(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2014-520877
(P2014-520877A)
(43)公表日　平成26年8月25日(2014.8.25)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07K 14/025	(2006.01)	C07K	14/025	4C084
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	4C085
A61P 31/20	(2006.01)	A61P	31/20	4C087
A61P 25/00	(2006.01)	A61P	25/00	4H045
A61P 37/06	(2006.01)	A61P	37/06	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 47 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2014-520691 (P2014-520691)
(86)(22)出願日　平成24年7月23日 (2012.7.23)
(85)翻訳文提出日　平成26年3月11日 (2014.3.11)
(86)国際出願番号　PCT/EP2012/064445
(87)国際公開番号　WO2013/014134
(87)国際公開日　平成25年1月31日 (2013.1.31)
(31)優先権主張番号　11006031.6
(32)優先日　平成23年7月22日 (2011.7.22)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

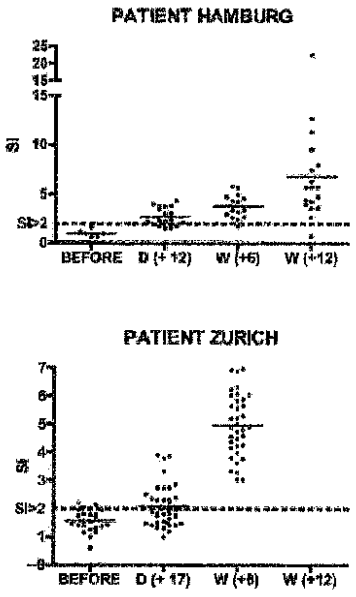
(71)出願人　501393966
ウニヴェルジテート・チューリッヒ
ＵＮＩＶＥＲＳＩＴＡＥＴ　ＺＵＥＲＩＣＨ
スイス、ツェーハー－８００６チューリッヒ、レミシュトラーセ７１番
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　イェルツィク，　イリヤス
スイス国　ツェーハー－８０３２　チューリッヒ，　アイマットシュトラーセ　６０

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ワクチン接種および診断適用におけるポリオーマウイルスＪＣペプチドおよびタンパク質

(57)【要約】
本発明は、ワクチン接種または免疫化、特に、治療的ワクチン接種、および診断の分野に関する。例えば、進行性多巣性白質脳症（ＰＭＬ）および／または進行性多巣性白質脳症－免疫再構築症候群（ＰＭＬ－ＩＲＩＳ）の治療または防止のために使用することができる、ポリオーマウイルスＪＣ（ＪＣＶ）に対する防御免疫応答を誘発することができる薬学的組成物およびキットを開示する。かかるＰＭＬまたはＰＭＬ－ＩＲＩＳの危険性のある個体は、例えば、免疫無防備状態患者もしくは免疫抑制患者または免疫抑制処置に適格な自己免疫疾患を有する患者であり得る。本発明はまた、ＪＣＶタンパク質の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む組成物、ならびにその治療的、予防的、および診断的使用に関する。

Fig. 11



【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含むタンパク質またはペプチドであって、該エピトープが配列番号１～９２を含む群から選択される、タンパク質またはペプチド。
【請求項２】
前記エピトープが、配列番号１～３、７～９、１１、２３、３７～３８、４３～４５、および６９～７１を含む群から選択される、請求項１に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項３】
前記ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む前記タンパク質が、ＶＰ１またはＶＰ１と少なくとも７０％アミノ酸同一性を有するタンパク質を含む、請求項１または２に記載のタンパク質。
【請求項４】
ＶＰ１またはＶＰ１と少なくとも７０％アミノ酸同一性を有するタンパク質が、配列番号１および配列番号４６～７６を含む群から選択される少なくとも１つのエピトープをさらに含む融合タンパク質である、請求項３に記載のタンパク質。
【請求項５】
ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む前記タンパク質が、ウイルス様粒子の形態で存在する、請求項３～４のいずれか１項に記載のタンパク質。
【請求項６】
ＪＣＶによる感染の診断方法で用いるための、および／またはＰＭＬの診断のための、請求項１～５のいずれか１項に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項７】
被験体のＰＭＬの処置方法で用いるための、請求項１～５のいずれか１項に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項８】
前記ＰＭＬ処置が、Ｔ細胞を増幅および維持することができるサイトカインの投与を含む、請求項７に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項９】
前記サイトカインが、ＩＬ－７、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１からなる群から選択される、請求項８に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１０】
前記ＰＭＬ処置が、アジュバントの投与を含む、請求項７～９のいずれか１項に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１１】
前記アジュバントが、ＭＦ５９、水酸化アルミニウム、リン酸カルシウムゲル、リポ多糖、イミダゾ－キノリン（例えば、イミキモド、Ｓ－２８４６３）、ＣｐＧモチーフを有するオリゴヌクレオチド配列、ステアリルチロシン、ＤＴＰ－ＧＤＰ、ＤＴＰ－ＤＰＰ、トレオニル－ＭＤＰ、７－アリル－８－オキソグアノシン、糖脂質ｂａｙＲ１００５、多抗原ペプチド系、重合ハプテンペプチド、細菌抽出物、ＴＬＲ－７アゴニスト、ＴＬＲ－８アゴニスト、およびｖｉｔ－Ａの群から選択される、請求項１０に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１２】
ＰＭＬ発症リスクのある被験体におけるＰＭＬおよび／またはＰＭＬ－ＩＲＩＳの予防方法で用いるための、請求項１～５のいずれか１項に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１３】
前記被験体がＪＣＶに感染している、請求項１２に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１４】
前記被験体が、以下：
ａ）先天性免疫不全（特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症または高ＩｇＥ症候群など）を有

する被験体、
ｂ）疾患または病的状態（ＡＩＤＳ、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、またはＢ型肝炎ウイルスもしくはＣ型肝炎ウイルスによる感染など）に起因する後天性免疫不全を有する被験体、および
ｃ）治療的介入（化学療法、照射、または免疫抑制処置など）に起因する後天性免疫不全を有する被験体、
の群から選択される、請求項７～１３のいずれか１項に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１５】
前記免疫抑制処置が、免疫抑制抗体を用いた処置を含む、請求項１４に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１６】
前記免疫抑制抗体が、ナタリズマブ、エファリズマブ、リツキシマブ、オクレリズマブ、およびアレムツズマブの群から選択される、請求項１５に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１７】
前記被験体が、自己免疫疾患を罹患している、請求項１４～１６のいずれか１項に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１８】
前記自己免疫疾患が、多発性硬化症である、請求項１７に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項１９】
前記被験体が、抗体ナタリズマブを用いて処置されるものである、請求項１８に記載のタンパク質またはペプチド。
【請求項２０】
ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含むタンパク質またはペプチド、ならびにＴＬＲ－７アゴニストおよび／またはＴＬＲ－８アゴニストを含む群から選択されることが好ましいアジュバントを含む薬学的キットであって、該エピトープが配列番号１～９２を含む群から選択される、薬学的キット。
【請求項２１】
前記アジュバントがＴＬＲ－７アゴニスト、好ましくは、イミキモドである、請求項２０に記載の薬学的キット。
【請求項２２】
ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む前記タンパク質が、ＶＰ１またはＶＰ１と少なくとも７０％アミノ酸同一性を有するタンパク質を含む、請求項２０または２１に記載の薬学的キット。
【請求項２３】
前記ＶＰ１またはＶＰ１と少なくとも７０％アミノ酸同一性を有する前記タンパク質が、配列番号１および配列番号４６～７６を含む群から選択される少なくとも１つのエピトープをさらに含む融合タンパク質である、請求項２２に記載の薬学的キット。
【請求項２４】
ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む前記タンパク質が、ウイルス様粒子の形態で存在する、請求項２０～２３のいずれか１項に記載の薬学的キット。
【請求項２５】
前記キットがＩＬ－７をさらに含む、請求項２０～２４のいずれか１項に記載の薬学的キット。
【請求項２６】
ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む前記タンパク質またはペプチドが、皮下投与されるものである、請求項２０～２５のいずれか１項に記載の薬学的キット。

【請求項２７】
前記アジュバントが皮膚投与されるものでる、請求項２０～２６のいずれか１項に記載の薬学的キット。
【請求項２８】
前記キットの構成要素が、ＰＭＬと診断された被験体またはＰＭＬ発症リスクのある被験体からなる群から選択される被験体に投与されるものであり、
該被験体がＪＣＶのキャリアであると必要に応じて診断されている、請求項２０～２７のいずれか１項に記載の薬学的キット。
【請求項２９】
前記キットの構成要素が、以下：
ａ）免疫無防備状態または免疫不全の被験体（ＨＩＶのキャリアなど）、免疫抑制処置を有する患者、または先天性免疫不全患者（特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症または高ＩｇＥ症候群を有する患者など）；
ｂ）免疫抑制処置に適格な被験体；
の群から選択される被験体に投与されるものである、請求項２０～２８のいずれか１項に記載の薬学的キット。
【請求項３０】
ＰＭＬ処置で用いるための、請求項２０～２９のいずれか１項に記載の薬学的キット。
【請求項３１】
以下：
ａ）免疫無防備状態または免疫不全の被験体（ＨＩＶのキャリアなど）、免疫抑制処置を有する被験体、または先天性免疫不全患者（特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症または高ＩｇＥ症候群を有する患者など）；および
ｂ）免疫抑制処置に適格な被験体；
の群から選択される被験体において、ＰＭＬおよび／またはＰＭＬ－ＩＲＩＳの予防で用いるためのものであり、
該免疫抑制処置が、好ましくは、ナタリズマブ、エファリズマブ、リツキシマブ、オクレリズマブ、およびアレムツズマブを用いた処置を含む群から選択される、請求項２０～３０のいずれか１項に記載の薬学的キット。
【請求項３２】
免疫抑制処置が自己免疫疾患と診断された被験体または移植患者の処置であり、前記キットの構成要素が、免疫抑制処置の前、後、または間に該患者に投与されるものであり、該免疫抑制処置が、好ましくは、ナタリズマブ、エファリズマブ、リツキシマブ、オクレリズマブ、およびアレムツズマブを用いた処置を含む群から選択される、請求項２９または３１のいずれか１項に記載の薬学的キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ワクチン接種または免疫、特に、治療的ワクチン接種、および診断の分野に関する。例えば、進行性多巣性白質脳症（ＰＭＬ）および／または進行性多巣性白質脳症－免疫再構築症候群（Ｉｍｍｕｎｅ　Ｒｅｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ　Ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ　Ｓｙｎｄｒｏｍｅ）ＰＭＬ－ＩＲＩＳ）の治療または予防のために使用することができる、ポリオーマウイルスＪＣ（ＪＣＶ）に対する防御免疫応答を誘発することができる薬学的組成物およびキットを開示する。かかるＰＭＬまたはＰＭＬ－ＩＲＩＳの危険性のある個体は、例えば、免疫無防備状態患者もしくは免疫抑制患者または免疫抑制処置に適格な自己免疫疾患を有する患者であり得る。本発明はまた、ＪＣＶタンパク質の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む組成物、ならびにその治療的、予防的、および診断的使用に関する。
【背景技術】
【０００２】

進行性多巣性白質脳症および進行性多巣性白質脳症－免疫再構築症候群は、中枢神経系のポリオーマウイルスＪＣ（ＪＣＶ）感染によって引き起こされる。これらは共に、多発性硬化症および他の自己免疫疾患におけるモノクローナル抗体治療の合併症として最近出現している。

【０００３】

進行性多巣性白質脳症（ＰＭＬ）は、１９５８年に最初に記載された。１９７１年に、ポリオーマウイルスＪＣ（ＪＣＶ）がＰＭＬの原因因子として同定された。ＰＭＬは、免疫無防備状態（ＨＩＶ感染、癌、臓器移植術、免疫不全、または稀に自己免疫疾患中など）で起こる日和見感染およびしばしば致命的な感染である。ＡＩＤＳ患者では、ＰＭＬは最も重篤な合併症の１つであったが、抗レトロウイルス治療の導入後にその発症率が減少した（Ｃｉｎｑｕｅら、２００１）。ＪＣＶによる感染は健康な成人で非常に流行しており、人口の６０％以上が潜伏感染／持続感染を保有している（Ｅｇｌｉら、２００９）。近年、ＰＭＬは、自己免疫疾患、特に多発性硬化症（ＭＳ）のモノクローナル抗体治療およびナタリズマブ（抗ＶＬＡ－４）を用いた処置において、ますます一般的で重篤な有害事象として出現している（Ｋｌｅｉｎｓｃｈｍｉｄｔ－ＤｅＭａｓｔｅｒｓ ａｎｄ Ｔｙｌｅｒ，２００５）（Ｌａｎｇｅｒ－Ｇｏｕｌｄら、２００５）（Ｊｉｌｅｋら）（匿名、２０１１）。他のモノクローナル抗体（リツキシマブ（抗ＣＤ２０）、インフリキシマブ（抗腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－αなど）、および関節リウマチ（ＲＡ）処置で使用されるＩｇＧ１－ＴＮＦ受容体２融合タンパク質であるエタネルセプトもまたＰＭＬに関連している。エファリズマブ（抗白血球機能関連抗原－１）は、既に市場から撤退せざるをえなかった（Ｐｕｇａｓｈｅｔｔｉ ａｎｄ Ｋｏｏ，２００９）。ナタリズマブを投与したＭＳ患者で報告された１２０を超えるＰＭＬ症例によると、ＰＭＬ発症率は１：５００～１：１，０００の間であり、この有効性の高い処置の使用が危ぶまれる（匿名、２０１１）。

【０００４】

ＰＭＬの病態は、著しい免疫反応の非存在下でのミエリン形成乏突起膠細胞の溶菌感染および星状膠細胞の不稔感染によって特徴付けられる。しかし、他のＣＮＳ細胞（小脳顆粒ニューロンなど）もまた、ＪＣＶに感染し得る（Ｄｕ Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００３ａ）。ＪＣＶ感染の制御機構は依然として完全には理解されていないが、ＪＣＶ感染の潜伏期は、おそらく、健康な個体において有効な体液性および／または細胞性の免疫応答によって制御される（Ｄｕ Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００１）（Ｄｕ Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００４ａ）（Ｗｅｂｅｒら、１９９７）。したがって、ＪＣＶ特異的ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞の存在がＰＭＬからの回復に結び付けられている一方で、これらの細胞は致死的転帰を有するＰＭＬの症例で存在しなかった（Ｄｕ Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００４ａ；Ｄｕ Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００６；Ｋｏｒａｌｎｉｋら、２００２）。また、ＰＭＬは、ＣＤ４＋ Ｔ細胞数が減少するかＣＤ４＋細胞機能が損なわれた状況（ＡＩＤＳおよび特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症など）で優先的に起こる（Ｓｔｏｎｅｒら、１９８６）（Ｇｉｌｌｅｓｐｉｅら、１９９１；Ｚｏｎｉｏｓら、２００８）。ＣＤ８＋ ＪＣＶ特異的Ｔ細胞の役割と比較して、ＰＭＬの消散はＣＤ４＋の数および機能の修復後となり、このことは、ＣＤ４＋ウイルス特異的Ｔ細胞およびＣＤ８＋ウイルス特異的Ｔ細胞の両方が宿主防御に不可欠であることを示す。

【０００５】

ＡＩＤＳ、非ホジキンリンパ腫、および白血病における重度の免疫抑制と対照的に、モノクローナル抗体ベースの治療は、抗ＶＬＡ－４／ナタリズマブ治療において特異的免疫機能（内皮バリアを通過する細胞遊走など）を阻害するか、またはリツキシマブの場合にある一定の免疫細胞（ＣＤ２０発現Ｂ細胞など）を排除する（Ｌｕｔｔｅｒｏｔｔｉ ａｎｄ Ｍａｒｔｉｎ，２００８）。抗ＶＬＡ－４治療の状況において、現在の仮説では、活性化されたＴ細胞およびＣＤ２０９＋未熟樹状細胞が血液脳関門（ＢＢＢ）を通過して脳に接近することができないので、ＰＭＬはＣＮＳの免疫監視機構の障害に起因すると考えられている（ｄｅｌ Ｐｉｌａｒ Ｍａｒｔｉｎら、２００８；Ｓｔｕｖｅら、２００

６；Ｙｅｄｎｏｃｋら、１９９２）。結果として、ＣＮＳ内の局所抗原提示に障害が生じる（ｄｅｌ　Ｐｉｌａｒ　Ｍａｒｔｉｎら、２００８）。

【０００６】

あるいは、骨髄内の造血前駆細胞についての保留シグナルとしての機能を果たすＶＬＡ－４／血管細胞接着分子－１（ＶＣＡＭ－１）相互作用の阻害によって、その天然のニッチのうちの１つからのＪＣＶの放出（Ｔａｎら、２００９ａ）、ウイルス複製の増加、およびＣＮＳ細胞指向性を有するＪＣＶバリアントの出現につながると考えられている（Ｈｏｕｆｆら、１９８８；Ｒａｎｓｏｈｏｆｆ，２００５）。

【０００７】

ＰＭＬにおけるこれらのモノクローナル抗体を用いた治療の休止によってＣＮＳ内のＪＣＶ感染細胞についての免疫学的調査が再度確立されており、この区画における臨床的に明らかな炎症応答につながる。炎症を、ＢＢＢの開放ならびにＴ細胞および単球／マクロファージの流入に起因する磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）上のコントラスト増強された病変によって視覚化することができる。ＰＭＬの後者の発現は、免疫ＰＭＬ再構築症候群（ＰＭＬ－ＩＲＩＳ）と呼ばれている（Ｋｏｒａｌｎｉｋ，２００６；Ｔａｎら、２００９ｂ）。ＰＭＬ－ＩＲＩＳにより、患者の臨床状態の急速な悪化、および症例のうちの約３０％～５０％の死亡につながり得る（Ｔａｎら、２００９ｂ）。その細胞および分子の病態（すなわち、どのＴ細胞サブタイプ、抗体、またはサイトカインが関与するか）は、現在あまり理解されていない。

【０００８】

進行性多巣性白質脳症－免疫再構築症候群は、進行性多巣性白質脳症の診断を不明瞭にし得、そして、重篤な臨床的障害を伴う顕著な免疫病態を導き、場合によっては死亡につながり得る。脱髄が感染部位での免疫応答の非存在下でのＪＣウイルスによる乏突起膠細胞溶解に起因する進行性多巣性白質脳症と異なり、進行性多巣性白質脳症－免疫再構築症候群における組織破壊は、ＪＣウイルス感染した乏突起膠細胞および星状膠細胞に対する活発な免疫応答ならびに脳の炎症性腫脹によって引き起こされる。例えば、高活性レトロウイルス治療で処置されたＡＩＤＳ患者または抗ＶＬＡ－４モノクローナル抗体であるナタリズマブで処置され、その後抗体を洗い流したＭＳ患者において免疫能が再確立された場合にＰＭＬ－ＩＲＩＳが開始される。ＰＭＬ－ＩＲＩＳ中、免疫細胞が脳に侵入し、ＪＣＶ感染した星状膠細胞および乏突起膠細胞を排除する。進行性多巣性白質脳症－免疫再構築症候群に関与する細胞およびメディエーターは、当該技術水準ではあまり理解されていない。

【０００９】

可能な限り早期のＰＭＬおよびＰＭＬ－ＩＲＩＳの診断ならびに根源的疾患機構に基づいた有効な治療の同定は、ＭＳだけでなく多数の他の自己免疫疾患においても、後天性免疫不全中、悪性疾患中、および移植物医療においても重要な目的である。ＪＣＶの診断方法は公知である。例えば、ＰＣＲによってウイルスを検出することが可能である。代替的アプローチは、例えばＥＬＩＳＡによる、ＪＣＶに対する抗体の検出である。例えばＪＣＶコアタンパク質ＶＰ１に対してＥＬＩＳＡを使用した、ＪＣＶ感染の例示的な診断方法は、Ｇｏｌｄｍａｎｎら、１９９９またはＤＥ１９５４３５５３に教示されている。

【００１０】

疾患の処置方法は、これまであまり研究されてこなかった。Ｇｏｌｄｍａｎｎら、１９９９またはＤＥ１９５４３５５３は、アセンブリしてウイルス様粒子になることができるＶＰ１タンパク質を用いたワクチン接種を示唆している。フロイント完全アジュバント（ＦＣＡ）を用いたワクチン接種によって免疫応答が誘導される一方で、アジュバントを用いないワクチン接種は免疫原性を示さないことが教示されている。しかし、フロイント完全アジュバントは、その毒性によってヒトで使用されない可能性がある。

