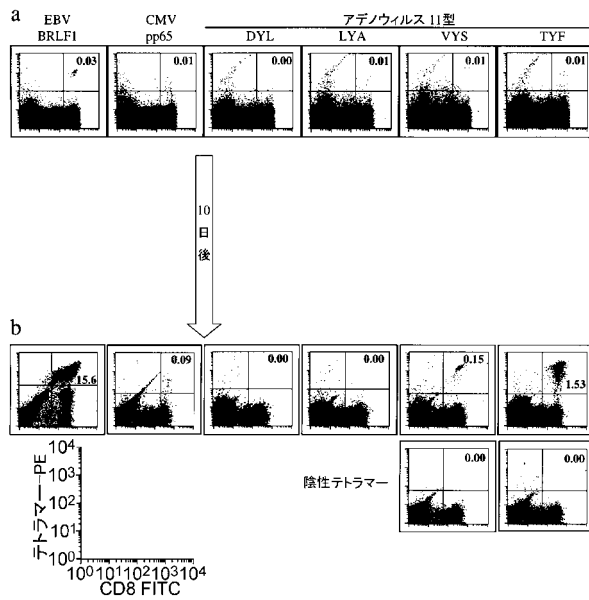
【図 5】



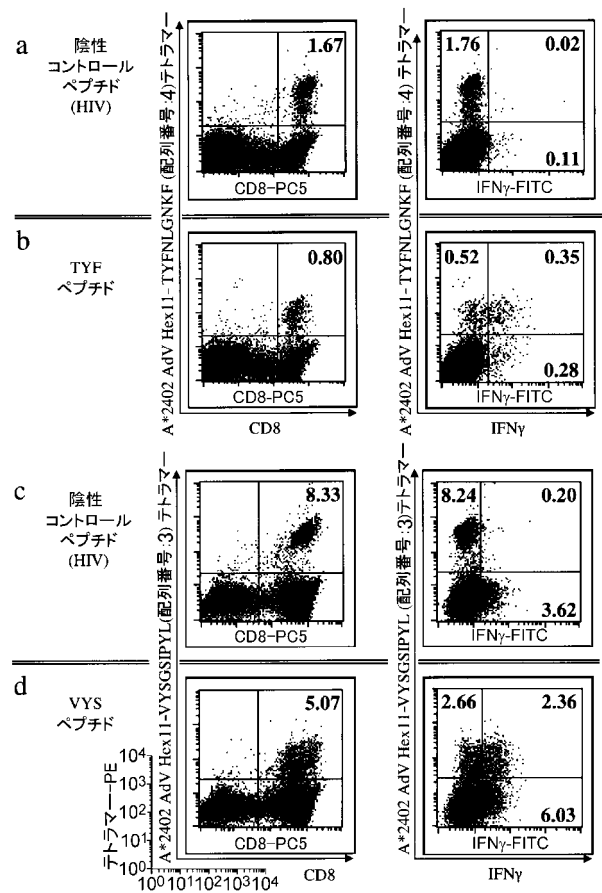
【図 6】



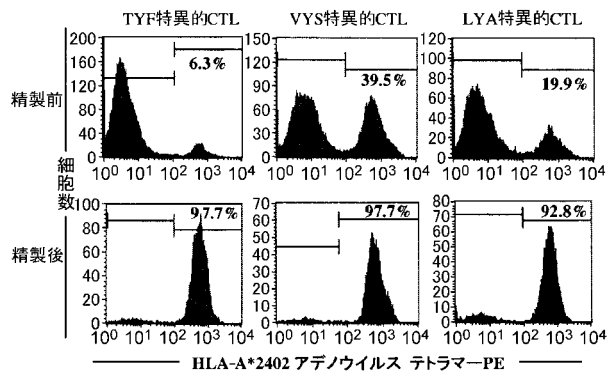
【図 7】



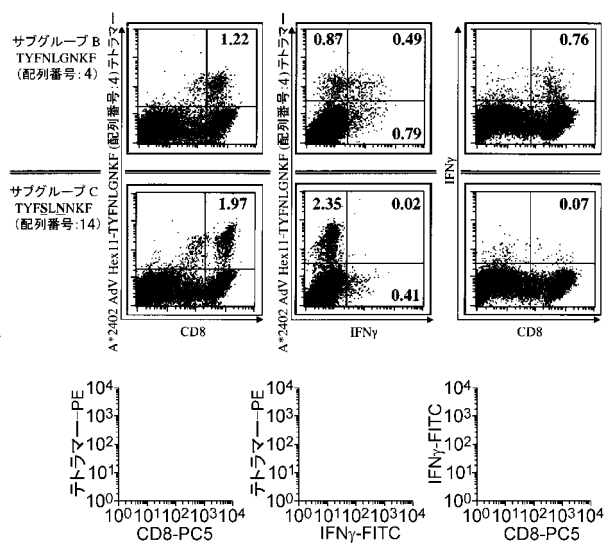
【図 8】



【図 9】



【図 10】



【図 11-1】

| サブ<br>グループ | CTL<br>エピトープ         | C末端<br>フラッキング領域 | タイプ                                                                        |
|------------|----------------------|-----------------|----------------------------------------------------------------------------|
| A          | ---C--- (配列番号: 15)   | ---             | (Adv12, 18)                                                                |
| B          | DYLGAAANML (配列番号: 1) | YPI             | (Adv3, 7, 11, 16, 21, 34, 35, 50)                                          |
| C          | --- (配列番号: 1)        | ---             | (Adv1, 2, 5)                                                               |
| D          | --- (配列番号: 1)        | ---             | (Adv9, 13, 20, 25, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 38, 39, 42, 43, 44, 48, 49) |
| E          | --- (配列番号: 1)        | ---             | (Adv4)                                                                     |
| F          | ---C--- (配列番号: 15)   | ---             | (Adv40, 41)                                                                |

【図 1 1 - 2】

| サブ<br>グループ | CTL<br>エピトープ       | C末端<br>フランキング領域 | タイプ                                                        |
|------------|--------------------|-----------------|------------------------------------------------------------|
| A          | ----- (配列番号:2)     | ---             | (Adv12,18)                                                 |
| B          | LYANSAHAL (配列番号:2) | DMT             | (Adv3,7,11,16,21,34,35,50)                                 |
| C          | ----- (配列番号:2)     | ---             | (Adv1,2,5)                                                 |
| D          | ----- (配列番号:2)     | ---             | (Adv9,13,20,25,27,28,29,30,32,<br>33,36,38,39,43,44,48,49) |
| E          | ----- (配列番号:2)     | -I-             | (Adv42)                                                    |
