

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年11月22日(22.11.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/157408 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 39/00 (2006.01) A61P 31/12 (2006.01)
A61K 35/76 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01) C07K 14/025 (2006.01)
A61K 39/145 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/060910
- (22) 国際出願日: 2012年4月24日(24.04.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-107874 2011年5月13日(13.05.2011) JP
特願 2011-191208 2011年9月2日(02.09.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人東京工業大学(Tokyo Institute of Techno-
logy) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区大岡山2-
1 2-1 Tokyo (JP). 学校法人埼玉医科大学
(SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒
3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷3 8
Saitama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 半田 宏
(HANDA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒1528550 東京都目黒区
大岡山2-1 2-1 国立大学法人東京工業大
学内 Tokyo (JP). 川野 雅章(KAWANO, Masaaki)
[JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本
郷3 8 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP).
松井 政則(MATSUI, Masanori) [JP/JP]; 〒3500495
埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷3 8 学校法人
埼玉医科大学内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 野村 健一, 外(NOMURA, Kenichi et al.);
〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁
目3 0番の1 農機舎館4階 Kanagawa (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
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, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))

(54) Title: CYTOTOXIC T CELL INDUCER

(54) 発明の名称: 細胞傷害性 T 細胞誘導剤

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to allow a peptide to exhibit a sufficient effect as a vaccine in the absence of any adjuvant. Provided is a cytotoxic T cell inducer comprising virus-like particles each of which is composed of VP1 of simian virus 40 and which is characterized in that a T cell epitope peptide is inserted in a DE loop and/or an HI loop of the VP1.

(57) 要約: アジュバントがなくても、ペプチドにワクチンとしての十分な効果を発揮させることを目的として、シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子を含有する細胞傷害性 T 細胞誘導剤であって、前記VP1のDEループ及び/又はHIループ中にT細胞エピトープペプチドが挿入されていることを特徴とする細胞傷害性 T 細胞誘導剤を提供する。



WO 2012/157408 A1

明 細 書

発明の名称：細胞傷害性T細胞誘導剤

技術分野

[0001] 本発明は、細胞傷害性T細胞(CTL)誘導剤、及びこれを利用したウイルス性疾患又は癌の予防又は治療方法に関する。

背景技術

[0002] シミアンウイルス(Simian virus)40(SV40)は、パポーバウイルス科に属する、サルのパリオーマウイルスの一種であり、小形で、エンベロップを有しない腫瘍ウイルスである。

[0003] SV40ウイルスの外殻は、VP1と呼ばれるメジャーカプシドタンパク質によって構成されている。VP1遺伝子を昆虫細胞内などで高発現させると、VP1が多量に合成され、細胞の核内で自己組織化して多くのウイルス様粒子(VLP)が形成される。このVLPの内部に薬剤などを封入し、ドラッグデリバリーとして利用することが本発明者らによって提案されている(国際公開2006/004173)。

[0004] VP1に外来性ペプチドを挿入すると正常なVLPが形成されなくなることが多いが、VP1中のDEループやHIループに挿入した場合には、正常な粒子が形成されることが本発明者らによって確認されている。この性質を利用し、DEループやHIループに外来性ペプチドを挿入し、VLPの細胞指向性を変更することが可能である(特許文献1)。

[0005] このVLPを利用してワクチンを作製することは従来から行われている。例えば、特許文献2には、CTLエピトープペプチドを結合させたVLPを含むCTLワクチンが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開2006/088229

特許文献2：特開2009-197001号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0007] ウイルス感染細胞などを破壊するため、ウイルス由来のペプチドをワクチンとして利用することが行われている。しかし、ペプチドは滞留性が悪く、また、分解され易いため、通常、アジュバントと共に投与される。しかし、アジュバントには副作用があるものが多く、ヒトに投与するには問題がある。

[0008] 本発明は、以上のような技術的背景の下になされたものであり、アジュバントがなくても、ペプチドにワクチンとしての十分な効果を発揮させ得る手段を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、T細胞エピソードペプチドをDEループやHIループに挿入した改変型VP1から構成されるVLPが強いCTL誘導性を示すことを見出した。

[0010] DEループやHIループに外来性ペプチドを挿入した改変型VP1から構成されるVLPは、特許文献1に開示されている。しかし、特許文献1では、外来性ペプチドは専らVLPの細胞指向性を変更するために挿入されており、外来性ペプチドを用いてCTLを誘導するという発想は、特許文献1には開示されていない。なお、特許文献1の請求項10などには、外来性ペプチドとして抗原エピソードを使用することが記載されているが、この抗原エピソードは、VLPが抗体と結合できるようにするために使用されているものである。即ち、特許文献1に記載されている「エピソード」は、抗体によって認識されるエピソードであり、T細胞によって認識されるエピソード（T細胞エピソード）ではない。

[0011] CTLエピソードペプチドを結合させたVLPを含むCTLワクチンは特許文献2に開示されている（請求項182など）。しかし、特許文献2には、シミアンウイルス40のVP1のDEループ及び／又はHIループ中にCTLエピソードペプチドを挿入することは開示されていない。また、本発明のCTL誘導剤は、免疫賦活

物質がなくても、十分なCTL誘導効果を持つが、引用文献2に開示されているワクチンは、非メチル化CpG含有オリゴヌクレオチドなどの免疫賦活物質を含んでおり（請求項1）、この点も、本発明のCTL誘導剤と異なる。

[0012] 本発明は、以上の知見に基づき完成されたものである。

[0013] 即ち、本発明は、以下の（1）～（10）を提供する。

（1）シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子を含有するCTL誘導剤であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中にT細胞エピトープペプチドが挿入されていることを特徴とするCTL誘導剤。

（2）T細胞エピトープペプチドが、ウイルスタンパク質由来のペプチドであることを特徴とする（1）に記載のCTL誘導剤。

（3）T細胞エピトープペプチドが、インフルエンザウイルスのHA、NA、M1、M2、NP、NS1、NS2、PA、PB1、PB2、又はPB1-F2由来のペプチドであることを特徴とする（1）に記載のCTL誘導剤。

（4）T細胞エピトープペプチドが、癌細胞に特異的なタンパク質由来のペプチドであることを特徴とする（1）に記載のCTL誘導剤。

（5）T細胞エピトープペプチドが、Melan-A/MART-1、gp100、MAGE-A3、MAGE-A10、CEA、HER2/new、NY-E50-1、WT-1、又はhTERT由来のペプチドであることを特徴とする（1）に記載のCTL誘導剤。

（6）T細胞エピトープペプチドが、配列番号1乃至39のいずれかの配列番号に記載されたアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする（1）に記載のCTL誘導剤。

（7）シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中にウイルスタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子を、ヒト以外の動物に投与することを特徴とするヒト以外の動物のウイルス性疾患の予防又は治療方法。

（8）シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中に癌細胞に特異的なタンパク質由来の

T細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子を、ヒト以外の動物に投与することを特徴とするヒト以外の動物の癌の予防又は治療方法。

(9) シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中にウイルスタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子を、ヒトに投与することを特徴とするヒトのウイルス性疾患の予防又は治療方法。

(10) シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中に癌細胞に特異的なタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子を、ヒトに投与することを特徴とするヒトの癌の予防又は治療方法。

発明の効果

[0014] 本発明のCTL誘導剤に含まれるVLPは、アジュバントがなくても、強いCTL誘導効果を持つ。従って、本発明のCTL誘導剤は、副作用を生じさせることなく、ウイルス性疾患や癌の予防や治療を行うことができる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1]M1-DE-VLPとM1-HI-VLPのライセート及びペレット溶液のSDS-PAGE後のCBB染色の結果を示す図。調製したライセート及びペレット溶液の一部を10%SDS-PAGEに展開し、CBBで染色した。M1-DE-VLPのライセートは左図のレーン1-4で、レーン1, 2はCpGアジュバントを含んでないもの、レーン3, 4はCpGアジュバントを含む試料を展開した。M1-DE-VLPのペレットは左図のレーン5-6で、レーン5, 6はCpGアジュバントを含んでいないもの、レーン7, 8はCpGアジュバントを含む試料を展開した。M1-HI-VLPのライセートは右図のレーン1-4で、レーン1, 2はCpGアジュバントを含んでないもの、レーン3, 4はCpGアジュバントを含む試料を展開した。M1-HI-VLPのペレットは右図のレーン5-6で、レーン5, 6はCpGアジュバントを含んでいないもの、レーン7, 8はCpGアジュバントを含む試料を展開した。

[図2]M1-DE-VLPとM1-HI-VLPのライセート及びペレット溶液の足蹠免疫後の細胞内サイトカイン染色 (ICS, Intracellular cytokine staining) 解析結果

を示す図。M1-DE-VLP (A、B) 及びM1-HI-VLP (C、D) のペレット溶液 (超音波処理によって再懸濁 (A、C)、及び、ピペッティングによって再懸濁 (B、D)) をトランスジェニックマウスに免疫し、一週間後ICSで解析した。また、M1-DE-VLP (E、F) 及びM1-HI-VLP (G、H) のペレット溶液 (超音波処理によって再懸濁 (E、G)) 及びライセート溶液 (F、H) をトランスジェニックマウスに免疫し、二週間後ICSで解析した。CpG (-) はCpGアジュバントを加えていないことを示し、CpG + はCpGアジュバントを加えていることを示している。また、peptide pulse (M1 flu M58-66) (-) は、CTLエピトープ配列 (GILGFVFTL) を加えていないもの、peptide pulse (M1 flu M58-66) + は、前記配列を加えることでCTLを再誘導していることを示している。各図の右上枠内のドットが、CD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞を表し、枠内の数字がこの細胞の割合を示す。

[図3] M1-DE-VLPとM1-HI-VLPの異なる免疫経路でのICS解析結果を示す図。M1-DE-VLP (左図) 及びM1-HI-VLP (右図) のペレット溶液 (超音波処理によって再懸濁) を踵関節、静脈内、腹腔内、筋肉内、鼻腔内の経路で免疫し、一週間後ICS解析を行った。peptide pulse (M1 flu M58-66) (-) は、CTLエピトープ配列 (GILGFVFTL) を加えていないもの、peptide pulse (M1 flu M58-66) + は、前記配列を加えることでCTLを再誘導していることを示している。また、spleenは脾臓から抽出したリンパ球、lungは肺から抽出したリンパ球を示している。各図の右上枠内のドットが、CD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞を表し、枠内の数字がこの細胞の割合を示す。

[図4] M1-DE-VLPとM1-HI-VLPの免疫でのCD107-ICS解析結果を示す図。M1-DE-VLP (左図) 及びM1-HI-VLP (右図) のペレット溶液 (超音波処理によって再懸濁) を、筋肉内、腹腔内の経路で免疫し、一週間後CD107-ICS解析を行った。peptide pulse (M1 flu M58-66) (-) は、CTLエピトープ配列 (GILGFVFTL) を加えていないもの、peptide pulse (M1 flu M58-66) + は、前記配列を加えることでCTLを再誘導していることを示している。また、spleenは脾臓から抽出したリンパ球を示している。各図の右上枠内のドットが、各々、CD8陽性・細

胞内IFN- γ 陽性細胞（上図）、CD8陽性細胞中のCD107陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞（下図）を表し、枠内の数字がこの細胞の割合を示す。

[図5]M1-DE-VLPとM1-HI-VLPの免疫での⁵¹Chrome release解析結果を示す図。M1-DE-VLP（左図）及びM1-HI-VLP（右図）のペレット溶液（超音波処理によって再懸濁）を筋肉内、腹腔内の経路で免疫し、一週間後⁵¹Chrome release解析のためにリンパ球を取り出して培養し、一週間の培養後⁵¹Chrome release解析を行った。（-）は、CTLエピトープ配列（GILGFVFTL）を加えていないターゲット細胞からのクロムリリースの割合、M1:58-66は、前記配列を加えたターゲット細胞からのクロムリリースの割合を示している。

[図6]M1-DE-VLPとM1-HI-VLPの免疫でのIn vivo CTL解析結果を示す図。M1-DE-VLP（左図）及びM1-HI-VLP（右図）のペレット溶液（超音波処理によって再懸濁）を筋肉内、腹腔内の経路で免疫し、一週間後、CFSE染色した、CTLエピトープ配列（GILGFVFTL）を混合したリンパ球（CFSE high）と混合していないリンパ球（CFSE low）を、同数、静脈注射で導入し、さらに一日後、In vivo CTL解析を行った。各図は、マウスのリンパ球中のCFSE染色した細胞のCFSE強度（横軸）と細胞数（縦軸）を示している。図中の（-）は、免疫をしていないマウスのリンパ球を用いた場合を示し、M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPは、それぞれM1-DE-VLP及びM1-HI-VLPで免疫したマウスのリンパ球を用いた場合を示している。枠内の数字は、以下の式によって算出されるリンパ球に対する特異的傷害率を示している。特異的傷害率(%)=(1-r(control)/r(immunized))x100但し、r(control)は、免疫していないマウスにおける(CFSE lowのリンパ球数/CFSE highのリンパ球数)を表し、r(immunized)は、免疫したマウスにおける(CFSE lowのリンパ球数/CFSE highのリンパ球数)を表す。