【００１１】

ＰＭＬ－ＩＲＩＳで広く認められる病原免疫応答の危険性を考慮して、ＰＭＬの処置ならびにＰＭＬおよびＰＭＬ－ＩＲＩＳの予防が可能なワクチン接種を開発することは特に

困難である。
【先行技術文献】
【非特許文献】
【００１２】
【非特許文献１】Cinque P, Bossolasco S, Brambilla AM, Boschini A, Mussini C, Pierotti C, et al. The effect of highly active antiretroviral therapy-induced immune reconstitution on development and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy: study of 43 cases with review of the literature. J Neurovirol 2003; 9 Suppl 1: 73-80.
【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１３】
この問題は、本発明によって、特に、特許請求の範囲の主題によって解決された。
【発明を実施するための形態】
【００１４】
本発明は、第１の態様では、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含むタンパク質またはペプチドであって、該エピトープが配列番号１～９２を含む群から選択される、タンパク質またはペプチドを提供する。第２の態様では、本発明は、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープ（該エピトープは配列番号１～９２を含む群から選択される）を含むタンパク質またはペプチドと、アジュバントとを含む薬学的キットを提供する。好ましくは、アジュバントは、ＴＬＲ－７アゴニストおよび／またはＴＬＲ－８アゴニストを含む群から選択される。
【００１５】
本発明者らは、驚いたことに、ＪＣＶ感染の制御およびＰＭＬの予防におけるＣＤ４＋応答の生物学的関連性を示した。ＪＣＶ制御における主な役割はＣＤ８＋細胞および細胞性免疫応答によって果たされると以前は考えられていた。
【００１６】
本発明者らは、治療用および予防用のワクチンでの使用に適切な、特にＪＶＣのＶＰ１タンパク質に由来する、多数のＣＤ４＋エピトープを同定した。例えば、これらのワクチンで用いるためのペプチドまたはタンパク質は、本明細書中に記載のＪＣＶタンパク質のうちの１つ以上由来のエピトープ配列のうちの１つ以上を含むことができる。本発明のタンパク質またはペプチドは、例えば、ＶＰ１タンパク質またはＶＰ１タンパク質と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有するタンパク質のアミノ酸配列を含むことができる。好ましい態様によれば、本発明は、ＶＰ１タンパク質またはＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有するタンパク質を用いたワクチン接種を言及する。ＶＰ１タンパク質またはそのバリアントは、五量体として（すなわち、ＪＣＶキャプソメア（ＪＣＶ　ｃａｐｓｏｍｅｒ）の形態で）そのワクチン中に存在し得る。しかし、好ましくは、ＶＰ１タンパク質またはそのバリアントは、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）の形態で存在する。ＶＬＰはＶＰ１からなり得るか、または他のＪＣＶタンパク質（ＶＰ２および／またはＶＰ３など）も含むことができる。したがって、本発明の薬学的キットは、一成分として抗原を含むことができる（すなわち、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含むタンパク質またはペプチドは、ＶＰ１またはＶＰ１と少なくとも７０％アミノ酸同一性を有するタンパク質を含む）。
【００１７】
タンパク質およびペプチドは、本出願の状況において相互に交換して広く使用される。典型的には、タンパク質はペプチドよりも長く（例えば、１００個よりも多くのアミノ酸を含む）、一方、ペプチドは５個～１００個の間のアミノ酸を有する。
【００１８】
ＣＤ４＋エピトープは、ＭＨＣクラスＩＩ分子の状況においてＣＤ４＋　Ｔ細胞のＴ細胞受容体によって認識され得るペプチドである。本発明者らは、健康なコントロールおよ

びＰＭＬ／ＰＭＬ－ＩＲＩＳを有する患者のＣＤ４＋　Ｔ細胞によって認識されるＣＤ４＋　Ｔ細胞エピトープを同定した。これらのペプチドは、後述の表１に開示されている（配列番号１～９２）。これらのエピトープのうちのいくつかは、末梢Ｔ細胞を使用した古典的方法によって同定することができなかったが、ＰＭＬ－ＩＲＩＳ患者の脳生検から単離したＴ細胞と反応性を示すことのみが同定された。この患者は脳およびＣＳＦ内の低量から存在しないＪＣＶウイルス量を示したので、ＪＣＶ特異的脳内ＣＤ４＋媒介免疫応答によって脳からウイルス感染が除去されたか、またはほとんど除去されたようであり、したがって、実施した実験により、同定されたＣＤ４＋　Ｔ細胞エピトープ、特に脳由来のＴ細胞によって認識されることが同定されたＣＤ４＋　Ｔ細胞エピトープの高い生物学的関連性が確認される。脳由来のＴ細胞によって同定されたＴ細胞エピトープを配列番号１～３、７～９、１１、２３、３７～３８、４３～４５、および６９～７１に示し、これらのエピトープを含むペプチドおよびタンパク質は本明細書中に記載の予防的および治療的なワクチン接種アプローチに特に好ましい。好ましい実施形態では、本発明のタンパク質またはペプチドは、配列番号１～３、７～９、１１、２３、３７～３８、４３～４５、および６９～７１を含む群から選択される少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む。

【００１９】

ＶＰ１はＪＣＶの主要キャプシドタンパク質であり、高比率の同定された免疫優性エピトープを含む。野生型ＶＰ１の配列は、例えば、ＤＥ１９５４３５５３に開示されている。しかし、ＶＰ１はまた、例えば、５５位および２６９位などで変異し得る。ｉｎ　ｖｉｖｏで起こるＶＰ１変異のうちの５０％よりも多くがこれらの位置において起こることが示されている。変異したＶＰ１タンパク質由来のペプチドに対応するエピトープを、本発明の状況で使用することもできる。表１中のいくつかのペプチドは、変異したＶＰ１フラグメントに対応する。本発明のＣＤ４＋エピトープを含むタンパク質またはペプチドは、配列番号１～９２のペプチドからなるか、またはより長くて良い（例えば、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、またはそれより長い、４０もしくはそれより長い、５０もしくはそれより長い、７５もしくはそれより長い、１００もしくはそれより長い、１２５もしくはそれより長い、１５０もしくはそれより長い、または２００もしくはそれより長いアミノ酸長を有する）。これらは野生型もしくは天然に存在する変異したＶＰ１もしくは他のＪＣＶタンパク質のアミノ酸からなってもよく、または異なる配列（同一のウイルスタンパク質を起源としないか、その天然の配置にはない配列など）を含んでもよい。例えば、これらは、配列番号１～９２を含む群から選択される２、３、４、５、６、７、８、９、１０、またはそれより多くのエピトープを含む融合タンパク質であり得る。

【００２０】

１つの実施形態では、タンパク質は、ＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有する。好ましくは、タンパク質は、配列番号１～９２を含む群から選択される少なくとも１つのエピトープを含む。ＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有するタンパク質は、配列番号１および配列番号４６～７６を含む群から選択される少なくとも１つのエピトープをさらに含む融合タンパク質であり得る。好ましくは、タンパク質は、配列番号１～３、７～９、１１、２３、３７～３８、４３～４５、および６９～７１に示すエピトープのうちの少なくとも１つを含む。

【００２１】

１つの実施形態では、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含むタンパク質は、ウイルス様粒子の形態で存在する。ＶＰ１タンパク質またはその誘導体（例えば、ＤＥ１９５４３５５３に記載のとおりの野生型ＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸配列同一性を含む変異体もしくはフラグメントまたはその融合タンパク質）はアセンブリしてウイルス様粒子になることができ、そのこともまたＤＥ１９５４３５５３に記載されている。

【００２２】

勿論、本発明のキットはまた、配列番号１～９２の群から選択されるＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む２つ以上のペプチドまたはタンパク質を、好ましくは１つの組成物中に含むことができる。好ましくは、キットは、配列番号１～３、７～９、１１、２３、３７～３８、４３～４５、および６９～７１の群から選択されるＪＣＶ由来の２つ以上のＣＤ４＋エピトープを有するペプチドまたはタンパク質を含む。ＣＤ４＋エピトープおよびＣＤ８＋エピトープの両方がＪＣＶに対する有効な免疫応答に関連するようであるので、本発明のペプチドまたはタンパク質が少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープおよび１つのＣＤ８＋エピトープの両方を含む場合に、それは特に有利である。

【００２３】

本発明の実施例で証明されるように、本発明のペプチドおよびタンパク質は、ＪＣＶに対する特異的な脳内ＣＤ４＋媒介免疫応答を誘導または増強するために、ＰＭＬを罹患している被験体に投与されるのに有用である。したがって、本発明の１つの態様によれば、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含むタンパク質またはペプチドを、被験体におけるＰＭＬの処置方法で使用する。ＰＭＬおよび／またはＰＭＬ－ＩＲＩＳを既に罹患している被験体の処置を、本明細書中で治療的ワクチン接種という。好ましい実施形態では、ＶＰ１タンパク質のアミノ酸配列またはＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有するタンパク質のアミノ酸配列を含むタンパク質を、ＰＭＬの処置で使用する。別の好ましい実施形態では、ＰＭＬの処置で使用されるペプチドまたはタンパク質は、配列番号１～３、７～９、１１、２３、３７～３８、４３～４５、および６９～７１の群から選択されるエピトープを含むか、またはエピトープからなる。

【００２４】

ＰＭＬを発症した被験体を処置する場合、Ｔ細胞を増幅（ｅｘｐａｎｄ）および維持することができるサイトカインの投与によって、本発明のペプチドまたはタンパク質の投与に基づいた処置をさらに改善することができることが見出された。かかるサイトカインの共投与（ｃｏ－ａｄｍｉｎｉｓｔｒａｔｉｏｎ）が重要な免疫機能の再構築の刺激を提供することが本発明で見出された。いくつかのサイトカイン（例えば、ＩＬ－７、ＩＬ－２、ＩＬ－１５、およびＩＬ－２１）を使用することができる。ＩＬ－７またはＩＬ－７の誘導体の使用が特に好ましい。

【００２５】

１つのなおさらなる実施形態では、治療的ワクチン接種によるＰＭＬ処置はまた、アジュバントの投与を含む。アジュバントは、ヒト被験体への投与に適切であって、且つ投与部位でＴ細胞活性化および／または抗原提示をもたらす、任意のアジュバントであり得る。例えば、本発明の方法およびキットで使用されるアジュバントを、ＭＦ５９、水酸化アルミニウム、リン酸カルシウムゲル、リポ多糖、イミダゾーキノリン（例えば、イミキモド、Ｓ－２８４６３）、ＣｐＧモチーフを有するオリゴヌクレオチド配列、ステアリルチロシン、ＤＴＰ－ＧＤＰ、ＤＴＰ－ＤＰＰ、トレオニル－ＭＤＰ、７－アリル－８－オキソグアノシン、糖脂質ｂａｙＲ１００５、多抗原ペプチド系、重合ハプテンペプチド、細菌抽出物、ＴＬＲ－７アゴニスト、ＴＬＲ－８アゴニスト、ｖｉｔ－Ａなどの群から選択することができる。

【００２６】

好ましくは、本発明の実施において使用されるアジュバントｆ（ａｄｊｕｖａｎｔ　ｆ）は、ＴＬＲ－７アゴニストまたはＴＬＲ－８アゴニストである。いくつかのＴＬＲ－７アゴニストが公知であり、例えば、Ｉｎｖｉｖｏｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏから市販されている。例は、アデニンアナログＣＬ２６４、グアノシンアナログであるロキソリビン、または、好ましくは、イミダゾキノリン化合物（レシキモド、ガーディキモド（Ｇａｒｄｉｑｕｉｍｏｄ）（商標）またはイミキモド（４－アミノ－１－イソブチル－１Ｈ－イミダゾール［４，５－ｃ］キノリン（４－ａｍｉｎｏ－１－ｉｓｏｂｕｔｙｌ－１Ｈ－ｉｍｉｄａｚｏｌ［４，５－ｃ］ｃｈｉｎｏｌｉｎ））など）である。ＴＬＲ－８アゴニストは、ＴＬＲ－７アゴニストと同様の生物学的効果を有することが公知であり、したがって、これもまた、または代替的に使用することができる。ＴＬＲ－８アゴニストの例は、

一本鎖ＲＮＡまたは大腸菌ＲＮＡである。例示的なＴＬＲ－７／８リガンドは、チアゾロキノリン化合物ＣＬ０７５、イミダゾキノリン化合物Ｒ８４８、または水溶性Ｒ８４８イミダゾキノリン化合物ＣＬ０９７、チミジンホモポリマーホスホロチオアートＯＤＮ（ポリ（ｄＴ））である。

【００２７】

本発明で使用される好ましいアジュバントはイミキモドである。好ましくはＴＬＲ－７アゴニストおよび／またはＴＬＲ－８アゴニストを含む群から選択される、１つより多くのアジュバントを本発明の状況で使用することができ、必要であれば、免疫応答のさらなる刺激手段を（例えば、下記のとおりに）使用することができる。

【００２８】

好ましい実施形態によれば、治療的ワクチン接種は、アジュバント（イミキモドなど）およびサイトカイン（ＩＬ－７など）と組み合わせたＶＰ１（またはＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有するタンパク質）の投与を含む。ＶＰ１タンパク質またはそのバリアントは、この組み合わせ中に五量体として（すなわち、ＪＣＶキャプソメアの形態で）存在し得る。しかし、好ましくは、ＶＰ１タンパク質またはそのバリアントは、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）の形態で存在する。ＶＬＰはＶＰ１からなっていてもよく、または他のＪＣＶタンパク質（ＶＰ２および／またはＶＰ３など）も含んでもよい。ＶＰ１またはＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有するタンパク質からなるＶＬＰをアジュバントおよびサイトカインと組み合わせて投与することが特に好ましい。最も好ましくは、ＶＰ１からなるＶＬＰを、治療的ワクチン接種用のイミキモドおよびＩＬ－７と組み合わせて投与する。

【００２９】

１つの実施形態では、例えば、キットは、ＩＬ－７をさらに含むことができる。ＰＭＬを罹患した被験体を処置し（すなわち、治療的ワクチン接種において）、さらなる刺激を用いずに十分な免疫応答が期待されない場合（例えば、患者が免疫不全の場合）、ＩＬ－７を使用することが好ましい。本発明者らは、キットの他の構成要素とのＩＬ－７の投与が先天性免疫欠損を有する個体において防御免疫応答を誘導することができることを示した。ＩＬ－７を、免疫抑制薬物を受けた被験体またはＨＩＶ感染に起因して免疫無防備状態の患者において使用することもできる。

【００３０】

好ましくは、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含む本発明のタンパク質またはペプチドを、皮下投与する。他の投与様式（例えば、皮膚、筋肉内、静脈内、肺、または経口での投与）も選択することができる。

【００３１】

アジュバントを、本発明のタンパク質またはペプチドに対する免疫応答の誘導に適切な方法で被験体に投与することが好ましい。例えば、アジュバントを、本発明のタンパク質またはペプチドと同様の方法でおよびその投与時に投与することができ、共に１つの組成物中に存在することができる（例えば、１つのバイアル中に含むことができる）。１つの実施形態では、ＣＤ４＋エピトープを含むタンパク質またはペプチドとアジュバントとの両方は皮下投与用である。あるいは、これらをエピトープに対する免疫応答を刺激することが可能な方法で投与する。例えば、抗原を皮下投与し、アジュバントを局所または皮膚に投与する。特に、アジュバントを、例えば、クリームまたはローションの形態で、抗原の注射部位に投与することができる。アジュバント（イミキモドなど）の皮膚適用方法は技術水準において公知である。例えば、有効濃度のアジュバントを含むクリームを、皮下注射近位の皮膚に約５ｃｍ×５ｃｍの面積で投与することができる。

【００３２】

アジュバントおよび抗原を、同時にまたは短期間のうちに引き続いて投与することが好ましい。例えば、イミキモドクリームを、皮下注射後に直接皮膚投与することができる。クリームがさらに拡がるのを防止するために覆い、約４～１２時間後（例えば、８時間後）に拭き取ることができる。

【００３３】
ＣＤ４＋エピトープのうちの少なくとも１つを含むタンパク質またはペプチドとアジュバントとの第１の投与後、免疫応答を追加免疫するためにさらなる投与クールを行うことができる（例えば、２、３、または４クールの投与）。クール間の期間は、約１～約４週間、好ましくは、約２～約３週間（例えば、１０日間）であり得る。１つの実施形態では、第１の投与後、２週間後および６週間後にさらに、ブースター免疫を行う。免疫不全または免疫無防備状態の被験体では、追加免疫のために抗原およびアジュバントの両方を投与することが有利である。免疫不全でも免疫無防備状態でもない被験体では、第１の免疫または第１および第２の免疫のためにアジュバントのみを使用する（すなわち、その後の免疫のためだけに抗原を使用する）ことも可能である。

【００３４】
ＰＭＬを発症している被験体の処置での使用は別として、本発明のタンパク質またはペプチドを、まだＰＭＬを発症していないが、この疾患を発症するリスクがある被験体におけるＰＭＬおよび／またはＰＭＬ－ＩＲＩＳの予防のために有効に使用することもできる。このアプローチを、本明細書中で、予防的ワクチン接種という。予防的ワクチン接種によって処置される被験体は、ＪＶＣをまだ感染していない被験体であり得る。これは、予防的ワクチン接種を使用して被験体の感染を予防することを意味する。しかし、好ましくは、予防的ワクチン接種によって処置される被験体は、既にＪＣＶに感染している被験体である。予防的ワクチン接種は、アジュバントの投与を含む必要がない。予防的ワクチン接種がアジュバントの投与もサイトカイン（ＩＬ－７など）の投与も含まないことが好ましい。しかし、予防的ワクチン接種アプローチはまた、各被験体へのこれらの化合物の投与を含むことができる。

【００３５】
好ましい態様によれば、予防的ワクチン接種は、ＶＰ１タンパク質またはＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有するタンパク質の投与を含む。ＶＰ１タンパク質またはそのバリアントは、五量体として（すなわち、ＪＣＶキャプソメアの形態で）予防的ワクチン中に存在し得る。しかし、好ましくは、ＶＰ１タンパク質またはそのバリアントは、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）の形態で予防的ワクチン中に存在する。ＶＬＰはＶＰ１からなってもよく、または他のＪＣＶタンパク質（ＶＰ２および／またはＶＰ３など）も含んでもよい。

【００３６】
治療的または予防的のいずれかのワクチン接種レジメンにおいて本発明のタンパク質またはペプチドが投与される被験体は、遺伝性または後天性の免疫不全を有し、このことは、適応免疫機能または先天性免疫機能のいくつかの態様が機能障害性または障害性を示すことを意味する。前記免疫不全は、遺伝性機能障害（特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症または高ＩｇＥ症候群など）または疾患もしくは病的状態（ＡＩＤＳ、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫、またはＢ型もしくはＣ型肝炎ウイルスによる感染など）に起因する後天性免疫不全に起因し得る。被験体はまた、治療的介入の結果として免疫無防備状態であり得る。例えば、癌処置は、しばしば、免疫系のある一定の機能障害を生じる化学療法クールまたは照射クールを含む。また、移植医学で一般に使用され、且つ自己免疫疾患の処置でも一般的に使用される免疫抑制処置は、本発明に従って処置される被験体の免疫不全の原因であり得る。

【００３７】
１つの好ましい実施形態によれば、予防的または治療的のいずれかの処置により、本発明のペプチドまたはタンパク質によって処置される被験体は、免疫抑制処置を受けているか、または免疫抑制処置を受ける。これは、一旦患者が免疫抑制剤の投与によって処置されると担当医によって決定されると、ＰＭＬおよび／またはＰＭＬ／ＩＲＩＳの発症を予防するために本発明のペプチドまたはタンパク質のうちの１つまたはそれより多くを前記患者に投与することが可能であることを意味する。これは、例えば、臓器移植術を受ける予定のある患者に特に有用である。

【００３８】
あるいは、免疫抑制処置を受けているかまたは免疫抑制処置に適格な被験体は、自己免疫疾患、好ましくは、Ｔ細胞が病因的役割を果たすか、または免疫抑制の標的であることを特徴とする自己免疫疾患を罹患している患者であり得る。本明細書中で使用する場合、自己免疫疾患は、例えば、急性散在性脳脊髄炎（ＡＤＥＭ）、強直性脊椎炎、抗リン脂質症候群、自己免疫性心筋症、自己免疫性心筋症、自己免疫性肝炎、自己免疫性内耳疾患、自己免疫性リンパ増殖性症候群、自己免疫性末梢神経障害、自己免疫性膵炎、自己免疫性多内分泌腺症候群（ａｕｔｏｉｍｍｕｎｅ　ｐｏｌｙｅｎｄｏｃｒｉｎｅ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性蕁麻疹、自己免疫性ブドウ膜炎、ベーチェット病、セリアック病、クローン病、皮膚筋炎、１型真性糖尿病、好酸球性筋膜炎、胃腸類天疱瘡、グッドパスチャー症候群、グレーブス病、ギラン・バレー症候群（ＧＢＳ）、橋本脳症、橋本甲状腺炎、エリテマトーデス（Ｌｕｐｕｓ　ｅｒｙｔｈｅｍａｔｏｓｕｓ）、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、悪性貧血、多発性筋炎、原発性胆汁性肝硬変、乾癬、乾癬性関節炎、再発性多発性軟骨炎、関節リウマチ、シェーグレン症候群、横断性脊髄炎、潰瘍性大腸炎、脈管炎、およびウェゲナー肉芽腫症を含む。好ましくは、自己免疫疾患は多発性硬化症である。ＭＳ以外の自己免疫疾患のうち、であるもの。
【００３９】
したがって、本発明のキットの構成要素は、ＰＭＬと診断された被験体またはＰＭＬ発症リスクのある被験体からなる群から選択される被験体への投与のためのものであり得る。
【００４０】
ＰＭＬ発症リスクのある被験体は、技術水準において周知である。これらの被験体を、本発明のタンパク質およびペプチドで予防的に処置することができる。上記で概説するように、例としては、例えばＨＩＶ感染もしくはＡＩＤＳに起因して、または腫瘍に起因して、免疫不全または免疫無防備状態の患者である。かかる患者はまた、先天性免疫不全を有し得る（特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症または高ＩｇＥ症候群を有する患者など）。あるいは、現在行われているかまたは計画されている免疫抑制処置に起因して免疫系が損なわれ得る。患者は、例えば、患者が自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、関節リウマチ、エリテマトーデス（Ｌｕｐｕｓ　ｅｒｙｔｈｅｍａｔｏｄｅｓ）、クローン病、または乾癬）を有する場合、または、患者が移植患者（すなわち、移植を受けているかまたは移植をまさに受けようとしている患者）である場合に、免疫抑制処置に適格であり得る。後天性または先天性の免疫低下状態を有する（特に、ＣＤ４＋　Ｔ細胞の数および機能が低下した）任意の患者は、根底にある免疫無防備状態を修正しようとするならば、潜在的にＰＭＬおよびその後のＰＭＬ－ＩＲＩＳの発症リスクがある。
【００４１】
本発明の状況では、免疫抑制処置は、例えば、シクロスポリンまたはＦＫ５０６結合タンパク質、細胞傷害性薬物（例えば、シクロホスファミド、ミトキサントロン（ｍｉｔｏｘａｎｔｒｏｎ）、ブスルファン、および血液腫瘍または固形腫瘍の処置における単剤療法または併用療法として標準的に使用される多数の他の薬物）、または免疫抑制抗体もしくは免疫調節抗体（例えば、ナタリズマブ、エファリズマブ、リツキシマブ、オクレリズマブ、およびアレムツズマブを含む群から選択されるモノクローナル抗体）を用いた処置であり得る。免疫抑制処置はまた、照射または化学療法であり得る。
【００４２】
免疫抑制処置は、好ましくは、１つもしくはそれより多くの免疫抑制抗体、より好ましくは１つもしくはそれより多くのモノクローナル抗体、または他の生物学的、細胞治療、もしくは小分子ベースを用いた被験体の処置を含む。例えば、癌および自己免疫疾患で用いられているいくつかの主要なモノクローナル抗体（ナタリズマブ（抗ＶＬＡ－４）、エファリズマブ（抗白血球機能関連抗原－１）（既に市場から撤退）、リツキシマブ（抗ＣＤ２０）、オクレリズマブ（抗ＣＤ２０）、アレムツズマブ（抗ＣＤ５２）、またはイン

フリキシマブ（抗腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）－α）が含まれる）またはＩｇＧ１－ＴＮＦ受容体２融合タンパク質であるエタネルセプトを用いた免疫抑制処置によって、ＰＭＬおよび／またはＰＭＬ－ＩＲＩＳをもたらし得ることが示されている。このリスクを、本発明によって予防または軽減することができる。ある特定の免疫機能（（ＣＮＳ免疫監視中の）活性化免疫細胞のＣＮＳへの遊走）を損なうか（ナタリズマブの場合のように）、または細胞を二次リンパ器官中に捕捉する（フィンゴリモドの場合のように）、他の生物学的製剤または小分子（例えば、スフィンゴシン－リン酸受容体１アゴニストであるフィンゴリモド）および類似の効果を有する他のものがＰＭＬ／ＰＭＬ－ＩＲＩＳの発症リスクの増大をもたらし得ると予想される。したがって、予防的または治療的のいずれかの処置により、本発明のペプチドおよびタンパク質によって処置される被験体は、ナタリズマブ、エファリズマブ、リツキシマブ、オクレリズマブ、およびアレムツズマブ、または別の免疫抑制剤（上記を参照のこと）の群から選択される１つもしくはそれより多くのモノクローナル抗体によって現在処置されている被験体、またはかかる処置が計画されている被験体であることが好ましい。好ましくは、被験体を、抗体ナタリズマブまたはその誘導体を用いて処置する。

【００４３】

好ましい実施形態では、本発明は、（例えば、五量体の形態、またはＶＰ１もしくはＶＰ１バリアントを含むかもしくはそれからなるＶＬＰの形態の）ＶＰ１タンパク質またはＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有するタンパク質を、上記免疫抑制抗体のうちの１つもしくはそれより多く、好ましくはナタリズマブを受けている被験体へと投与することを含む、予防的または治療的なワクチン接種に関する。

【００４４】

本発明のキットを用いた被験体の処置は、ＪＣＶのキャリアであると診断されている被験体に特に有利であり得る。しかし、（例えば、免疫抑制処置の過程において）被験体が新たにＪＣＶに感染するという有意なリスクも存在する。したがって、ＪＣＶ感染の診断が行われていないかまたはＪＣＶ試験が陰性であった場合、本発明のキットによって被験体をＪＣＶに対して免疫することも有利である。

【００４５】

本発明のキット（ｋｉｔ　ｏｒ　ｔｈｅ　ｉｎｖｅｎｔｉｏｎ）の構成要素を、以下：

ａ）免疫無防備状態または免疫不全の被験体（ＨＩＶのキャリアなど）、免疫抑制処置を有する被験体、または先天性免疫不全患者（特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症または高ＩｇＥ症候群（Ｓｙｎｄｒｏｍ）を有する患者など）；

ｂ）免疫抑制処置に適格な被験体

の群から選択される被験体に投与することが好ましい。

【００４６】

１つの態様では、本発明は、ＰＭＬ処置（すなわち、ＰＭＬと診断された被験体の処置）で用いるための本明細書中に記載のとおりの薬学的キットに関する。本発明者等によって驚いたことに示されるように、ＪＣＶに対する免疫性を本発明によって誘導することができ、ＪＣＶを脳から排除することができ、ＰＭＬの症状を治癒（軽減または消滅）させることができる。

【００４７】

本発明はまた、以下：

ａ）免疫無防備状態または免疫不全の被験体（ＨＩＶのキャリアなど）、免疫抑制処置を有する被験体、または先天性免疫不全患者（特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症または高ＩｇＥ症候群を有する患者など）；

ｂ）免疫抑制処置に適格な被験体

の群から選択される被験体において、ＰＭＬおよび／またはＰＭＬ－ＩＲＩＳの予防で用いるための本明細書中に記載のとおりの薬学的キットに関する。

【００４８】

免疫抑制処置は、例えば、自己免疫疾患と診断された被験体または移植患者の処置であ

り得る。キットの構成要素を、免疫抑制処置の前、後、またはその間に前記患者に投与することができる。特に、免疫抑制処置の開始が緊急でない場合、免疫抑制処置を開始する前に本発明によってＪＣＶに対する免疫応答を開始させるかまたは追加免疫することが有利であり得る。しかし、本発明者らは、免疫無防備状態の個体においてＰＭＬを処置するのに十分なＪＣＶに対する免疫応答を達成することも可能であることを示した。これは、免疫抑制処置を受けている被験体と類似の状況である。

【００４９】

いくつかの状況下で、本発明の免疫後（ｉｍｍｕｎｉｓａｔｉｏｎ　ｏｒ　ｔｈｅ　ｉｎｖｅｎｔｉｏｎ）の最初の数日間もしくは数週間（例えば、２日間、５日間、７日間、１４日間、または２８日間）、または脳からのＪＣＶの除去が認められるか、もしくはＰＭＬの症状が治癒するまで、免疫抑制処置を軽減するかまたは中断することが有利であり得る。これを、患者の免疫状態および患者の免疫抑制処置を軽減または中断するリスクに応じて医療従事者によって決定することができる。あるいは、またはさらに、免疫刺激処置（ＩＬ－７を用いた処置など）を被験体に施すことができる。

【００５０】

本発明はまた、ＰＭＬの処置方法ならびにＰＭＬおよび／またはＰＭＬ－ＩＲＩＳの予防方法であって、

ａ）ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープ（該エピトープは配列番号１～９２を含む群から選択される）を含むタンパク質またはペプチドを患者に投与し、

ｂ）必要に応じて、ＴＬＲ－７アゴニストおよび／またはＴＬＲ－８アゴニストを含む群から選択されるアジュバントを患者に投与する、方法に関する。

【００５１】

本発明はまた、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープ（該エピトープは配列番号１～９２を含む群から選択される）を含むタンパク質またはペプチドに関する。前記タンパク質またはペプチドは、本明細書中に記載の本発明のキットに適切であり、したがって、アジュバントを添加する、前記キットの調製に適切な一構成要素である。

【００５２】

本発明者らは、開示されるＣＤ４＋エピトープの生物学的関連を示しており、これらのエピトープからなるペプチドを最初に単離した。本発明の状況では、エピトープは、さらなる抗原提示細胞によるプロセシングを受けてかまたは受けずに、ＭＨＣ　ＩＩに関連して提示されることができる。すなわち、用語「エピトープ」は、ＣＤ４＋　Ｔ細胞応答を誘導することができると本発明者らによって示された配列番号１～９２に開示のアミノ酸配列に関しており、ＭＨＣ　ＩＩから単離することができるペプチドに必ずしも関連しない。

【００５３】

ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープ（該エピトープは配列番号１～９２を含む群から選択される）を含むタンパク質またはペプチドは、配列番号１および配列番号４６～７６を含む群から選択される少なくとも１つのエピトープをさらに含む、ＶＰ１またはＶＰ１と少なくとも７０％のアミノ酸同一性を有するタンパク質の融合タンパク質であり得る。したがって、本発明のタンパク質またはペプチドは、１つより多くのネイティブなＪＣＶタンパク質由来の（例えば、２、３、または４つのＪＣＶタンパク質由来の）エピトープを含むことができる。

【００５４】

上記のように、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープ（該エピトープは配列番号１～９２を含む群から選択される）を含むタンパク質またはペプチドを、本発明のキットの調製のために、すなわち、例えば、ＰＭＬまたはＰＭＬ－ＩＲＩＳの処置または予防のための、ＪＣＶに対する被験体の免疫のために使用することができる。あるいは、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープを含むタンパク質またはペプチド（該エピトープは配列番号１～９２を含む群から選択される）を、ＪＣＶによる感染の診断のために使用することができる。特に、このタンパク質またはペプチドを、（好ましくは、

症状および／またはＭＲＩもしくは脳の分析などの他の方法と関連させて）ＰＭＬの診断のために使用することができる。

【００５５】

本明細書中に記載のタンパク質またはペプチドは、ＪＣＶによる感染の診断方法および／またはＰＭＬの診断方法での使用に非常に適切である。したがって、本発明はまた、被験体由来のサンプルを、ＪＣＶ由来の少なくとも１つのＣＤ４＋エピトープ（該エピトープは配列番号１～９２を含む群から選択される）を含むタンパク質またはペプチドと接触させる工程を含む、ＪＣＶによる感染の診断方法またはＰＭＬの診断方法に関する。

【００５６】

１つの実施形態では、感染の診断方法を、サンプル由来の抗体の前記タンパク質またはペプチドへの結合に適切な条件下で実施する。サンプルへの抗体の結合が、例えば、ＥＬＩＳＡによって検出される場合、被験体はＪＣＶに感染しているか、または以前よりＪＣＶに感染している。

【００５７】

好ましい実施形態では、本発明のタンパク質またはペプチドのＣＤ４＋エピトープを含むという特徴を利用する。感染の診断方法を、エピトープ（単数または複数）の存在に対する、サンプル中のＣＤ４＋　Ｔ細胞の反応の検出に適切な条件下で実施することができる。例えば、３Ｈ－チミジン（Ｔｈｙｍｉｄｉｎ）の取り込み、ブロモ－２’－デオキシウリジン（ＢｒｄＵ）の取り込みを測定することができるＴ細胞についての増殖アッセイ、または活性化マーカー（ＣＤ２５または１つもしくはそれより多くのサイトカインなど）の発現についてのアッセイを使用することができる。ＥＬＩＳＰＯＴアッセイを使用することができるが、ＥＬＩＳＡアッセイ、シンチレーションアッセイ、または細胞外もしくは細胞内のＦＡＣＳも適切であり得る。開示されるエピトープ（単数または複数）を含むタンパク質またはペプチドによるＣＤ４＋活性化についてのアッセイは、ＰＣＲ試験および／または患者由来のサンプル中のＪＣＶに対する抗体の存在についての試験と組み合わせた場合のＪＣＶ感染または被験体の免疫状態に関するさらなる情報を提供することができるか、あるいはこのアッセイを、技術水準において以前に公知であったような試験のかわりに使用することができる。

【００５８】

１つの実施形態では、ＣＤ４＋　Ｔ細胞活性化を試験し、ＣＤ４＋　Ｔ細胞の表現型を分析する（例えば、Ｔｈ１、Ｔｈ２、またはＴｈ１／２表現型を決定する）。これを、技術水準において公知のとおりサイトカインの発現に基づき、および／または他の分化マーカー（転写因子など）の発現に基づいて実施することができる。

【００５９】

本発明の状況では、分析される（そしてこの分析によって変換される）サンプルは、好ましくは、血液サンプル、脳組織サンプル（例えば、脳生検または穿刺由来の、脳実質由来のサンプルまたは脳脊髄液（ＣＳＦ）のサンプルなど）、またはこれら由来のサンプルである。例えば、Ｔ細胞活性を分析しようとする場合、ＰＢＭＣ細胞またはＴ細胞を当該分野で公知の方法によって血液またはＣＳＦから単離することができる。しかし、本発明者らは、脳組織（脳実質など）由来のＴ細胞のＴ細胞活性を分析することが好ましいことを示した。抗体を分析しようとする場合、血清を使用することができる。

【００６０】

本発明の１つの好ましい実施形態では、被験体または患者はヒトである。あるいは、被験体または患者はまた、ヒト化動物（実験系においてＪＣＶによる感染に感受性を示すヒト化マウスなど）であり得る。被験体／患者がヒトである場合、本出願で言及されるタンパク質はまた、他で具体的に言及されない限り、好ましくはヒトまたはヒト起源である。例えば、ＩＬ－７は、ＩＬ－７受容体に結合してそのシグナル伝達を媒介することができる、ヒトＩＬ－７またはその誘導体であり得る。ＩＬ－７は、（例えば、融合タンパク質の形態の）組換えＩＬ－７であり得る。ＴＬＲはまた、ヒトＴＬＲである。

【００６１】

ＪＣＶに対する免疫応答および脳からのウイルスの排除におけるＣＤ４＋応答の重要性を認識した本発明者らは、ポリオーマウイルスＪＣの免疫原性エピトープをマッピングした。ＪＣＶの３つのオープンリーディングフレーム由来の免疫優性ペプチドを同定した。主要キャプシドタンパク質内の重要なバリアントをはじめとするＪＣＶの全オープンリーディングフレームにわたる重複ペプチドセットのペプチドを試験した。同定されたＣＤ４＋　Ｔ細胞エピトープを、ＪＣＶ感染状態の診断検査のために使用することができるが、患者／コントロール（例えば、ＪＣＶに対する弱い免疫応答を有し（構成的に、または疾患（例えば、ＡＩＤＳ、構成性免疫不全（特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症など））もしくは処置（癌治療、モノクローナル抗体治療（例えば、ＭＳにおけるナタリズマブ）、しかし、他も同様）に起因して）、およびＰＭＬの発症リスクがあるか、またはＰＭＬを既に発症している被験体）にワクチン接種するために使用することもできる。

【００６２】

本発明者らは、全ＪＣＶタンパク質に対するＣＤ４＋　Ｔ細胞エピトープの微細特異性をマッピングした。ＰＭＬおよびＰＭＬ－免疫再構築症候群（ＰＭＬ－ＩＲＩＳ）を罹患している患者の脳生検由来のＴ細胞培養物およびＴ細胞クローンを調べた。この免疫応答がウイルスの最も重要なエピトープを標的にし、その排除および感染を含むこと（ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ）をもたらすという意味でこの免疫応答は防御的であるので、健康なコントロールおよび多発性硬化症（ＭＳ）患者の末梢血リンパ球試験由来のマッピングデータ、特に、ＰＭＬ－ＩＲＩＳ中の脳浸潤Ｔ細胞の抗原微細特異性の特徴付けに由来するデータは、診断およびワクチン接種／治療目的のための生物学的関連性および有用性を支持する。

【００６３】

本発明の過程で、さらに、６４歳でＰＭＬを発症した特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症（稀な構成性の免疫不全）患者において個人治癒の試みを行った。この患者において、本発明者らは、主要キャプシドタンパク質ＶＰ１全体を使用したワクチン接種が、一定の条件下で、ＪＣＶに対する不十分な免疫応答を、脳からＪＣＶを排除することができる程度まで追加免疫することができるかどうかという状況を試験した。本発明者らは、皮膚適用したＴＬＲ７アゴニスト（イミキモド、アルダラ）および組換えｉ．ｖ．ＩＬ－７（Ｃｙｔｈｅｒｉｓ）と組み合わせた組換えＶＰ１タンパク質の皮下注射によって、この患者をワクチン接種した。この患者は、２回のみのワクチン接種後にＪＣＶ　ＶＰ１に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ増殖応答を示しただけでなく、血清ＪＣＶウイルス量を０まで減少させ、脳ＭＲＩ画像化によるわずかなコントラスト増強を示し始め、ＣＳＦ細胞数がわずかに増加し、最後に臨床的に改善した。これらは全てこのワクチン接種がｉｎ　ｖｉｖｏでうまく働いたことを支持している。

【００６４】

以下の実施例は、本発明を例示することを意味するが、その範囲を制限することを意味しない。本明細書中に引用した全ての刊行物は、全ての目的のために本明細書に十分に援用される。

【図面の簡単な説明】

【００６５】

【図１】ａ）脳生検由来のＰＨＡ増幅バルク単核球集団（左のパネル）、ＣＳＦ由来のＰＨＡ増幅バルク単核球集団（左から２番目のパネル）、およびＰＢＭＣ由来のＰＨＡ増幅バルク単核球集団（左から３番目のパネル）、ならびに非操作ＰＢＭＣ（右のパネル）を、ＪＣＶ　ＶＰ１／ＶＬＰタンパク質および破傷風トキソイドタンパク質（ＴＴｘ）に対して試験した。結果を平均ＳＩ±ＳＥＭで示す。ｙ軸のスケールが異なることに留意のこと。ｂ）脳生検由来のＰＨＡ増幅ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞（左のパネル）、ＣＳＦ由来のＰＨＡ増幅ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞（左から２番目のパネル）、ＰＢＭＣ由来のＰＨＡ増幅ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞（左から３番目のパネル）、および非操作ＰＢＭＣ（右のパネル）におけるＴｈ１細胞、Ｔｈ２細胞、Ｔｈ１７細胞、およびＴｈ１－２細胞のｅｘ－ｖｉｖｏ定量。数字は陽性細胞の百分率を示す。Ｔｈ１は、ＣＤ４$^{+}$ＩＦＮ－γ^{+}ＩＬ－１７Ａ$^{-}$／ＩＬ－４$^{-}$

と同定され、Ｔｈ１７細胞は、ＣＤ４$^{+}$ＩＬ－１７Ａ$^{+}$ＩＦＮ－γ^{-}と同定され、Ｔｈ２はＣＤ４$^{+}$ＩＬ－４$^{+}$ＩＦＮ－γ^{-}と同定され、Ｔｈ１－２はＣＤ４$^{+}$ＩＦＮ－γ^{+}ＩＬ－４$^{+}$と同定された。

【図２】ａ）ＪＣＶの全てのオープンリーディングフレーム（Ａｇｎｏ、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ラージＴ、およびスモールＴタンパク質を含む）にまたがり、それぞれ５ペプチドの４１プールにまとめた２０４種の重複する１５マーペプチドに対する脳由来のＰＨＡ増幅細胞の増殖応答。結果を平均ＳＩ±ＳＥＭで示す。バーの異なるパターンは、異なるオープンリーディングフレームに対応する。ＪＣＶゲノム中の５つのオープンリーディングフレームの略図（図の右上）。ｂ）個々のＪＣＶペプチドに対する脳由来のバルク単核球集団の増殖応答。結果を平均ＳＩ±ＳＥＭで示す。パネルａとｂとでｙ軸のスケールが異なることに留意のこと。ｃ）脳生検由来のＰＨＡ増幅細胞において最強の増殖応答を誘導する５つのＪＣＶペプチドに特異的な（ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｏｆ）Ｔ細胞の前駆体頻度。ｄ）ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１－ＶＰ1_{36}四量体（中央のグラフ）およびＨＬＡ－Ａ＊０２：０１－ＶＰ1_{100}四量体（下のグラフ）に結合するＣＤ８＋　Ｔ細胞の百分率。

【図３】ａ）脳生検中の各個々のＴＣＣ頻度を示すドーナッツ図。ｂ）６４種の個々のＶＰ１ペプチドに対するＴＣＣの増殖応答。結果を平均ＳＩ±ＳＥＭで示す。ｃ）脳由来のバルク集団（上のグラフ。平均ＳＩ±ＳＥＭを示す）および異なるＴＣＣ（下のグラフ。異なるパターンは異なるＴＣＣに対応し、各単一細胞増殖培地を四角によって示す）について同定した免疫優性ペプチドの略図。

【図４】ａ）Ｔｈ１－２（上のプロット）およびＴｈ１（下のプロット）ＶＰ１／ＶＬＰ特異的ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞クローンによる細胞内ＩＦＮ－γおよびＩＬ－４産生の代表的なフローサイトメトリー分析。ｂ）ドットプロットは、細胞内サイトカイン染色によるＴｈ１－２表現型およびＴｈ１表現型を有するＶＰ１特異的な脳由来の単一細胞培養物の百分率を示す。各ドットは、分析した２１種の単一細胞培養物のうちの１つに対応する。ドーナッツは、各ＴＣＣの機能的表現型を示す。ｃ）ＰＨＡでの刺激７２時間後のＴｈ１－２　ＴＣＣ（ｎ＝５、黒色バー）およびＴｈ１　ＴＣＣ（ｎ＝６、白色バー）の培養上清中のＩＦＮ－γおよびＩＬ－４の産生のＥＬＩＳＡ検出。結果を平均±ＳＥＭで示す。ｄ）Ｔｈ１－２　ＴＣＣ（ｎ＝５、黒色バー）およびＴｈ１　ＴＣＣ（ｎ＝６、白色バー）の転写因子Ｇａｔａ３およびｔ－ｂｅｔについてのＲＴ－ＰＣＲ分析。値は、脳由来のＰＨＡ増幅細胞（標準物質＝１）と比較した相対発現である。結果を平均±ＳＥＭで示す。

【図５】ＶＰ１での免疫無防備状態の被験体の免疫のための処置スキーム。Ｍ＝月、Ｄ＝日、Ｗ＝週、ＭＲＩ＝磁気共鳴画像法。ＶＰ１投与後にアジュバント（イミキモド）を直接投与した。

【図６】処置中のＶＰ１免疫応答の発生。ＶＬＰ１＝ＶＰ１タンパク質から構成されるウイルス様粒子１、ＴＴ＝破傷風トキソイド。

【図７Ａ】図７。処置クール。図７ＡはＶＰ１刺激後のウイルス量および平均ＳＩを示し、図７ＢはＣＳＦ中の白血球数を示す。ＩＬ－７およびＶＰ１の投与時点は同一であり、図５中に示すスキームに対応する。

【図７Ｂ】図７。処置クール。図７ＡはＶＰ１刺激後のウイルス量および平均ＳＩを示し、図７ＢはＣＳＦ中の白血球数を示す。ＩＬ－７およびＶＰ１の投与時点は同一であり、図５中に示すスキームに対応する。

【図８】ＶＰ１特異的Ｔ細胞の特徴付け。ＣＤ４＋細胞のみがＶＰ１刺激後に増殖する（免疫６週間後）。

【図９】増殖しているＣＤ４細胞は活性化記憶細胞である。

【図１０】ＶＰ１によって活性化されたＣＤ４＋　Ｔ細胞は、高バックグラウンドのＩＬ－４を発現し、ＶＰ１刺激後にＩＦＮ－γを産生する。０日目にＣＤ４＋　Ｔ細胞を抗原で刺激した。６日目に、これらの細胞を抗原で再度刺激し、１時間後にブレフェルジンＡを用いて分泌を遮断し、１５時間後に細胞内サイトカイン染色を行い、ＦＡＣＳによって分析した。

【図１１】３Ｈ－チミジン取り込みアッセイ。表示の時点で、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を患者から得、抗原（ＶＰ１／ＶＬＰ）と共に新たに播種した（１×１０^{5}細胞／ウェル）。７日間のインキュベーション後、３Ｈ－チミジン取り込みを測定した。２よりも大きな刺激指数を陽性応答とみなした。ＳＩを、グラフのｙ軸上に示す。

【実施例】

【００６６】

実施例１－免疫優性ＣＤ４＋エピトープの同定

【００６７】

材料および方法

患者

ＨＬＡ－クラスＩＩ型：ＤＲＢ１＊１３：０１、－＊１６：０１；ＤＲＢ３＊０２：０２；ＤＲＢ５＊０２：０２；ＤＱＡ１＊０１：０２、－＊０１：０３；ＤＱＢ１＊０５：０２、－＊０６：０３（患者１）；およびＤＲＢ１＊１１：０３、－＊１５：０１；ＤＲＢ３＊０２：０２；ＤＲＢ５＊０１：０１；ＤＱＡ１＊０１：０２、－＊０５：ＸＸ（Ｘは、正確なサブタイプに分類されていないことを示す）；ＤＱＢ１＊０３：０１、－＊０６：０２（患者２）。

【００６８】

神経病理学

総体積がおよそ０．１ｍｌの小組織フラグメントを、開放生検によって得た。緩衝化ホルマリン中で２時間の固定後、組織をパラフィン中に包埋した。４μｍのミクロトーム切片を、ヘマトキシリン－エオシン（Ｈ＆Ｅ）、ヴァン・ギーソンのトリクローム、ＰＡＳ、シデリン（siderin）についてのターンブル染色およびルクソールで染色した。免疫組織化学染色を、以下の抗体を使用して製造者の説明書に従って自動化ベンタナＨＸ　ＩＨＣシステムベンチマーク（Ｖｅｎｔａｎａ－Ｒｏｃｈｅ　Ｍｅｄｉｃａｌ　ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｔｕｃｓｏｎ，ＡＺ，ＵＳＡ）にて行った：抗ＣＤ４５／ＬＣＡ（ＤＡＫＯ，Ｇｌｏｓｔｒｕｐ，Ｄｅｎｍａｒｋ；Ｍ７０１）、抗ＣＤ３（ＤＡＫＯ；Ｍ１５８０）、抗ＣＤ４５Ｒ０（ＤＡＫＯ；Ｍ０７４２）、抗ＣＤ２０（ＤＡＫＯ；Ｍ０７５５）、抗ＣＤ７９ａ（ＤＡＫＯ；Ｍ７０５０）、抗ＣＤ６８（Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈ／Ｂｅｃｋｍａｎｎ－Ｃｏｕｌｔｅｒ，Ｋｒｅｆｅｌｄ，Ｇｅｒｍａｎｙ，２１６４）、抗ＨＬＡ－ＤＲ（ＤＡＫＯ；Ｍ７７５）、抗ＮＦ（Ｚｙｍｅｄ／Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ，８０７４２９７１）、抗ＧＦＡＰ（ＤＡＫＯ；Ｚ３３４）、および抗ｐ５３（ＤＡＫＯ；Ｍ７００１）。

【００６９】

脳由来、ＣＳＦ由来、および末梢血単核球の脳組織プロセシングおよび増幅

およそ０．０３３ｍｌの生検を小片に切断し、水浴中にて１ｍｇ／ｍｌコラゲナーゼＡ（Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｐｅｎｚｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）および０．１ｍｇ／ｍｌ　ＤＮアーゼＩ（Ｒｏｃｈｅ）を含む溶液中３７℃で４５分間のインキュベーションによって破壊した。得られた細胞懸濁液を３回洗浄し、脳由来単核球をパーコール密度勾配遠心分離（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ，Ｍｕｎｉｃｈ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用して分離した。細胞を３０％パーコール溶液に再懸濁し、７８％パーコール溶液を慎重に重層した。遠心分離後、脳由来単核球を、勾配の界面部から集めた。

【００７０】

ＣＳＦ由来単核球を診断脊椎穿刺から直接得て、末梢血単核球をフィコール密度勾配遠心分離（ＰＡＡ，Ｐａｓｃｈｉｎｇ，Ａｕｓｔｒｉａ）によって分離した。

【００７１】

脳由来の単核球、ＣＳＦ由来の単核球、および末梢血由来の単核球を、２×１０^{5}非自系で照射したＰＢＭＣ（３，０００ｒａｄ）および１μｇ／ｍｌのＰＨＡ－Ｌ（Ｓｉｇｍａ，Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）と共に２０００細胞／ウェルを播種することによって９６ウェルＵ底マイクロタイタープレート中で増幅した。培地は、１００Ｕ／ｍｌペニシリン／ストレプトマイシン（ＰＡＡ）、５０μｇ／ｍｌゲンタマイシン（ＢｉｏＷｈｉｔｔａ

ｋｅｒ，Ｃａｍｂｒｅｘ）、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（ＧＩＢＣＯ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、および５％加熱補体除去（ｈｅａｔ－ｄｅｃｏｍｐｌｅｍｅｎｔｅｄ）ヒト血清（ＰＡＡ）を含むＲＰＭＩ（ＰＡＡ）からなっていた。２４時間後、２０Ｕ／ｍｌのヒト組換えＩＬ－２（ｈｒＩＬ－２、Ｔｅｃｉｎ，Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ）を添加し、３～４日毎にさらなるｈｒＩＬ２を添加した。２週間後、細胞をプールおよび分析し、低温保存したか、または１μｇ／ｍｌ　ＰＨＡ、２０Ｕ／ｍｌ　ｈｒＩＬ－２、および同種異系の照射したＰＢＭＣを用いて再度刺激した。

【００７２】

脳由来単核球のフローサイトメトリー分析

脳消化に直接由来する脳由来単核球を、表面マーカーについての以下の抗体を用いて染色した：ＣＤ４５（ＡｍＣｙａｎ，２Ｄ１，ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＵＳＡ）、ＣＤ５６（Ａｌｅｘａ　４８８，Ｂ１５９，ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ３（ＰｅＣｙ７，ＵＣＨＴ１，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＵＳＡ）、ＣＤ４（ＡＰＣ，ＲＰＡ－Ｔ４，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＤ８（ＰＢ，ＤＫ２５，Ｄａｋｏ，Ｇｌｏｓｔｒｕｐ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＣＤ４５ＲＯ（ＦＩＴＣ，ＵＣＨＬ１，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＤ１９（ＦＩＴＣ，ＨＩＢ１９，ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＣＤ３８（ＡＰＣ，ＨＩＴ２，ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、およびＣＤ２７（ＡＰＣ－Ａｌｅｘａ　７５０，ＣＬＢ－２７／１，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）。ａ３　ＬＳＲＩＩ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｈｅｉｄｅｌｂｅｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）フローサイトメーターにて分析を行った。

【００７３】

タンパク質およびペプチド

ＪＣＶ特異的Ｔ細胞の同定のために、ＪＣウイルスプロテオーム全体を包含する２０４種の（１３～１６マー）ペプチドを適用した。ｐｅ（ｐｅｐｔｉｄｅｓ　ａｎｄ　ｅｌｅｐｈａｎｔｓ　ＧｍｂＨ，Ｐｏｔｓｄａｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ）によってペプチドが合成され、提供された。これらの２０４種のペプチドは５アミノ酸が重複し、３５種の共通の単一アミノ酸変異を含む。異なるＪＣＶ遺伝型および株の間で生じるアミノ酸のバリエーションを説明するために、各ＪＣＶコードタンパク質のアミノ酸配列（ＧｅｎＢａｎｋで（２００８年３月現在）利用可能な４７９種の全ＪＣＶゲノム配列由来のＡｇｎｏ、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ラージＴ抗原、およびスモールｔ抗原が含まれる）をアラインメントし、全検索配列のうちの１％よりも多くで優勢な多型を共通変異と定義した。

【００７４】

どの個々のペプチドがＣＮＳ由来のＴ細胞によって認識されるかを決定するために、二次元播種スキームを適用した。ペプチドを、各プールが５つの異なるペプチドを含む一組の８２プール中に配置した。矩形行列に従った各ウェル中の異なるペプチドと、残存ペプチドが異なる２つのプール中に正確に出現する各個々のペプチドとの組み合わせにより、免疫原性候補ペプチドを、陽性プールの共通部分で同定することができた。

【００７５】

ＪＣＶ　ＶＰ１タンパク質はウイルス様（ＶＬＰ）粒子を形成し、したがって、ＶＰ１およびＶＬＰを交換可能な用語として使用する。ＶＬＰ（ＶＰ１／ＶＬＰ）を形成するＶＰ１タンパク質を、先に記載（Ｇｏｌｄｍａｎｎら、１９９９）のとおりにＬｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｉｎｋｕｂａｔｏｒ，Ｂｏｎｎ，Ｇｅｒｍａｎｙによって生成した。１０アミノ酸が重複し、且つＭＢＰ（１６ペプチド）、ＭＯＧ（２５ペプチド）、およびＰＬＰ（２７ペプチド）を包含する２０マーミエリンペプチドを、ＰＥＰＳｃｒｅｅｎ，Ｃｕｓｔｏｍ　Ｐｅｐｔｉｄｅ　Ｌｉｂｒａｒｉｅｓ，ＳＩＧＭＡによって合成および提供した。破傷風トキソイド（ＴＴｘ）（Ｎｏｖａｒｔｉｓ　Ｂｅｈｒｉｎｇ，Ｍａｒｂｕｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）をポジティブコントロールとして使用した。

【００７６】

増殖アッセイ

ＪＣＶペプチド、ＶＰ１／ＶＬＰ、およびＴＴｘの認識を、ペプチドを用いて、または

用いずに、９６ウェルU底マイクロタイタープレート中に１ウェルあたり２～２．５×１０^{4}個の脳由来、ＣＳＦ由来、または末梢血由来のＰＨＡ増幅細胞および１×１０^{5}個の自系で照射したＰＢＭＣを７２時間二連で播種することによって試験した。非操作ＰＢＭＣを、７日間の一次増殖において２×１０^{5}細胞／ウェルで試験した。ＴＴｘに加えて、ポジティブコントロールとしてＰＨＡ－Ｌ刺激を加えた。全ＪＣＶペプチドを、プール中または個々のペプチドとしていずれかで、そしてプール中のペプチドについては２μＭ／ペプチドの最終濃度で、個々のペプチドについては１０μＭの濃度で試験した。ＶＰ１／ＶＬＰを２μｇ／ｍｌ、破傷風トキソイド（ＴＴｘ）を５μｇ／ｍｌ、およびＰＨＡを１μｇ／ｍｌで試験した。増殖を、シンチレーションベータカウンター（Ｗａｌｌａｃ １４５０，ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ，Ｒｏｄｇａｕ－Ｊｕｅｒｇｅｓｈｅｉｍ，Ｇｅｒｍａｎｙ）中での^{3}Ｈ－チミジン（Ｈａｒｔｍａｎｎ Ａｎａｌｙｔｉｃ，Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）取り込みによって測定した。刺激指数（ＳＩ）を、ＳＩ＝平均ｃｐｍ（カウント／分）（ペプチド）／平均ｃｐｍ（バックグラウンド）として計算した。ＳＩ＞３、ｃｐｍ＞１０００、および平均バックグラウンドｃｐｍよりも少なくとも３標準偏差（ＳＤ）高い場合、応答を陽性とみなした。

【００７７】

ミエリンペプチドを、上記のとおりに５μＭでの個々のペプチドとして試験した。

【００７８】

脳由来のＶＰ１／ＶＬＰ特異的Ｔ細胞クローンの生成

２．５×１０^{4}個の脳由来のＰＨＡ増幅細胞を、ＶＰ１／ＶＬＰタンパク質を用いて、または用いずに、９６ウェルU底マイクロタイタープレート中で１×１０^{5}個の自系で照射したＰＢＭＣを用いて播種した。４８時間の培養後、プレートをマザープレートおよびドータープレートに分割した。メチル－^{3}Ｈ－チミジン取り込みによってドータープレート中にて増殖を測定した。マザープレート中でＶＰ１／ＶＬＰ応答性培養物を同定し、１２日目までＩＬ－２を３～４日毎に添加した。Ｔ細胞クローン（ＴＣＣ）を、限界希釈条件下でのＶＰ１／ＶＬＰ応答性ウェル由来の細胞の０．３細胞／ウェルおよび１細胞／ウェルでの９６ウェルU底マイクロタイタープレート中への播種、および完全ＲＰＭＩ中への２×１０^{5}個の同種異系で照射したＰＢＭＣおよび１μｇ／ｍｌのＰＨＡ－Ｌの添加によって陽性培養物から確立した。２４時間後、２０Ｕ／ｍｌのヒト組換えＩＬ－２を添加した。次いで、ＶＰ１／ＶＬＰ特異性を、ＶＰ１／ＶＬＰタンパク質を用いて、または用いずに自系で照射したＰＢＭＣを用いた増殖中のコロニー由来の２．５×１０^{4}細胞の７２時間の播種で確認した。特定の培養物を、１μｇ／ｍｌ ＰＨＡ－Ｌ、２０Ｕ／ｍｌ ｈｒＩＬ－２、および同種異系で照射したＰＢＭＣを用いて２週間毎に再刺激し、ｈｒＩＬ２を３～４日毎に添加した。

【００７９】

ＴＣＲ分析

ＴＣＲ Ｖβ鎖発現を、ＣＤ４（ＡＰＣ，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）およびＣＤ８（ＰＢ，ＰＢ，ＤａｋｏＣｙｔｏｍａｔｉｏｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）と組み合わせた２２種の抗ＴＣＲＢＶモノクローナル抗体（Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈ，Ｍａｒｓｅｉｌｌｅ，Ｆｒａｎｃｅ，（Ｍｕｒａｒｏら、２０００））によってＰＨＡ増幅細胞およびＴ細胞クローン中で評価した。

【００８０】

ＣＮＳ由来単核球中の前駆体頻度の決定

ＶＰ１／ＶＬＰ特異的細胞の頻度を、限界希釈によって決定した。２０、２００、２，０００、または２０，０００個の脳由来ＰＨＡ増幅細胞を、ＶＰ１／ＶＬＰタンパク質を用いて、または用いずに、９６ウェルU底マイクロタイタープレート中に１×１０^{5}個の自系で照射したＰＢＭＣを用いて四連で播種した。７２時間後、メチル－^{3}Ｈ－チミジン取り込みによって増殖を測定した。頻度を、先に記載（Ｔａｓｗｅｌｌ，１９８１）のとおりに計算した。観察されたデータは以下であった：ｒ（各用量ｉの負に応答する培養物またはウェルの数）；ｎ（用量ｉあたりの総ウェル数）、およびλ（用量ｉ中の細胞数）

。計算したデータは以下であった：ｐｉ＝ｒｉ／ｎｉ、各用量ｉの負に応答する培養物の分数。頻度を、以下の式を使用して計算した：ｆ＝－（ｌｎ　ｐｉ）／λｉ。

【００８１】

サイトカイン産生

細胞内サイトカイン染色のために、ＰＨＡ増幅細胞およびＴＣＣを、最後の再刺激の１２日後に分析した。細胞を、ブレフェルジンＡ（１０μｇ／ｍｌ、ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）の存在下にてＰＭＡ（５０ｎｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）およびイオノマイシン（１μｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ）で５時間刺激した。次に、細胞をＬＩＶＥ／ＤＥＡＤ（登録商標）Ｆｉｘａｂｌｅ　Ｄｅａｄ　Ｃｅｌｌ　Ｓｔａｉｎ　Ｋｉｔ（ＡｍＣｙａｎ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ，Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で染色し、固定し、対応する緩衝液（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いて透過処理し、ＣＤ３（ＰＥ，ＤａｋｏＣｙｔｏｍａｔｉｏｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＣＤ８（ＰＢ，ＤａｋｏＣｙｔｏｍａｔｉｏｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＩＦＮγ（ＦＩＴＣ，ＢＤＰｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＩＬ－４（ＰＥ－Ｃｙ７，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、およびＩＬ－１７Ａ（Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標）－６４７，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）について室温で染色した。ＰＨＡ増幅細胞の培養上清中およびＴＣＣ中のＩＦＮ－γレベル、ＩＬ－４レベル、およびＩＬ－２レベルも、ＰＨＡまたはＶＰ１／ＶＬＰを用いた刺激の７２時間後に製造者のプロトコール（Ｂｉｏｓｏｕｒｃｅ，Ｃａｍａｒｉｌｌｏ，Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）に従ってＥＬＩＳＡによって決定した。

【００８２】

ＲＴ－ＰＣＲによるｍＲＮＡ発現レベルの定量

ｍＲＮＡ遺伝子発現アッセイについては、プライマーおよびプローブセット（Ｔｂｅｔ，Ｈｓ００２０３４３６＿ｍ１およびＧａｔａ３，Ｈｓ００２３１１２２＿ｍ１）を、Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ，ＣＡ）から購入した。１８Ｓ　ｒＲＮＡを内在性コントロールとして使用し、相対遺伝子発現を、標準物質として脳由来ＰＨＡ増幅細胞を使用したΔΔＣｔ法によって計算した。

【００８３】

ＶＰ１／ＶＬＰ特異的抗体についてのＥＬＩＳＡ

両ＩＲＩＳ－ＰＭＬ患者由来のＣＳＦおよび血清中のＶＰ１／ＶＰＬ特異的免疫グロブリンＧ抗体の力価を、先に記載（Ｗｅｂｅｒら、１９９７）のとおりに決定した。簡潔に述べれば、ＥＬＩＳＡプレートを１００ｍｌ　ＶＰ１－ＶＬＰ（１ｍｇ／ｍｌ）でコーティングし、ＣＳＦまたは血清の連続希釈物とともにインキュベーションした。ヒトＩｇＧをビオチンコンジュゲート抗ヒトＦｃ抗体（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）によって捕捉し、アビジンセイヨウワサビペルオキシダーゼ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）によって検出した。ＣＳＦおよび血清中の抗体力価を、特定の区画中の総ＩｇＧ量に合わせた。結果を、常に同一のヒト血清を標準として使用して標準化された任意の単位として示した。

【００８４】

ＨＬＡ－Ａ＊０２０１／ＪＣＶ　ＶＰ１$_{36}$およびＶＰ１$_{100}$四量体および四量体染色

ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１四量体複合体を、先に記載のとおりに合成した。簡潔に述べれば、ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１、β２ミクログロブリン（β２　ｍｉｃｒｏｇｌｕｂｌｕｉｎ）、およびエピトープペプチドを再折り畳みし、サイズ排除（ｓｉｚｅ　ｅｃｌｕｓｉｏｎ）クロマトグラフィーを使用して単離した。部位特異的ビオチン化を、ＨＬＡ－Ａ＊０２０１分子の最後のＣ末端細胞外ドメインへのＢｉｒＡ標的配列の付加によって行った。四量体複合体を、Ｅｘｔｒａｖｉｄｉｎ－ＰＥ（Ｓｉｇｍａ）を使用して生成した。ＰＨＡ増幅脳浸潤細胞を、抗ＣＤ２／ＣＤ３／ＣＤ２８　ＭＡＣｓビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ，Ａｕｂｕｒｎ，ＣＡ）を用いて刺激し、刺激後５日目に細胞を洗浄し、５×１０^{6}細胞／ｍｌの濃度で再懸濁した。１００μｌを、３μｌのＰＥカップリングした四量体ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１／ＪＣＶ　ＶＰ１$_{36}$またはＨＬＡ－Ａ＊０２：０１／ＪＣＶ　ＶＰ１$_{100}$を用いて染色した。３７℃で３０分間のインキュベーション後、細胞を洗浄し、抗ＣＤ３（ＰＢ，ｅＢｉｏｌｅｇｅｎｄ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）お

よび抗ＣＤ８（ＦＩＴＣ，Ｄａｋｏ）を用いて氷上でさらに３０分間染色した。次いで、細胞を洗浄し、０．５％パラホルムアルデヒドで固定後フローサイトメトリーによって分析した。

【００８５】

結果

２症例のナタリズマブ関連ＰＭＬ－ＩＲＩＳ

４１歳および４３歳の２人の男性の再発寛解型ＭＳ（ＲＲ－ＭＳ）患者は、それぞれ、２００９年７月および２０１０年１月に臨床徴候（患者１において視野欠損；患者２において単不全麻痺）およびそれぞれ２８ヶ月間および４０ヶ月間のナタリズマブ処置の後にＰＭＬが疑われる画像所見を示した。ナタリズマブを直ちに中止し、数ラウンドのプラスマフェレシスを行った。両患者は、その後にＭＲＩ上にコントラスト増強された斑状または帯様領域を有するＰＭＬ－ＩＲＩＳを発症し（図１ａ）、患者１においては完全な失明、患者２においては片麻痺、半盲、および神経心理学的悪化という臨床所見の悪化が認められた。診断のための精密検査に関して、少量であったがＣＳＦ　ＪＣＶウイルス量に基づいて患者１を直ちにＰＭＬと診断した。患者２の診断はより複雑であり、３回目の試験で閾値レベルを少し超えて陽性となるまで（１２コピー；ＮＩＨ参考検査室において閾値１０コピー）ＣＳＦ　ＪＣＶウイルス量についてのＰＣＲ結果は繰り返し陰性であった。低いかまたはボーダーラインのＪＣＶ　ＣＳＦウイルス量と対照的に、本研究中に確立された、血清およびＣＳＦ中のＪＣＶ主要キャプシドタンパク質（ＶＰ１／ＶＬＰ）特異的抗体についての抗体試験により、総ＩｇＧ濃度を同一レベルまで調整した後に血清と比較してＣＳＦにおけるＶＰ１／ＶＬＰ特異的抗体力価が９５～１８０倍高い強力な髄腔内抗体応答が明らかとなった。それ故、ウイルスＤＮＡについてのＰＣＲ試験と異なり、髄腔内抗体応答はＰＭＬ－ＩＲＩＳ時のＪＣＶによるＣＮＳ感染を疑う余地がなかった。患者２におけるＩｇＧサブクラスの分析は、髄腔内抗体が主にＩｇＧ１およびＩｇＧ３であることを証明した。これらのデータは、ＣＮＳ区画に限局され、且つ主に主要構造ＪＣＶタンパク質ＶＰ１／ＶＬＰに指向した強力なＪＣＶ特異的体液性免疫応答を示す。抗体応答の微量な構成要素が他のＪＣＶタンパク質をターゲティングするかどうかは研究の余地がある。

【００８６】

上記のＰＭＬ診断の困難に起因して、患者２は、ＰＭＬを確認するかまたはＰＭＬは誤りであると証明するために診断的脳生検を受けた。神経病理学的検査では、ＰＭＬの典型的な兆候（すなわち、高クロマチン乏突起膠細胞および異様な星状膠細胞中の核封入体）を示すことができなかったが、むしろ、ＣＮＳ細胞の欠乏、大量の血管周囲および実質のリンパ単核球浸潤、星状アストロサイトを伴う反応性神経膠症、ならびに泡沫状マクロファージの散在性および破壊性の実質浸潤の優勢を示した。大部分の細胞は、ＨＬＡ－ＤＲについて陽性に染色された。ＨＬＡ－ＤＲは通常は活性化ミクログリア上でもっぱら認められ、且つ正常な脳組織中に存在しない。Ｔ細胞およびＢ細胞は浸潤物中に存在し、高比率の後者が形質細胞マーカーＣＤ１３８について陽性染色された。生検組織の一部を処理し、ＣＮＳ由来単核球もフローサイトメトリーによって特徴付けた。９６．５％の細胞が汎造血（ｐａｎ　ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ）細胞マーカーＣＤ４５を発現し（示さず）、その内の４２．４％が汎Ｔ細胞マーカーＣＤ３$^{+}$を発現した。これらのうちの２４．１％がＣＤ８$^{+}$であり、７０．４％がＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞であった。これらの細胞のほとんど全てが記憶マーカーＣＤ４５ＲＯを発現した。２９％のＣＤ４５$^{+}$ＣＮＳ浸潤細胞がＢ細胞マーカーＣＤ１９を発現し、これらのうちの８６．１％がＣＤ２７／ＣＤ３８について陽性であった（すなわち、これらは記憶Ｂ細胞／形質細胞であった）。したがって、ＰＭＬよりもむしろ炎症性脱髄疾患と診断された。その後のＪＣＶについての免疫組織化学は陰性であったが、ＪＣＶ　ＤＮＡについてのまばらな核シグナルがｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションにおける２回目の試みによって見出され（データ示さず）、このことは、低ＪＣＶウイルス量および強力な髄腔内抗体応答と併せて、ＰＭＬの最初の疑いを確認し、根底にある脱髄疾患よりもむしろＩＲＩＳが神経病理学的所見の原因であると指摘

した。

【００８７】

脳浸潤Ｔ細胞の抗原特異性

次に、脳浸潤Ｔ細胞の抗原特異性および頻度を特徴付けた。脳由来単核球を、偏りのない刺激（ＰＨＡ）によってバルク集団として最初に増幅した。本発明者らの培養条件がＣＤ８$^+$　Ｔ細胞よりもＣＤ４$^+$　Ｔ細胞の増幅に好ましい一方で、Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ）可変鎖Ｖβ１－Ｖβ２２に対するモノクローナル抗体を用いた染色によって実証されるように、ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞の相対組成が安定なままであった。脳生検時に記憶ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞がＣＤ８$^+$　Ｔ細胞のほぼ３倍過剰であることに起因して、本発明者らはＣＤ４$^+$細胞に注意を向け、ＪＣＶに対するその特異性を評価した。この目的のために、増幅した脳Ｔ細胞を、増殖アッセイにおいて組換えＪＣＶキャプシドタンパク質ＶＰ１／ＶＬＰに対して、および破傷風毒素タンパク質（ＴＴｘ）に対して試験した。本発明者らは、脳由来Ｔ細胞を、ＣＳＦ由来または末梢血由来Ｔ細胞に対して、および非操作末梢血単核球に対して直接比較した。図１ａに示すように、脳由来Ｔ細胞は、ＶＰ１／ＶＬＰタンパク質に対して６００より大の刺激指数（ＳＩ）で応答したが、ＴＴｘに対しては応答がなかった。ＣＳＦにおけるＶＰ１／ＶＬＰおよびＴＴｘに対するＳＩは、それぞれ７および１４であり、ＰＨＡ増幅ＰＢＭＣにおいてはＶＰ１／ＶＬＰおよびＴＴｘに対する応答は、それぞれ陰性および中程度に陽性（ＳＩ６．５）であった。非操作ＰＢＭＣは、７日間の一次増殖アッセイにおいてＶＰ１／ＶＬＰと比較してＴＴｘに対して有意により強い応答を示した。

【００８８】

脳浸潤ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞の機能的表現型

次いで、本発明者らは、大脳内ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞が、そのサイトカイン分泌パターンに基づいて主要なＴヘルパー（Ｔｈ）サブタイプ（Ｔｈ１細胞、Ｔｈ２細胞、またはＴｈ１７細胞）のうちの１つに属するかどうかを検査した。脳、ＣＳＦ、およびＰＢＭＣ由来の増幅バルクＴ細胞集団ならびに非操作ＰＢＭＣを、ＩＦＮ－γ、ＩＬ－４、およびＩＬ－１７（Ｔｈ１細胞、Ｔｈ２細胞、およびＴｈ１７細胞のシグネチャーサイトカイン）に対する細胞内サイトカイン染色によって検査した。ＩＬ－１７産生細胞は検出困難であった一方で（図１ｂ）、ＩＦＮ－γ分泌細胞は脳およびＣＳＦ由来の細胞の４６．１％～５３．２％の間を構成した（図１ｂ）。ＩＦＮ－γおよびＩＬ－４についての細胞内染色を組み合わせた場合、状況は顕著に異なった。脳およびＣＳＦ由来の集団において、Ｔｈ１細胞、Ｔｈ２細胞、および二機能性Ｔｈ１－２細胞（ＩＬ－４およびＩＦＮ－γの両方を分泌する）は頻度が類似していた一方で（図１ｂ）、Ｔｈ２細胞は末梢血由来のＰＨＡ増幅細胞中で優勢であった（図１ｂ）。３２．７％の脳由来ＣＤ４$^+$　Ｔ細胞は、二機能性Ｔｈ１－２表現型を有していた。

【００８９】

脳浸潤Ｔ細胞の微細特異性および頻度

どの特異的ＪＣＶペプチドが脳浸潤Ｔ細胞によって認識されるのかを決定するために、全ＪＣＶタンパク質（Ａｇｎｏ、ＶＰ１、ＶＰ２、ＶＰ３、ラージＴ、およびスモールＴ）にまたがる２０４種の１５マーペプチドを合成し、一組の８２プールに配置した。ここで、各ペプチドが２回、しかし２つの異なるプール中に、出現する（方法を参照のこと）。脳由来Ｔ細胞は、複数のプールに応答した（図２ａ；プール１～４１）。本発明者らは、１５種の免疫原性候補ペプチドを同定し、次いで、これらを個々に試験し、１１種の刺激ペプチド（ＳＩ＞１０を有するペプチド）の同定につながった（図４ｂ）。

【化１】

応答は、ペプチド **4** ($Agno_{25}$, 数字は15マーペプチドの第1のアミノ酸(aa)を示す)、**20** ($VP1_{34}$)、**23** ($VP1_{54}$)、**27-29** ($VP1_{74}$)(全 $VP1_{74}$ ペプチド; 28 および 29 は、単一のaa変異を有するペプチド 27のバリアントである)、72 ($VP1_{310}$)、**73** ($VP1_{319}$)、**76** ($VP1_{335}$)、**191** ($LTAg_{668}$)、および 195 ($sTAg_{82}$) (SI > 25 を有するペプチドは太字) に対するものであった。

したがって、脳由来Ｔ細胞は、いくつかのＪＣＶタンパク質（Ａｇｎｏ、ＶＰ１、ＬＴＡｇ、ｓＴＡｇ）に応答したが、ＶＰ１に対してが、はるかに最も強かった（６ペプチド）。そのＶＰ１が極上の標的（ｐｒｉｍｅ　ｔａｒｇｅｔ）であることは、ＶＰ１／ＶＬＰタンパク質全体に対するさらにより強力な応答（図１ａ）およびＡｇｎｏ$_{25}$（１／１４９２）およびＬＴＡｇ$_{668}$（１／１４４９）に応答する細胞と比較した場合のＶＰ１特異的Ｔ細胞（ペプチドＶＰ１$_{34}$、ＶＰ１$_{319}$、およびＶＰ１$_{74}$に応答する１／２９４～１／７１４の間のＴ細胞）のより高い前駆体頻度（図２ｃ）によって支持される。本発明者らがＰＨＡ増幅ＣＳＦ由来および末梢血由来Ｔ細胞を検査した場合、ＣＳＦのみがプール３９に対して弱い応答を開始し、ペプチドＬＴＡｇ$_{668}$がこのプール中に含まれ、ＰＢＭＣが陰性であった。著しいことに、ペプチドＶＰ１$_{34}$（ＳＩ（図２ｂ）および前駆体頻度（図２ｃ）に関して最強の応答を惹起するペプチド）は、ＪＣＶエピトープＶＰ１$_{36}$（２つのエピトープのうちの１つ）をＨＬＡ－Ａ＊０２：０１との関連においてＨＬＡクラスＩ拘束性ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞によって認識されるＶＰ１$_{100}$と共に含む（Ｄｕ　Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００３ｂ）。ＰＭＬ－ＩＲＩＳ患者２はＨＬＡ－Ａ＊０２：０１$^{+}$（方法下でＨＬＡ－クラスＩおよびクラスＩＩ型）であり、このため、本発明者らは、四量体染色によってＰＨＡ増幅脳浸潤ＣＤ８＋　Ｔ細胞中のこれら２つのＨＬＡ－Ａ＊０２：０１　ＪＣＶエピトープに特異的なＣＤ８＋　Ｔ細胞の頻度を決定した。０．８％のＰＨＡ増幅脳浸潤ＣＤ８＋　ＴはＶＰ１$_{36}$に対して特異的であり、ＶＰ１$_{100}$に対しては０．６％であった（図４ｄ）。ＨＬＡ－クラスＩＩに関して、患者２はＭＳ関連ＨＬＡ－ＤＲハプロタイプＤＲＢ１＊１５：０１およびＤＲＢ５＊０１：０１を発現する。ＶＰ１／ＶＬＰタンパク質がＤＲＢ１＊１５：０１／Ｂ５＊０１：０１ホモ接合型ドナー由来のＡＰＣによって提示された場合、ＪＣＶ特異的ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞応答は、ＤＲＢ１＊１５：０１／Ｂ５＊０１：０１によって大きく拘束された（示さず）。これらのデータは、髄腔内抗体と類似して、ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞応答が主に主要な構造ＪＣＶタンパク質ＶＰ１に対して指向されること、およびペプチドＶＰ１$_{34}$がウイルス特異的ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞の両方のエピトープを含むことを実証している。かかるＣＤ４＋　Ｔ細胞およびＣＤ８＋　Ｔ細胞の同一の免疫優性エピトープへの集中は、インフルエンザ核タンパク質ペプチドについて以前に示されていた（Ｃａｒｒｅｎｏら、１９９２）。

【００９０】

表１は、本発明者らによって同定された免疫優性ＣＤ４＋　Ｔ細胞エピトープを示す。

【００９１】

ＰＭＬが乏突起膠細胞溶解およびミエリンの放出によって特徴付けられ、且つ患者がＭＳを罹患しているので、脳由来Ｔ細胞がミエリンタンパク質に応答するのかどうかを検査することを目的とした。ＰＨＡ増幅脳由来Ｔ細胞を、主要なミエリンタンパク質（ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）、プロテオリピドタンパク質（ＰＬＰ）、およびミエリン乏突起膠細胞糖タンパク質（ＭＯＧ））にまたがる重複ペプチドに対して試験したが、ＪＣＶ　ＶＰ１／ＶＬＰタンパク質に対する強力な応答にもかかわらず、いずれのミエリンペプチドも認識されなかった。

【００９２】

【表１－１】

表1：免疫優性JCVエピトープのリスト。各JCVペプチドのアミノ酸配列および長さを示す。それぞれのペプチドの位置は、基準JCVゲノムNC_001699のそれぞれのタンパク質に関連する。アミノ酸変異を有するペプチドを、バリアントと命名する（V1、V2など）。脳のみから単離されたT細胞クローンによって認識されるペプチドを、太字で示す。他のペプチドは、末梢T細胞クローンによって認識された。

ペプチド番号	名称（位置）	配列	長さ	配列番号
4	***Agno (25-39)***	***AQRILIFLLEFLLDF***	***15***	***1***
20	***VP1 (34-48)***	***VDSITEVECFLTPEM***	***15***	***2***
23	***VP1 (54-68)***	***HLRGFSKSISISDTF***	***15***	***3***
24	VP1 (64-78) V1	ISDTFESDSPNRDML	15	4
25	VP1 (64-78) V2	ISDTFESDSPNFDML	15	5
26	VP1 (64-78) V3	ISDTFESDSPNKDML	15	6
27	***VP1 (74-88) V1***	***NRDMLPCYSVARIPL***	***15***	***7***
28	***VP1 (74-88) V2***	***NFDMLPCYSVARIPL***	***15***	***8***
29	***VP1 (74-88) V3***	***NKDMLPCYSVARIPL***	***15***	***9***
30	VP1 (81-95)	YSVARIPLPNLNEDL	15	10
31	***VP1 (91-105)***	***LNEDLTCGNILMWEA***	***15***	***11***
32	VP1 (101-115)	LMWEAVTLKTEVIGV	15	12
33	VP1 (108-122) V1	LKTEVIGVTSLMNVH	15	13
34	VP1 (108-122) V2	LKTEVIGVTTLMNVH	15	14
35	VP1 (108-122) V3	LKTEVIGVTALMNVH	15	15
36	VP1 (118-129) V1	LMNVHSNGQATH	12	16
37	VP1 (118-129) V2	LMNVHSNGQAAH	12	17
38	VP1 (118-129) V3	LMNVHSNGQASH	12	18
39	VP1 (123-137) V1	SNGQATHDNGAGKPV	15	19
40	VP1 (123-137) V2	SNGQAAHDNGAGKPV	15	20
41	VP1 (123-137) V3	SNGQASHDNGAGKPV	15	21
42	VP1 (133-147)	AGKPVQGTSFHFFSV	15	22
43	***VP1 (143-157)***	***HFFSVGGEALELQGV***	***15***	***23***
44	VP1 (151-165) V1	ALELQGVLFNYRTKY	15	24
45	VP1 (151-165) V2	ALELQGVLFNYRTTY	15	25

【表１－２】

46	VP1 (161-175) V1	YRTKYPDGTIFPKNA	15	26
47	VP1 (161-175) V2	YRTTYPDGTIFPKNA	15	27
48	VP1 (161-175) V3	YRTTYPHGTIFPKNA	15	28
49	VP1 (171-186)	FPKNATVQSQVMNTEH	16	29
50	VP1 (182-196)	MNTEHKAYLDKNKAY	15	30
51	VP1 (193-208)	KNKAYPVECWVPDPTR	16	31
52	VP1 (203-217)	PDPTRNENTRYFGTL	15	32
53	VP1 (210-224)	NTRYFGTLTGGENVP	15	33
54	VP1 (220-234) V1	GENVPPVLHITNTAT	15	34
55	VP1 (220-234) V2	GENVPSVLHITNTAT	15	35
56	VP1 (220-234) V3	GENVPPVLHITKTAT	15	36
57	***VP1 (229-243) V1***	***ITNTATTVLLDEFGV***	***15***	***37***
58	***VP1 (229-243) V2***	***ITKTATTVLLDEFGV***	***15***	***38***
59	VP1 (239-253) V1	DEFGVGPLCKGDNLY	15	39
60	VP1 (239-253) V2	DEFGVRPLCKGDNLY	15	40
61	VP1 (249-263)	GDNLYLSAVDVCGMF	15	41
62	VP1 (259-273) V1	VCGMFTNRSGSQQWR	15	42
72	***VP1 (310-321)***	***RVDDGQPMYGMDAQV***	***15***	***43***
73	***VP1 (319-331)***	***MAQVEEVRVFEGTE***	***14***	***44***
76	***VP1 (335-349)***	***GDPDMMRYVDKYGQL***	***15***	***45***
78	VP2 (1-15)	MGAALALLGDLVATV	15	46
79	VP2 (11-24)	LVATVSEAAAATGF	14	47
80	VP2 (20-34)	AATGFSVAEIAAGEA	15	48
81	VP2 (30-43)	AAGEAAATIVEIA	14	49
82	VP2 (39-51)	EVEIASLATVEGI	13	50
83	VP2 (47-61)	TVEGITSTSEAIAAI	15	51
84	VP2 (57-71)	AIAAIGLTPETYAVI	15	52
85	VP2 (67-81)	TYAVITGAPGAVAGF	15	53
86	VP2 (77-88)	AVAGFAALVQTV	12	54
87	VP2 (84-97)	LVQTVTGGSAIAQL	14	55
153	LTAg (328-342)	FADSKNQKSICQQAV	15	56
154	LTAg (338-351)	CQQAVDTVAAKQRV	14	57
155	LTAg (347-361)	AKQRVDSIHMTREEM	15	58
156	LTAg (357-370)	TREEMLVERFNFLL	14	59
158	LTAg (376-390)	IFGAHGNAVLEQYMA	15	60
159	LTAg (386-399)	EQYMAGVAWIHCLL	14	61
161	LTAg (405-419)	VIYDFLKCIVLNIPK	15	62
162	LTAg (415-429)	LNIPKKRYWLFKGPI	15	63
168	LTAg (472-486)	VFEDVKGTGAESRDL	15	64
169	LTAg (482-495)	ESRDLPSGHGISNL	14	65
170	LTAg (491-506)	GISNLDCLRDYLDGSV	16	66
171	LTAg (500-514)	DYLDGSVKVNLERKH	15	67
172	LTAg (508-522)	VNLERKHQNKRTQVF	15	68
191	***LTAg (668-681)***	***CTFHICKGFQCFKK***	***14***	***69***
195	***StAg (82-96) V1***	***VGCDFPPNSDTLYCK***	***15***	***70***

【表１－３】

196	*StAg (82-96) V2*	*VSCDFPPNSDTLYCK*	*15*	*71*
200	StAg (123-137)	RKFLRSSPLVWIDCY	15	72
201	StAg (133-146)	WIDCYCFDCFRQWF	14	73
202	StAg (142-156)	FRQWFGCDLTQEALH	15	74
203	StAg (149-162)	DLTQEALHCWEKVL	14	75
204	StAg (158-172)	WEKVLGDTPYRDLKL	15	76
271	VP1 L55F (54-68)	HFRGFSKSISISDTF	15	77
272	VP1 S269Y (259-273)	VCGMFTNRSGYQQWR	15	78
273	VP1 K60N (54-68)	HLRGFSNSISISDTF	15	79
274	VP1 D66H (54-68)	HLRGFSKSISISHTF	15	80
275	VP1 D66H (64-78)	ISHTFESDSPNRDML	15	81
276	VP1 V223I (220-234)	GENIPPVLHITNTAT	15	82
277	VP1 N265D (259-273)	VCGMFTDRSGSQQWR	15	83
278	VP1 S267F (259-273)	VCGMFTNRFGSQQWR	15	84
279	VP1 Q271H (259-273)	VCGMFTNRSGSQHWR	15	85
280	VP1 S61L (54-68)	HLRGFSKLISISDTF	15	86
281	VP1 K60E (54-68)	HLRGFSESISISDTF	15	87
282	VP1 N265H (259-273)	VCGMFTHRSGSQQWR	15	88
283	VP1 N265T (259-273)	VCGMFTTRSGSQQWR	15	89
284	VP1 S267Y (259-273)	VCGMFTNRYGSQQWR	15	90
285	VP1 S267L (259-273)	VCGMFTNRLGSQQWR	15	91
286	VP1 S269C (259-273)	VCGMFTNRSGCQQWR	15	92

【００９３】

ＪＣＶ特異的ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞クローンの微細特異性および機能表現型

先のデータは、ＣＤ４＋が一定の転写因子の発現に基づいて一定のＴヘルパー表現型（Ｔｈ１細胞（ＩＦＮ－γ産生細胞）、ＩＬ－１７を分泌するＴｈ１７細胞、シグネチャーサイトカインＩＬ－４を発現するＴｈ２細胞、またはＴ調節細胞など）に分化することを示していた（Ｚｈｕら、２０１０）。Ｔｈ１細胞またはＴｈ２細胞への分化は相互排除的と考えられ、転写因子Ｔ－ｂｅｔ（Ｔｈ１）およびＧａｔａ－３（Ｔｈ２）によって制御される（Ｚｈｕら、２０１０）。これらのデータに基づいて、二機能性（Ｔｈ１－２）表現型を有する拘束された（ｃｏｍｍｉｔｔｅｄ）記憶細胞の本発明者らの知見は全く予想外であったので、本発明者らはクローンレベルでこの点を調べるためにＶＰ１／ＶＬＰ特異的Ｔ細胞クローンを確立した。ＶＰ１／ＶＬＰ特異的ＴＣＣを、材料および方法に記載のとおりに生成した。最初に、２１種のＶＰ１／ＶＬＰ特異的な単一細胞由来の培養物を限界希釈によって生成し、ＴＣＲＶβ発現、機能的表現型、および微細特異性について特徴付けた（表２）。この特徴付けにより、１１種の推定される異なるＴＣＣの同定が可能となった。各ＴＣＣに対応する単一細胞増殖培養物の数により、脳浸潤中の各ＴＣＣの頻度についての考えが得られる（図３ａ）。ＴＣＣ－４が最も豊富であり、単増殖ウェルから出現した５つコロニーによって示され、次いで３つの単一細胞増殖培養物を有するＴＣＣ－２、２つの単一細胞増殖培養物を有するＴＣＣ－１、ＴＣＣ－８、ＴＣＣ－９、およびＴＣＣ－１０、最後に１つのみの単一細胞増殖培養物を有するＴＣＣ－３、ＴＣＣ－５、ＴＣＣ－６、ＴＣＣ－７、およびＴＣＣ－１１が続いた。１１種のＴＣＣの微細特異性を図５ｂにまとめている。各ＴＣＣをＶＰ１タンパク質にまたがる６４種の１５マーペプチドに対して試験し、以下の刺激ペプチドの同定につながった：$VP1_{34}$（ＴＣＣ－１およびＴＣＣ－２によって認識される）、$VP1_{54}$（ＴＣＣ－３によって認識される）、$VP1_{74}$（全$VP1_{74}$ペプチド、ＴＣＣ－４によって認識される）、$VP1_{91}$（ＴＣＣ－５によって認識される）、$VP1_{143}$（ＴＣＣ－６によって認識される）、$VP1_{229}$（ＴＣＣ－７によって認識される）、$VP1_{319}$（ＴＣＣ－８およびＴＣＣ

－９によって認識される）、およびＶＰ１$_{335}$（ＴＣＣ－１０およびＴＣＣ－１１によって認識される）。特異的ペプチドを認識する異なるＴＣＣの数および脳浸潤中の各ＴＣＣの頻度の両方を考慮して、ＶＰ１特異的脳浸潤ＴＣＣによって認識される免疫優性ペプチドは、ＶＰ１$_{34}$、ＶＰ１$_{74}$、ＶＰ１$_{319}$、およびＶＰ１$_{335}$であり、脳由来バルク細胞集団を使用して得られた微細特異性が確認された（図３ｃ）。これらＴＣＣの細胞内サイトカイン染色により、Ｔｈ１－２およびＴｈ１表現型が明らかとなった（図４ａ）。脳由来ＶＰ１特異的単一細胞増殖培養物のうちの５７％を表す５種のＴＣＣはＴｈ１－２表現型を示し、脳由来ＶＰ１特異的単一細胞増殖培養物のうちの４３％を表す６種のＴＣＣはＴｈ１表現型を示した（図４ｂ）。特異性と機能的表現型とは相関しなかった。免疫優性ペプチドのうちの3つ（ＶＰ１$_{34}$、ＶＰ１$_{319}$、およびＶＰ１$_{335}$）について、本発明者らは両表現型を有するＴＣＣを見出した。Ｔｈ１－２およびＴｈ１　ＴＣＣのＴヘルパー表現型を、ＥＬＩＳＡによるＩＬ－４およびＩＦＮ－γのタンパク質分泌の測定によって、および転写因子Ｇａｔａ３およびＴ－ｂｅｔのｍＲＮＡ発現の決定によって、確認した。Ｔｈ１－２　ＴＣＣ（ｎ＝５）は、ＩＦＮ－γに加えてＩＬ－４を分泌した一方で、ＩＬ－４分泌はＴｈ１　ＴＣＣ（ｎ＝６）中で辛うじて検出可能であった（図６ｃ）。ＶＰ１／ＶＬＰタンパク質での特異的刺激後に、培養上清物由来の細胞内サイトカイン染色またはＥＬＩＳＡ測定によって同一の安定なパターンが認められたので、サイトカイン分泌プロフィールはＰＨＡでの刺激に起因しなかった。転写因子発現により、ＴＣＣの表現型が確認された。Ｔｈ１－２　ＴＣＣ（ｎ＝５）はＧａｔａ３およびＴ－ｂｅｔのｍＲＮＡを発現した一方で、Ｔｈ１　ＴＣＣ（ｎ＝６）はｔ－ｂｅｔのみを発現した（図６ｄ）。

【００９４】

考察

ＰＭＬのウイルス病因学はほぼ４０年前から示されてきたが、ＪＣＶ感染を制御する免疫機構については依然として知られていることが比較的少ない。ＣＤ８$^{+}$　ＪＣＶ特異的細胞傷害性Ｔ細胞はＰＭＬからの回復に関連しており（Ｄｕ　Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００４ａ；Ｋｏｒａｌｎｉｋら、２００２）、ＨＬＡ－Ａ*０２：０１陽性個体において2つのウイルスエピトープが同定されている（Ｄｕ　Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００４ａ；Ｄｕ　Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００４ｂ）。対照的に、ＰＭＬにおけるＪＣＶ特異的ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞の微細特異性および特徴に関して利用可能な情報は限られており、ＰＭＬ－ＩＲＩＳに関してはさらに少ない（Ｊｉｌｅｋら）。感染部位（すなわち、ＣＮＳ実質）でのウイルス特異的Ｔ細胞応答は、全く調べられていなかった。

【００９５】

本発明者らのデータは、この被験体についての新規の洞察を提供し、ナタリズマブ処置下でのＰＭＬ－ＩＲＩＳ中の以下の病理学的事象を提案することにつながる。抗ＶＬＡ－４抗体は、細胞遊走の遮断により免疫特権（ｉｍｍｕｎｏｐｒｉｖｉｌｅｇｅｄ）部位（脳など）でのＪＣＶ感染の免疫監視機構（Ｓｔｕｖｅら、２００６）およびＣＮＳ内での局所抗原提示（ｄｅｌ　Ｐｉｌａｒ　Ｍａｒｔｉｎら、２００８）を阻害する。結果として、病理学的向神経性ＪＣＶバリアントは少数（１／５００～１／１０００）の処置されたＭＳ患者においてＰＭＬにつながり得るが、その理由は依然として理解されていない（Ｍａｊｏｒ，２０１０；Ｒａｎｓｏｈｏｆｆ，２００５）。ＰＭＬが疑われ、ナタリズマブを停止するか、またはプラスマフェレシスによって積極的に除去されるとすぐに、完全に機能的な活性化Ｔ細胞がＣＮＳ区画への接近を回復し、ＰＭＬ－ＩＲＩＳに典型的な強い炎症が開始され、多数の機構（ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞ならびに抗体形成形質細胞が含まれる）によってウイルス感染細胞を有効に排除する。

【００９６】

【表２】

表2 VP1特異的脳浸潤T細胞クローン(TCC)の特徴付け

TCC番号	ウェル番号	Th表現型	TCRβ eta	微細特異性
TCC-1	17A	Th0	Vß2	$VP1_{34}$
	18A	Th0	Vß2	$VP1_{34}$
TCC-2	16A	Th1	Vß2	$VP1_{34}$
	28A	Th1	Vß2	$VP1_{34}$
	18B	Th1	Vß2	$VP1_{34}$
TCC-3	29A	Th1	Vb18	$VP1_{54}$
TCC-4	10A	Th0	Vß5.1	$VP1_{74-1}$, $VP1_{74-2}$, $VP1_{74-3}$
	14A	Th0	Vß5.1	$VP1_{74-1}$, $VP1_{74-2}$, $VP1_{74-3}$
	27A	Th0	Vß5.1	$VP1_{74-1}$, $VP1_{74-2}$, $VP1_{74-3}$
	30A	Th0	Vß5.1	$VP1_{74-1}$, $VP1_{74-2}$, $VP1_{74-3}$
	19B	Th0	Vß5.1	$VP1_{74-1}$, $VP1_{74-2}$, $VP1_{74-3}$
TCC-5	3A	Th1	Vß -	$VP1_{91}$
TCC-6	11B	Th1	Vß -	$VP1_{143}$
TCC-7	12B	Th0	Vß2	$VP1_{229}$
TCC-8	21A	Th0	Vß -	$VP1_{319}$
	25A	Th0	Vß -	$VP1_{319}$
TCC-9	36A	Th1	Vß -	$VP1_{319}$
	1B	Th1	Vß -	$VP1_{319}$
TCC-10	19A	Th0	Vß5.3	$VP1_{335}$
	3B	Th0	Vß5.3	$VP1_{335}$
TCC-11	24A	Th1	Vß -	$VP1_{335}$

【００９７】

ＣＮＳ浸潤Ｔ細胞およびＢ細胞のうち、Ｔｈ１表現型または上記の二機能性Ｔｈ１－２表現型のいずれかを有するＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞は、以下の所見に基づけば、おそらく最も重要な要素である。Ｔｈ１（ＩＦＮ－γ）およびＴｈ２（ＩＬ－４）サイトカインのその並行分泌により、おそらく、常在細胞（ウイルス感染星状膠細胞およびミクログリアなど）上のＨＬＡ－クラスＩＩ分子の発現が説明されるが、浸潤免疫細胞上の発現についても説明され、これはＩＦＮ－γがＨＬＡ－クラスＩＩの最強の誘発因子であるからである。材料不足によって星状細胞マーカー（ＧＦＡＰなど）を用いたＨＬＡ－ＤＲの共局在研究を実施できなかったにもかかわらず、ＨＬＡ－ＤＲの広範な発現は、これらも陽性であることを強く示唆している。移住Ｔ細胞の局所再活性化が証明されているＭＳおよびその動物モデル実験の自己免疫性脳炎（ＥＡＥ）と類似して、ＪＣＶ特異的Ｔｈ１－２およびＴｈ１細胞もおそらくＪＣＶ感染したＨＬＡ－クラスＩＩ陽性星状膠細胞、ミクログリア／マクロファージ、または動員樹状細胞（ＤＣ）上のＪＣＶペプチドの認識によって局所的に再活性化される。さらに、大量のＩＬ－４の分泌がＣＮＳ区画内の記憶Ｂ細胞／形質芽球の活性化および増幅につながり、その結果ウイルス特異的抗体が分泌される。局所産生されたＪＣＶキャプシドタンパク質（ＶＰ１）特異的ＩｇＧ抗体はウイルス感染乏突起膠細胞を認識することができ、次いで、ウイルス感染乏突起膠細胞は、補体媒介細胞傷害性または抗体媒介細胞傷害性によって溶解され得る。高親和性で補体に結合し、他のウイルス

感染に関連して記載されているＩｇＧ１抗体およびＩｇＧ３抗体のＣＳＦ内の相対的増加は、この概念を支持している。感染乏突起膠細胞がＨＬＡ－クラスＩＩを発現しないがＨＬＡ－クラスＩを有効に発現するので、ＪＣＶ特異的ＨＬＡ－Ａ２拘束ＣＤ８$^{+}$細胞溶解性Ｔ細胞（Ｋｏｒａｌｎｉｋら、２００１）（Ｋｏｒａｌｎｉｋら、２００２）もまたＪＣＶ感染した乏突起膠細胞および／または星状膠細胞の殺傷によって貢献すると予想することができる。ＰＭＬを有するＡＩＤＳ患者の末梢血中のこれらの以前に記載された細胞がおそらく脳内のＪＣＶの局所根絶にも関与することは、ペプチド負荷されたＨＬＡ－Ａ＊０２：０１四量体によって定義されるＪＣＶ　ＶＰ1_{36}およびＪＣＶ　ＶＰ$_{100}$に特異的な本発明者らのＣＤ８＋　Ｔ細胞の観察によって支持される。感染星状膠細胞はＣＤ４$^{+}$ウイルス特異的Ｔ細胞のための局所抗原提示細胞としての役割を果たし得るだけでなく、Ｔｈ１－２細胞溶解性細胞によって殺傷され得る（Ｈｅｍｍｅｒら、１９９７）が、これは星状膠細胞によるＤＲ発現の問題と併せてさらに研究する必要がある。

【００９８】

上記の病理発生シナリオはＩＦＮ－γおよびＩＬ－４の影響（すなわち、脳内のＨＬＡ－クラスＩＩ分子の広範な発現およびＪＣＶに対する強い髄腔内抗体応答）を説明するが、大部分の脳浸潤細胞がＴｈ１－２表現型を示すことが依然として不可解である。以前に、これらの細胞はＴｈ０細胞と呼ばれ、ナイーブ細胞がＴｈ１またはＴｈ２系譜のいずれかに拘束された記憶細胞になる前の中間分化工程と考えられた（Ｍｏｓｍａｎｎ　ａｎｄ　Ｃｏｆｆｍａｎ，１９８９）。しかし、この概念は、以下の単一クローンのサイトカインパターンに基づいて早い段階で既に主張されていた（Ｋｅｌｓｏ、１９９５）。今日、Ｔｈ１細胞およびＴｈ２細胞は、相互に排除される運命にあると理解されている（Ａｎｓｅｌら、２００６）。しかし、サイトカインを二重分泌する個々のＴＣＣは、麻疹ウイルス感染（Ｈｏｗｅら、２００５）において、およびＭＳの変化したペプチドリガンドベースの治療中の疾患憎悪自己反応性Ｔ細胞の間でＴｈ０細胞と記載されている（Ｂｉｅｌｅｋｏｖａら、２０００）。細胞内サイトカイン染色、サイトカイン分泌、および転写因子発現に基づいた安定なＴｈ１－２クローンの本発明者らの本観察は、中間または一過性の分化段階よりもむしろＣＮＳ内の定義されたＴヘルパー細胞亜集団を示す。Ｔｈ０細胞の上記の不明確な役割および最終分化細胞としてのその存在についての前の論議に起因して、本発明者らは、ここに、ＩＦＮ－γ／ＩＬ－４　Ｔヘルパー細胞を二機能性Ｔｈ１－２細胞ということを提案する。このＴｈ１－２分化につながる状況およびシグナルはさらに調べる必要がある。最近発表されたウイルス感染モデルに関する研究では、著者らは、抗原特異的ＴＣＲシグナル、Ｉ型およびＩＩ型インターフェロン、ならびにＩＬ－１２の共同作用によって非防御的Ｔｈ２細胞を、ＩＦＮ－γ／ＩＬ－４を安定に発現しかつ防御的なＣＤ４＋細胞へと変換することができることを実証した（Ｈｅｇａｚｙら、２０１０）（Ｚｈｕ　ａｎｄ　Ｐａｕｌ，２０１０）。本発明者らの知見は、ヒトにおけるｉｎ　ｖｉｖｏでの安定なＧＡＴＡ－３＋Ｔ－ｂｅｔ＋およびＩＬ－４＋ＩＦＮ－γ＋Ｔｈ２＋１表現型の存在の最初の証拠である。これらの細胞が脳内で再プログラミングされたと考えられ得、またこれらの細胞は、ＰＭＬ－ＩＲＩＳの異常に強い免疫応答および劇症過程を十分に説明することができる。

【００９９】

脳浸潤Ｔ細胞の微細特異性に関して、本発明者らのデータはいくつかの局面で興味深い。ほとんど全てのＪＣＶタンパク質由来のペプチドが認識されるので、ＪＣＶ特異的Ｔ細胞応答は全体的に見て広範であり、このことは、健康なドナーおよびＭＳ患者における末梢血由来ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞についてのＪＣＶの免疫優性エピトープをマッピングする本発明者らの試みと一致する。しかし、脳由来ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞によって認識されるペプチドのうちの５０％より多くが主要構造タンパク質ＶＰ１の一部である。さらに、ＶＰ１特異的Ｔ細胞は、増殖強度および前駆体頻度に関して優位を占める。ＶＰ$1_{34\sim48}$が細胞傷害性ＨＬＡ－Ａ＊０２：０１拘束ＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞の主要エピトープ（Ｄｕ　Ｐａｓｑｕｉｅｒら、２００３ｂ）、（本発明者らは、四量体染色によってそれをＰＭＬ－ＩＲＩＳ患者の脳内にも見出した）だけでなく、ＨＬＡ－ＤＲＢ１＊１５：０１／ＤＲＢ５＊０

１：０１拘束ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞の主要エピトープも含むことが興味深い。さらに、ペプチドＶＰ１$_{74}$および１アミノ酸置換を有するその２つのバリアントの認識は、このエピトープの認識が持続ＪＣＶ感染中の免疫回避からの宿主の防御に関連し得ることを示す。これは、ヒト免疫不全ウイルス感染（Ｂｏｒｒｏｗら、１９９７）およびリンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス感染について前に示されている（Ｃｉｕｒｅａら、２００１）。ＶＰ１に対する活発な髄腔内抗体応答は、この構造タンパク質の役割をさらに強調している。したがって、本発明者らの所見は、ＶＰ１がＪＣＶ感染脳細胞に対する防御免疫応答に重要であり、これらが抗体、ＣＤ４$^{+}$、およびＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞によって媒介されることを示す。この応答の強度は、おそらく、ＣＤ４$^{+}$　Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$　Ｔ細胞に同一のＶＰ１エピトープを提示する主要ＭＳリスク対立遺伝子ＤＲＢ１*１５：０１／ＤＲＢ５*０１：０１およびＡ*０２：０１の両方を発現する患者２のＨＬＡ型によって一部決定される。したがって、その患者は、その免疫病理学的結果は、過度のＰＭＬ－ＩＲＩＳ、脳腫脹、および神経学的悪化を伴って、脳内に特に著しいＴ細胞媒介性免疫応答を経験したかもしれない。他者によってすでに指摘されているように（Ｃｉｎｑｕｅら、２００３）、ＪＣＶ特異的免疫応答は、諸刃の剣である。機能的免疫応答がなければ、ウイルス感染と戦えないことによって脳細胞が溶解される。他方では、制御を解いた場合に、ＰＭＬ－ＩＲＩＳ中の活発なＪＣＶ特異的応答によって脳の炎症および浮腫が引き起こされる一方で、ＣＮＳからＪＣＶを有効に排除し、免疫抑制によって少なくとも一過性に弱められない場合、この応答によって患者は死亡し得る（Ｔａｎら、２００９ｂ）。

【０１００】

ＰＭＬ－ＩＲＩＳ中の脳内における細胞性および体液性のＪＣＶ特異的免疫応答は、処置を複雑にするだけでなく、最初の場所のＰＭＬ診断も不明瞭にし得る。ＣＳＦ内のＪＣＶウイルス量ならびに（生検を行う場合）ＪＣＶ抗原およびＤＮＡのそれぞれについての免疫組織化学およびｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションに依存する現在の慣行と異なり、ＶＰ１に対する髄腔内抗体応答はより頑強なようであり、試験を行うべきである。この研究における両ＰＭＬ－ＩＲＩＳ患者では、ＪＣＶのＤＮＡはＰＣＲおよびｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションによってほとんど検出不可能であるにもかかわらず、髄腔内ＶＰ１特異的抗体力価は非常に高かった。ＪＣＶ抗体試験の重要な役割は、ＰＭＬを有するＡＩＤＳ患者における抗体力価が高いという先の観察によって（Ｗｅｂｅｒら、１９９７）、ナタリズマブ処置ＭＳ患者における最近のデータ（Ｇｏｒｅｌｉｋら、２０１０）によっても支持される。

【０１０１】

本研究の別の重要且つ予想外の所見は、ＪＣＶ特異的抗体応答と異なり、病原的に関連するＴ細胞がＣＮＳ実質自体に限局し、ＣＳＦがＴ細胞の特異性および機能の調査にほとんど有用でないことである。明白な理由（すなわち、ＣＮＳ組織が研究者に利用可能であることは稀であるため）から、ほとんどの研究がＣＮＳ内の応答の代用としてＣＳＦに注目している場合、この所見はおそらくＰＭＬ－ＩＲＩＳだけでなくＭＳにも強く関連している。したがって、将来の研究では、生検組織または剖検組織を獲得することができる場合、これらを試験するためのあらゆる可能な努力をすべきである。このＰＭＬ－ＩＲＩＳを有するこのＭＳ患者の脳浸潤ＣＤ４＋　Ｔ細胞を研究する場合、本発明者らは、３つの主要なミエリンタンパク質由来のペプチドがいずれも認識されないことを確かめてさらに驚愕し、大きな脳の炎症中にミエリン特異的Ｔ細胞のバイスタンダー細胞の活性化も動員も起こらないが、これらの細胞が病因に非常に特異的であることを示唆した。

【０１０２】

実施例２－ＪＣＶに対する免疫

個人治癒の試みを、６４歳でＰＭＬを発症した特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症（稀な構成性免疫不全）を有する患者（図１１で「患者ハンブルグ」と呼ばれる）において行った。全生涯を通じて、この男性患者は健康であった（すなわち、異常も頻繁な感染も経験していなかった）が、２０１０年２月に起源不明の脳炎の兆候によって入院していた。この男性患者は徹底的に精密検査を受けており、ＥＢＶ関連脳炎の疑いありとの診断を受けて

いた。抗ウイルス治療中の一過性の改善後、この男性患者はゆっくりとではあるがさらに悪化した。２０１０年中に２回の脳生検を行い、２０１０年末の２回目の生検の際に、ＣＳＦ中の陽性ＪＣＶウイルス量ならびに脳内にＪＣＶ感染された乏突起膠細胞および星状膠細胞が証明されたことに基づいて進行性多巣性白質脳症（ＰＭＬ）の診断を受けた。並行して、本発明者らは低ＣＤ４＋　Ｔ細胞数（約３００／マイクロリットル）および０．５以下のＣＤ４＋／ＣＤ８＋比を見出し、これらは共に特発性ＣＤ４＋リンパ球減少症の診断と一致する。さらに、研究所でのｉｎ　ｖｉｔｒｏ実験により、末梢血単核球中でＪＣＶウイルスＶＰ１に対するＴ細胞応答が存在しないことおよびナイーブＣＤ４＋　Ｔ細胞がほとんど完全に存在しないことが報告された。これらの観察後、本発明者らは、患者が、おそらく、５０歳よりも高齢で開始および増加する完全に生理学的な免疫衰退によってさらに強調された既存のおそらく遺伝的に決定された低ＣＤ４＋数に基づいてＰＭＬを発症したと理由付けた。

【０１０３】

本発明者らは、ＶＰ１を用いたワクチン接種、ＣＤ４＋リンパ球減少症のこの症例において好ましくは組換えＩＬ－７と組み合わせたＶＰ１を用いたワクチン接種によって、患者が有していたにちがいない（なぜなら、この患者はＪＣＶ陽性であるため）ＪＣＶ特異的Ｔ細胞の数を増加させるかどうかを試験することを望んだ。さらに、この増加が起こるならば、本発明者らは、ワクチンで誘導されるか追加免疫されたＪＣＶ　ＶＰ１特異的Ｔ細胞応答によってこれらの細胞がＣＮＳへ移行し、ウイルスおよびウイルス感染細胞がＣＮＳ区画から排除されるのではないかと期待した。したがって、本発明者らは、「個人治癒の試み」を申請し、この選択肢およびその潜在的なリスクをこの患者と話し合い、この患者から同意を得た。ＩＬ－７（Ｃｙｔｈｅｒｉｓ）の使用は、ＣＤ４＋リンパ球減少症の別の症例における最近の刊行物によってさらに支持された（Ｐａｔｅｌら、２０１０）。ここで、抗ウイルス薬を併用した組換えＩＬ－７によって患者は実質的に改善したが、この患者において免疫学的研究は行われておらず、したがって、抗原特異的免疫応答の改善についてはわからなかった。

【０１０４】

上記患者におけるワクチン接種アプローチには、以下の工程が含まれていた（ワクチン接種および試験のタイミングについては以下のスキームを参照のこと）：皮膚適用されるＴＬＲ７アゴニスト（イミキモド（ｉｍｉｑｉｍｏｄ）、アルダラ；市販）およびｉ．ｖ．組換えＩＬ－７（Ｃｙｔｈｅｒｉｓ）と組み合わせた組換え主要キャプシドタンパク質ＶＰ１全体（Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｉｎｋｕｂａｔｏｒ，Ｂｏｎｎから提供）での皮下注射。ＶＰ１タンパク質を、ウイルス様粒子（ＶＬＰ）の形態で、本明細書中で使用した条件下でかかる粒子に会合した組換え発現ＶＰ１タンパク質として投与した。以下に示すように、この患者は、２回のみのワクチン接種後にＪＣＶ　ＶＰ１に対するｉｎ　ｖｉｔｒｏ増殖応答を示しただけでなく、ＪＣＶウイルス量も０に減少し、最終的に、脳ＭＲＩ画像化によってＰＭＬ病変周囲のわずかなコントラスト増強が示され始めた。これらは全てワクチン接種がｉｎ　ｖｉｖｏで作用したことを支持する。この患者はまた、ＪＣＶ特異的免疫応答の発生後にわずかに遅れて臨床上の改善を示した。さらに、実施例１に記載のＰＭＬ－ＩＲＩＳ患者における脳浸潤Ｔ細胞からの発明者らのデータが、Ｔヘルパー１－２表現型を有するＪＣＶ特異的ＣＤ４＋　Ｔ細胞がおそらく脳からのＪＣＶウイルスの排除に極めて重要であることを示唆していたので、本発明者らはこの患者の脳脊髄液中のＴｈ１－２　ＣＤ４＋　Ｔ細胞も染色し、これらの細胞が実際に存在することを証明することができた。

【０１０５】

別の個人治癒の試みを、化学療法を受け、化学療法の副作用として急性骨髄性白血病（ＡＭＬ）を発症した乳癌患者で行った。次いで、この患者にＡＭＬの処置として自系および同種異系の造血幹細胞移植を受けさせ、その後に急性移植片対宿主病（グレードＩＶ）を発症した。これらの処置の結果として獲得した免疫不全によってＰＭＬがもたらされた。この症例を、図１１中で「患者チューリッヒ」という。両患者を、組換えＩＬ－７（ｓ

．ｃ．）によって処置した。２日後、第１の用量のＶＰ１（ｓ．ｃ．１ｍｇ、皮膚へのイミキモドクリーム）を投与した。第１の用量のＶＰ１の２日後、第２の用量のｒＩＬ－７を与えた。第１のＩＬ－７用量後の１２日目に、この患者にＶＰ１（ｓ．ｃ．）とイミキモドを用いた第２のワクチン接種を行い、この場合、同時にｒＩＬ－７を投与した。６週目に、第３の用量のＶＰ１／イミキモドおよび第４の用量のｒＩＬ－７を投与した。図１１は、両患者から得た末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を用いてグラフ中に示した時点で行った下記の増殖アッセイからの結果を示す。２より大の刺激指数を陽性応答とみなす。両患者がワクチン接種後のＪＣＶに対する陽性免疫応答を示したことが理解され得る。

【０１０６】

材料および方法

血液およびＣＳＦサンプル

生物サンプルを、書面によるインフォームドコンセント後に得た。末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を、フィコール（ＰＡＡ，Ｐａｓｃｈｉｎｇ，Ａｕｓｔｒｉａ）密度遠心分離によってＥＤＴＡ－血液から分離した。

【０１０７】

脳脊髄液（ＣＳＦ）由来単核球を、２０００細胞／ウェルおよび2×10^5照射（４５Ｇｙ）同種フィーダー細胞の播種によって増幅した。１μｇ／ｍｌ　ＰＨＡ－Ｌ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｍｕｎｉｃｈ，Ｇｅｒｍａｎｙ）および５００ＩＵ／ｍｌ　ＩＬ－２（Ｆｅｄｅｒｉｃａ　Ｓａｌｌｕｓｔｏ，Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｆｏｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　ｉｎ　Ｂｉｏｍｅｄｉｃｉｎｅ，Ｂｅｌｌｉｎｚｏｎａ，ＣＨの好意による提供）を添加した。ＩＬ－２の添加を、１４日目まで３～４日毎に繰り返した。

【０１０８】

増殖アッセイ

ＶＰ１（Ｖｉｋｔｏｒｙａ　Ｄｅｍｉｎａ，Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｉｎｋｕｂａｔｏｒ，Ｂｏｎｎ，Ｇｅｒｍａｎｙの好意による提供）および破傷風トキソイド（ＴＴｘ，Ｎｏｖａｒｔｉｓ，Ｍａｒｂｕｒｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）に対するＰＢＭＣの増殖応答を、９６ウェルU底マイクロタイタープレート中への2×10^5細胞の播種によって試験した。ＶＰ１を２μｇ／ｍｌで使用し、ＴＴｘを５μｇ／ｍｌで使用した。７日間のインキュベーション後、^{3}Ｈ－チミジン（Ｈａｒｔｍａｎｎ　Ａｎａｌｙｔｉｃ，Ｂｒａｕｎｓｃｈｗｅｉｇ，Ｇｅｒｍａｎｙ）の取り込みを測定した。刺激指数（ＳＩ）を、抗原ありのウェルの平均ＣＰＭ（カウント／分）を抗原なしのウェルの平均ＣＰＭで除することによって計算した。

【０１０９】

フローサイトメトリーによるＶＰ１およびＴＴｘに対する増殖応答を測定するために、ＣｅｌｌＴｒａｃｅ（商標）ＣＦＳＥ細胞増殖キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｄａｒｍｓｔａｄｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を使用した。したがって、細胞を上記のとおりに播種し、６日後に抗原で再刺激し、製造者の説明書にしたがってＣＦＳＥで処理した。５日後、細胞をフローサイトメトリーによって分析した。

【０１１０】

フローサイトメトリー分析

全血染色を、体積５０μｌ～１００μｌの血液中に適切な抗体カクテルを添加することによって行った。混合物を室温で３０分間インキュベーションし、その後にＦＡＣＳ溶解溶液（ＢＤ　ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ）を用いて赤血球を１０分間溶解した。洗浄後、細胞を、ＬＳＲ　ＩＩ（ＢＤ）におけるフローサイトメトリーによって分析した。以下の抗体を使用した：ＣＤ４（ＡＰＣ，ＲＰＡ－Ｔ４，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＤ８（ＰＢ，ＤＫ２５，Ｄａｋｏ，Ｇｌｏｓｔｒｕｐ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＣＤ４５ＲＯ（ＦＩＴＣ，ＵＣＨＬ１，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＤ２５（ＰＥ－Ｃｙ７，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）、ＣＤ３（ＰＥ，ＤａｋｏＣｙｔｏｍａｔｉｏｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＣＤ８（ＰＢ，ＤａｋｏＣｙｔｏｍａｔｉｏｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＩＦＮ－γ（ＦＩＴＣ，ＢＤ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）、ＩＬ－４（ＰＥ－Ｃｙ７，ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）。

【０１１１】
参考文献
【表３－１】

Anonymous. http://tysabri.de/index.php?inhalt=tysabri.pmlinzidenz 2011.

Astrom KE, Mancall EL, Richardson EP, Jr. Progressive multifocal leuko-encephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. Brain 1958; 81: 93-111.

Carreno BM, Turner RV, Biddison WE, Coligan JE. Overlapping epitopes that are recognized by CD8+ HLA class I-restricted and CD4+ class II-restricted cytotoxic T lymphocytes are contained within an influenza nucleoprotein peptide. J Immunol 1992; 148: 894-9.

Cavacini LA, Kuhrt D, Duval M, Mayer K, Posner MR. Binding and neutralization activity of human IgG1 and IgG3 from serum of HIV-infected individuals. AIDS Res Hum Retroviruses 2003; 19: 785-92.

Cinque P, Bossolasco S, Brambilla AM, Boschini A, Mussini C, Pierotti C, et al. The effect of highly active antiretroviral therapy-induced immune reconstitution on development and outcome of progressive multifocal leukoencephalopathy: study of 43 cases with review of the literature. J Neurovirol 2003; 9 Suppl 1: 73-80.

Du Pasquier RA, Clark KW, Smith PS, Joseph JT, Mazullo JM, De Girolami U, et al. JCV-specific cellular immune response correlates with a favorable clinical outcome in HIV-infected individuals with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Neurovirol 2001; 7: 318-22.

Du Pasquier RA, Corey S, Margolin DH, Williams K, Pfister LA, De Girolami U, et al. Productive infection of cerebellar granule cell neurons by JC virus in an HIV+ individual. Neurology 2003a; 61: 775-82.

Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Zheng Y, Martin K, Peyerl FW, et al. Low frequency of cytotoxic T lymphocytes against the novel HLA-A*0201-restricted JC virus epitope VP1(p36) in patients with proven or possible progressive multifocal leukoencephalopathy. J Virol 2003b; 77: 11918-26.

Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Zheng Y, Jean-Jacques J, Letvin NL, Koralnik IJ. A prospective study demonstrates an association between JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes and the early control of progressive multifocal leukoencephalopathy. Brain 2004a; 127: 1970-8.

Du Pasquier RA, Schmitz JE, Jean-Jacques J, Zheng Y, Gordon J, Khalili K, et al. Detection of JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in healthy individuals. J Virol 2004b; 78: 10206-10.

Du Pasquier RA, Stein MC, Lima MA, Dang X, Jean-Jacques J, Zheng Y, et al. JC virus induces a vigorous CD8+ cytotoxic T cell response in multiple sclerosis patients. J Neuroimmunol 2006; 176: 181-6.

Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, et al. Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. J Infect Dis 2009; 199: 837-46.

【表３－２】

Gillespie SM, Chang Y, Lemp G, Arthur R, Buchbinder S, Steimle A, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981-1989. Ann Neurol 1991; 30: 597-604.

Goldmann C, Petry H, Frye S, Ast O, Ebitsch S, Jentsch KD, et al. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. J Virol 1999; 73: 4465-9.

Hegazy AN, Peine M, Helmstetter C, Panse I, Frohlich A, Bergthaler A, et al. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. Immunity 2010; 32: 116-28.

Houff SA, Major EO, Katz DA, Kufta CV, Sever JL, Pittaluga S, et al. Involvement of JC virus-infected mononuclear cells from the bone marrow and spleen in the pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. N Engl J Med 1988; 318: 301-5.

Jilek S, Jaquiery E, Hirsch HH, Lysandropoulos A, Canales M, Guignard L, et al. Immune responses to JC virus in patients with multiple sclerosis treated with natalizumab: a cross-sectional and longitudinal study. Lancet Neurol 2010; 9: 264-72.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. N Engl J Med 2005; 353: 369-74.

Koralnik IJ. Progressive multifocal leukoencephalopathy revisited: Has the disease outgrown its name? Ann Neurol 2006; 60: 162-73.

Koralnik IJ, Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Dang X, Zheng Y, et al. Association of prolonged survival in HLA-A2+ progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope. J Immunol 2002; 168: 499-504.

Koralnik IJ, Du Pasquier RA, Letvin NL. JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in individuals with progressive multifocal leukoencephalopathy. J Virol 2001; 75: 3483-7.

Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, Bollen AW, Pelletier D. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. N Engl J Med 2005; 353: 375-81.

Major EO. Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. Annu Rev Med 2010; 61: 35-47.

Ogg GS, Jin X, Bonhoeffer S, Dunbar PR, Nowak MA, Monard S, et al. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. Science 1998; 279: 2103-6.

Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH. Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy. Lancet 1971; 1: 1257-60.

Patel A, Patel J, Ikwuagwu J. A case of progressive multifocal leukoencephalopathy and idiopathic CD4+ lymphocytopenia. J. Antimicrob. Chemother. 2010; 65:2489.

Ransohoff RM. Natalizumab and PML. Nat Neurosci 2005; 8: 1275.

Stoner GL, Ryschkewitsch CF, Walker DL, Webster HD. JC papovavirus large tumor (T)-antigen expression in brain tissue of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and non-AIDS patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. Proc Natl Acad Sci U S A 1986; 83: 2271-5.

Stuve O, Marra CM, Jerome KR, Cook L, Cravens PD, Cepok S, et al. Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. Ann Neurol 2006; 59: 743-7.

【表３－３】

Tan CS, Dezube BJ, Bhargava P, Autissier P, Wuthrich C, Miller J, et al. Detection of JC virus DNA and proteins in the bone marrow of HIV-positive and HIV-negative patients: implications for viral latency and neurotropic transformation. J Infect Dis 2009a; 199: 881-8.

Tan K, Roda R, Ostrow L, McArthur J, Nath A. PML-IRIS in patients with HIV infection: clinical manifestations and treatment with steroids. Neurology 2009b; 72: 1458-64.

Weber T, Trebst C, Frye S, Cinque P, Vago L, Sindic CJ, et al. Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. J Infect Dis 1997; 176: 250-4.

Zhu J, Paul WE. CD4+ T cell plasticity-Th2 cells join the crowd. Immunity 2010; 32: 11-3.

Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). Annu Rev Immunol 2010; 28: 445-89.

Zonios DI, Falloon J, Bennett JE, Shaw PA, Chaitt D, Baseler MW, et al. Idiopathic CD4+ lymphocytopenia: natural history and prognostic factors. Blood 2008; 112: 287-94.

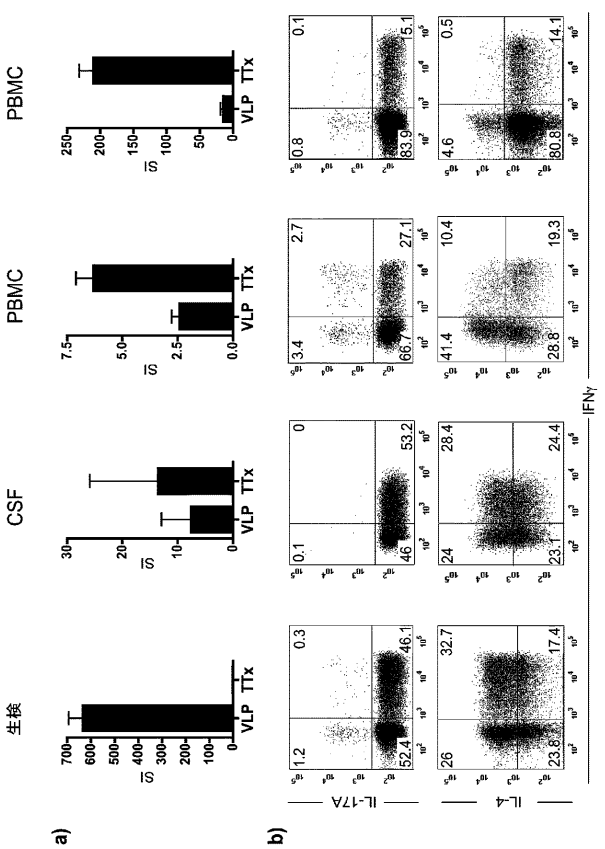
Zurhein G, Chou SM. Particles Resembling Papova Viruses in Human Cerebral Demyelinating Disease. Science 1965; 148: 1477-9.