| F          | ----- (配列番号:2)     | --N             | (Adv4)                                                     |
|            |                    | ---             | (Adv40,41)                                                 |

【図 1 1 - 6】

| サブ<br>グループ | CTL<br>エピトープ       | C末端<br>フランキング領域 | タイプ                                                           |
|------------|--------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| A          | S----- (配列番号:25)   | ---             | (Adv12)                                                       |
| B          | ----- (配列番号:6)     | ---             | (Adv18)                                                       |
| C          | GYKDRMYSF (配列番号:6) | FRN             | (Adv3,7,11,16,21,34,35,50)                                    |
| D          | S----- (配列番号:25)   | ---             | (Adv1,2,5)                                                    |
| E          | ----- (配列番号:6)     | ---             | (Adv9,13,20,25,27,28,29,30,32,<br>33,36,38,39,42,43,44,48,49) |
| F          | S----- (配列番号:25)   | ---             | (Adv4)                                                        |
|            |                    | ---             | (Adv40,41)                                                    |

【図 1 1 - 3】

| サブ<br>グループ | CTL<br>エピトープ         | C末端<br>フランキング領域 | タイプ                                                           |
|------------|----------------------|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| A          | ----- (配列番号:16)      | ---             | (Adv12,18)                                                    |
| B          | VYSOSIPYL (配列番号:3)   | ---             | (Adv3,7,11,16,21,34,35,50)                                    |
| C          | T----- (配列番号:17)     | DGT             | (Adv1,2,5)                                                    |
| D          | ----- (配列番号:3)       | ---             | (Adv9,13,20,25,27,28,29,30,32,<br>33,36,38,39,42,43,44,48,49) |
| E          | ----- (配列番号:3)       | ---             | (Adv4)                                                        |
| F          | T-----V--- (配列番号:18) | ---             | (Adv40,41)                                                    |