[図7]M1-DE-VLPとM1-HI-VLPの添加によるリンパ球の成熟化を示す図。何も加えない（ヒストグラムで灰色の領域）、50% Opti-prep™ 溶液の添加（上段、ヒストグラムで太線、中抜け）、M1-DE-VLPの添加（中段、ヒストグラムで太線、中抜け）、M1-HI-VLPの添加（下段、ヒストグラムで太線、中抜け）したリンパ球を、6時間後（各々の左図）、および、24時間後（各々の右図）に回収

し、FITC-抗CD80抗体（左）、FITC-抗CD86抗体（中央）、FITC-抗CD40抗体（右）で染色し、ヒストグラム解析した。縦軸は細胞数を表し、横軸はFITCの強度を表す。FITC-抗CD86抗体、および、FITC-CD40抗体で染色したM1-DE-VLPおよびM1-HI-VLPとインキュベートしたリンパ球（ヒストグラムで太線、中抜け）では、何もくわえなかったもの（ヒストグラムで灰色の領域）と比べて、ヒストグラムが右に偏っている。これは、CD86およびCD40がリンパ球表面に発現したため、何も加えなかったリンパ球に対し、FITC-抗CD86抗体、および、FITC-抗CD40抗体がより多くリンパ球表面に結合したことを表している。

[図8]M1-DE-VLPとM1-HI-VLPの免疫でのインフルエンザウイルスに対するウイルスチャレンジ実験解析結果を示す図。〔図8-a〕M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPのペレット溶液（超音波処理によって再懸濁）を、筋肉内、腹腔内の経路で免疫し、一週間後、influenza A virus (A/H1N1/PR8及びA/H3N2/Aichi、濃度：100 TCID₅₀/20 µl、接種量：20 µl) を、免疫したマウスに麻酔を施した後、経鼻感染させ、4日後に肺から抽出液を調製し、そこに含まれるインフルエンザウイルス量を赤血球の凝集の分布から、tissue culture influenza virus infectious dose (TCID₅₀) で算出した。左の表は、A/H1N1/PR8を感染させたマウス肺のインフルエンザウイルス量の結果、右の表は、A/H3N2/Aichiを感染させたマウス肺のインフルエンザウイルス量の結果を示している。immunized with (-)は、免疫していないマウス、M1-DE-VLPはM1-DE-VLPで免疫したマウス、M1-HI-VLPはM1-HI-VLPで免疫したマウスの肺の抽出液1 mlあたりに含まれるインフルエンザウイルス量のtissue culture influenza virus infectious dose (TCID₅₀)を示している。〔図8-b〕M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPのペレット溶液（超音波処理によって再懸濁）を、筋肉内、腹腔内の経路で免疫し、一週間後、influenza A virus (A/H1N1/PR8、濃度：100 TCID₅₀/20 µl、接種量：20 µl) を、免疫したマウスに麻酔を施した後、経鼻感染させ、その時のマウスの体重を100%として、2週間、マウスの体重変化を毎日解析した。左図は免疫していないマウス、中央はM1-DE-VLPで免疫したマウス、右図はM1-HI-VLPで免疫したマウスの体重変化を示している。

[図9] [図9-a] WT1WT-DE-VLPとWT1WT-HI-VLPのライセート及びペレット溶液のSDS-PAGE後のCBB染色の結果を示す図。調製したライセート及びペレット溶液の一部を10%SDS-PAGEに展開し、CBBで染色した。WT1WT-DE-VLPのライセートはレーン3、WT1WT-DE-VLPのペレットはレーン4、WT1WT-HI-VLPのライセートはレーン5、WT1WT-HI-VLPのペレットはレーン6である。[図9-b] WT1WT-DE-VLPとWT1WT-HI-VLPの異なる免疫経路でのICS解析結果を示す図。WT1WT-DE-VLP (図9-b、上段) 及びWT1WT-HI-VLP (図9-b、下段) のペレット溶液 (超音波処理によって再懸濁) を筋肉内 (WT1WT-DE-VLP)、腹腔内 (WT1WT-HI-VLP) の経路で免疫し、一週間後ICS解析を行った。peptide pulse (RMFPNAPYL) (-)は、CTLエピトープ配列 (RMFPNAPYL) を加えていないもの、peptide pulse (RMFPNAPYL) +は、前記配列を加えることでCTLを再誘導していることを示している。各図の右上枠内のドットが、CD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞を表し、枠内の数字がこの細胞の割合を示す。[図9-c] WT1WT-DE-VLPとWT1WT-HI-VLPの免疫での⁵¹Chrome release解析結果を示す図。M1-DE-VLP (左図) 及びM1-HI-VLP (右図) のペレット溶液 (超音波処理によって再懸濁) を筋肉内、腹腔内の経路で免疫し、一週間後⁵¹Chrome release解析のためにリンパ球を取り出して培養し、一週間の培養後⁵¹Chrome release解析を行った。(-)は、CTLエピトープ配列 (RMFPNAPYL) を加えていないターゲット細胞からのクロムリリースの割合、WT1WTは、前記配列を加えたターゲット細胞からのクロムリリースの割合を示している。

[図10] IFA (incomplete freund' s adjuvant) とM1-DE-VLP、M1-HI-VLPのCTL誘導をICS解析によって比較した結果を示す図。M1 : 58-66のCTLエピトープ配列 (GILGFVFTL) のペプチドをIFAで懸濁させた乳濁液を皮下内 (s.c.) の経路で一回免疫 (左上図)、及び、一回免疫一週間後に二回目の免疫 (左下図) を行って一週間経過したマウスと、M1-DE-VLP (右上図) 及びM1-HI-VLP (右下図) のペレット溶液 (超音波処理によって再懸濁) を皮下内 (s.c.) の経路で免疫して一週間経過したマウスでICS解析を行った。peptide pulse (M1: 58-66) (-)は、CTLエピトープ配列 (GILGFVFTL) を加えていないもの、pe

ptide pulse (M1: 58-66) +は、前記配列を加えることでCTLを再誘導していることを示している。また、spleenは脾臓から抽出したリンパ球を示している。各図の右上枠内のドットが、CD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞を表し、枠内の数字がこの細胞の割合を示す。

[図11]M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPでインキュベートしたときの脾臓抽出リンパ球からのIL-12の分泌量をELISAで解析した結果を示す図。表の左のoptiprepはVLPを溶解している溶媒のみ、wild-type-VLPはCTLエピトープを挿入していない野生型のVLP、LPSはlipopolysaccharideで脾臓から抽出したリンパ球とインキュベートしたことを示している。中央はインキュベーション時間、右はELISAによって算出したリンパ球を培養した培養上清のIL-12の濃度を示している。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0017] 本発明のCTL誘導剤は、シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子を含有するものであって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中にT細胞エピトープペプチドが挿入されていることを特徴とするものである。

[0018] 本発明において使用するT細胞エピトープペプチドはCTLを誘導し得るものであれば特に限定されない。T細胞エピトープペプチドとしては、ウイルスタンパク質由来のペプチドや癌細胞に特異的なタンパク質由来のペプチドなどが知られているが、本発明においては、これらいずれのペプチドも使用できる。なお、ここで「癌細胞に特異的なタンパク質」とは、正常細胞では発現せず、癌細胞のみで発現しているタンパク質、又は正常細胞と比較して癌細胞で発現が増加しているタンパク質をいう。

[0019] ウイルスタンパク質由来のペプチドとしては、インフルエンザウイルスのHA、NA、M1、M2、NP、NS1、NS2、PA、PB1、PB2、PB1-F2などのタンパク質由来のペプチドを例示できる。これらの中では、インフルエンザウイルスのM1、NP、NS1、PA、PB1、PB2などのタンパク質由来のペプチドが好ましい。具体的なペプチドとしては、インフルエンザウイルスのM1由来のペプチドであるGIL

GVFVFTL (配列番号 1)、ASCMGLIY (配列番号 2)、SIIPSGPLK (配列番号 3)、ILGFVFTLTV (配列番号 4)、NP由来のペプチドであるCTELKLSDY (配列番号 5)、LPFEKSTVM (配列番号 6)、ILRGVAHK (配列番号 7)、ELRSRYWAI (配列番号 8)、SRYWAIRTR (配列番号 9)、PB1由来のペプチドであるNMLSTVLGV (配列番号 10)、RIFLAMITYI (配列番号 11)、VSDGGPNLY (配列番号 12)、PB2由来のペプチドであるVLTGNLQTL (配列番号 13)、NS1由来のペプチドであるIILKANFSV (配列番号 14)などを例示できる。

[0020] インフルエンザウイルス以外のウイルスのタンパク質由来のペプチドとしては、HIVのGag、Pol、Env、Tat、Nef、Rev由来のペプチド、C型肝炎ウイルス(HCV)のE1、E2、Core、NS2、NS3、NS4、NS5由来のペプチド、ヒトパピローマウイルス(HPV)のE6、E7由来のペプチドなどを例示できる。

[0021] 癌細胞に特異的なタンパク質由来のペプチドとしては、Melan-A/MART-1、gp100、MAGE-A3、MAGE-A10、CEA、HER2/new、NY-E50-1、WT-1、hTERTなどのタンパク質由来のペプチドを例示できる。これらの中では、HER2/new、WT-1、MAGE-A3などのタンパク質由来のペプチドが好ましい。具体的なペプチドとしては、HER2/new由来のペプチドであるALCRWGLLL (配列番号 15)、QLFEDNYAL (配列番号 16)、KIFGSLAFL (配列番号 17)、ILHNGAYSL (配列番号 18)、IISAVVGIL (配列番号 19)、VVLGVVFGI (配列番号 20)、RLLQETELV (配列番号 21)、VMAGVGSPYV (配列番号 22)、CLTSTVQLV (配列番号 23)、QLMPYGCLL (配列番号 24)、YLEDVRLV (配列番号 25)、VLVKSPNHV (配列番号 26)、YMIMVKCWMI (配列番号 27)、ELVSEFSRM (配列番号 28)、VLRENTSPK (配列番号 29)、RWGLLLALL (配列番号 30)、TYLPTNASL (配列番号 31)、PYVSRLGI (配列番号 32)、WT-1由来のペプチドであるRMFPNAPYL (配列番号 33)、SLGEQQYSV (配列番号 34)、CMTWNQMNL (配列番号 35)、YMFNPAPYL (配列番号 36)、CMTWNQMNL (配列番号 37)、CYTWNQMNL (配列番号 38)、RWPSCQKKF (配列番号 39)などを例示できる。

[0022] ループ中に挿入するT細胞エピトープペプチドの長さは、CTLを誘導し得る限り限定されないが、通常、3～27アミノ酸であり、好ましくは、8～1

1 アミノ酸、より好ましくは9アミノ酸である。

[0023] DEループはVP1のN末端から数えて127-146位にあり、HIループは268-277位にある（国際公開2006/088229）。T細胞エピトープペプチドは、これらのループのいずれに挿入してもよいが、DEループについては137-138位のアミノ酸配列をT細胞エピトープペプチドで置き換えるように挿入するのが好ましく、HIループについては273-274位のアミノ酸配列をT細胞エピトープペプチドで置き換えるように挿入するのが好ましい。また、ループに挿入されるT細胞エピトープペプチドの両端には、通常、1～数個のスペーサーアミノ酸、例えば、グリシン、アラニン、セリンなどが挿入されている（国際公開2006/088229）。スペーサーアミノ酸の個数は、通常、1～9個であり、好ましくは1～6個であり、更に好ましくは3～6個である。

[0024] T細胞エピトープペプチドは、DEループ及びHIループの両方に挿入してもよいし、一方にのみ挿入してもよい。また、両方挿入する場合は、同一のT細胞エピトープペプチドを挿入してもよいし、異なるT細胞エピトープペプチドを挿入してもよい。更に、ループ中に二以上のT細胞エピトープペプチドを直列に挿入してもよい。

[0025] 外来性ペプチドをループ中に挿入したVP1から構成されるウイルス様粒子の作製方法は、国際公開2006/088229に記載されているので、この方法に従って、T細胞エピトープペプチドをループ中に挿入したVP1から構成されるウイルス様粒子を作製することができる。例えば、T細胞エピトープペプチドをコードする塩基配列が挿入された改変型VP1遺伝子を作製し、この改変型VP1遺伝子を、バキュロウイルスベクター等を用いて昆虫細胞内等で高発現させることにより、目的のウイルス様粒子を作製できる。

[0026] 本発明のCTL誘導剤は、有効成分とされる物質の性状に応じた一般的な医薬組成物の形態とし、組成物の直接送達は、一般に非経口的注射（例えば、皮下注射、腹腔内注射、静脈内注射、筋肉内注射、組織の間隙の空間への注射等）によって達成される。他の投与方法としては、粘膜投与（例えば、経口、経鼻、また肺）、眼を通じた投与、経皮的投与及び坐剤が挙げられる。

- [0027] すなわち、非経口的に投与する場合には、注射剤、経鼻剤、局所投与剤（経皮剤等）、直腸投与剤等の投与形態で投与することができる。経口的に投与する場合、通常当分野で用いられる投与形態で投与することができる。注射剤としては、例えば無菌の溶液又は懸濁液、乳剤等が挙げられ、具体的には水、水-プロピレングリコール溶液、緩衝化液、0.4%の生理食塩水等が挙げられる。さらに液状製剤とした場合は凍結保存、又は、凍結乾燥等により水分を除去して保存することができる。凍結乾燥製剤は、用時に注射用蒸留水などを加え、再溶解して使用される。局所投与剤としては、例えばクリーム、軟膏、ローション、経皮剤等が挙げられる。経口剤又は直腸投与剤としては、例えばカプセル、錠剤、ピル、散剤、ドロップ、座剤、液剤等が挙げられる。
- [0028] 以上の剤形は通常当分野で行われている手法により、薬学的に許容される賦形剤、添加剤と共に製剤化される。薬学的に許容される賦形剤、添加剤としては、担体、結合剤、香料、緩衝剤、増粘剤、着色剤、安定剤、乳化剤、分散剤、懸濁化剤、防腐剤、pH調節剤、張度調節剤、浸潤剤等が挙げられる。また、薬学的に許容される担体としては、例えば炭酸マグネシウム、ラクトース、ペクチン、澱粉、メチルセルロース等が挙げられる。
- [0029] 本発明のCTL誘導剤は、アジュバントがなくても十分なCTL誘導効果を持つので、アジュバントを含まなくてもよいが、含んでいてもよい。使用するアジュバントとしては、水酸化アルミニウムゲル、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント、ポリ(I,C)、CpG-DNA等が挙げられる。
- [0030] 製剤中のT細胞エピトープペプチドの投与量、製剤の投与回数は、T細胞エピトープペプチドの種類、投与対象の症状、年齢、体重、投与形態等によって異なるが、通常0.01 μ g~1mg、好ましくは0.1 μ g~500 μ g、より好ましくは1.0 μ g~100 μ gであり、これを数日ないし数月に1回投与するのが好ましい。例えば、初期免疫（すなわち、治療的又は予防的投与）では成人患者に関して1.0 μ g~500 μ gのペプチドを投与し、患者の血液における特異的なCTL

活性の測定による患者の応答及び状態に応じて、数週間から数ヶ月にわたるブースティング療法に従う $1.0\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}$ のペプチドのブースティング投与がそれに続く。

[0031] 本発明のCTL誘導剤は、ウイルス性疾患の予防又は治療用ワクチンや各種癌の予防又は治療用ワクチンとして使用できる。

[0032] 本発明のCTL誘導剤は、ヒトやヒト以外の動物を投与対象とすることができる。ヒト以外の動物としては、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ニワトリなど）、愛玩動物（例えば、イヌ、ネコなど）、実験動物（マウス、ラットなど）などを挙げるができる。

[0033] 本発明のCTL誘導剤は、以下のような予防又は治療方法にも利用できる。

(A) シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中にウイルスタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子をヒトに投与し、ヒトのウイルス性疾患を予防又は治療する方法。

(B) シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中にウイルスタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子をヒト以外の動物に投与し、ヒト以外の動物のウイルス性疾患を予防又は治療する方法。

(C) シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中に癌細胞に特異的なタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子をヒトに投与し、ヒトの癌を予防又は治療する方法。

(D) シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中に癌細胞に特異的なタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子をヒト以外の動物に投与し、ヒト以外の動物の癌を予防又は治療する方法。

実施例

[0034] 以下、実施例により本発明を更に詳細に説明する。

〔実施例1〕 M1 CTLエピトープ挿入SV40 VP1遺伝子の作製

インフルエンザウイルス粒子内部タンパク質M1のCTLエピトープ配列 (GILG FVFTL)を (このエピトープ配列は、ヒトのMHC class IのHLA-A*0201に対するエピトープ配列である。)、SV40 VP1に挿入した。具体的には、VP1のDEループ領域 (137-138アミノ酸領域、古典的にVP1遺伝子の4番目のAlaをアミノ酸番号1として) またはHIループ領域 (273-274アミノ酸領域) をGILGFVFTLで置き換え、M1 CTL エピトープ挿入SV40 VP1挿入変異体を作製した (M1-DE-VP1、M1-HI-VP1)。作製方法は、SV40 VP1をコードするpFastBac 1-SV40 wild type VP1をテンプレートして、Overhang PCR法にて作製した。プライマーは以下のものを用いた。

[0035] M1-DE-VP1作製用プライマー

1st round

5' -SalI-Kozac-SV40 VP1

AAAAGTCGACACCATGAAGATGGCCCCAACAAAAAG (配列番号40)

3' -DE2 loop (M1)

CGTGAACACAAAGCCCAAAATGCCGCCACCGCCATGAGTTTTTTGTGTCCCTGAATG (配列番号41)

5' -DE2 loop (M1)

CATTTTTGGGCTTTGTGTTTCACGTTGGGCGGCGGTGGTGTGGAAAACCCATTCAAG (配列番号42)

3' -KpnI-SV40 VP1

AAAAGGTACCTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG (配列番号43)

[0036] 2nd round

5' -SalI-Kozac-SV40 VP1

AAAAGTCGACACCATGAAGATGGCCCCAACAAAAAG (配列番号44)

3' -KpnI-SV40 VP1

AAAAGGTACCTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG (配列番号45)

[0037] M1-HI-VP1作製用プライマー

1st round

5' -SalI-Kozac-SV40 VP1

AAAAGTCGACACCATGAAGATGGCCCCAACAAAAAG (配列番号 4 6)

3' -HI1 loop (M1)

CGTGAACACAAAGCCCAAAATGCCGCCACCGCCGTTGGTAAACAGCCCACAAATG (配列番号 4 7
)

5' -HI1 loop (M1)

CATTTTGGGCTTTGTGTTACGTTGGGCGCGGTGGAACACAGCAGTGAAGGG (配列番号 4 8
)

3' -KpnI-SV40 VP1

AAAAGGTACCTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG (配列番号 4 9)

[0038] 2nd round

5' -SalI-Kozac-SV40 VP1

AAAAGTCGACACCATGAAGATGGCCCCAACAAAAAG (配列番号 5 0)

3' -KpnI-SV40 VP1

AAAAGGTACCTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG (配列番号 5 1)

[0039] テンプレートは10 ng使用し、プライマーは、50 pmolずつ加えて、KOP polymerase 2.5 units, 0.2 mM dNTPs, 1 mM MgCl₂, 6 mM (NH₄)₂SO₄, 10 mM KCl, 120 mM Tris-HCl(pH8.0), 0.1% TritonX-100, 0.001% BSAの濃度の混合溶液 30 μlを調製した。

[0040] PCRは1st round、2 nd round共に、98°Cで60秒インキュベートした後、次のサイクルを25回繰り返す(98°C15秒、59°C15秒、74°C30秒)、最後に74°Cで1分30秒インキュベートして、4°Cに移行した。

[0041] Overhang PCRで作製した、PCR断片を制限酵素のKpnIとSalIで切断し、pFastBac 1プラスミドベクターのKpnI、SalIサイトの間に挿入し、M1-DE-VP1及びM1-HI-VP1プラスミドとした。

[0042] [実施例2] M1-DE-VP1及びM1-HI-VP1を発現するバキュロウイルスの作製バキュロウイルスゲノムを保持する大腸菌DH10bac (invitrogen) にM1-DE-

VP1及びM1-HI-VP1プラスミドを導入して形質転換し、M1-DE-VP1及びM1-HI-VP1を組込んだ組換えバキュロウイルスゲノムを調製した。組換えバキュロウイルスゲノムをSf-9細胞にトランスフェクションし、三日後にその上清を回収して、組換えバキュロウイルスを含む溶液とした。この溶液の一部を再び、Sf-9細胞に感染させることで、組換えバキュロウイルスタイターを上昇させて、組換えバキュロウイルスのストック溶液とした。

[0043] [実施例3] M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPの調製

M1-DE-VP1及びM1-HI-VP1を組込んだ組換えバキュロウイルスを、M.O.I. (multiplicity of infection) = 0.05~0.2で 3×10^7 個のSf-9細胞に感染させた。感染3日後にSf-9細胞を回収、PBS(-)で洗浄した後、細胞を200 μ lの50% Opti-prep™ 溶液 (20 mM Tris-HCl(pH7.9), 50% Opti-prep™) で再懸濁し、超音波破碎して、ライセート溶液とした (図1左図、レーン1-4、M1-DE-VP1及び右図、レーン1-4、M1-HI-VP1)。一方、細胞を1 mlのVP1 超音波処理 溶液 (20 mM Tris-HCl(pH7.9), 1% sodium deoxycholate) で再懸濁し、超音波破碎した後、15,000 rpm、4°Cで5分間遠心して上清とペレットに分画し、上清を除いた。残ったペレットに50% Opti-prep™ 溶液 (20 mM Tris-HCl(pH7.9), 50% Opti-prep™) を加えて、ピペティング、または、超音波処理することで再懸濁し、ペレット溶液とした (図1左図、レーン5-8、M1-DE-VP1及び右図、レーン5-8、M1-HI-VP1)。

[0044] 調製したライセート及びペレット溶液の一部をSDS-PAGEで泳動後、CBB染色によって染色した (図1)。

[0045] [実施例4] M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPの免疫

上記のM1-DE-VLP及びM1-HI-VLPを含むライセート溶液 (100 μ l) 及びペレット溶液 (100 μ l) にアジュバントとしてはCpG-oligodeoxynucleotide5002 (TCCATGACGTTCTTGATGTT : 配列番号52) アジュバントを5 μ g加えて、8週齢のトランスジェニックマウスに足蹠、踵関節、静脈内、腹腔内、筋肉内、鼻腔内の経路で免疫した。トランスジェニックマウスは、C57BL/6をバックグラウンドとし、HLA-A*0201とH-2Dbのキメラでさらにヒトの β 2mを融合したも

のを発現しているものを使用した。このマウスは、マウスの $\beta 2m$ およびH-2Dbをロックアウトしているため、マウス由来のMHC class Iは細胞表面に露出していないと考えられる。

[0046] [実施例5] 免疫したマウスの脾臓及び肺からのリンパ球の調製

免疫1週間または2週間後、マウスから脾臓及び肺を摘出し、それぞれ5 mlのRPMI-1640 培地の入った $\phi 6$ cm ディッシュに置いた。ピンセットを用いて脾臓を培地内で、良く揉みほぐし、培地に溶出されたリンパ球を含む溶液を15 ml チューブに移し、もう一度、 $\phi 6$ cm ディッシュを5 mlのRPMI-1640 培地で洗浄し、上清をその15 ml チューブに加え、総量 10 mlとした。すぐに15 ml チューブの底にたまる組織断片を残して、上清を再び新しい15 ml チューブに移し、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、赤血球を除くために、250 μ lの NH_4Cl -トリス溶液を加えかき混ぜた後、すばやく10 mlのRPMI-1640 培地を加え、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、再び10 mlのRPMI-1640 培地を加え、変性した赤血球を吸わないように、ピペットで新しい15 ml チューブに移して、再び室温、1,200 rpmで5分間遠心した。上清を除いた後、ペレットをほぐしてもう一度10 mlのRPMI-1640 培地で懸濁し、室温、1,200 rpmで5分間遠心した。上清を除いて、最後に2 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地で懸濁した。リンパ球を数えるために、490 μ lの2%酢酸溶液に10 μ lの上記懸濁溶液を加え、ビュルケルチュルク血球計算版で、細胞数を算出し、 2×10^7 cells/mlとなるように10%FCS混入RPMI-1640 培地で希釈、または、濃縮した。

[0047] 摘出した肺は、培地の混入していない $\phi 6$ cm ディッシュに移し、ハサミで良く切り刻んだ後、10 mlの50 unit/ml Collagenase Type 1、10% FCS混入RPMI-1640 培地で懸濁し、1時間、37°C、5% CO_2 incubatorでインキュベートした。インキュベート後、100 μ m Nylon製のcell strainer (BD Falcon) を通して、50 ml チューブに上清を回収し、strainerに残った組織片をcell scraperですり潰した後、さらに10 ml 10% FCS混入RPMI-1640 培地を通過させ、

総量 20 mlの溶液を50 ml チューブに回収した。回収した溶液を室温、1,200 rpmで5分間遠心し、上清を除いて、ペレットをほぐした後、10 ml RPMI-1640 培地を加えて、懸濁液を15 ml チューブに移した。移した15 ml チューブを室温、1,200 rpmで5分間遠心し、上清を除き、ペレットをほぐした後、さらに10 ml RPMI-1640 培地を加えて室温、1,200 rpmで5分間遠心することで、細胞を洗浄した。上清を除いた後、ペレットをほぐして、最後に10 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加えて室温、1,200 rpmで5分間遠心し、上清を除いて、ペレットをほぐした後、250 μ lの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加えた。

[0048] [実施例6] ICS解析

上記の方法で脾臓及び肺から回収したリンパ球中に、M1のCTLエピトープ配列 (GILGFVFTL)に反応して誘導されるCTLが存在することを調べるために、ICS解析を行った。96 ウェル丸底プレートに10% FCS混入RPMI-1640 培地で25倍希釈したBD GolgiPlug™ (BD) を1 ウェル当たり5 μ l加え、そこにさらに10% FCS混入RPMI-1640 培地で希釈した20 μ MのM1のCTLエピトープのペプチド (GILGFVFTL、Operon) を100 μ l加えた。ネガティブコントロールとして、ペプチドを含まない10% FCS混入RPMI-1640 培地を100 μ l加えた。

[0049] このウェルに上記で調製した、脾臓から調製したリンパ球及び肺から調製したリンパ球を100 μ l加えた後、5時間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。

[0050] インキュベート後4°C、1,400 rpmでスピンドウンして上清を除き、ボルテックスミキサーで細胞をほぐした後、1 ウェル当たり、FACS バッファー (2% FCS, 0.1% sodium azide, 1xPBS(-))を200 μ l加え、再び4°C、1,400 rpmでスピンドウンして上清を除き、細胞をほぐした後、FACS バッファーで5 μ g/mlに希釈したMouse BD Fc Block™ (BD Pharmingen) を100 μ l加えて、4°Cで10分間インキュベートした。

[0051] インキュベート後、4°C、1,400 rpmでスピンドウンして上清を除き、細胞をほぐした後、1 ウェル当たり、FACS バッファーを200 μ l加え、再び4°C、1,

400 rpmでスピンドウンして上清を除き、もう一度FACS バッファーによる洗浄操作を行った。ほぐした細胞に、1 ウェル当り、FACS バッファーで10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したFITC Rat Anti-Mouse CD8a Clone: 53-6.7 (BD Pharmingen) を50 μl 加えて、4°C暗所で30分間インキュベートした。

[0052] インキュベート後、200 μl のFACS バッファーでの洗浄操作を2回行った後、ほぐした細胞に、1 ウェル当り、100 μl のBD Cytotfix/Cytoperm™ (BD Biosciences)を加えて、4°C暗所で20分間インキュベートした。インキュベート後、200 μl の1xBD Perm/Wash™ (BD biosciences)でFACS バッファーで行った洗浄操作と同様の操作を2回行った後、ほぐした細胞に、1xBD Perm/Wash™ で10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したPE anti-mouse IFN- γ Clone: XMG1.2 (BioLegend) を50 μl 加えて、4°C暗所で30分間インキュベートした。

[0053] インキュベート後、200 μl の1xBD Perm/Wash™での洗浄操作を2回行った後、ほぐした細胞に、1 ウェル当り、100 μl のFACS固定バッファー (1%ホルムアルデヒド, 1xFACS バッファー)を加えて、4°C 暗所でovernightインキュベートした。

[0054] インキュベート後、400 μl のFACS バッファーを5 mlのポリスチレンチューブに加え、そこに100 μl のFACS固定バッファーで固定したサンプルを加えた後、FACScan (BD) でドットプロット解析を行った。解析にはCell Quest (BD) のソフトウェアを使用した。図2、図3に、ICSの2次元解析の結果を示した。

[0055] 図2に示すように、いずれの測定結果においてもCTLエピトープペプチドのインキュベートによりCD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞数の割合が増大していた。また、CpGを加えない方がCD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞数の割合が増大するという結果も得られた。これらから、M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPは、アジュバントがなくても、CTLを誘導できる可能性があることがわかった。

[0056] 図3に示すように、M1-DE-VLPを筋肉内投与した場合、及びM1-HI-VLPを腹腔内投与した場合に、CTLエピトープペプチドのインキュベートによるCD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞数の増大が著しかった。

[0057] [実施例7] CD107-ICS解析

実施例5の方法で脾臓から回収したリンパ球中に、M1のCTLエピトープ配列 (GILGFVFTL) に反応して誘導される細胞傷害活性を有するCTLが存在することを調べるために、CD107-ICS解析を行った。96 ウェル丸底プレートに10% FCS混入RPMI-1640 培地で25倍希釈したBD GolgiPlug™ (BD) を1 ウェル当り5 μ l、及び、10% FCS混入RPMI-1640 培地で25倍希釈したBD GolgiStop™ (BD) を1 ウェル当り5 μ l、FITC Rat Anti-Mouse CD107a Clone: 1D4B (BD Pharmingen) を0.8 μ g加え、そこにさらに10% FCS混入RPMI-1640 培地で希釈した20 μ MのM1のCTLエピトープのペプチド (GILGFVFTL、Operon) を100 μ l加えた。ネガティブコントロールとして、ペプチドを含まない10% FCS混入RPMI-1640 培地を100 μ l加えた。

[0058] このウェルに実施例5で調製した、脾臓から調製したリンパ球を100 μ l加えた後、暗所、6時間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。

[0059] インキュベート後4°C、1,400 rpmでスピンドウンして上清を除き、ボルテックスミキサーで細胞をほぐした後、1 ウェル当り、FACS バッファー (2% FCS, 0.1% sodium azide, 1xPBS(-)) を200 μ l加え、再び4°C、1,400 rpmでスピンドウンして上清を除き、細胞をほぐした後、FACS バッファーで5 μ g/mlに希釈したMouse BD Fc Block™ (BD Pharmingen) を100 μ l加えて、4°Cで10分間インキュベートした。

[0060] インキュベート後、4°C、1,400 rpmでスピンドウンして上清を除き、細胞をほぐした後、1 ウェル当り、FACS バッファーを200 μ l加え、再び4°C、1,400 rpmでスピンドウンして上清を除き、もう一度FACS バッファーによる洗浄操作を行った。ほぐした細胞に、1 ウェル当り、FACS バッファーで10 μ g/mlに希釈したPE/Cy5 Rat Anti-Mouse CD8a Clone: 53-6.7 (BD Pharmingen) を50 μ l加えて、4°C暗所で30分間インキュベートした。

[0061] インキュベート後、200 μ lのFACS バッファーでの洗浄操作を2回行った後、ほぐした細胞に、1 ウェル当り、100 μ lのBD Cytofix/Cytoperm™ (BD Biosciences) を加えて、4°C暗所で20分間インキュベートした。インキュベート

後、200 μ lの1xBD Perm/Wash™ (BD biosciences)でFACS バッファーで行った洗浄操作と同様の操作を2回行った後、ほぐした細胞に、1xBD Perm/Wash™ で10 μ g/mlに希釈したPE anti-mouse IFN- γ Clone: XMG1.2 (BioLegend) を50 μ l加えて、4°C暗所で30分間インキュベートした。

[0062] インキュベート後、200 μ lの1xBD Perm/Wash™での洗浄操作を2回行った後、ほぐした細胞に、1 ウェル当り、100 μ lのFACS固定バッファー (1%ホルムアルデヒド, 1xFACS バッファー)を加えて、4°C 暗所でovernightインキュベートした。

[0063] インキュベート後、400 μ lのFACS バッファーを5 mlのポリスチレンチューブに加え、そこに100 μ lのFACS固定バッファーで固定したサンプルを加えた後、FACSscan (BD) でドットプロット解析を行った。解析にはCell Quest (BD) のソフトウェアを使用した。図4に、CD107-ICSの2次元解析の結果を示した。

[0064] 図4に示すように、いずれの測定結果においてもCTLエピトープペプチドのインキュベートによりCD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞数の割合が増大する場合、CD8陽性・CD107陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞数の割合も増大することがわかった。CD8陽性・CD107陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞は、細胞傷害活性を有することから、M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPによる免疫は、細胞傷害性を有するCTLを誘導できる可能性があることがわかった。

[0065] [実施例8] ⁵¹Chrome release解析

実施例7で示した、CD8陽性・CD107陽性・細胞内IFN- γ 陽性細胞が、細胞傷害することを示すために、⁵¹Chrome release解析を行った。免疫をしていないマウスから脾臓のリンパ球を実施例5と同様の方法で調製した。2 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地中の免疫していないマウスの脾臓リンパ球 2.4×10^8 cellsに、10 mMのM1のCTLエピトープのペプチド (GILGFVFTL, Operon) を4 μ l加え、15 mlチューブ中で、2時間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。インキュベート後、20 Gy (グレイ) のX線を照射した。照射後、室温、1,2000 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて

、ペレットをほぐした後、2 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加え、リンパ球を数えるために、490 μ lの2%酢酸溶液に10 μ lのリンパ球溶液を加え、ビュルケルチュルク血球計算版で、細胞数を算出し、 5×10^6 cells/mlとなるように10%FCS混入RPMI-1640 培地で希釈した。

[0066] 同時に、筋肉注射によって約50 μ gのM1-DE-VLP、及び、腹腔注射によって約50 μ gのM1-HI-VLPを免疫し、免疫1週間後、マウスから脾臓を摘出し、それぞれ5 mlのRPMI-1640 培地の入った ϕ 6 cm ディッシュに置いた。ピンセットを用いて脾臓を培地内で、良く揉みほぐし、培地に溶出されたリンパ球を含む溶液を15 ml チューブに移し、もう一度、 ϕ 6 cm ディッシュを5 mlのRPMI-1640 培地で洗浄し、上清をその15 ml チューブに加え、総量 10 mlとした。免疫をしたリンパ球は、血液を除かないので、すぐに15 ml チューブの底にたまる組織断片を残して、上清を再び新しい15 ml チューブに移し、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、2 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加え、リンパ球を数えるために、490 μ lの2%酢酸溶液に10 μ lのリンパ球溶液を加え、ビュルケルチュルク血球計算版で、細胞数を算出し、 5×10^6 cells/mlとなるように10%FCS混入RPMI-1640 培地で希釈した。

[0067] 48 ウェルのプレートに、1 ウェル当り、上記免疫を施していない、M1のCTLEエピトープのペプチドでインキュベートし、X線照射したリンパ球 5×10^6 cells/ml、500 μ lと、免疫したリンパ球 5×10^6 cells/ml、500 μ lを混合した。このウェルは1 サンプル当り、24 ウェル作製した。混合後、7日間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。

[0068] 7日間のインキュベート後、24 ウェル中のリンパ球を1本の50 mlチューブに集めて、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、2 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加え、リンパ球を数えるために、20 μ lの0.4%トリパンブルー溶液 (Gibco) に20 μ lのリンパ球溶液を加え、ビュルケルチュルク血球計算版で、細胞数を算出し、 7.5×10^6 cells/mlとなるように10%FCS混入RPMI-1640 培地で希

釈または濃縮した。この調製したリンパ球をエフェクター細胞とした。

[0069] 同時に、 1×10^6 cells/mlのRMA-HHD培養細胞を1 mlずつ、2本の15 mlチューブに分注し、片方のチューブには、10 mMのM1のCTLエピトープのペプチド (G ILGFVFTL, Operon) を5 μ l加え、2時間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。もう片方のチューブにはペプチドは加えなかった。インキュベート後、室温、1,000 rpmで5分間遠心し、細胞をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、100 μ Ci (マイクロシーベルト) のNa₂⁵¹CrO₄溶液を加え、30分間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。インキュベート後、室温、1,000 rpmで5分間遠心し、細胞をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、洗浄操作のために、1 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加え、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させ、上清を除いた。この洗浄操作を5回繰り返した。最後に、上清を除いた後、1 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加えた。新しい15 mlチューブに、この細胞溶液500 μ lと9.5 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を混合して20倍希釈した。この細胞溶液をターゲット細胞とした。

[0070] 96 ウェルプレートに、100 μ lのターゲット細胞 (5×10^3 cells) を分注し、そこに、エフェクター細胞：ターゲット細胞の比率が150：1となるように、エフェクター細胞を100 μ l (7.5×10^5 cells)、エフェクター細胞：ターゲット細胞の比率が30：1となるように、エフェクター細胞を20 μ l (1.5×10^5 cells)と80 μ lの10% FCS混入RPMI-1640 培地、エフェクター細胞：ターゲット細胞の比率が15：1となるように、エフェクター細胞を10 μ l (7.5×10^4 cells)と90 μ lの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加えた。ポジティブコントロールとして、100 μ lの5% Triton-X 100溶液、ネガティブコントロールとして、100 μ lの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加えた。混合後、4時間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。

[0071] インキュベート後、Supernatant collection system (Molecular Devices) を用いて、上清を回収し、AUTO WELL GAMMA SYSTEM (ARC-380CL, Aloka)、及び、ALOKA RIA Program (ARCAS ver. 3.11, Aloka)で、リリースされた⁵¹Cr

のガンマ線をカウントし、解析した。図5に⁵¹Chrome release解析の結果を示した。

[0072] 図5に示すように、M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPで免疫し、調製したリンパ球は、M1のCTLエピトープのペプチド（GILGFVFTL）を提示している細胞（図5のM1：58-66）を選択的に傷害することで、⁵¹Crのリリースを誘導することから、M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPによる免疫は、M1のCTLエピトープのペプチド（GILGFVFTL）を提示している細胞を選択的に傷害するCTLを誘導できることがわかった。

[0073] [実施例9] In vivo CTL解析

実施例8で示した、M1のCTLエピトープのペプチド（GILGFVFTL）を提示している細胞を選択的に傷害するCTLが、実際に動物体内でM1のCTLエピトープのペプチド（GILGFVFTL）を提示している細胞を選択的に傷害することを解析するために、In vivo CTL解析を行った。筋肉注射によって約50 µgのM1-DE-VLP、及び、腹腔注射によって約50 µgのM1-HI-VLPを免疫した。

[0074] 免疫1週間後、免疫していないマウス3匹から脾臓を摘出し、5 mlのRPMI-1640 培地の入ったφ6 cm ディッシュに置いた。ピンセットを用いて脾臓を培地内で、良く揉みほぐし、培地に溶出されたリンパ球を含む溶液を15 ml チューブに移し、もう一度、φ6 cm ディッシュを5 mlのRPMI-1640 培地で洗浄し、上清をその15 ml チューブに加え、総量 10 mlとした。免疫をしていないリンパ球は、血液を除かないので、すぐに15 ml チューブの底にたまる組織断片を残して、上清を再び新しい15 ml チューブに移し、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、2 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加えた。2本の15 mlチューブに調製した免疫をしていないリンパ球を1 mlずつ分注し、片方には、10 mMのM1のCTLエピトープのペプチド（GILGFVFTL、Operon）を1 µl加え、1時間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。インキュベート後、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、再び10 mlのRPMI-1640 培地を加え、室温、1,20

00 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、20 mlの0.1% BSA混入PBS(-)溶液を加え、CTLエプトープのペプチド (GILGFVFTL) でインキュベートしたリンパ球溶液には、10 μ lの5 mM carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes)、ペプチドでインキュベートしていないリンパ球溶液には、1 μ lの5 mM CFSEを加えて、よく混合した後、10分、37°Cのウォーターバスで振とう培養した。振とう後、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、10 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加え、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、2 mlの10% FCS混入RPMI-1640 培地を加え、リンパ球を数えるために、490 μ lの2%酢酸溶液に10 μ lのリンパ球溶液を加え、ビュルケルチュルク血球計算版で、細胞数を算出し、 5×10^7 cells/mlとなるように10%FCS混入RPMI-1640 培地で希釈または濃縮した。CFSEで標識したペプチドでインキュベートしていないリンパ球 5×10^7 cells/mlとインキュベートしたリンパ球 5×10^7 cells/mlを同量混合し、CFSE標識リンパ球溶液とした。

- [0075] 免疫をしていないマウス、筋肉注射によって約50 μ gのM1-DE-VLP、及び、腹腔注射によって約50 μ gのM1-HI-VLPを免疫し、一週間経過したマウス各々に、上記で調製したCFSE標識リンパ球溶液200 μ lを静脈注射し、一日経過させた。
- [0076] 一日経過後、マウスから脾臓を摘出し、5 mlのRPMI-1640 培地の入った ϕ 6 cm ディッシュに置いた。ピンセットを用いて脾臓を培地内で、良く揉みほぐし、培地に溶出されたリンパ球を含む溶液を15 ml チューブに移し、もう一度、 ϕ 6 cm ディッシュを5 mlのRPMI-1640 培地で洗浄し、上清をその15 ml チューブに加え、総量 10 mlとした。リンパ球は、血液を除かないので、すぐに15 ml チューブの底にたまる組織断片を残して、上清を再び新しい15 ml チューブに移し、室温、1,200 rpmで5分間遠心し、リンパ球をペレットに移行させた。上清を除いて、ペレットをほぐした後、1 mlのFACS固定バッフ

アー (1% ホルムアルデヒド, 1xFACS バッファー)を加えた。500 μ lのFACS バッファーを5 mlのポリスチレンチューブに加え、そこに200 μ lのFACS固定 バッファーで固定したリンパ球溶液を加えた後、FACSscan (BD) でヒストグラム解析を行った。解析にはCell Quest (BD) のソフトウェアを使用した。図6 に、In vivo CTL解析の結果を示した。

[0077] 図6に示すように、免疫していないマウスからリンパ球を調製した場合、CTLエピトープ配列を混合していないリンパ球 (図中のlowの位置に示される。) とCTLエピトープ配列を混合したリンパ球 (図中のhighの位置に示される。) の細胞数はほぼ同じであった。一方、M1-DE-VLP又はM1-HI-VLPで免疫したマウスからリンパ球を調製した場合、CTLエピトープ配列を混合していないリンパ球 (図中のlowの位置に示される。) に比べCTLエピトープ配列を混合したリンパ球 (図中のhighの位置に示される。) の細胞数は少なかった。このことから、M1-DE-VLP又はM1-HI-VLPでの免疫によって誘導されたCTLは、実際に動物体内でM1のCTLエピトープのペプチドを提示している細胞を選択的に傷害することがわかった。

[0078] [実施例10] リンパ球の成熟化解析

実施例5と同様の方法で、C57BL/6マウスの脾臓から赤血球を除いたリンパ球を精製し、 1×10^7 cells/mlとなるように10% FCS混入RPMI-1640 培地で希釈した。96 ウェルプレートに、a)何も加えない50% Opti-prep™ 溶液 (20 mM Tris-HCl(pH7.9), 50% Opti-prep™)を5 μ l、b)実施例3で調製したM1-DE-VLP溶液を5 μ l、もしくは、c)M1-HI-VLP溶液を5 μ l加え、そこに、上記で調製したリンパ球を50 μ l加え、1 ウェル当りの総量が200 μ lとなるように、10% FCS混入RPMI-1640 培地を加えた。ピペティングで混合した後、このプレートを6時間、または24時間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。

[0079] インキュベート後4°C、1,400 rpmでスピンドウンして上清を除き、ボルテックスミキサーで細胞をほぐした後、1 ウェル当り、FACS バッファー (2% FCS, 0.1% sodium azide, 1xPBS(-))を200 μ l加え、再び4°C、1,400 rpmでス

ピンダウンして上清を除き、細胞をほぐした後、FACS バッファーで10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したFITC Armenian Hamster Anti-Mouse CD80 Clone: 16-10A1 (BD Pharmingen)、または、FITC Rat Anti-Mouse CD86 Clone: GL-1 (BD Pharmingen)、もしくは、FITC Armenian Hamster Anti-Mouse CD40 Clone: HM40-3 (BD Pharmingen)を100 μl 加えて、4 $^{\circ}\text{C}$ 、暗所で30分間インキュベートした。

[0080] インキュベート後、200 μl のFACS バッファーでの洗浄操作を2回行った後、ほぐした細胞に、1 ウェル当り、100 μl のFACS固定バッファー (1%ホルムアルデヒド, 1xFACS バッファー) を加えて、4 $^{\circ}\text{C}$ 暗所でovernightインキュベートした。

[0081] インキュベート後、400 μl のFACS バッファーを5 mlのポリスチレンチューブに加え、そこに100 μl のFACS固定バッファーで固定したサンプルを加えた後、FACSscan (BD) でヒストグラム解析を行った。解析にはCell Quest (BD) のソフトウェアを使用した。図7に、ヒストグラムの結果を示した。

[0082] 図7に示すように、50% Opti-prepTM 溶液はCD80, CD86, CD40の成熟化マーカーの発現を誘導しないのに対し、M1-DE-VLPおよびM1-HI-VLP混入の溶液は、CD86, CD40の成熟化マーカーの発現を誘導した。CD86の発現は細胞傷害性T細胞の活性化に重要であることから、M1-DE-VLP及びM1-HI-VLPは細胞傷害性T細胞の活性化作用があることがわかった。

[0083] [実施例11] ウイルスチャレンジ実験

M1のCTLエピトープのペプチド (GILGFVFTL) を提示している細胞を選択的に傷害するCTLが、インフルエンザウイルス感染に与える影響を解析するために、ウイルスチャレンジ実験を行った。筋肉注射によって約50 μg のM1-DE-VLP、及び、腹腔注射によって約50 μg のM1-HI-VLPをHLA-A2トランスジェニックマウス (HHDマウス) に免疫した。

[0084] 免疫1週間後、インフルエンザウイルス (A/H1N1/PR8、および、A/H3N2/Aichi) をtissue culture influenza virus infectious dose (TCID₅₀) で100 TCID₅₀/20 μl となるようにPBS(-)で希釈し、この希釈溶液20 μl を、免疫したマウスに麻酔を施した後、経鼻感染させた。

[0085] 感染4日後に、マウス肺を取り出し、1 mlのPBS(-)を加えた後、ティッシュホモジナイザー（ガラスホモジナイザー、イボ付き、10 ml、812-770-02、池本理化）で組織が見えなくなるまですりつぶした後、溶液を15 mlチューブに移した。遠心機で4°C、2000 rpm、5分間遠心し、上清をスクリーキャップ付きの2 mlチューブに移した。鶏の赤血球を加えることによる赤血球の凝集からインフルエンザウイルス量を算出するために、マウス肺をすりつぶした上清100 μ lを丸底の96穴プレートのレーンAに加え、レーンBからGには5%FCS混入DMEM培地を90 μ l加え、ネガティブコントロールとしてレーンHに5%FCS混入DMEM培地を100 μ l加えた。レーンAから10 μ lをレーンBに移動させ、ピペティングで懸濁した後、レーンBから10 μ lをレーンCに移動させ懸濁するという繰り返し操作を、レーンGまで行い、インフルエンザウイルス感染肺上清の10倍希釈系列を作製した。平均を算出するために、1サンプル当たり、この系列を5つ作製した。この系列全てに 2.5×10^5 cells/mlのMDCK細胞を100 μ lずつ加えた後、24時間、35°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。インキュベート後、培養上清をピペットで全て取り除き、200 μ lの0.0002% trypsin混入 (2 μ l/ml trypsin) DMEM培地を加えた後、さらに3日間、35°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。インキュベート後、50 μ lの0.8%ニワトリ血液（ニワトリ保存血液、0109-1、日本バイオテスト研究所）を加え、4°Cで1時間静置した。赤血球の凝集の分布から、tissue culture influenza virus infectious dose (TCID₅₀) を算出した。

[0086] 図8aに示すように、M1-DE-VLPおよびM1-HI-VLPで免疫したマウス肺におけるインフルエンザウイルスタイターは、免疫を行わなかったマウスと比較して、およそ10倍低いことから、M1-DE-VLPおよびM1-HI-VLP免疫はインフルエンザウイルスの肺での増殖を抑制する効果があることが示唆された。

[0087] また、インフルエンザウイルス (A/H1N1/PR8) 感染後から、マウスの体重を2週間毎日計測し、感染前の体重を100%としたときの体重変化を記録した。図8bに示すように、M1-DE-VLPおよびM1-HI-VLPで免疫したマウスの体重はおおよそ元の体重を維持するのに対し、免疫を行わなかったマウスでは、著し

い体重減少が観察されたことから、M1-DE-VLPおよびM1-HI-VLPによる免疫は、インフルエンザウイルス感染による体重減少の抑制にも効果があることが示唆された。

[0088] [実施例 1 2] がんCTLエピトープを挿入したVLP免疫

実施例 1 から 3 と同じ方法で、M1のCTLエピトープ配列 (GILGFVFTL) の代わりに、がん抗原として知られているWT1のHLA-A2に対するCTLエピトープ配列 (RMFPNAPYL) を挿入したVLPを調製した (WT1WT-DE-VLP、WT1WT-HI-VLP) (図 9-a)。実施例 4 から 6 と同じ方法で、HLA-A2トランスジェニックマウスに免疫し、リンパ球を調製、WT1のCTLエピトープ配列に対するICS解析を行った (図 9-b)。また、実施例 8 と同様の方法により、WT1のCTLエピトープ配列に対する⁵¹Chrome release解析を行った。

[0089] 図 9 に示すように、M1のCTLエピトープ配列を挿入したVLPと同様に、WT1のCTLエピトープ配列を挿入したVLPを調製し (図 9-a)、免疫する事で、WT1のCTLエピトープ配列 (RMFPNAPYL) に対するCTLが誘導され (図 9-b)、誘導されたWT1のCTLエピトープに対するCTLがWT1のCTLエピトープ配列を提示している細胞を選択的に障害することが明らかになった (図 9-c)。このことから、VLPが様々なCTLエピトープ配列に対するCTLを誘導することができる有用なキャリアであることが示された。

[0090] [実施例 1 3] M1 CTL peptide懸濁IFA乳濁液によるCTL誘導のICS解析

実施例 3 から 6 と同様の方法によって、M1-DE-VLP (図 10, 右上図) 及びM1-HI-VLP (図 10, 右下図) のICS解析を行った。免疫は、実施例 4 と同様に調製した100 μ lのM1-DE-VLP及びM1-HI-VLPのペレット溶液を鼠蹊部皮下 (subcutaneous, s.c.) に注射することによって行った。

[0091] 一方、M1のCTLエピトープのペプチド (GILGFVFTL) を懸濁したIFA乳濁液は、20 μ g/ μ lの濃度のDMSO溶媒に溶解させたGILGFVFTLペプチド (Operon) 50 μ lを、450 μ lのPBS(-)で希釈し、500 μ lのincomplete freund' s adjuvant (IFA) (Sigma) と共にTwo-syringe法 (GPシリンジコネクタ, NIPRO) (Inject 2 ml, B. BRAUN) で混和することで調製した。調製した乳濁液100 μ lを

鼠蹊部皮下 (subcutaneous, s.c.) に注射することによって免疫を行った。一回免疫 (図 10, 左上図)、及び、一回免疫一週間後に二回目の免疫 (図 10, 左下図) を行って一週間経過したマウスを用いて実施例 5 から 6 と同様の方法によってICS解析を行った。

[0092] 図 10 に示すように、M1 CTL peptide懸濁IFA乳濁液によって一回免疫、二回免疫したマウス脾臓リンパ球よりも、M1-DE-VLPおよびM1-HI-VLPで一回免疫したマウスの脾臓リンパ球の方が、M1 CTL peptideとのインキュベーションによって誘導されるCD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性CTLの割合が高かった。このことから、古典的なアジュバントとして知られているIFAよりもVLPを用いて構築した本発明の細胞傷害性T細胞誘導剤の方がCD8陽性・細胞内IFN- γ 陽性CTLの誘導効率が良いことが示唆された。

[0093] [実施例 14] 脾臓リンパ球のIL-12の分泌量のELISA解析

実施例5と同様の方法で、HLA-A2トランスジェニックマウスの脾臓から赤血球を除いたリンパ球を精製し、 1×10^7 cells/mlとなるように10% FCS混入RPMI-1640 培地で希釈した。96 ウェルプレートに、a)何も加えない50% Opti-prepTM 溶液 (20 mM Tris-HCl(pH7.9), 50% Opti-prepTM) を5 μ l、b)高度に精製された野生型SV40 VP1-VLP (500 ng/ μ l) を5 μ l、c)実施例3で調製したM1-DE-VLP溶液を5 μ l、もしくは、d)M1-HI-VLP溶液を5 μ l加え、そこに、上記で調製したリンパ球を50 μ l加え、1 ウェル当りの総量が200 μ lとなるように、10%FCS混入RPMI-1640 培地を加えた。または、上記で精製したリンパ球50 μ lに10% FCS混入RPMI-1640 培地で100 ng/ μ lとなるように希釈したLPS (Sigma) を150 μ l加えた。ピペティングで混合した後、このプレートを6時間、または24時間、37°C、5% CO₂ incubatorでインキュベートした。インキュベート後4°C、1,400 rpmでスピンドウンして上清をエッペンドルフチューブに回収し、4°C、15,000 rpmでスピンドウンして上清を新しいエッペンドルフチューブに回収した。回収した培養上清の50 μ lをIL-12のenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Mouse Total IL-12 ELISA Kit, Thermo SCIENTIFIC) でキットのプロトコールに従って解析し、培養上清中のIL-12の濃度を

算出した（図11）。

[0094] 図11に示すように、マウスのリンパ球と外来のM1のCTLエピトープをVLPのDEループまたはHIRループに挿入したVLP（M1-DE-VLP、M1-HI-VLP）でインキュベートすると、野生型のSV40 VP1 VLPと比べて培養上清中のIL-12の濃度が約20倍増大したことから、外来のエピトープを挿入することで、野生型のVLPよりも、アジュバントとしての活性が増強され、細胞傷害性T細胞誘導剤としての効果が増大することが示された。

産業上の利用可能性

[0095] 本発明は、ウイルス性疾患や癌の予防薬や治療薬として有用なので、製薬などの産業分野において利用可能である。

[0096] 本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願（特願2011-107874号及び特願2011-191208号）の明細書および／または図面に記載されている内容を包含する。また、本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子を含有する細胞傷害性T細胞誘導剤であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中にT細胞エピトープペプチドが挿入されていることを特徴とする細胞傷害性T細胞誘導剤。
- [請求項2] T細胞エピトープペプチドが、ウイルスタンパク質由来のペプチドであることを特徴とする請求項1に記載の細胞傷害性T細胞誘導剤。
- [請求項3] T細胞エピトープペプチドが、インフルエンザウイルスのHA、NA、M1、M2、NP、NS1、NS2、PA、PB1、PB2、又はPB1-F2由来のペプチドであることを特徴とする請求項1に記載の細胞傷害性T細胞誘導剤。
- [請求項4] T細胞エピトープペプチドが、癌細胞に特異的なタンパク質由来のペプチドであることを特徴とする請求項1に記載の細胞傷害性T細胞誘導剤。
- [請求項5] T細胞エピトープペプチドが、Melan-A/MART-1、gp100、MAGE-A3、MAGE-A10、CEA、HER2/new、NY-E50-1、WT-1、又はhTERT由来のペプチドであることを特徴とする請求項1に記載の細胞傷害性T細胞誘導剤。
- [請求項6] T細胞エピトープペプチドが、配列番号1乃至39のいずれかの配列番号に記載されたアミノ酸配列からなるペプチドであることを特徴とする請求項1に記載の細胞傷害性T細胞誘導剤。
- [請求項7] シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中にウイルスタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子を、ヒト以外の動物に投与することを特徴とするヒト以外の動物のウイルス性疾患の予防又は治療方法。
- [請求項8] シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中に癌細胞に特異的なタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子を、ヒト以外の動物に投与することを特徴とするヒト以外の動物

の癌の予防又は治療方法。

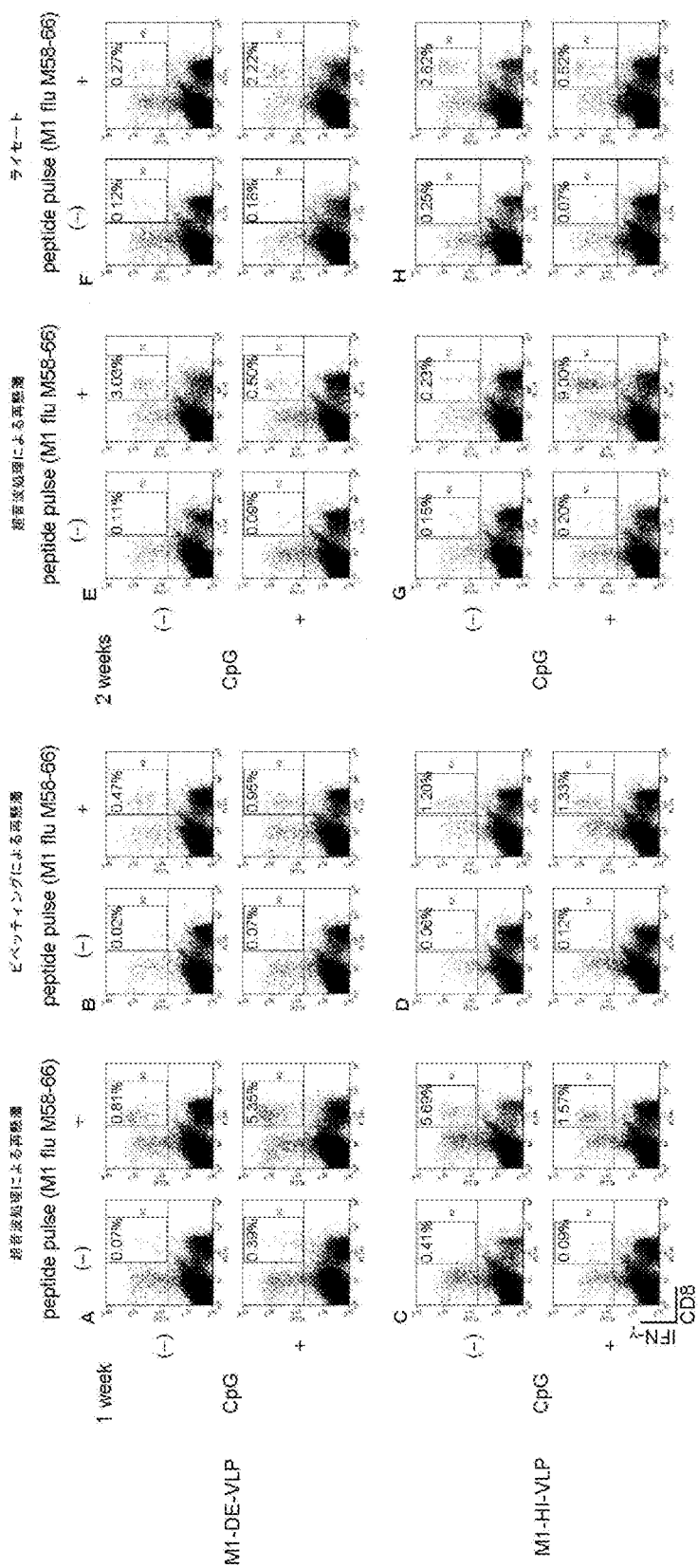
[請求項9]

シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中にウイルスタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子を、ヒトに投与することを特徴とするヒトのウイルス性疾患の予防又は治療方法。

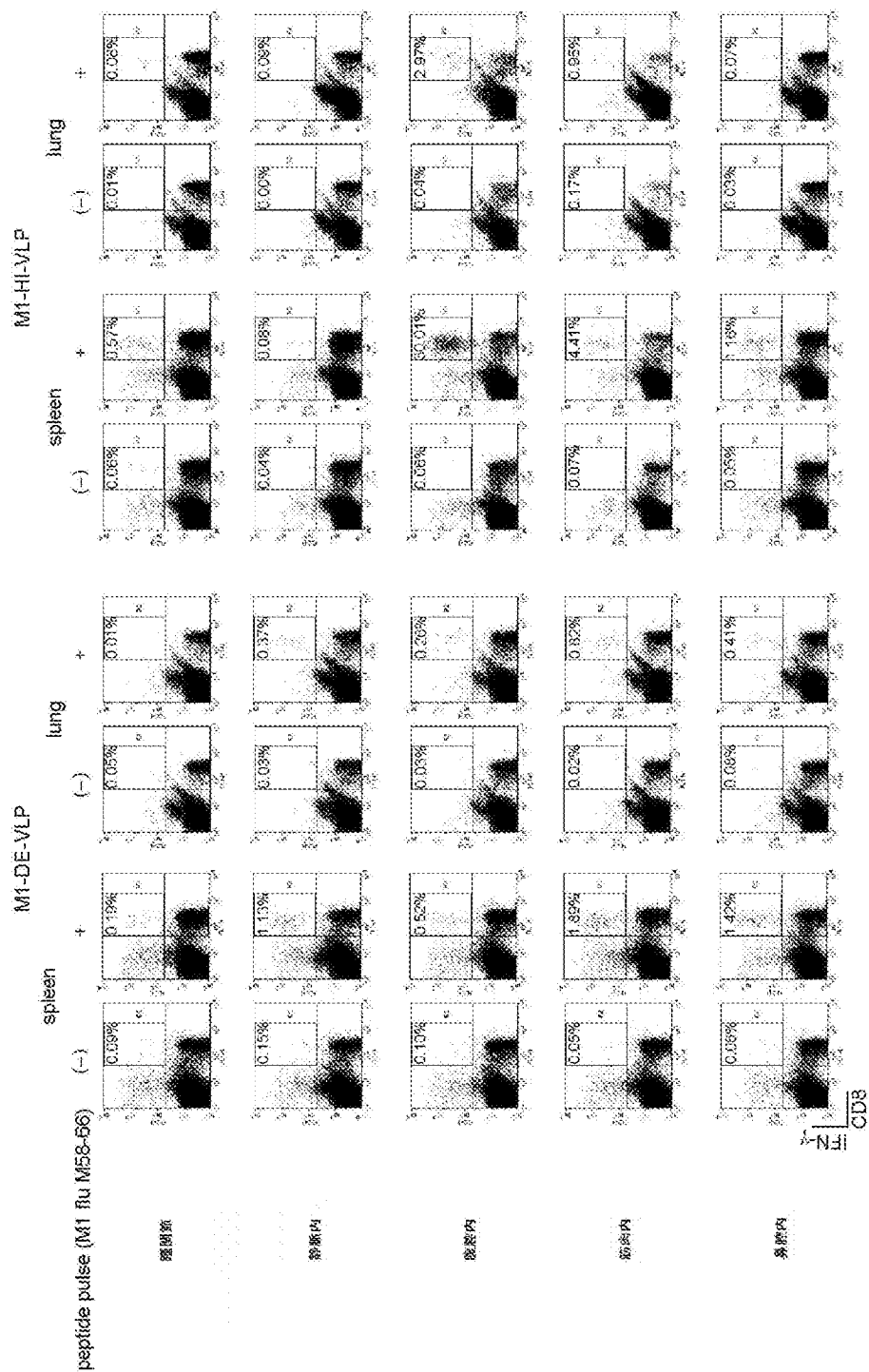
[請求項10]

シミアンウイルス40のVP1から構成されるウイルス様粒子であって、前記VP1のDEループ及び／又はHIループ中に癌細胞に特異的なタンパク質由来のT細胞エピトープペプチドが挿入されているウイルス様粒子を、ヒトに投与することを特徴とするヒトの癌の予防又は治療方法。

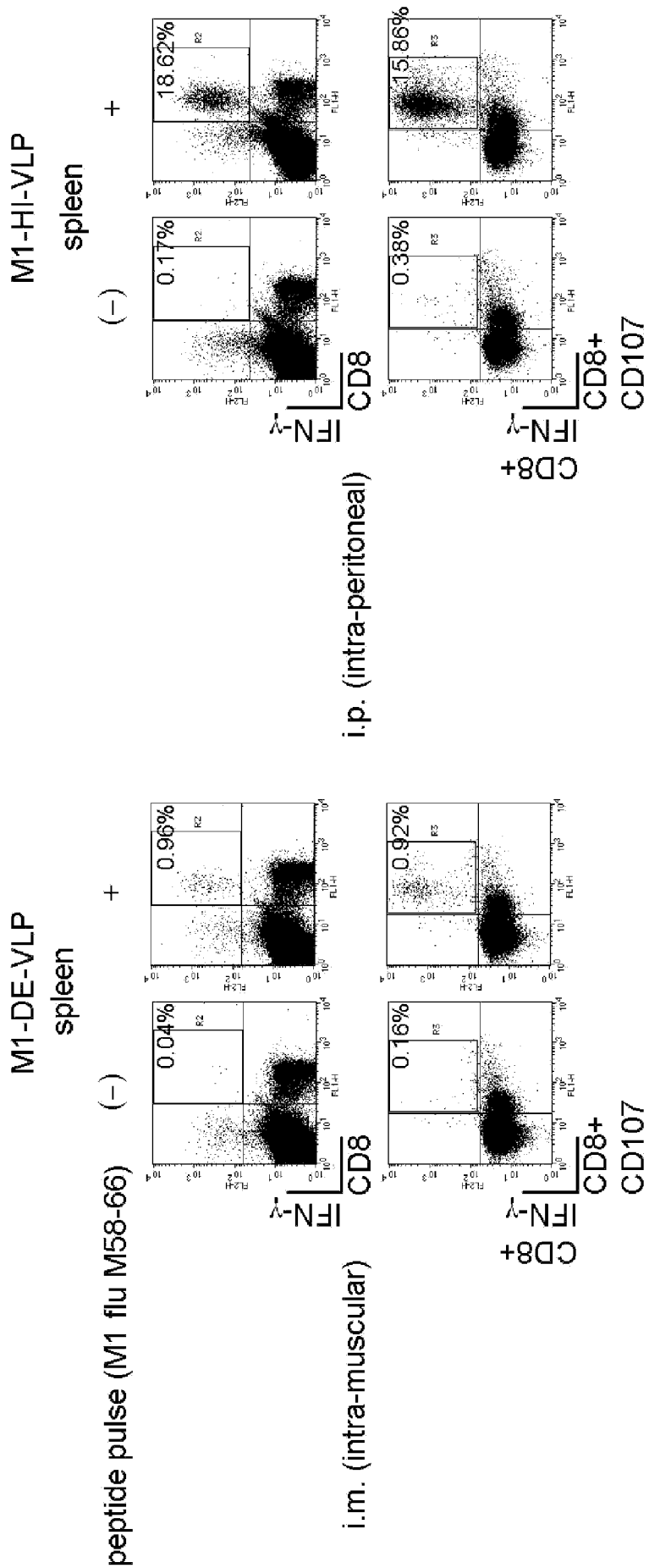
[図2]



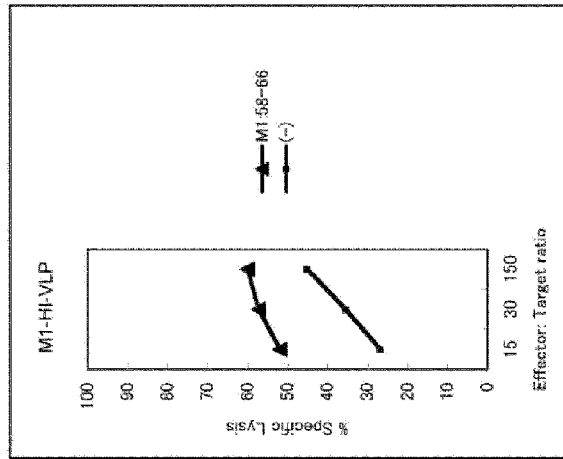
[図3]



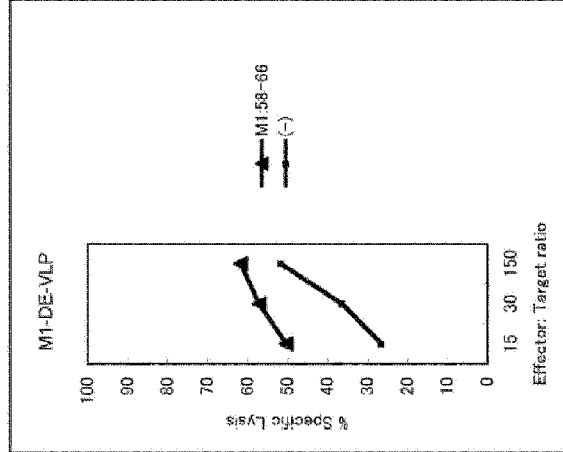
[圖4]



[図5]

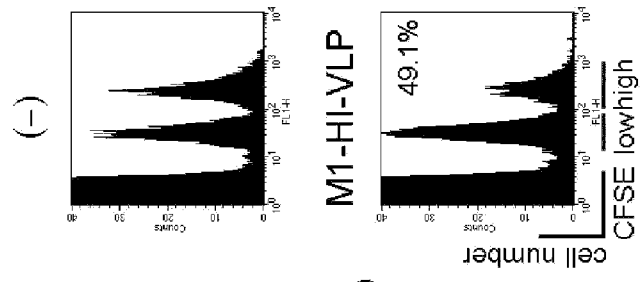


M1-HI-VLP
immunization route:
i.p. (intra-peritoneal)

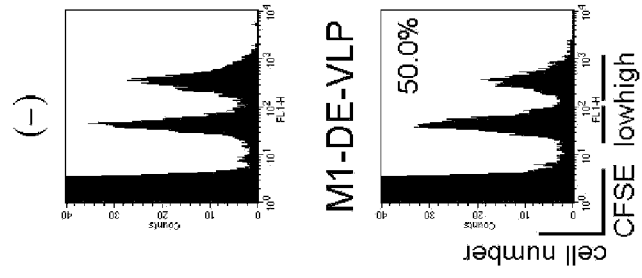


M1-DE-VLP
immunization route:
i.m. (intra-muscular)

[図6]



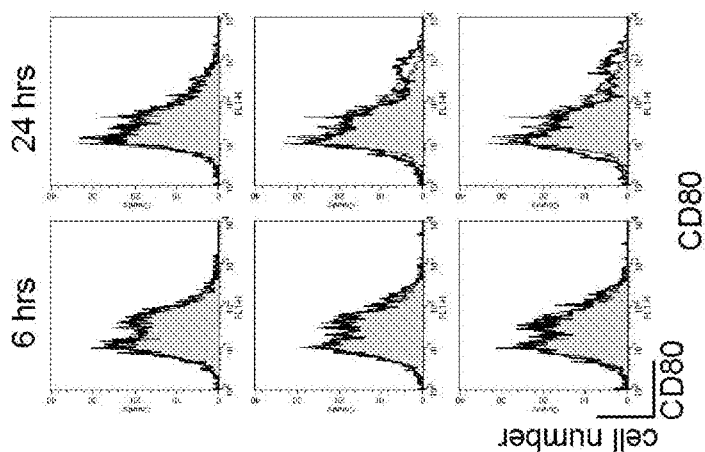
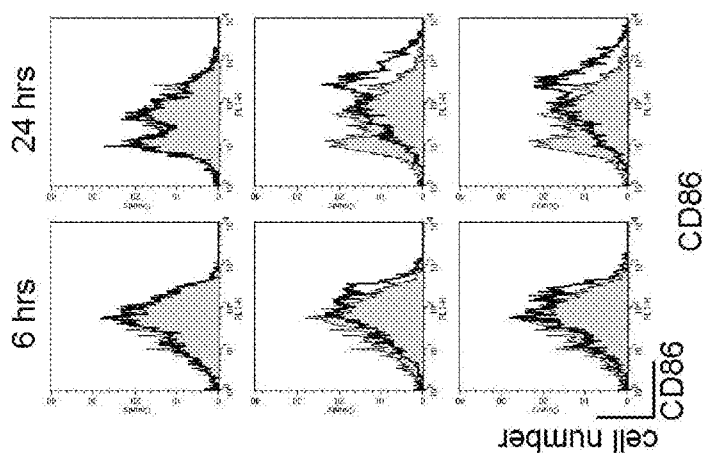
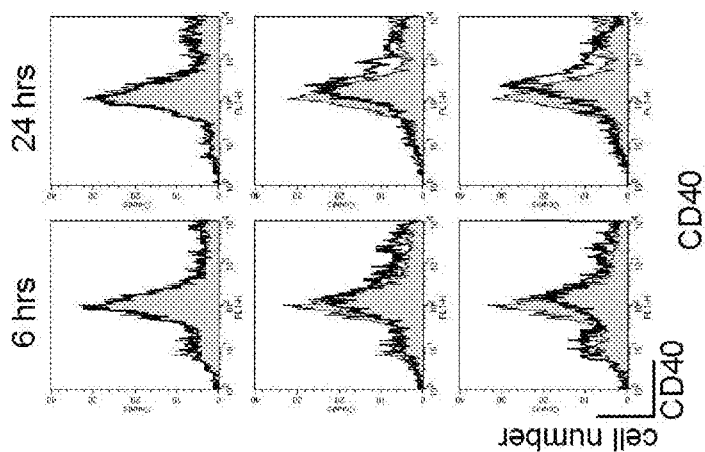
M1-HI-VLP
immunization route:
i.p. (intra-peritoneal)



M1-DE-VLP
immunization route:
i.m. (intra-muscular)

[7]

VLP preparation: pellet (resuspend sonication)



Opti-prep

M1-DE-VLP

M1-HI-VLP

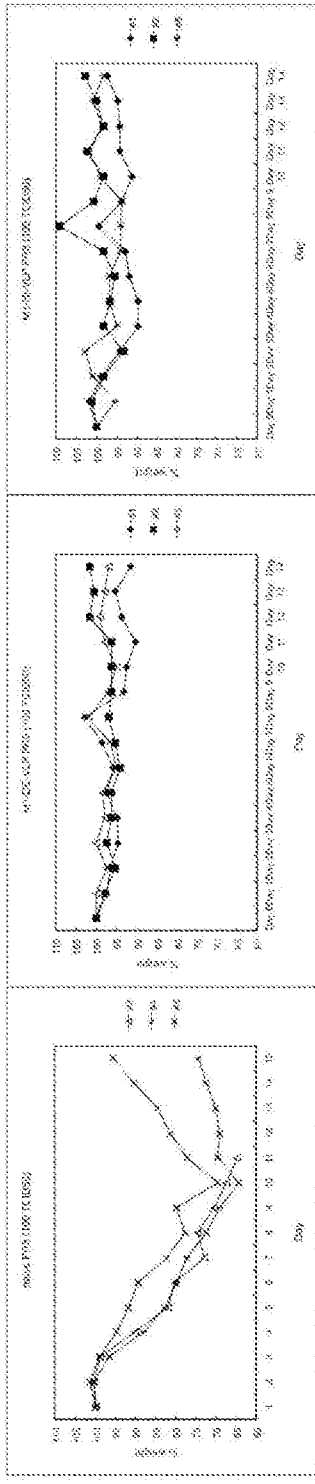


a

WZ (transmission: public (business) services)

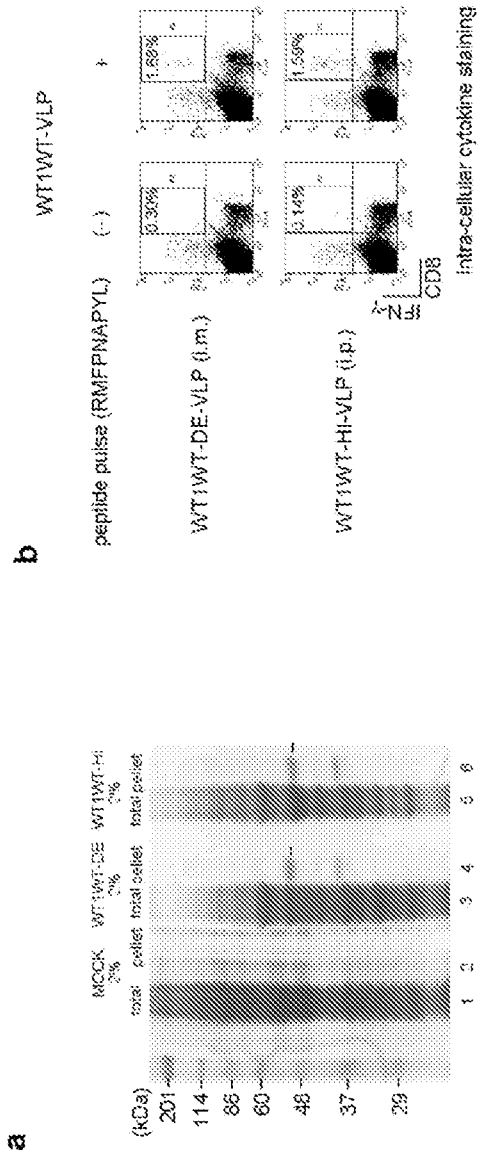
Account No.	Account Name	Account No.	Account Name
001-001-001	001-001-001	001-001-001	001-001-001
001-001-002	001-001-002	001-001-002	001-001-002
001-001-003	001-001-003	001-001-003	001-001-003
001-001-004	001-001-004	001-001-004	001-001-004
001-001-005	001-001-005	001-001-005	001-001-005
001-001-006	001-001-006	001-001-006	001-001-006
001-001-007	001-001-007	001-001-007	001-001-007
001-001-008	001-001-008	001-001-008	001-001-008
001-001-009	001-001-009	001-001-009	001-001-009
001-001-010	001-001-010	001-001-010	001-001-010
001-001-011	001-001-011	001-001-011	001-001-011
001-001-012	001-001-012	001-001-012	001-001-012
001-001-013	001-001-013	001-001-013	001-001-013
001-001-014	001-001-014	001-001-014	001-001-014
001-001-015	001-001-015	001-001-015	001-001-015
001-001-016	001-001-016	001-001-016	001-001-016
001-001-017	001-001-017	001-001-017	001-001-017
001-001-018	001-001-018	001-001-018	001-001-018
001-001-019	001-001-019	001-001-019	001-001-019
001-001-020	001-001-020	001-001-020	001-001-020
001-001-021	001-001-021	001-001-021	001-001-021
001-001-022	001-001-022	001-001-022	001-001-022
001-001-023	001-001-023	001-001-023	001-001-023
001-001-024	001-001-024	001-001-024	001-001-024
001-001-025	001-001-025	001-001-025	001-001-025
001-001-026	001-001-026	001-001-026	001-001-026
001-001-027	001-001-027	001-001-027	001-001-027
001-001-028	001-001-028	001-001-028	001-001-028
001-001-029	001-001-029	001-001-029	001-001-029
001-001-030	001-001-030	001-001-030	001-001-030
001-001-031	001-001-031	001-001-031	001-001-031
001-001-032	001-001-032	001-001-032	001-001-032
001-001-033	001-001-033	001-001-033	001-001-033
001-001-034	001-001-034	001-001-034	001-001-034
001-001-035	001-001-035	001-001-035	001-001-035
001-001-036	001-001-036	001-001-036	001-001-036
001-001-037	001-001-037	001-001-037	001-001-037
001-001-038	001-001-038	001-001-038	001-001-038
001-001-039	001-001-039	001-001-039	001-001-039
001-001-040	001-001-040	001-001-040	001-001-040
001-001-041	001-001-041	001-001-041	001-001-041
001-001-042	001-001-042	001-001-042	001-001-042
001-001-043	001-001-043	001-001-043	001-001-043
001-001-044	001-001-044	001-001-044	001-001-044
001-001-045	001-001-045	001-001-045	001-001-045
001-001-046	001-001-046	001-001-046	001-001-046
001-001-047	001-001-047	001-001-047	001-001-047
001-001-048	001-001-048	001-001-048	001-001-048
001-001-049	001-001-049	001-001-049	001-001-049
001-001-050	001-001-050	001-001-050	001-001-050
001-001-051	001-001-051	001-001-051	001-001-051
001-001-052	001-001-052	001-001-052	001-001-052
001-001-053	001-001-053	001-001-053	001-001-053
001-001-054	001-001-054	001-001-054	001-001-054
001-001-055	001-001-055	001-001-055	001-001-055
001-001-056	001-001-056	001-001-056	001-001-056
001-001-057	001-001-057	001-001-057	001-001-057
001-001-058	001-001-058	001-001-058	001-001-058
001-001-059	001-001-059	001-001-059	001-001-059
001-001-060	001-001-060	001-001-060	001-001-060
001-001-061	001-001-061	001-001-061	001-001-061
001-001-062	001-001-062	001-001-062	001-001-062
001-001-063	001-001-063	001-001-063	001-001-063
001-001-064	001-001-064	001-001-064	001-001-064
001-001-065	001-001-065	001-001-065	001-001-065
001-001-066	001-001-066	001-001-066	001-001-066
001-001-067	001-001-067	001-001-067	001-001-067
001-001-068	001-001-068	001-001-068	001-001-068
001-001-069	001-001-069	001-001-069	001-001-069
001-001-070	001-001-070	001-001-070	001-001-070
001-001-071	001-001-071	001-001-071	001-001-071
001-001-072	001-001-072	001-001-072	001-001-072
001-001-073	001-001-073	001-001-073	001-001-073
001-001-074	001-001-074	001-001-074	001-001-074
001-001-075	001-001-075	001-001-075	001-001-075
001-001-076	001-001-076	001-001-076	001-001-076
001-001-077	001-001-077	001-001-077	001-001-077
001-001-078	001-001-078	001-001-078	001-001-078
001-001-079	001-001-079	001-001-079	001-001-079
001-001-080	001-001-080	001-001-080	001-001-080
001-001-081	001-001-081	001-001-081	001-001-081
001-001-082	001-001-082	001-001-082	001-001-082
001-001-083	001-001-083	001-001-083	001-001-083
001-001-084	001-001-084	001-001-084	001-001-084
001-001-085	001-001-085	001-001-085	001-001-085
001-001-086	001-001-086	001-001-086	001-001-086
001-001-087	001-001-087	001-001-087	001-001-087
001-001-088	001-001-088	001-001-088	001-001-088
001-001-089	001-001-089	001-001-089	001-001-089
001-001-090	001-001-090	001-001-090	001-001-090
001-001-091	001-001-091	001-001-091	001-001-091
001-001-092	001-001-092	001-001-092	001-001-092
001-001-093	001-001-093	001-001-093	001-001-093
001-001-094	001-001-094	001-001-094	001-001-094
001-001-095	001-001-095	001-001-095	001-001-095
001-001-096	001-001-096	001-001-096	001-001-096
001-001-097	001-001-097	001-001-097	001-001-097
001-001-098	001-001-098	001-001-098	001-001-098
001-001-099	001-001-099	001-001-099	001-001-099
001-001-100	001-001-100	001-001-100	001-001-100

b

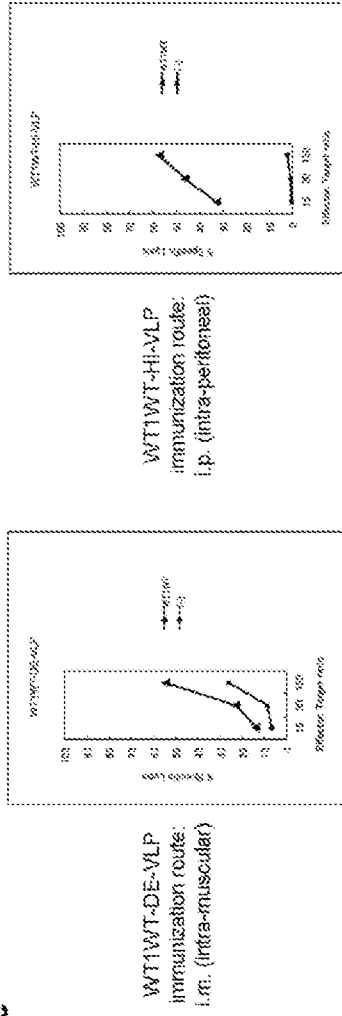


[9]

VLP preparation: pellet (resuspend sonication)



c



[10]

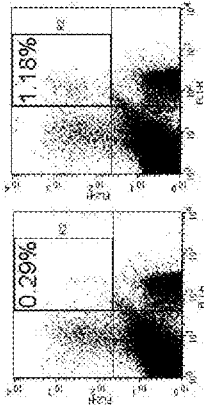
M1-VLPs

spleen

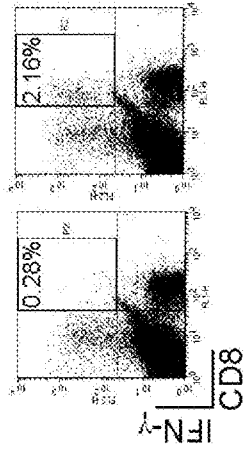
+

(-)

peptide pulse (M1: 58-66)



M1-DE-VLP
one time immunization
s.c. (sub-cutaneous)



M1-HI-VLP
one time immunization
s.c. (sub-cutaneous)

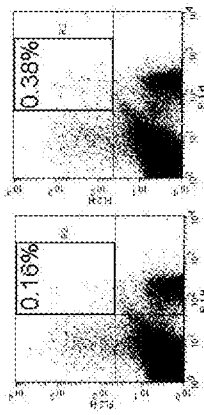
IFA (M1: 58-66)

spleen

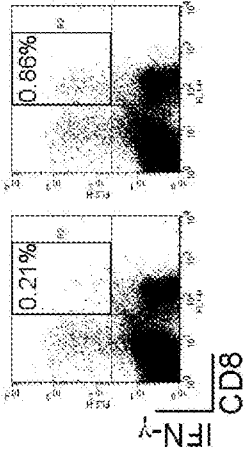
+

(-)

peptide pulse (M1: 58-66)



one time immunization
s.c. (sub-cutaneous)



two time immunization
s.c. (sub-cutaneous)

[11]

sample	incubation time (hrs)	IL-12 concentration (pg/ml)
optiprep	6 hrs	2.4442
	24 hrs	174.4403
wild-type-VLP	6 hrs	11.9243
	24 hrs	182.5661
M1-DE-VLP	6 hrs	1684.4848
	24 hrs	4012.5265
H1-DE-VLP	6 hrs	1719.6966
	24 hrs	4093.7845
LPS	6 hrs	301.7445
	24 hrs	548.2271

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060910

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K39/00(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61K39/145
(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/025
(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

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)

A61K39/00, A61K35/76, A61K39/12, A61K39/145, A61P31/12, A61P35/00,
C07K14/025, C12N15/09

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Dorn D.C. et al., Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope., Viral Immunology, 2008, Vol.21, No.1, pages 12 to 26, ISSN: 0882-8245	1-8
Y	Tegerstedt K. et al., A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors., Cancer Research, 2005, Vol.65, No.13, pages 5953 to 5957, ISSN: 0008-5472	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 June, 2012 (18.06.12)

Date of mailing of the international search report
26 June, 2012 (26.06.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060910

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Sominskaya I. et al., Construction and immunological evaluation of multivalent hepatitis B virus (HBV) core virus-like particles carrying HBV and HCV epitopes., <i>Clinical and Vaccine Immunology</i> , 2010, Vol.17, No.6, pages 1027 to 1033, ISSN: 1556-6811	1-8
Y	Zhang Y. et al., Generation of chimeric HBc proteins with epitopes in E.coli: formation of virus-like particles and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and anti-tumor effect in vivo., <i>Cellular Immunology</i> , 2007, Vol.247, No.1, pages 18 to 27, ISSN: 0008-8749	1-8
Y	Lacasse P. et al., Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation., <i>Journal of Virology</i> , 2008, Vol.82, No.2, pages 785 to 794, ISSN: 0022-538X	1-8
Y	Takahashi R.U. et al., Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles., <i>Journal of Biotechnology</i> , 2008, Vol.135, No.4, pages 385 to 392, ISSN: 0168-1656	1-8
Y	WO 2006/088229 A1 (The Circle for the Promotion of Science and Engineering), 24 August 2006 (24.08.2006), entire text; particularly, examples 2, 4, 5 & EP 1849799 A1 & US 2009/0298955 A1	1-8
Y	Ryou TAKAHASHI et al., "Gairaisei Epitope o Donyu shita SV40 Shuyo Kozo Tanpakushitsu VP1 kara naru Kaihengata Virus-yo Ryushi no Sakusei", <i>The Japanese Society of Virology Gakujutsu Shukai Program Shoroku-shu</i> , 2005, vol.53, page 216, P1032	1-8
Y	Matsui M. et al., A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice., <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , 2010, Vol.391, No.3, pages 1494 to 1499, ISSN: 0006-291X	3,6
Y	Rezvani K. et al., Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies., <i>Blood</i> , 2008, Vol.111, No.1, pages 236 to 242, ISSN: 0006-4971	5,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/060910

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.: 9, 10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 9 and 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out a search under the provision of PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/00(2006.01)i, A61K35/76(2006.01)i, A61K39/12(2006.01)i, A61K39/145(2006.01)i, A61P31/12(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K14/025(2006.01)n, C12N15/09(2006.01)n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K39/00, A61K35/76, A61K39/12, A61K39/145, A61P31/12, A61P35/00, C07K14/025, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2012年
日本国実用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録実用新案公報	1994-2012年

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

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Dorn D. C. et al., Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope., Viral Immunology, 2008, Vol.21, No.1, pages 12 to 26, ISSN: 0882-8245	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.06.2012

国際調査報告の発送日

26.06.2012

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小森 潔

4U

3762

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Tegerstedt K. et al., A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors., Cancer Research, 2005, Vol.65, No.13, pages 5953 to 5957, ISSN: 0008-5472	1-8
Y	Sominskaya I. et al., Construction and immunological evaluation of multivalent hepatitis B virus (HBV) core virus-like particles carrying HBV and HCV epitopes., Clinical and Vaccine Immunology, 2010, Vol.17, No.6, pages 1027 to 1033, ISSN: 1556-6811	1-8
Y	Zhang Y. et al., Generation of chimeric HBc proteins with epitopes in E.coli: formation of virus-like particles and a potent inducer of antigen-specific cytotoxic immune response and anti-tumor effect in vivo., Cellular Immunology, 2007, Vol.247, No.1, pages 18 to 27, ISSN: 0008-8749	1-8
Y	Lacasse P. et al., Novel plant virus-based vaccine induces protective cytotoxic T-lymphocyte-mediated antiviral immunity through dendritic cell maturation., Journal of Virology, 2008, Vol.82, No.2, pages 785 to 794, ISSN: 0022-538X	1-8
Y	Takahashi R.U. et al., Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles., Journal of Biotechnology, 2008, Vol.135, No.4, pages 385 to 392, ISSN: 0168-1656	1-8
Y	WO 2006/088229 A1 (財団法人理工学振興会) 2006.08.24, 文献全体、特に、実施例2、4、5 & EP 1849799 A1 & US 2009/0298955 A1	1-8
Y	高橋陵宇他, 外来性エピトープを導入したSV40主要構造タンパク質VP1からなる改変型ウイルス様粒子の作製, 日本ウイルス学会学術集会プログラム・抄録集, 2005, Vol.53, page 216, P1032	1-8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Matsui M. et al., A CTL-based liposomal vaccine capable of inducing protection against heterosubtypic influenza viruses in HLA-A*0201 transgenic mice., Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010, Vol.391, No.3, pages 1494 to 1499, ISSN: 0006-291X	3,6
Y	Rezvani K. et al., Leukemia-associated antigen-specific T-cell responses following combined PR1 and WT1 peptide vaccination in patients with myeloid malignancies., Blood, 2008, Vol.111, No.1, pages 236 to 242, ISSN: 0006-4971	5,6

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 9, 1 0 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、請求項 9, 1 0 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。