DE 195 43 553

Goldmann et al., 1999, Journal of Virology 73, p. 4465-4469

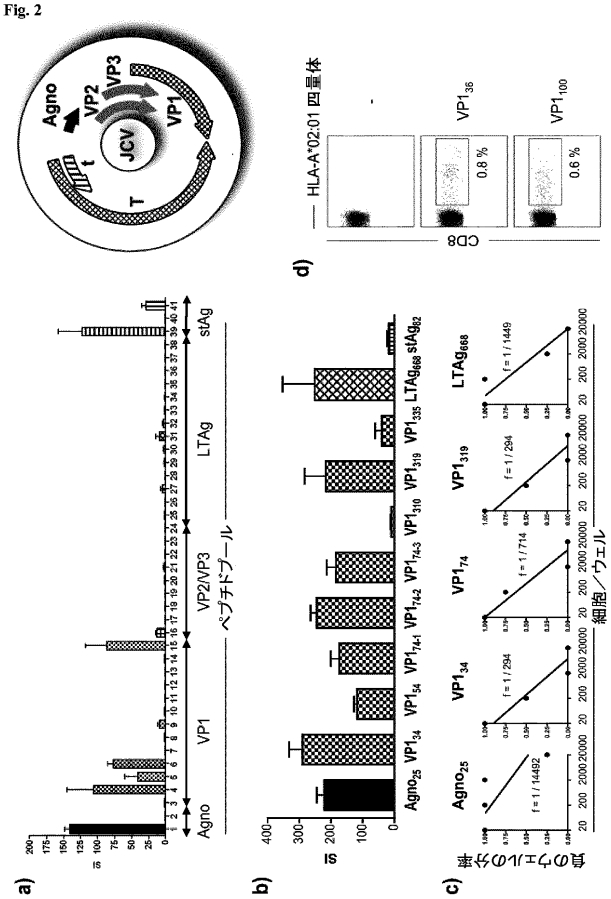
【図１】

Fig. 1



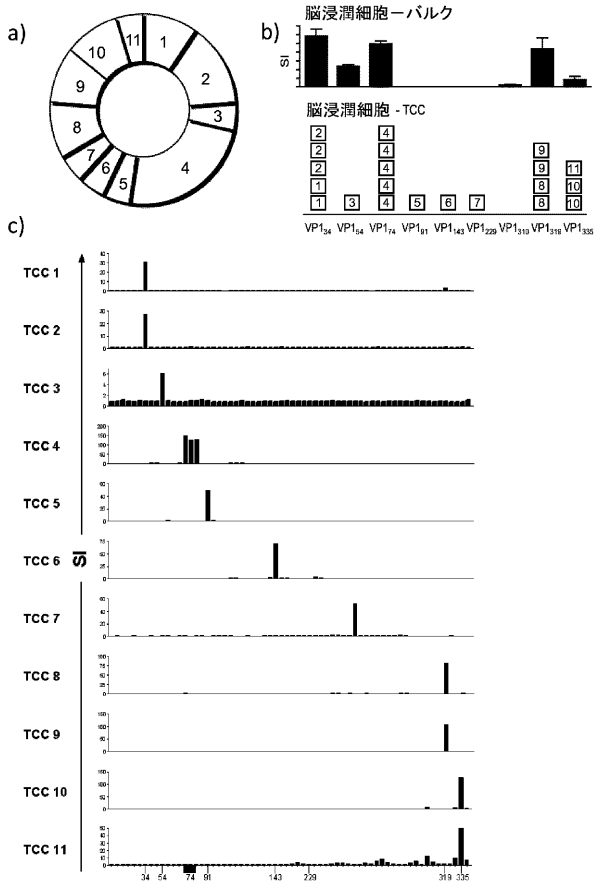
【図２】

Fig. 2



【図３】

Fig. 3



【図４】

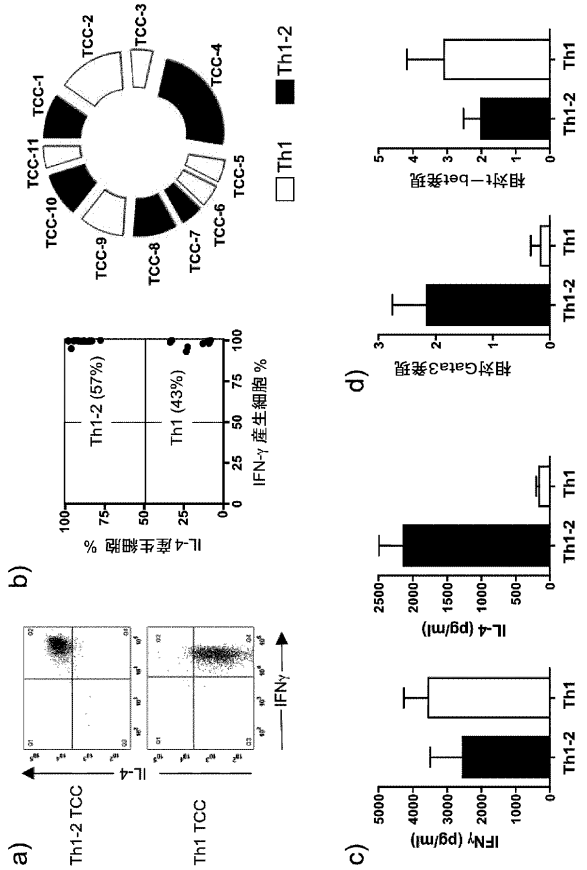
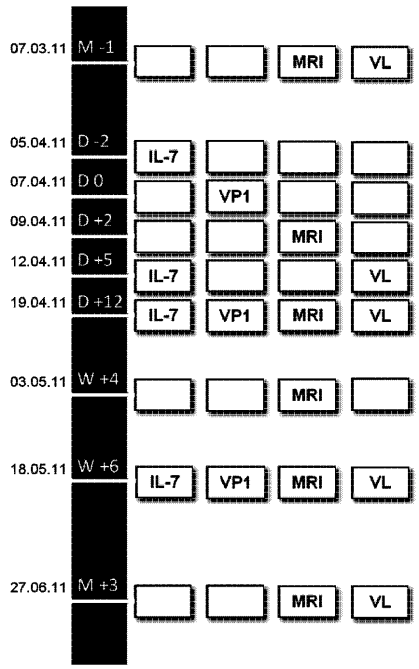


Fig. 4

【図５】

Fig. 5



【図６】

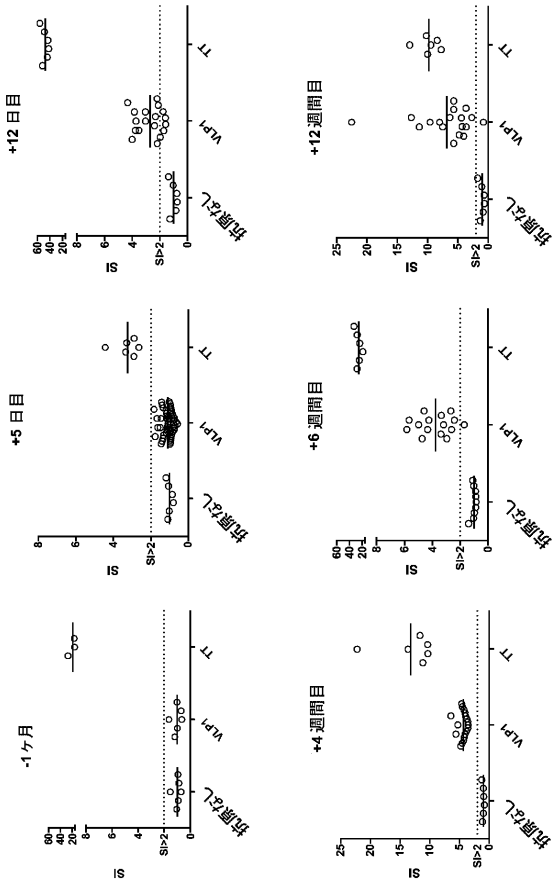
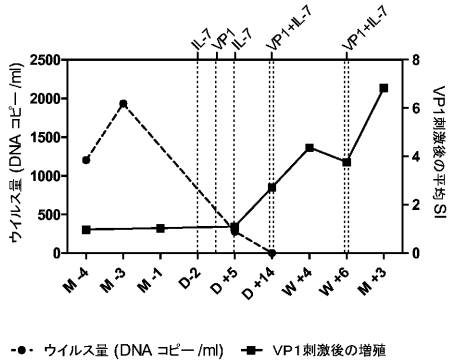
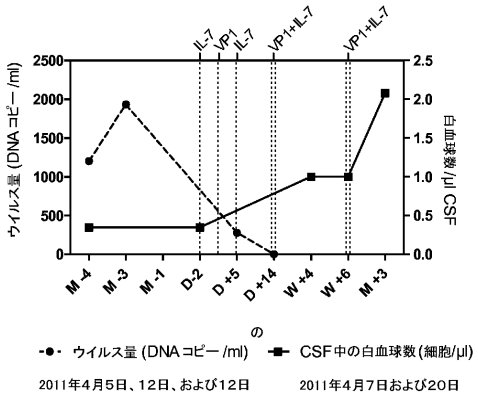


Fig. 6

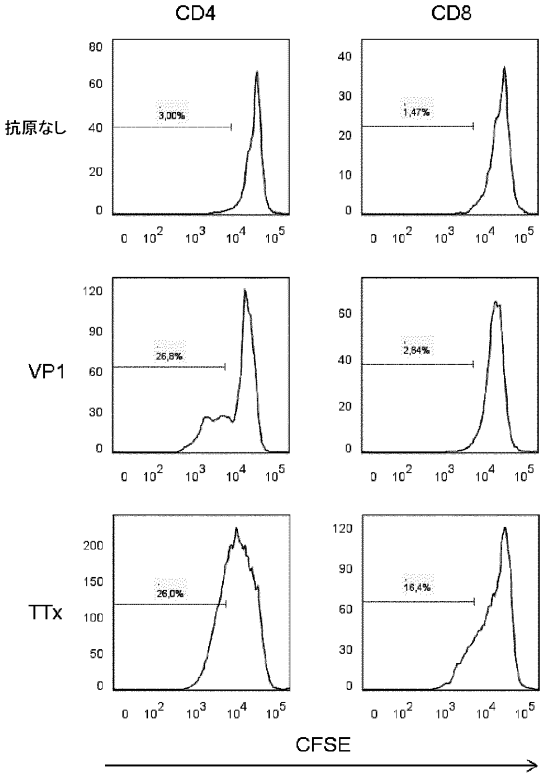
【図７Ａ】
Fig. 7A



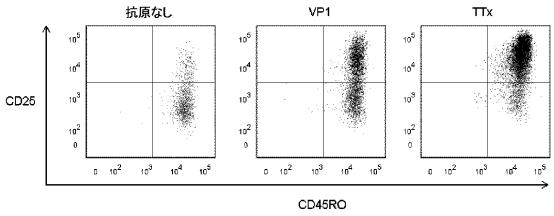
【図７Ｂ】
Fig. 7B



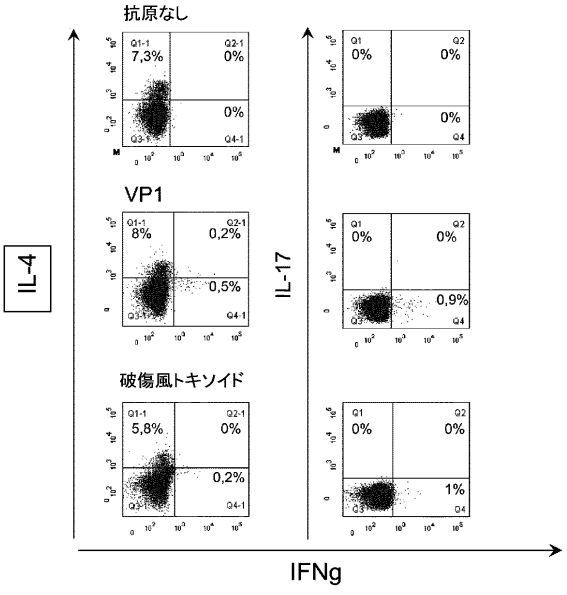
【図８】
Fig. 8



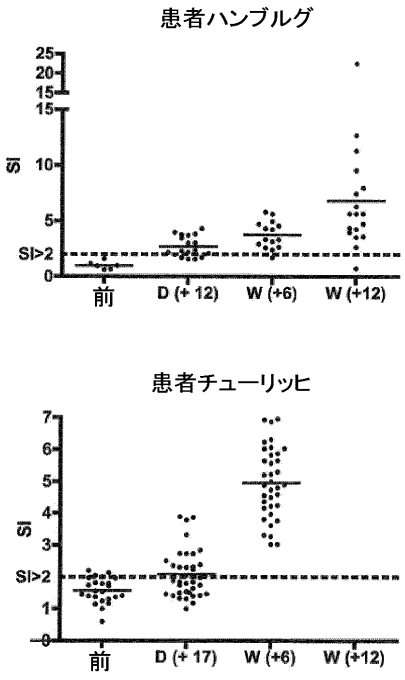
【図９】
Fig. 9



【図１０】
Fig. 10



【図１１】
Fig. 11



【配列表】
2014520877000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/064445

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K38/04 A61K38/16 C07K14/025
ADD.

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)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2005 341864 A (JAPAN SCIENCE & TECH AGENCY) 15 December 2005 (2005-12-15) the whole document & "machine-based translation of the abstract of JP2005341864" In: "machine-based translation of the abstract of JP2005341864", 1 December 2005 (2005-12-01), XP055044936, & "machine-based full-text translation of JP2005341864" In: "machine-based full-text translation of JP2005341864", 1 December 2005 (2005-12-01), XP055044941, ----- -/--	1,2,7, 12-14 1-32

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 November 2012	01/03/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Merlos, Ana Maria

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/064445

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/106626 A2 (UNIV TEMPLE [US]; KHALILI KAMEL [US]) 24 December 2003 (2003-12-24) page 12, line 19 - page 13, line 25 page 5, line 12 - line 26; claims 26, 27 page 19, line 14 - line 23	1,2,7, 12,13
X	SHISHIDO-HARA Y ET AL: "Analysis of capsid formation of human polymavirus JC (Tokyo-1 strain) by a eukaryotic expression system: splicing of late RNAs, translation and nuclear transport of major capsid protein VP1, and assembly", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 74, no. 4, 1 February 2000 (2000-02-01), pages 1840-1853, XP002997063, ISSN: 0022-538X, DOI: 10.1128/JVI.74.4.1840-1853.2000 page 1841, left-hand column, paragraph 2; figures 1, 2 page 1843, left-hand column, paragraph 4 - page 1844, left-hand column, paragraph 1	1-5
X	FRISQUE R J ET AL: "HUMAN POLYOMAVIRUS JC VIRUS GENOME", JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 51, no. 2, 1 August 1984 (1984-08-01), pages 458-469, XP008041561, ISSN: 0022-538X figures 4-8	1-5
Y	SHISHIDO-HARA YUKIKO ET AL: "Major and minor capsid proteins of human polyomavirus JC cooperatively accumulate to nuclear domain 10 for assembly into virions", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 78, no. 18, September 2004 (2004-09), pages 9890-9903, XP002687657, ISSN: 0022-538X the whole document	1-5
Y	PATEL AMILA ET AL: "Treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy and idiopathic CD4+ lymphocytopenia", JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, vol. 65, no. 12, December 2010 (2010-12), pages 2489-2492, XP002687658, ISSN: 0305-7453 the whole document	8-32

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/064445

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MONIUSZKO MARCIN ET AL: "Recombinant interleukin-7 induces proliferation of naive macaque CD4+ and CD8+ T cells in vivo", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 78, no. 18, September 2004 (2004-09), pages 9740-9749, XP002687659, ISSN: 0022-538X page 9748, right-hand column, paragraphs 4, 5	8-11, 14-19, 25-32
Y	Cytheris The Immune Enhancing Company: "Cytheris Announces Publication of Clinical Case Study Combining Recombinant Human Interleukin-7 (CYT107) with Antiviral Agent CMX001 as Potential Treatment for Progressive Multifocal Leukoencephalopathy (PML)", , 30 November 2010 (2010-11-30), XP002687660, Retrieved from the Internet: URL:http://www.forbion.com/upload/news/cytheris_101130_pmlpublication_eng%5B1%5D.pdf [retrieved on 2012-11-20] the whole document	8-32
Y	RECHTSTEINER GERD ET AL: "Cutting edge: Priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with imiquimod", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 174, no. 5, 1 March 2005 (2005-03-01) , pages 2476-2480, XP002687661, ISSN: 0022-1767 the whole document	10,11, 14-32
Y	CLARK TRISTAN W ET AL: "Trial of 2009 influenza A (H1N1) monovalent MF59-adjuvanted vaccine", NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, MASSACHUSETTS MEDICAL SOCIETY, BOSTON, MA, US, vol. 361, no. 25, 17 December 2009 (2009-12-17), pages 2424-2435, XP002588191, ISSN: 1533-4406, DOI: 10.1056/NEJMOA0907650 [retrieved on 2009-09-10] the whole document	10,11, 14-32

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/064445

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TAN C S ET AL: "Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis", LANCET NEUROLOGY, LANCET PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 9, no. 4, 1 April 2010 (2010-04-01), pages 425-437, XP027155413, ISSN: 1474-4422 [retrieved on 2010-04-01] the whole document	1-32
X	DE 195 43 553 A1 (DEUTSCHES PRIMATENZENTRUM GMBH [DE]) 28 May 1997 (1997-05-28)	1-3
Y	the whole document	3-32
A	KORALNIK IGOR J: "Overview of the cellular immunity against JC virus in progressive multifocal leukoencephalopathy.", JOURNAL OF NEUROVIROLOGY, vol. 8, no. Supplement 2, December 2002 (2002-12), pages 59-65, XP002687662, ISSN: 1355-0284 the whole document	1-32
A	GHEUENS SARAH ET AL: "Role of CD4+ and CD8+ T-cell responses against JC virus in the outcome of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and PML with immune reconstitution inflammatory syndrome", JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 85, no. 14, 1 July 2011 (2011-07-01), pages 7256-7263, XP009154706, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US ISSN: 1098-5514 the whole document	1-32
A	GASNAULT JACQUES ET AL: "Critical role of JC virus-specific CD4 T-cell responses in preventing progressive multifocal leukoencephalopathy", AIDS, vol. 17, no. 10, 4 July 2003 (2003-07-04), pages 1443-1449, XP002520358, LONDON, GB ISSN: 0269-9370, DOI: 10.1097/00002030-200307040-00004 the whole document	1-32
4 A	US 2004/259767 A1 (NAGASHIMA KAZUO [JP] ET AL) 23 December 2004 (2004-12-23) the whole document	1-32
2		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/064445

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

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

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

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

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

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

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

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

1-32(partially)

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.

International Application No. PCT/ EP2012/ 064445

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-32(partially)

A protein or peptide or pharmaceutical kit comprising at least one CD4+ epitope derived from JCV which epitope comprises SEQ ID NO: 1 (agnoprotein) and its use for treating PML

---

2. claims: 1-32(partially)

A protein or peptide or pharmaceutical kit comprising at least one CD4+ epitope derived from JCV which epitope is selected from the group comprising SEQ ID NOS: 2-45 and 77-92 (VP1) and its use for treating PML

---

3. claims: 1-32(partially)

A protein or peptide or pharmaceutical kit comprising at least one CD4+ epitope derived from JCV which epitope is selected from the group comprising SEQ ID NOS: 46-55 (VP2) and its use for treating PML

---

4. claims: 1-32(partially)

A protein or peptide or pharmaceutical kit comprising at least one CD4+ epitope derived from JCV which epitope is selected from the group comprising SEQ ID NOS: 56-69 (LTAg) and its use for treating PML

---

5. claims: 1-32(partially)

A protein or peptide or pharmaceutical kit comprising at least one CD4+ epitope derived from JCV which epitope is selected from the group comprising SEQ ID NOS: 70-76 (StAg)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2012/064445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 2005341864 A	15-12-2005	NONE	
WO 03106626 A2	24-12-2003	AU 2003238008 A1	31-12-2003
		US 2006052296 A1	09-03-2006
		WO 03106626 A2	24-12-2003
DE 19543553 A1	28-05-1997	AT 288489 T	15-02-2005
		CA 2236159 A1	29-05-1997
		DE 19543553 A1	28-05-1997
		DE 59611189 D1	10-03-2005
		DK 0862633 T3	30-05-2005
		EP 0862633 A1	09-09-1998
		ES 2237778 T3	01-08-2005
		JP 4456671 B2	28-04-2010
		JP 2000500973 A	02-02-2000
		JP 2007197441 A	09-08-2007
		US 6238859 B1	29-05-2001
		WO 9719174 A1	29-05-1997
US 2004259767 A1	23-12-2004	CA 2467930 A1	30-05-2003
		JP 4840792 B2	21-12-2011
		JP 2003160510 A	03-06-2003
		US 2004259767 A1	23-12-2004
		WO 03044184 A1	30-05-2003

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ　39/395	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｎ
Ａ６１Ｋ　39/39	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/39	
Ａ６１Ｋ　39/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/12	
Ａ６１Ｋ　49/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	49/00	Ａ
Ａ６１Ｋ　35/76	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	49/00	Ｃ
Ａ６１Ｋ　38/22	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
		Ａ６１Ｋ	37/24	

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

(72)発明者　マルティン,　ローラント
スイス国　ツェーハー－８０４４　チューリッヒ,　ヴォルタシュトラーセ　８０
(72)発明者　シプリンク,　スフェン
スイス国　ツェーハー－８０５５　チューリッヒ,　デルチハルデ　１５
(72)発明者　ゾスペドラ,　ミレイヤ
スイス国　ツェーハー－８０４４　チューリッヒ,　ヴォルタシュトラーセ　８０
(72)発明者　ユーゼフ,　ザーラ
ドイツ国　２２４５３　ハンブルク,　ボルステラー　ショッセ　９

Ｆターム(参考)　4C084 AA02 BA44 DA12 DA14 MA02 MA52 MA56 MA63 MA66 NA05
NA14 ZA021 ZB081 ZB261 ZB271 ZB331
4C085 AA03 AA14 AA38 BA76 CC23 EE01 EE03 EE06 FF02 FF12
FF13 FF14 FF17 FF19 FF21 GG04 GG10 HH01 HH07
4C087 AA01 AA02 BC83 MA02 NA05 ZB08 ZB26 ZB27 ZB33
4H045 AA11 AA30 BA17 CA01 DA86 EA20 EA31 FA20