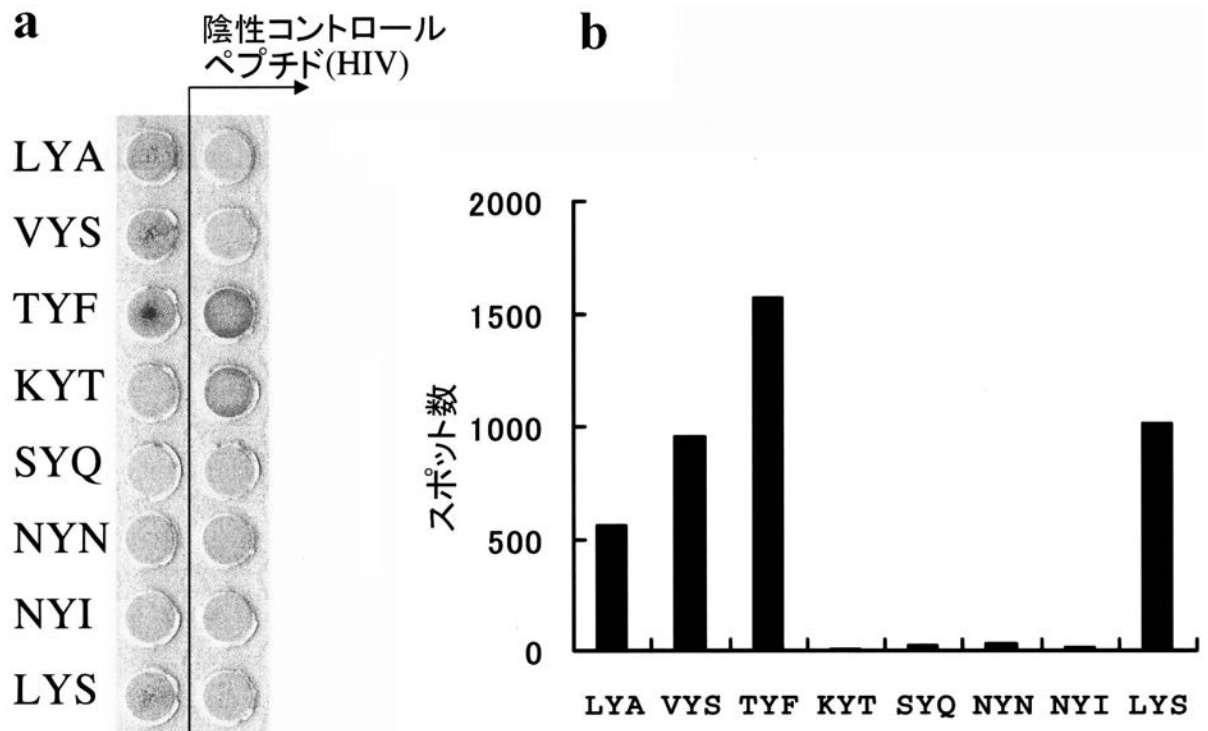
【図 1 1 - 4】

| サブ<br>グループ | CTL<br>エピトープ          | C末端<br>フランキング領域 | タイプ              |
|------------|-----------------------|-----------------|------------------|
| A          | ---T----- (配列番号:19)   | ---             | (Adv12)          |
| B          | TYFNLGNKF (配列番号:4)    | RNP             | (Adv11,21,34,35) |
| C          | ---SM----- (配列番号:20)  | ---             | (Adv3,7,16)      |
| D          | ---S-M----- (配列番号:14) | ---             | (Adv1,2,5)       |
| E          | ---S----- (配列番号:21)   | ---             | (Adv9)           |
| F          | ---S----- (配列番号:21)   | ---             | (Adv4)           |
|            |                       | ---             | (Adv40,41)       |

【図 1 1 - 5】

| サブ<br>グループ | CTL<br>エピトープ        | C末端<br>フランキング領域 | タイプ                                              |
|------------|---------------------|-----------------|--------------------------------------------------|
| A          | ---G--- (配列番号:22)   | ---D            | (Adv12,31)                                       |
| B          | LYSHVALYL (配列番号:5)  | PDS             | (Adv11,14,16,21,34,35)                           |
| C          | ----- (配列番号:5)      | ---V            | (Adv3,7)                                         |
| D          | ---I----- (配列番号:23) | ---K            | (Adv1,2,5,6)                                     |
| E          | ----- (配列番号:5)      | ---             | (Adv8,9,10,15,17,19,22,23,24,<br>37,45,46,47,48) |
| F          | ---A----- (配列番号:24) | ---K            | (Adv4)                                           |
|            |                     | ---             | (Adv40,41)                                       |

【図 4】



【配列表】

0004976294000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02  
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50 K

(72)発明者 田路 真悟  
長野県伊那市手良沢岡 1 0 6 3 - 1 0 3 株式会社医学生物学研究所内  
(72)発明者 金 律子  
長野県伊那市手良沢岡 1 0 6 3 - 1 0 3 株式会社医学生物学研究所内  
(72)発明者 鈴木 進  
長野県伊那市手良沢岡 1 0 6 3 - 1 0 3 株式会社医学生物学研究所内

審査官 戸来 幸男

(56)参考文献 Blood, 2 0 0 4 年, vol.104, no.8, pp.2432-2440

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)  
C12N 15/00-15/90  
C07K 7/06  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/  
REGISTRY(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed