

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6655626号
(P6655626)

(45) 発行日 令和2年2月26日(2020.2.26)

(24) 登録日 令和2年2月5日(2020.2.5)

(51) Int.Cl.	F 1		
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 3/10	(2006.01)	A 6 1 P 3/10	
C 0 7 K 9/00	(2006.01)	C 0 7 K 9/00	

請求項の数 31 (全 37 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-540316 (P2017-540316)	(73) 特許権者	517133976 イムサイス エスエー I M C Y S E S A ベルギー、ビー-4000 リエージュ、 アヴェニュ ド ロピタル 1、ギガ ビ -34 G 1 G A B 3 4, A v e n u e d e l ' H o p i t a l 1, B - 4 0 0 O L i e g e, B e l g i u m
(86) (22) 出願日	平成27年10月16日(2015.10.16)		
(65) 公表番号	特表2018-504419 (P2018-504419A)		
(43) 公表日	平成30年2月15日(2018.2.15)		
(86) 國際出願番号	PCT/EP2015/074063		
(87) 國際公開番号	W02016/059236		
(87) 國際公開日	平成28年4月21日(2016.4.21)		
審査請求日	平成30年10月12日(2018.10.12)		
(31) 優先権主張番号	1418433.7	(74) 代理人	100065248 弁理士 野河 信太郎
(32) 優先日	平成26年10月17日(2014.10.17)	(74) 代理人	100159385 弁理士 甲斐 伸二
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)	(74) 代理人	100163407 弁理士 金子 裕輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規な免疫原性ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗原のMHCクラスII T細胞エピトープと、該エピトープと直接接して又は該エピトープから最大で7アミノ酸離れて、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、配列番号90若しくは配列番号91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、配列番号92若しくは配列番号93)のレドックスモチーフ配列とを含む13~100アミノ酸の免疫原性ペプチドを含んでなる、前記抗原に対する免疫応答の低減用又は防止用医薬組成物。

【請求項 2】

前記抗原が、その配列内に、前記エピトープの10アミノ酸以内の距離に前記レドックスモチーフを含まないか、又は前記抗原がその配列内に前記レドックスモチーフを含まない、請求項1に記載の医薬組成物。

10

【請求項 3】

モチーフがH-X-C-X(2)-[CST] (配列番号90)若しくは[CST]-X(2)-C-X-H (配列番号92)のレドックスモチーフ配列であるか、又はモチーフがH-C-X(2)-[CST] (配列番号78)若しくは[CST]-X(2)-C-H (配列番号79)のレドックスモチーフ配列であるか、又はモチーフがH-X(0,2)-C-X(2)-C (配列番号80、配列番号96若しくは配列番号97)若しくはC-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号83、配列番号94若しくは配列番号95)であるか、又はモチーフがH-C-X(2)-C (配列番号80)若しくはC-X(2)-C-H (配列番号83)である、請求項1又は2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

20

ペプチドが13～75アミノ酸長、好ましくは13～50アミノ酸長、より好ましくは13～30アミノ酸長を有する、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項5】

MHCクラスII T細胞エピトープが、前記モチーフと、最大で4アミノ酸の配列、好ましくは2アミノ酸の配列により分離されている、請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項6】

レドックスモチーフ内のXがGly若しくはProであるか、又はレドックスモチーフ内のXがCysでないか、又はレドックスモチーフのHisとその近接Cysとの間のXがCysでもSerでもThrでもない、請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬組成物。 10

【請求項7】

抗原が多発性硬化症に関与する自己抗原である、多発性硬化症(MS)の予防用又は治療用の請求項1～6のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項8】

自己抗原がMOGである、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項9】

ペプチドがエピトープ配列VVHLYRNGK(配列番号3)を含む、請求項7又は8に記載の医薬組成物。

【請求項10】

ペプチドが配列HCPYCSR^VHLYRNGKD(配列番号1)、HCPYCSR^VVHLYRNGK(配列番号8)、HxC^PYCSR^VVHLYRNGKD(配列番号115)又はHxxCPYCSR^VVHLYRNGKD(配列番号116)を有する、請求項7～9のいずれか1項に記載の医薬組成物。 20

【請求項11】

抗原が糖尿病に関与する自己抗原である、糖尿病の予防用又は治療用の請求項1～6のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項12】

抗原がプロインスリンである、請求項11に記載の医薬組成物。

【請求項13】

ペプチドがエピトープ配列LALEGSLQKを含む、請求項11又は12に記載の医薬組成物。

【請求項14】

ペプチドが配列HCPYCVRS^LQPLALEGSLQKRG(配列番号108)又は配列AAHCHPCVRS^LQPLALEGSLQKRG(配列番号113)を有する、請求項11～13のいずれか1項に記載の医薬組成物。 30

【請求項15】

抗原のMHCクラスII T細胞エピトープと、該エピトープと直接接して又は該エピトープから最大で7アミノ酸離れて、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST](配列番号78若しくは配列番号90若しくは配列番号91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H(配列番号79、配列番号92若しくは配列番号93)のレドックスモチーフ配列とを含む13～100アミノ酸の単離免疫原性ペプチド(但し、前記抗原は、その配列内に、前記エピトープの10アミノ酸以内の距離に前記モチーフを含まない)。

【請求項16】

前記抗原がその配列内に前記レドックスモチーフを含まない、請求項15に記載のペプチド。

【請求項17】

レドックスモチーフがH-X-C-X(2)-[CST](配列番号90)若しくは[CST]-X(2)-C-X-H(配列番号92)のレドックスモチーフ配列であるか、又はレドックスモチーフがH-C-X(2)-[CST](配列番号78)若しくは[CST]-X(2)-C-H(配列番号79)のレドックスモチーフ配列である、請求項15又は16に記載のペプチド。

【請求項18】

- 前記モチーフがH-X(0,2)-C-X(2)-[CST](配列番号78、90又は91)である場合、該モチーフは当該ペプチド内でT細胞エピトープのN末端側に位置し、 50

- 前記モチーフが[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、92又は93)である場合、該モチーフはT細胞エピトープのC末端側に位置する、

請求項15～17のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項19】

モチーフがH-X(0,2)-C-X(2)-C (配列番号80、配列番号96若しくは配列番号97)若しくはC-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号83、配列番号94若しくは配列番号95)であるか、又はモチーフがH-C-X(2)-C (配列番号80)若しくはC-X(2)-C-H (配列番号83)である、請求項15～18のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項20】

前記モチーフがT細胞エピトープのN末端側に位置する、請求項15～19のいずれか1項に記載のペプチド。 10

【請求項21】

13～75アミノ酸長、より好ましくは13～50アミノ酸長、最も好ましくは13～30アミノ酸長を有する請求項15～20のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項22】

MHCクラスII T細胞エピトープが、前記モチーフと、最大で4アミノ酸の配列、より好ましくは2アミノ酸の配列により分離されている、請求項15～21のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項23】

レドックスモチーフ内のXがGly若しくはProであるか、又はレドックスモチーフ内のXがCysでないか、又はレドックスモチーフのHisとその近接Cysとの間のXがCysでもSerでもThrでもない、請求項15～22のいずれか1項に記載のペプチド。 20

【請求項24】

自己抗原がMOGである、請求項15～23のいずれか1項に記載のペプチド。

【請求項25】

エピトープ配列VVHLYRNGK (配列番号3)を含むか、又は配列HCPYCSRVVHLYRNGKD (配列番号1)、HCPYCSRVVHLYRNGK (配列番号8)、HxCPYCSRVVHLYRNGKD (配列番号115)若しくはHxCPYCSRVVHLYRNGKD (配列番号116)を有する請求項24に記載のペプチド。

【請求項26】

自己抗原がプロインスリンである、請求項15～23のいずれか1項に記載のペプチド。 30

【請求項27】

エピトープ配列LALEGSLQKを含むか、又は配列HCPYCVRSLQPLALEGSLQKRG (配列番号108)若しくは配列AAHCHPCVRSLQPLALEGSLQKRG (配列番号113)を有する請求項26に記載のペプチド。

【請求項28】

抗原特異的CD4+細胞溶解性T細胞の作製のための請求項15～27のいずれか1項に記載のペプチドのインビトロ使用。

【請求項29】

- 末梢血細胞を準備する工程、
- 抗原のMHCクラスII T細胞エピトープと、該エピトープと直接接して又は該エピトープから最大で7アミノ酸離れて、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78若しくは配列番号90若しくは配列番号91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、配列番号92若しくは配列番号93)のレドックスモチーフ配列とを含む13～100アミノ酸の免疫原性ペプチドを、前記細胞とインビトロで接觸させる工程、及び
- IL-2の存在下で前記細胞を拡大させる工程

を含む、細胞抗原に対して細胞溶解性であるCD4+T細胞の集団を得る方法。

【請求項30】

請求項29に記載の方法により得ることができる細胞の集団を含んでなる、前記抗原に対する免疫応答の低減用又は防止用医薬組成物。

【請求項31】

10

20

30

40

50

請求項 2 9 に記載の方法により得ることができる細胞の集団を含んでなり、前記抗原が糖尿病又は多発性硬化症に関する自己抗原である、それ respective 糖尿病又は多発性硬化症の治療用医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、免疫原性ペプチドに関する。該ペプチドは、抗原特異的細胞溶解性CD4+ T 細胞を生じさせるために、インビトロ及びインビボ系で用いられる。ペプチド及びこれらのペプチドにより得られる細胞は、多発性硬化症のような自己免疫疾患を含む様々な障害のための薬学的に活性なペプチドとして用いられる。

10

【背景技術】

【0 0 0 2】

国際公開第2008/017517号は、抗原のMHCクラスII T 細胞エピトープとレドックスモチーフ配列とを含む新規なクラスのペプチドを開示している。

レドックスモチーフ配列は、Fomenkoら(2003) *Biochemistry* 42, 11214-11225において概説されている。レドックスモチーフ配列の異なる代替物は、C(X)2C (配列番号71)、C(X)2S (配列番号72)、C(X)2T (配列番号73)、S(X)2C (配列番号74)及びT(X)2C (配列番号75)である。レドックスモチーフ配列についての他の先行技術は、レドックスモチーフ配列内のヒスチジンの関連性について解説している(Kortemmeら(1996) *Biochemistry* 35, 145 03-14511)。

20

国際公開第2008/017517号は、ペプチド内で T 細胞エピトープとレドックスモチーフ配列とが互いの近傍で組み合わされていることが、以前には認識されていなかった特性をもたらすことを説明している。すなわち、このようなペプチドは、ペプチドに存在する T 細胞エピトープを含む抗原を提示する抗原提示細胞を特異的に死滅させるCD4+細胞溶解性 T 細胞の集団を誘発する能力を有する。

【0 0 0 3】

よって、これらペプチドは、免疫応答を、非常に早期の段階で、すなわち抗原提示のレベルにて遮断するために用いることができる。国際公開第2008/017517号は、アレルギー及び免疫障害の治療及び予防におけるこれらペプチドの医薬的使用を証明している。この発明の概念は、後になってCarlierら(2012) *Plos one* 7, 10 e45366において発表された。更なる特許出願は、このようなペプチドを、免疫応答を回避すべき他の医薬的用途、例えば腫瘍、移植拒絶、可溶性アロ因子に対する免疫応答、ウイルスベクターの骨格によりコードされるウイルスタンパク質に対する免疫応答の治療において用いることができることを証明した。

30

上記の刊行物は、レドックスモチーフ配列のタイプ及びレドックスモチーフと T 細胞エピトープ配列との間隔について論じている。ペプチドの特性を改善し得るペプチド内の更なる決定因子は、報告されていない。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 4】

40

上記「導入」において言及した4アミノ酸レドックスモチーフ配列の異なる代替物は、[CST]-X(2)-C (配列番号76)又はC-X(2)-[CST] (配列番号77)と書き表すこともできる。本発明は、モチーフの外側に直接接する(モチーフのN末端(-1位)又はC末端(+5位))の追加のヒスチジンアミノ酸の存在が、レドックスモチーフの安定性を増加させることを明らかにする。よって、本発明は、H-C-X(2)-[CST] (配列番号78)又は[CST]-X(2)-C-H (配列番号79)の一般構造を有する改変レドックスモチーフに関する。

この安定性改善によって、ペプチドの比還元活性は増加するので、例えば、追加のヒスチジンが存在しないペプチドと比較して、用いるペプチドを少なくできるか、又は注射の回数が減少する。

【0 0 0 5】

50

第一の態様は、医薬としての使用のための、抗原のMHCクラスII T細胞エピトープと、前記エピトープと直接接して又は前記エピトープから最大で7アミノ酸離れて、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、配列番号90若しくは配列番号91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、配列番号92若しくは配列番号93)のレドックスモチーフ配列とを含む、13~100アミノ酸の単離免疫原性ペプチドに関する。

或る種の実施形態では、前記抗原は、その配列内に、前記エピトープの10アミノ酸以内の距離に前記モチーフを含まないか、又はその配列内に前記モチーフを含みさえしない。

具体的な実施形態では、モチーフは、H-X-C-X(2)-[CST] (配列番号90)若しくは[CST]-X(2)-C-X-H (配列番号92)のレドックスモチーフ配列又はH-C-X(2)-[CST] (配列番号78)若しくは[CST]-X(2)-C-H (配列番号79)のレドックスモチーフ配列である。 10

他の実施形態では、モチーフは、H-X(0,2)-C-X(2)-C (配列番号80、配列番号96若しくは配列番号97)又はC-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号83、配列番号94若しくは配列番号95)である。

更に他の実施形態では、モチーフは、H-C-X(2)-C (配列番号80)又はC-X(2)-C-H (配列番号83)である。

【0006】

具体的な実施形態では、本ペプチドは、13~75アミノ酸長、13~50アミノ酸長又は13~30アミノ酸長を有する。

MHCクラスII T細胞エピトープは、前記モチーフと、最大で4アミノ酸の配列により又は2アミノ酸の配列により分離されていることもできる。 20

具体的な実施形態では、レドックスモチーフ内のXはGly又はProであるか、レドックスモチーフ内のXはCysでない。

他の具体的な実施形態では、レドックスモチーフ外のXは、CysでもSerでもThrでもない。

【0007】

本ペプチドは、多発性硬化症(MS)の予防又は治療に用いることができ、そのためには、抗原は、多発性硬化症に関与する自己抗原、例えばMOGである。

MS用ペプチドの具体的な実施形態は、エピトープ配列VVHLYRNGK (配列番号3)を含み、例えばHCPYCSRVVHLYRNGKD (配列番号1)、HxCPTYCSRVVHLYRNGKD (配列番号115)又はHxxCPYCSRVVHLYRNGKD (配列番号116)を含む。 30

本ペプチドは、糖尿病の予防又は治療に用いることができ、そのためには、抗原は、例えば、プロインスリンである。

【0008】

別の態様は、抗原のMHCクラスII T細胞エピトープと、前記エピトープと直接接して又は前記エピトープから最大で7アミノ酸離れて、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78若しくは配列番号90若しくは配列番号91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、配列番号92若しくは配列番号93)のレドックスモチーフ配列とを含む、13~100アミノ酸の単離免疫原性ペプチド(但し、前記抗原は、その配列内に、前記エピトープの10アミノ酸以内の距離に前記モチーフを含まない)に関する。

或る種の実施形態では、抗原はその配列内に前記モチーフを含まない。 40

モチーフの具体的な実施形態は、H-X-C-X(2)-[CST] (配列番号90)、[CST]-X(2)-C-X-H (配列番号92)、H-C-X(2)-[CST] (配列番号78)又は[CST]-X(2)-C-H (配列番号79)、X(0,2)-C-X(2)-C (配列番号80、配列番号96、配列番号97)、C-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号83、配列番号94、配列番号95)、H-C-X(2)-C (配列番号80)又はC-X(2)-C-H (配列番号83)である。

本ペプチドの具体的な実施形態では、前記モチーフがH-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、90又は91)である場合、該モチーフはペプチド内でT細胞エピトープのN末端側に位置し、前記モチーフが[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、92又は93)である場合、該モチーフはT細胞エピトープのC末端側に位置する。

【0009】

モチーフはT細胞エピトープのN末端側に位置し得る。本ペプチドは、13~75アミノ酸長、13~50アミノ酸長、13~30アミノ酸長を有することができる。

具体的な実施形態では、MHCクラスII T細胞エピトープは、前記モチーフと、最大で4アミノ酸の配列により分離されているか、又は前記モチーフと2アミノ酸の配列により分離されている。

具体的な実施形態では、レドックスモチーフ内のXはGly又はProであるか、レドックスモチーフ内のXはCysでない。

具体的な実施形態では、レドックスモチーフ外のXは、CysでもSerでもThrでもない。

特定のペプチドの抗原は、MOG又はプロインスリンである自己抗原に由来する。

特定のペプチドは、エピトープ配列VVHLYRNGK (配列番号3)を含み、例えばHCPYCSRVVHLYRNGKD (配列番号1)、HxCOPYCSRVVHLYRNGKD (配列番号115)又はHxxCOPYCSRVVHLYRNGKD (配列番号116)を含む。 10

【0010】

別の態様は、抗原のMHCクラスII T細胞エピトープと、前記エピトープと直接接して又は前記エピトープから最大で7アミノ酸離れて、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、配列番号90若しくは配列番号91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、配列番号92若しくは配列番号93)のレドックスモチーフ配列とを含む、13~100アミノ酸の免疫原性ペプチドの有効量を投与する工程を含む治療又は予防の方法である。

本発明の別の態様は、抗原特異的CD4+細胞溶解性T細胞を作製するための上記ペプチドのインビトロ使用に関する。 20

別の態様は、細胞抗原に対して細胞溶解性であるCD4+T細胞の集団を得る方法であって、末梢血細胞を準備する工程と；抗原のMHCクラスII T細胞エピトープと、前記エピトープと直接接して又は前記エピトープから最大で7アミノ酸離れて、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78若しくは配列番号90若しくは配列番号91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、配列番号92若しくは配列番号93)のレドックスモチーフ配列とを含む13~100アミノ酸の単離免疫原性ペプチドを、前記細胞とインビトロで接触させる工程と；IL-2の存在下で前記細胞を拡大させる工程とを含む方法に関する。

別の態様は、医薬としての使用のための、上記の方法により得ることができる細胞の集団に関する。

別の態様は、上記の細胞の有効量を投与する工程を含む治療及び予防の方法に関する。 30

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】MOGのT細胞エピトープと、追加のヒスチジンなし(右のバー)及びあり(左のバー)のレドックスモチーフとを有するペプチド(それぞれ、配列番号7及び配列番号1)に対するナイーブヒトCD4+T細胞株の応答。

【発明を実施するための形態】

【0012】

定義

用語「ペプチド」は、本明細書で用いる場合、ペプチド結合により接続された2~200アミノ酸のアミノ酸配列を含む(ただし、非アミノ酸構造を含み得る)分子をいう。本発明によるペプチドは、常用の20アミノ酸若しくはその改変バージョンのいずれをも含むことができ、ペプチド化学合成又は化学的若しくは酵素的改変により組み込まれた天然に存在しないアミノ酸を含むことができる。用語「抗原」は、本明細書で用いる場合、巨大分子、典型的にはタンパク質(多糖部分を有していてもいなくてもよい)の構造体をいい、又は1若しくは2以上のハプテンを含み、T細胞エピトープを含むタンパク質組成物で作られている。用語「抗原性タンパク質」は、本明細書で用いる場合、1又は2以上のT細胞エピトープを含むタンパク質をいう。自己抗原又は自己抗原性タンパク質は、本明細書で用いる場合、体内に存在するヒト又は動物のタンパク質であって、当該ヒト又は動物の体内で免疫応答を誘発するタンパク質をいう。 40

【0013】

用語「食品又は医薬品中の抗原性タンパク質」は、食品又は医薬品(例えばワクチン)に天然に存在する抗原性タンパク質をいう。用語「エピトープ」は、抗体若しくはその一部分(Fab'、Fab2'など)又はB若しくはT細胞リンパ球の細胞表面に提示される受容体が特異的に認識して結合する抗原性タンパク質の一部分又は幾つかの部分(立体エピトープを規定してもよい)であって、結合により免疫応答を誘導することができる部分をいう。用語「T細胞エピトープ」は、本発明との関係では、ドミナント、サブドミナント又はマイナーT細胞エピトープ(すなわち、Tリンパ球の細胞表面の受容体が特異的に認識して結合する抗原性タンパク質の一部)をいう。エピトープがドミナントであるか、サブドミナントであるかマイナーであるかは、当該エピトープに対して誘発される免疫反応に依存する。優勢の程度は、タンパク質中の可能な全てのTエピトープのうち、当該エピトープがT細胞により認識されてT細胞を活性化する頻度に依存する。

【0014】

T細胞エピトープは、MHCクラスII分子により認識されるエピトープであり、MHC II分子の溝に嵌まる9アミノ酸前後の配列からなる。T細胞エピトープを表すペプチド配列中で、エピトープ内のアミノ酸はP1～P9と番号付けされ、エピトープに対してN末端側のアミノ酸はP-1、P-2という具合に、エピトープに対してC末端側のアミノ酸は、P+1、P+2という具合に番号付けされる。MHCクラスII分子が認識し、MHCクラスI分子が認識しないペプチドは、MHCクラスII拘束T細胞エピトープという。

用語「MHC」は、「主要組織適合性抗原」をいう。ヒトでは、MHC遺伝子はHLA(「ヒト白血球抗原」)遺伝子として知られる。一貫する慣例はないが、幾つかの文献は、HLAタンパク質分子をるためにHLAを、HLAタンパク質をコードする遺伝子をのためにMHCを用いる。よって、用語「MHC」及び「HLA」は本明細書で用いる場合には同義である。ヒトにおけるHLA系は、マウスにおける対応物(すなわち、H2系)と等価である。最もよく研究されているHLA遺伝子は、9つのいわゆる古典的MHC遺伝子、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DQA1、HLAs DQB1、HLA-DRA及びHLA-DRB1である。ヒトでは、MHCは、3つの領域：クラスI、II及びIIIに分けられる。A、B及びC遺伝子はMHCクラスIに属し、6つのD遺伝子はクラスIIに属する。MHCクラスI分子は、3つのドメイン(1、2及び3)を含む単一の多形性鎖からなり、細胞表面にて2ミクログロブリンと結合する。クラスII分子は、各々が2つの鎖(1及び2、並びに1及び2)を含む2つの多形性鎖からなる。

クラスI MHC分子は、実質的に全ての有核細胞上で発現される。

【0015】

クラスI MHC分子に関して提示されるペプチド断片は、CD8+Tリンパ球(細胞溶解性Tリンパ球又はCTL)により認識される。CD8+Tリンパ球は、刺激性抗原を有する細胞を溶解できる細胞溶解エフェクターに頻繁に成熟する。クラスII MHC分子は、活性化リンパ球及び抗原提示細胞上に主に発現する。CD4+Tリンパ球(ヘルパーTリンパ球又はTh)は、マクロファージ又は樹状細胞のような抗原提示細胞上で通常見出されるクラスII MHC分子により提示される独特なペプチド断片の認識に伴い活性化される。CD4+Tリンパ球は、増殖し、抗体媒介性及び細胞媒介性応答を支持するサイトカイン、例えばIL-2、IFN- γ 及びIL-4を分泌する。

機能的HLAは、内因性及び外因性のおそらくは抗原性であるペプチドが結合する深い結合溝を特徴とする。溝は、十分に規定された形状及び物理化学的性質により更に特徴づけられる。HLAクラスI結合部位は、ペプチドの両末端が溝の両端に固定される点で、閉じている。溝の両端は、保存的HLA残基との水素結合のネットワークにも関与している。このような拘束の観点から、結合するペプチドの長さは、8～10残基に限定される。しかし、12アミノ酸残基までのペプチドもHLAクラスIと結合できることが証明されている。異なるHLA複合体の構造の比較により、ペプチドが比較的直鎖状の拡がった立体構造をとるか、又は溝外に膨らむ中央残基を含むことができるという一般的結合様式が確認された。

【0016】

HLAクラスI結合部位とは対照的に、クラスII部位は両端で開放している。このことに

10

20

30

40

50

より、ペプチドは、実際の結合領域から伸びて、両端で「外に突き出る」ことができる。クラスII HLAは、よって、可変長(9~25又はそれ以上のアミノ酸残基)のペプチドリガンドと結合できる。HLAクラスIと同様に、クラスIIリガンドの親和性は、「定常」及び「可変」成分により決定される。定常成分は、HLAクラスII溝の保存残基と、結合したペプチドの主鎖との間で形成される水素結合のネットワークに起因する。しかし、この水素結合パターンは、ペプチドのN末端及びC末端の残基に限定されず、鎖全体にわたって分布する。このことは、複合体形成したペプチドの立体構造を、厳密に直鎖状の結合様式に限定するので重要である。このことは、全てのクラスIIアロタイプに共通する。ペプチドの結合親和性を決定する第2成分は、クラスII結合部位内の或る幾つかの位置での多形により変動し得る。異なるアロタイプは、溝の中に異なる相補性ポケットを形成することにより、ペプチドのサブタイプ依存性選択又は特異性をもたらす。重要なことに、クラスIIポケット内に保持されるアミノ酸残基についての拘束は、一般的に、クラスIより「柔軟」である。異なるHLAクラスIIアロタイプ間でのペプチドの交差反応性がより遙かに多い。MHC II分子の溝に嵌まるMHCクラスII T細胞エピトープの9アミノ酸前後の配列は、通常、P1~P9と番号付けされる。エピトープに対してN末端側の更なるアミノ酸は、P-1、P-2という具合に番号付けされ、エピトープに対してC末端側のアミノ酸は、P+1、P+2という具合に番号付けされる。10

【0017】

本発明に用いられるエピトープに関する用語「ホモログ」は、本明細書で用いる場合、天然に存在するエピトープと少なくとも50%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有し、このことにより、抗体又はB及び/若しくはT細胞の細胞表面受容体と結合する当該エピトープの能力を維持する分子をいう。エピトープの特定のホモログは、最大で3、より具体的には最大で2、最も具体的には1つのアミノ酸が改変された天然エピトープに相当する。20

本発明のペプチドに関する用語「誘導体」は、本明細書で用いる場合、少なくともペプチド活性部分(すなわち、細胞溶解性CD4+T細胞活性を誘発できる部分)と、ペプチドの安定化又はペプチドの薬物動態若しくは薬力学特性の改変というような異なる目的を有し得る補助的部品とを含む分子をいう。

2つの配列の「配列同一性」との用語は、本明細書で用いる場合、2つの配列を整列させたときの、(同一ヌクレオチド又はアミノ酸の位置の数)/(短い方の配列のヌクレオチド数又はアミノ酸数)をいう。特に、配列同一性は、70%~80%、81%~85%、86%~90%、91%~95%、96%~100%又は100%である。30

用語「ペプチドコーディングポリヌクレオチド(又は核酸)」及び「ペプチドをコードするポリヌクレオチド(又は核酸)」は、本明細書で用いる場合、適当な環境で発現したときに、適切なペプチド配列又はその誘導体若しくはホモログの生成をもたらすヌクレオチド配列をいう。このようなポリヌクレオチド又は核酸は、ペプチドをコードする通常の配列、並びに要求される活性を有するペプチドを発現できるこれら核酸の誘導体及び断片を含む。本発明によるペプチド又はその断片をコードする核酸は、哺乳動物を起源とするか若しくは哺乳動物、最も具体的にはヒトのペプチド断片に対応するペプチド又はその断片をコードする配列である。40

【0018】

用語「免疫障害」又は「免疫疾患」は、免疫系の反応が生物における機能不全又は非生理学的状態を担うか又は維持する疾患をいう。免疫障害として、とりわけ、アレルギー疾患及び自己免疫疾患が挙げられる。

用語「アレルギー疾患」又は「アレルギー障害」は、本明細書で用いる場合、アレルゲン(例えは、花粉、虫針、薬剤又は食物)と呼ばれる特定の物質に対する免疫系の過敏反応を特徴とする。アレルギーは、アトピー性個体患者が既に感作されたアレルゲンに遭遇する場合にいつでも観察される一連の兆候及び症状であり、様々な疾患、特に気管支喘息のような呼吸系疾患及び症状の発症をもたらすことがある。様々な種類の分類が存在し、ほとんどのアレルギー障害は、それが哺乳動物の身体のどこで起こるかに応じて異なる名称50

を有する。「過敏症」は、感作されたアレルゲンへの曝露の際に個体に生じる望ましくない(有害で、不快を生じ、時に致命的な)反応である。「即時型過敏症」は、IgE抗体の生成に依存し、よって、アレルギーと同義である。

【0019】

用語「自己免疫疾患」又は「自己免疫障害」は、生物が自身の(分子以下のレベルに至る)構成部分を「自己」であると認識できることによる、生物自身の細胞及び組織に対する当該生物の異常な免疫応答に起因する疾患である。この疾患群は、2つの範疇、器官特異的疾患及び全身性疾患に分けることができる。「アレルゲン」は、素因、特に遺伝的素因がある個体(アトピー性)患者においてIgE抗体の生成を誘発する物質(通常、巨大分子又はタンパク質組成物)と定義される。同様の定義が、Liebersら(1996) Clin. Exp. Allergy 26, 494-516に示されている。10

用語「治療有効量」は、患者において所望の治療的又は予防的効果を生じる本発明のペプチド又はその誘導体の量をいう。例えば、疾患又は障害に言及する場合において、治療有効量は、疾患又は障害の1又は2以上の症状を或る程度低減する、より具体的には疾患若しくは障害と関連するか又はそれらの原因である生理的又は生化学的パラメータが部分的又は完全に正常に戻る量である。典型的には、治療有効量は、改善又は正常な生理的状態の回復を導く本発明のペプチド又はその誘導体の量である。例えば、免疫障害に罹患している哺乳動物を治療的に処置するために用いる場合、治療有効量は、前記哺乳動物の体重1kgあたりのペプチドの1日量である。或いは、遺伝子治療により投与する場合、ネイキッドDNA又はウイルスベクターの量は、適切な用量の本発明のペプチド、その誘導体又はホモログの局所的生成を確実にするように調整される。20

【0020】

ペプチドに言及する場合の用語「天然」は、配列が天然に存在するタンパク質(野生型又は変異体)の断片と同一であるという事実に関連する。これに対して、用語「人工」は、自然に生じない配列をいう。人工配列は、天然配列から、限定的な改変、例えば天然に存在する配列の1若しくは2以上のアミノ酸を変更/欠失/挿入すること、又は天然に存在する配列に対してN若しくはC末端側に/のアミノ酸を付加/除去することにより得られる。

これに関連して、ペプチド断片は、典型的にはエピトープスキャニングに関して、抗原から作製されることが認識される。偶然にも、このようなペプチドは、その配列中に、MHCクラスIIエピトープと、その近傍に改変レドックスモチーフH-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、90若しくは91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、92若しくは93)を有する配列を含むことがある。本明細書において、「近傍」は、MHCクラスIIエピトープ配列と上記のH-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、90若しくは91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、92若しくは93)モチーフとの間に、最大で7アミノ酸、最大で4アミノ酸、最大で2アミノ酸のアミノ酸配列が存在し得、0アミノ酸のアミノ酸配列さえも存在し得る(換言すれば、エピトープとモチーフ配列とは互いに直接接している)ことを意味する。30

したがって、本発明の具体的な実施形態は、直接接しているか又は2、4若しくは7アミノ酸までのアミノ酸配列により分離されたMHCクラスT細胞とレドックスモチーフ配列とを偶然に含む、抗原のペプチド断片を除外する。40

本発明の他の具体的な実施形態は、エピトープと改変レドックスモチーフとの間隔に関わらず、MHCクラスII T細胞エピトープとレドックスモチーフ配列とを偶然に含む抗原のペプチド断片を除外する。

【0021】

抗原のペプチド断片は、免疫原性について研究されているが、一般的には、(アレルギー及び腫瘍ワクチン接種の分野以外で)治療剤として用いられない。よって、本発明のペプチドの改善された特性についての知見がなければ、当該ペプチドの医薬としての使用は、予期できない。

【0022】

50

本明細書においてアミノ酸は、その完全な名称、3文字略称又は1文字略称で言及する。

アミノ酸配列のモチーフは、本明細書において、Prositeのフォーマットに従って記載する。モチーフは、配列の特定部分での或る配列多様性を記述するために用いられる。記号Xは、任意のアミノ酸が許容される位置に用いる。選択肢は、所与の位置について許容され得るアミノ酸を大括弧([])内に列挙することにより示す。例えば、[CST]は、Cys、Ser又はThrから選択されるアミノ酸を表す。選択肢として除外されるアミノ酸は中括弧([])内に列挙することにより示す。例えば、[AM]は、Ala及びMet以外の任意のアミノ酸を表す。モチーフ中の異なる要素は、互いにハイフン(-)により分離される。モチーフ中の同一要素の反復は、その要素の後ろに括弧内の数値又は数値範囲を配置することにより示すことができる。例えば、X(2)はX-Xに相当し、X(2, 5)は、2、3、4又は5つのアミノ酸Xに相当し、A(3)はA-A-Aに相当する。

よって、H-C-X(2)-C (配列番号80)は、HCXXC (配列番号80)と書き表すことができる。

同様に、C-X(2)-C-X(0,2)-Hは、HとCとの間に0、1又は2アミノ酸が存在する3つの可能性、すなわちCXXCH (配列番号83)、CXXCXH (配列番号94)及びCXXCXXH (配列番号95)を表す。

同様に、H-X(0,2)-C-X(2)-Cは、HとCとの間に0、1又は2アミノ酸が存在する3つの可能性、すなわちHCXXC (配列番号80)、HXCXXC (配列番号96)及び

【化1】

HXXCXXC (配列番号97)

を表す。

【0023】

アミノ酸Xを区別するために、HとCとの間のものを外部アミノ酸X(上記配列中、一本下線)、レドックスモチーフ内のものを内部アミノ酸X(上記配列中、二本下線)と呼ぶ。

Xは、任意のアミノ酸、特にL-アミノ酸、より具体的には20の天然に存在するL-アミノ酸のうちの1つを表す。

【0024】

T細胞エピトープと改変ペプチドモチーフ配列とを含み還元活性を有するペプチドは、抗原提示細胞に向けられた抗原特異的細胞溶解性CD4+T細胞の集団を生成することができる。

したがって、最も広い意味において、本発明は、免疫反応を誘引する能力を有する抗原(自己又は非自己)の少なくとも1つのT細胞エピトープと、ペプチドジスルフィド結合の還元活性を有する改変チオレダクターゼ配列モチーフとを含むペプチドに関する。T細胞エピトープ及び改変レドックスモチーフ配列は、ペプチド内で直接接することができるか、又は場合によって1若しくは2以上のアミノ酸(いわゆるリンカー配列)により分離されていてよい。場合によって、ペプチドは、エンドソームターゲティング配列及び/又は更なる「フランкиング」配列を更に含む。

【0025】

本発明のペプチドは、免疫反応を誘引する能力を有する抗原(自己又は非自己)のMHCクラスII T細胞エピトープと、改変レドックスモチーフとを含む。ペプチド内のモチーフ配列の還元活性は、例えば、インスリンの可溶性が還元に際して変化するインスリン可溶性アッセイにおいて又はインスリンのような蛍光標識した基質を用いて、スルフヒドリル基を還元する能力についてアッセイできる。このようなアッセイの例は、本出願の実験部においてより詳細に記載する。

改変レドックスモチーフは、T細胞エピトープのアミノ末端側に位置してもよいし、T細胞エピトープのカルボキシ末端側に位置してもよい。

還元活性を有するペプチド断片は、グルタレドキシン、ヌクレオレドキシン、チオレドキシン及びその他のチオール/ジスルフィド酸化還元酵素を含む小ジスルフィド還元酵素であるチオレダクターゼ中で見出される(Holmgren (2000) *Antioxid. Redox Signal.* 2,

10

20

30

40

50

811-820 ; Jacquot ら (2002) *Biochem. Pharm.* 64, 1065-1069)。これらは多機能性であり、遍在し、多くの原核及び真核生物で見出される。これらは、保存的活性ドメインコンセンサス配列 : C-X(2)-C (配列番号71)、C-X(2)-S (配列番号72)、C-X(2)-T (配列番号73)、S-X(2)-C (配列番号74)、T-X(2)-C (配列番号75)(Fomenko ら (2003) *Biochemistry* 42, 11214-11225 ; Fomenko ら (2002) *Prot. Science* 11, 2285-2296)(×は、任意のアミノ酸である)内の酸化還元活性システインにより、タンパク質(例えば、酵素)のジスルフィド結合について還元活性を発揮する。このようなドメインは、より大きいタンパク質、例えばタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)及びホスホイノシチド特異的ホスホリバーゼCにおいても見出される。

【 0 0 2 6 】

10

例えばFomenko及び国際公開第2008/017517号から既知となっている4アミノ酸レドックスモチーフは、1位及び/又は4位にシステインを含む。よって、モチーフは、C-X(2)-[CST] (配列番号77)又は[CST]-X(2)-C (配列番号76)のいずれかである。このようなテトラペプチド配列を、「モチーフ」という。ペプチド内のモチーフは、選択肢C-X(2)-C (配列番号71)、S-X(2)-C (配列番号74)、T-X(2)-C (配列番号75)、C-X(2)-S (配列番号72)又はC-X(2)-T (配列番号73)のいずれかであり得る。特に、本ペプチドは、配列モチーフC-X(2)-C (配列番号71)を含む。

本発明のペプチドの「改変」レドックスモチーフは、システインに直接接して及びモチーフの外側に、ヒスチジンが存在することが先行技術とは異なる。換言すれば、改変レドックスモチーフは、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、90若しくは91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、92若しくは93)と書き表される。

20

その実施形態は、H-XX-C-X(2)-[CST] (配列番号91)、H-X-C-X(2)-[CST] (配列番号90)、H-C-X(2)-[CST] (配列番号78)、[CST]-X(2)-C-XX-H (配列番号93) [CST]-X(2)-C-X-H (配列番号92)及び[CST]-X(2)-C-H (配列番号79)である。

【 0 0 2 7 】

より具体的な実施形態は、

H-C-X(2)-S (配列番号81)、
H-X-C-X(2)-S (配列番号98)、
H-XX-C-X(2)-S (配列番号99)、
H-C-X(2)-T (配列番号82)、
H-X-C-X(2)-T (配列番号100)、
H-XX-C-X(2)-T (配列番号101)、
S-X(2)-C-H (配列番号84)、
S-X(2)-C-X-H (配列番号102)、
S-X(2)-CXX-H (配列番号103)、
T-X(2)-C-H (配列番号85)、
T-X(2)-C-X-H (配列番号104)、
T-X(2)-C-XX-H (配列番号105)、
C-X(2)-C-H (配列番号83)、
C-X(2)-C-X-H (配列番号94)、
C-X(2)-C-XX-H (配列番号95)、
H-C-X(2)-C (配列番号80)、
H-X-C-X(2)-C (配列番号96)、
H-XX-C-X(2)-C (配列番号97)

30

である。

【 0 0 2 8 】

40

本発明の具体的な実施形態では、H-C-X(2)-C-H (配列番号86)モチーフを有するペプチドは、本発明の範囲から除外される。

その他の具体的な実施形態は、レドックスモチーフのシステインアミノ酸が、2つのヒスチジン配列に挟まれたペプチド、例えばHCHxC (配列番号106)又はCxxHCH (配列番号107

50

)である。

【0029】

以下で詳細に説明するように、本発明のペプチドは、化学合成により作製できるため、非天然アミノ酸の組み込みが可能になる。したがって、上記の改変レドックスモチーフ中の「C」は、システイン或いはチオール基を有する他のアミノ酸(例えば、メルカプトバリン、ホモシステイン)又はチオール官能性を有する他の天然若しくは非天然アミノ酸のいずれかである。還元活性を有するために、改変レドックスモチーフ内に存在するシステインは、システインジスルフィドブリッジの一部として存在しない。にもかかわらず、改変レドックスモチーフは、インビボで遊離チオール基を有するシステインに変換される改変システイン、例えばメチル化システインを含むことがある。Xは、S、C若しくはTを含む20の天然アミノ酸のいずれかであり得るか、又は非天然アミノ酸であり得る。特定の実施形態では、Xは、小さい側鎖を有するアミノ酸、例えばGly、Ala、Ser又はThrである。更なる特定の実施形態では、Xは、嵩高い側鎖を有するアミノ酸、例えばTrpでない。更なる特定の実施形態では、Xは、システインでない。更なる特定の実施形態では、改変レドックスモチーフ内の少なくとも1つのXは、Hisである。他の更なる特定の実施形態では、改変レドックス中の少なくとも1つのXは、Proである。

【0030】

本ペプチドは、安定性又は可溶性を増大させるための改変、例えばN末端NH₂基又はC末端COOH基の改変(例えば、COOH基からCONH₂基への改変)を更に含んでよい。

改変レドックスモチーフを含む本発明のペプチドにおいて、モチーフは、エピトープがMHC溝に嵌まったとき、MHC結合溝の外に残るように位置する。改変レドックスモチーフは、ペプチド内でエピトープ配列と直接接している(換言すれば、モチーフとエピトープとの間に0アミノ酸のリンカー配列)か、又は7アミノ酸以下のアミノ酸配列を含むリンカーによりT細胞エピトープと分離されている。より具体的には、リンカーは、1、2、3又は4アミノ酸を含む。具体的な実施形態は、エピトープ配列と改変レドックスモチーフ配列との間に0、1又は2アミノ酸のリンカーを有するペプチドである。或いは、リンカーは、5、6、7、8、9又は10アミノ酸を含んでよい。改変レドックスモチーフ配列がエピトープ配列と近接しているペプチドにおいて、改変レドックスモチーフ配列は、エピトープ配列に対する位置としてP-4～P-1又はP+1～P+4と表す。ペプチドリンカーとは別に、その他の有機化合物をリンカーとして用いて、ペプチドの一部を互いに(例えば、改変レドックスモチーフ配列をT細胞エピトープ配列に)連結してよい。

【0031】

本発明のペプチドは、T細胞エピトープと改変レドックスモチーフとを含む配列に対してN又はC末端側に追加の短いアミノ酸配列を更に含むことができる。このようなアミノ酸配列は、一般に、本明細書において「フランкиング配列」という。フランкиング配列は、エピトープとエンドソームターゲティング配列との間及び/又は改変レドックスモチーフとエンドソームターゲティング配列との間に位置できる。エンドソームターゲティング配列を含まない或る種のペプチドでは、短いアミノ酸配列は、ペプチド内の改変レドックスモチーフ及び/又はエピトープ配列に対してN及び/又はC末端側に存在してよい。より具体的には、フランкиング配列は、1～7アミノ酸の配列、最も具体的には2アミノ酸の配列である。

改変レドックスモチーフは、エピトープのN末端側にあってよい。

改変レドックスモチーフが1つのシステインを含む或る種の実施形態では、このシステインは、改変レドックスモチーフにおいて、エピトープから離れた位置に存在し、よって、改変レドックスモチーフは、例えばエピトープに対してN末端側にH-C-X(2)-T(配列番号82)又はH-C-X(2)-S(配列番号81)として現れるか、又はエピトープに対してC末端側にT-X(2)-C-H(配列番号85)又はS-X(2)-C-H(配列番号84)として現れる。

【0032】

本発明の或る種の実施形態では、1つのエピトープ配列と改変レドックスモチーフ配列とを含むペプチドが提供される。更なる特定の実施形態では、改変レドックスモチーフは

10

20

30

40

50

、例えば1若しくは2以上のアミノ酸により互いに分離され得る改変レドックスモチーフの反復又は互いに直接接している反復として、ペプチド内に数回(1、2、3、4回又はそれ以上)現れる。或いは、1又は2以上の改変レドックスモチーフは、T細胞エピトープ配列のN末端及びC末端の両方にある。

本発明のペプチドについて構想されるその他の変種は、T細胞エピトープ配列の反復を含み、各エピトープ配列の前及び/又は後に改変レドックスモチーフがあるペプチド(例えば、「改変レドックスモチーフ-エピトープ」の反復又は「改変レドックスモチーフ-エピトープ-改変レドックスモチーフ」の反復)を含む。ここで、改変レドックスモチーフは、全て同じ配列を有することができるが、常にそうである必要はない。それ自体が改変レドックスモチーフを含むエピトープを含んでなるペプチドの反復配列も、「エピトープ」と「改変レドックスモチーフ」との両方を含む配列をもたらすことに留意されたい。このようなペプチドでは、1つのエピトープ配列内の改変レドックスモチーフは、第2のエピトープ配列の外側の改変レドックスモチーフとして機能する。

【0033】

典型的には、本発明のペプチドは、T細胞エピトープを1つだけ含む。以下に記載するように、タンパク質配列内のT細胞エピトープは、機能性アッセイ及び/又は1若しくは2以上のインシリコ予測アッセイにおいて同定できる。T細胞エピトープ配列内のアミノ酸は、MHCタンパク質の結合溝内での位置に従って番号付けされる。ペプチド内に存在するT細胞エピトープは、8~25アミノ酸、より具体的には8~16アミノ酸、最も具体的には8、9、10、11、12、13、14、15又は16アミノ酸からなる。

より特定の実施形態では、T細胞エピトープは、9アミノ酸の配列からなる。更に特定の実施形態では、T細胞エピトープは、MHCクラスII分子によりT細胞に提示されるエピトープ(MHCクラスII拘束T細胞エピトープ)である。典型的には、T細胞エピトープ配列は、MHC IIタンパク質の裂溝に嵌まるオクタペプチド配列又はより具体的にはノナペプチド配列をいう。

本発明のペプチドのT細胞エピトープは、タンパク質の天然エピトープ配列に相当し得るか、又は天然エピトープ配列の改変バージョンであり得る(但し、改変T細胞エピトープが、天然T細胞エピトープ配列と同様に、MHC裂溝内で結合する能力を保持することを条件とする)。改変T細胞エピトープは、MHCタンパク質に対して天然エピトープと同じ結合親和性を有することができるが、親和性が低下していてもよい。特に、改変ペプチドの結合親和性は、元のペプチドの10分の1以上、より具体的には5分の1以上である。本発明のペプチドは、タンパク質複合体に対して安定化作用を有する。したがって、ペプチド-MHC複合体の安定化作用は、MHC分子に対する改変エピトープの親和性の低下を補償する。

【0034】

本ペプチド内のT細胞エピトープと還元性化合物とを含む配列は、プロセシング及びMHCクラスII決定基内での提示のための後期エンドソームへの該ペプチドの取り込みを容易にするアミノ酸配列(又は別の有機化合物)に更に連結できる。後期エンドソームターゲティングは、タンパク質の細胞質尾部に存在し、十分に同定されたペプチドモチーフ、例えばジロイシンベースの[DE]XXXL[LI] (配列番号87)若しくはDXXLL (配列番号88)モチーフ、チロシンベースのYXX (配列番号89)モチーフ又はいわゆる酸性クラスタモチーフに相当するシグナルにより媒介される。記号 は、嵩高い疎水性側鎖を有するアミノ酸残基、例えばPhe、Tyr及びTrpを表す。後期エンドソームターゲティング配列は、抗原由来T細胞エピトープのプロセシング及びMHCクラスII分子による効率的な提示を可能にする。このようなエンドソームターゲティング配列は、例えば、gp75タンパク質(Vijayasaradhiら(1995) J. Cell. Biol. 130, 807-820)、ヒトCD3 タンパク質、HLA-BM 11(Copierら(1996) J. Immunol. 157, 1017-1027)、DEC205受容体の細胞質尾部(Mahnkeら(2000) J. Cell Biol. 151, 673-683)に含まれる。エンドソームへの選別シグナルとして機能するペプチドの他の例は、Bonifacio及びTraub (2003) Annu. Rev. Biochem. 72, 395-447の概説に開示されている。或いは、そのような配列は、タンパク質からのサブドミナント又はマイ

10

20

30

40

50

ナーT細胞エピトープのものであり得、これは、抗原に対するT細胞応答を弱めることなく後期エンドソームへの取り込みを容易にする。後期エンドソームターゲティング配列は、効率的な取り込み及びプロセシングのために抗原由来ペプチドのアミノ末端又はカルボキシ末端のいずれにあることもでき、フランкиング配列(例えば、10アミノ酸までのペプチド配列)を介して結合することもできる。ターゲティング目的にマイナーT細胞エピトープを用いる場合、それは、典型的には、抗原由来ペプチドのアミノ末端に位置する。

【0035】

したがって、本発明は、抗原性タンパク質のペプチド、及び特異的免疫反応を誘発するためのその使用を構想する。このペプチドは、配列内に、すなわち、還元性化合物と、最大で10、好ましくは7以下のアミノ酸離れたT細胞エピトープとを含むタンパク質の断片に相当することができる。或いは、ほとんどの抗原性タンパク質について、本発明のペプチドは、還元性化合物、より具体的には本明細書に記載する還元性改変レドックスモチーフを、抗原性タンパク質のT細胞エピトープにN末端又はC末端で(直接接して又は最大で10、より具体的には最大で7アミノ酸のリンカーを用いて)結合させることにより作製される。更に、天然に存在する配列と比べて、タンパク質のT細胞エピトープ配列及び/若しくは改変レドックスモチーフを改変でき、並びに/又は、1若しくは2以上のフランキング配列及び/若しくはターゲティング配列を導入(又は改変)できる。よって、本発明の特徴が興味対象の抗原性タンパク質の配列内で見出すことができるか否かに依存して、本発明のペプチドは、「人工の」又は「天然に存在する」配列を含むことができる。

本発明のペプチドは長さを実質的に変動させることができる。本ペプチドの長さは、13又は14アミノ酸(すなわち、8~9アミノ酸のエピトープと、これと近接して、ヒスチジンを有する5アミノ酸の改変レドックスモチーフからなる)から20、25、30、40、50、75、100又は200アミノ酸まで変動させることができる。例えば、本ペプチドは、40アミノ酸のエンドソームターゲティング配列、約2アミノ酸のフランキング配列、5アミノ酸の本明細書に記載するモチーフ、4アミノ酸のリンカー及び9アミノ酸のT細胞エピトープペプチドを含むことができる。

したがって、特定の実施形態では、完全ペプチドは、13から50、75、100又は200までのアミノ酸からなる。より具体的には、還元性化合物が本明細書に記載する改変レドックスモチーフである場合、エンドソームターゲティング配列を含まず、場合によってはリンカーで接続されていてもよいエピトープと改変レドックスモチーフとを含む(人工又は天然の)配列(本明細書において「エピトープ-改変レドックスモチーフ」配列という)の長さは、重要である。「エピトープ-改変レドックスモチーフ」は、より具体的には、13、14、15、16、17、18又は19アミノ酸の長さを有する。このような13又は14アミノ酸から19アミノ酸までのペプチドは、場合により、エンドソームターゲティングシグナル(そのサイズは然程重要でない)と結合することができる。

上記で詳述したように、特定の実施形態では、本発明のペプチドは、T細胞エピトープ配列と連結した、本明細書に記載する還元性改変レドックスモチーフを含む。

【0036】

数は少ないが、タンパク質配列、タンパク質の断片又は合成ペプチドは、改変レドックスモチーフ配列を偶然に含む可能性がある。しかし、これらタンパク質が改変レドックス配列の近傍にMHCクラスT細胞エピトープを含む蓋然性は非常に低くなる。存在すれば、そのようなペプチドは、おそらく、一連のオーバーラッピングペプチド断片を合成するエピトープスキヤン実験から知られているであろう。そのような実験を記載する刊行物では、興味はエピトープにあり、改変レドックスモチーフとヒスチジンとの関係及び上記のようなペプチドの医薬用途における適切さについては全く無関心である。

よって、そのようなペプチドは、本発明の着想とは無関係の偶然の開示にすぎない。

【0037】

更なる特定の実施形態では、本発明のペプチドは、天然配列内にレドックス特性を有するアミノ酸配列を含まないT細胞エピトープを含むペプチドである。

しかし、代替の実施形態では、T細胞エピトープは、MHC裂溝へのエピトープの結合を

10

20

30

40

50

確実にする任意のアミノ酸配列を含んでよい。抗原性タンパク質の興味対象のエピトープがその配列内に改変レドックスモチーフ(例えば、本明細書に記載のもの)を含む場合、本発明による免疫原性ペプチドは、(エピトープ内に存在する改変レドックスモチーフが裂溝内に埋もれるのに対して)付着された改変レドックスモチーフが還元性活性をもたらすように、エピトープ配列とN若しくはC末端で結合した本明細書に記載する改変レドックスモチーフの配列及び/又は別の還元性配列を含む。

したがって、T細胞エピトープ及びモチーフは、直接接しているか、又は互いに離れており、オーバーラップしない。「直接接する」又は「離れている(分離されている)」との概念を評価するために、MHC裂溝に嵌まる8又は9アミノ酸配列を決定し、このオクタペプチド又はノナペプチドと改変レドックスモチーフペントペプチドとの間の距離を決定する。

【0038】

一般に、本発明のペプチドは、T細胞エピトープに加えて本明細書に記載する改変レドックスモチーフを含み、該改変レドックスモチーフがT細胞エピトープと直接接しているか又は7まで、最も具体的には4まで又は2までのアミノ酸からなるリンカーによりT細胞エピトープから分離されている、天然のペプチドではなく(よって、タンパク質の断片自体ではない)、人工ペプチドである。

本発明によるペプチド(又は当該ペプチドを含む組成物)は、哺乳動物への投与(すなわち注射)に際して、抗原由来T細胞エピトープを認識するT細胞の活性化を誘発し、表面受容体の還元によりT細胞に更なるシグナルを与えることが示された。この最適を超える活性化の結果として、T細胞は、該T細胞エピトープを提示する細胞に関する細胞溶解性及びバイスタンダーT細胞に対する抑制効果を獲得する。このように、抗原由来T細胞エピトープと、該エピトープの外側の改変レドックスモチーフとを含む本発明に記載するペプチド又は当該ペプチドを含む組成物は、ヒトを含む哺乳動物の直接免疫化に用いることができる。よって、本発明は、医薬としての使用のため、本発明のペプチド又はその誘導体を提供する。したがって、本発明は、本発明による1又は2以上のペプチドを、それを必要とする患者に投与することを含む治療方法を提供する。

【0039】

本発明は、細胞溶解性を有する抗原特異的T細胞を、小ペプチドでの免疫により惹起することができる方法を提供する。(i)抗原からのT細胞エピトープをコードする配列と、(ii)レドックス特性を有するコンセンサス配列とを含み、場合により、効率的なMHCクラスII提示のために後期エンドソームへの取込みを容易にする配列を更に含んでもよいペプチドは、サブレッサーT細胞を惹起することが見出された。

本発明のペプチドの免疫原性は、免疫反応の治療及び予防において特に興味深い。

本明細書に記載するペプチドは、医薬品として用いられ、より具体的には、哺乳動物、より具体的にはヒトにおける免疫障害の予防又は治療のための医薬の製造に用いられる。

【0040】

本発明は、本発明のペプチド、そのホモログ又は誘導体を用いて、必要とする哺乳動物の免疫障害を治療又は予防する方法であって、免疫障害に罹患しているか又はその危険性がある哺乳動物に、本発明のペプチド、そのホモログ又は誘導体の治療有効量、例えば免疫障害の症状を低減する治療有効量を投与することを含む方法を記載する。ヒト及び動物(例えば、ペット及び家畜)の両方の処置が企図される。ある実施形態では、処置される哺乳動物はヒトである。上記の免疫障害は、特定の実施形態では、アレルギー疾患及び自己免疫疾患から選択される。アレルギー疾患は、慣例上、1型媒介疾患又はIgE媒介疾患と記載される。アレルギー疾患の臨床症状は、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物過敏症及び虫刺され又は薬剤に対するアナフィラキシー反応を含む。アレルギー疾患は、アレルゲン(例えば、花粉、刺毛/毒針(sting)、薬剤又は食物)とよばれる特定の物質に対する免疫系の過敏反応を原因とする。アレルギー障害の最も重篤な形は、アナフィラキシーショックであり、これは、医学的緊急事態である。アレルゲンは、空中浮遊アレルゲン、例えばイエダニ、ペット及び花粉のものを含む。アレルゲンは、果物、野

10

20

30

40

50

菜及び乳を含む食物過敏症の原因である経口摂取アレルゲンも含む。上記疾患を治療するために、本発明によるペプチドは、疾患の原因因子であることが知られているか又はそのように考えられている抗原性タンパク質又はアレルゲンから作製する。T細胞エピトープの選択に用いることができるアレルゲンは、代表的には、ピーナッツ、魚(例えば、タラ)、卵白、甲殻類(例えば、エビ)、乳(例えば、牛乳)、小麦、穀物、バラ科果物(リンゴ、プラム、イチゴ)、ユリ科、アブラナ科、ナス科及びセリ科の野菜、木本性ナッツ、ゴマ、ピーナッツ、ダイズその他のマメ科アレルゲン、スパイス、メロン、アボカド、マンゴ、イチジク、バナナなどに存在する食物アレルゲン、デルマトファゴイデスの種(*Dermatophagoides* spp)若しくはヤケヒヨウヒダニ(*D. pteronyssinus*)、コナヒヨウヒダニ(*D. farinae*)及び*D. microceras*)、シワチリダニ(*Euroglyphus maynei*)又はブロミアの種(*Blomia* sp.)から得られるイエダニアレルゲン、ゴキブリ又は膜翅目(*Hymenoptera*)に存在する昆虫からのアレルゲン、花粉、特に木本、イネ科草本(grass)及び雑草草本(weed)の花粉からのアレルゲン、動物、とくにネコ、イヌ、ウマ及びげっ歯類からのアレルゲン、真菌類、特にアスペルギルス(*Aspergillus*)、アルテマリア(*Alternaria*)又はクラドスボリウム(*Cladosporium*)からのアレルゲン、並びにラテックス、アミラーゼなどの製品に存在する職業性アレルゲンからなる群から選択されるアレルゲンである。
10

【0041】

本発明に関するアレルゲンの例として、der p 2ペプチドCGFSSNYCQIYPPNANKIR (配列番号9)は、HCGFSSNYCQIYPPNANKIR (配列番号10)又はHCGFCSNYCQIYPPNANKIR (配列番号11)に改変される。アレルゲンの更なる例として、der p 2ペプチドCHGSEPCIIHRGKPF (配列番号12)は、HCHGSEPCIIHRGKPF (配列番号13)、HCHGCEPCIIHRGKPF (配列番号14)に、より典型的にはHCxGSEPCIIHRGKPF (配列番号15)又はHCxGCEPCIIHRGKPF (配列番号16)(×は、HisでもCysでもない)に改変される。
20

アレルゲンの更なる例として、ラクトグロブリンペプチドCHGCAQKKIIAEK (配列番号17)は、HCHGCAQKKIIAEK (配列番号18)に、より典型的にはHCxGCAQKKIIAEK (×は、CysでもHisでもない)(配列番号19)に改変される。

自己免疫疾患の例として、甲状腺ペルオキシダーゼペプチドCGPCMNEELTERL (配列番号20)は、HCGPCMNEELTERL (配列番号21)に改変される。

自己免疫疾患の例として、サイログロブリンペプチドCGPSAALTWVQTH (配列番号22)は、HCGPCAALTWVQTH (配列番号23)に改変される。
30

【0042】

本発明は更に、遺伝子治療及び遺伝子ワクチン接種に用いられるウイルスベクターの骨格にコードされるウイルスタンパク質のMHCクラスII T細胞エピトープを含み、改変レドックスモチーフを有するペプチドに関する。本発明は更に、ウイルスベクターに対する免疫原性応答の治療及び予防の方法に関する。ウイルスベクター(例えばアデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス又はポックスウイルス、レトロウイルス又はレンチウイルス由来)及びウイルスタンパク質(例えばカブシドタンパク質)の例は、国際公開第2009101204号に開示されている。

本発明の教示の例として、アデノウイルスペプチドCHGCPPTLLYVLFEV (配列番号24)は、HCHGCPPTLLYVLFEV (配列番号25)、より典型的にはHCxGCPTLLYVLFEV (×は、CysでもHisでもない)(配列番号26)に改変される。
40

更なる例として、アデノウイルス後期タンパク質2ペプチドCGPCGGYVPFHIQVP (配列番号27)は、HCGPCGGYVPFHIQVP (配列番号28)に改変される。

【0043】

本発明は更に、細胞内病原体のタンパク質のMHCクラスII T細胞エピトープを含み、改変レドックスモチーフを有するペプチドに関する。本発明は更に、細胞内病原体感染の治療及び予防の方法に関する。細胞内病原体(細胞内生活環を有するウイルス(DNA対RNAウイルス、ss対dsウイルス、細菌、マイコバクテリア又は寄生体)及び抗原の例は、国際公開第2009101208号で論じられている。例えば、ヘルペスウイルス科(Herpesviridae)、フラビウイルス科(Flaviviridae)及びピコルナウイルス科(Picornaviridae)、インフルエンザ
50

、麻疹及び免疫不全ウイルス、パピローマウイルス。細菌、並びに結核菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、ヒト又は動物に対して病原性であるその他のマイコバクテリアを含むマイコバクテリア、例えばエルシニア(*Yersiniae*)、ブルセラ(*Brucellae*)、クラミジア(*Chlamydiae*)、マイコプラズマ(*Mycoplasmae*)、リケッチャ(*Rickettsiae*)、サルモネラ(*Salmonellae*)及びシゲラ(*Shigellae*)。寄生体は、プラスモジウム(*Plasmodiums*)、リーシュマニア(*Leishmanias*)、トリパノソーマ(*Trypanosomas*)、トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)、リステリアの種(*Listeria sp.*)、ヒストプラズマの種(*Histoplasma sp.*)を含む。

【 0 0 4 4 】

更なる例として、マラリアのCSP抗原CGHCDKHIEQYLK (配列番号29)は、HCGHCDKHIEQYLK (配列番号30)、より典型的にはHCGxCDKHIEQYLK (xは、CysでもHisでもない)(配列番号31)に改変される。

更なる例として、同じ抗原のCGHCEKKICKMEK (配列番号32)ペプチドは、HCGHCEKKICKMEK (配列番号33)、より典型的にはHCGxCEKKICKMEK (配列番号34)(xは、CysでもHisでもない)に改変される。

更なる例として、インフルエンザ赤血球凝集素からのペプチドは、CGHCKYVKQNTLK (配列番号35)からHCGHCKYVKQNTLK (配列番号36)、より典型的にはHCGxCKYVKQNTLK (xは、CysでもHisでもない)(配列番号37)に改変される。

更なる例として、リーシュマニアLack抗原からのペプチドCGHCEHPIVVSGS (配列番号38)は、HCGHCEHPIVVSGS (配列番号39)、より典型的にはHCGxCEHPIVVSGS (xは、CysでもHisでもない)(配列番号40)に改変される。

更なる例として、HIVのEnvタンパク質のgp120サブユニットのペプチドは、CGHCRAMYAPP IA (配列番号41)からHCGHCRAMYAPP IA (配列番号42)、より具体的にはHCGxCRAMYAPP IA (xは、CysでもHisでもない)(配列番号43)に改変される。

【 0 0 4 5 】

本発明は更に、補充療法において用いられるような可溶性アロ因子のMHCクラスII T細胞エピトープを含み、改変レドックスモチーフを有するペプチドに関する。本発明は更に、可溶性アロ因子に対する免疫反応の治療及び予防の方法に関する。可溶性アロ因子の例は、国際公開第2009101206号に開示されている。

本発明の例として、第VIII因子に対するB02C11抗体のVH領域の相補性決定領域(CDR)3のペプチドCHGCYCAVPDDPDA (配列番号44)は、HCHGCYCAVPDDPDA (配列番号45)に、より典型的にはHCxGCYCAVPDDPDA (xは、CysでもHisでもない)(配列番号46)に改変される。

更なる例として、別の抗第VIII因子抗体に由来するペプチドCGHCGGIRLHPTHYSIR (配列番号47)は、HCGHCGGIRLHPTHYSIR (配列番号48)、より具体的にはHCGxCGGIRLHPTHYSIR (xは、CysでもHisでもない)(配列番号49)に改変される。

【 0 0 4 6 】

本発明は更に、腫瘍関連抗原のMHCクラスII T細胞エピトープを含み、改変レドックスモチーフを有するペプチドに関する。本発明は更に、腫瘍の治療及び予防の方法に関する。関連する腫瘍(例えば、癌遺伝子、癌原遺伝子、ウイルスタンパク質、生存因子、クロノタイプ決定因子)及び腫瘍関連抗原の例は、国際公開第2009101205号に開示されている。このような腫瘍関連抗原は、腫瘍原因ウイルス(例えば、HPV)のウイルス抗原、野生型配列を有するが腫瘍で発現が増大している患者の腫瘍関連抗原、又は点変異、欠失、フレームシフト又は染色体再編による変異配列を有する抗原を含む。

本発明の教示の例として、MAGE-3ペプチドCHGCYRQVPGSDP (配列番号50)は、HCHGCYRQVPGSDP (配列番号51)、より典型的にはHCxGCYRQVPGSDP (xは、CysでもHisでもない)(配列番号52)に改変される。

更なる例として、サイクリンDペプチドCHGCFVALCATDV (配列番号53)は、HCHGCFVALCATDV (配列番号54)、より典型的にはHCxGCFVALCATDV (xは、CysでもHisでもない)(配列番号55)に改変される。

更なる例として、生存ペプチドCHGCFKELEGWEP (配列番号56)は、HCHGCFKELEGWEP (配列

10

20

30

40

50

番号57)、より典型的にはHCxGCFKELEGWEP (xは、CysでもHisでもない)(配列番号58)に改変される。

更なる例として、エプスタインバーウイルスペプチドCHGCVASSYAAQ (配列番号59)は、HCHGCVASSYAAQ (配列番号60)、より典型的にはHCxGCVASSYAAQ (xは、CysでもHisでもない)(配列番号61)に改変される。

【0047】

本発明は更に、同種移植片のアロ抗原性タンパク質のMHCクラスII T細胞エピトープを含み、改変レドックスモチーフを有するペプチドに関する。本発明は更に、同種移植片拒絶の治療及び予防の方法に関する。例は、骨髄移植片、実質性器官移植片(例えば、腎臓、肺、心臓、肝臓、脾臓、骨若しくは皮膚)又は細胞移植片(例えば、臍帯血細胞移植片、幹細胞移植片若しくは臍島細胞移植片)である。マイナー組織適合抗原、主要組織適合抗原又は組織特異的抗原のようなアロ抗原性タンパク質の例は、国際公開第2009100505号に開示されている。

本発明の例として、マウスDby抗原からのペプチドCHGCFNSRANSS (配列番号62)は、HCHGCFNSRANSS (配列番号63)、より具体的にはHCxGCFNSRANSS (xは、CysでもHisでもない)(配列番号64)に改変される。

別の例では、ヒトDbyからの配列CGHCLVLAPTR (配列番号65)は、HCGHCLVLAPTR (配列番号66)、より具体的にはHCGxCLVLAPTR (xは、CysでもHisでもない)(配列番号67)に改変される。

別の例では、マウスBlack 6鎖特異的ペプチドCGHCPEFLEQKRA (配列番号68)は、HCGHCPEFLEQKRA (配列番号69)、より典型的にはHCGxCPEFLEQKRA (xは、CysでもHisでもない)(配列番号70)に改変される。

【0048】

上記の全てのペプチドについて、ヒスチジンとシステインとの間に1又は2つのアミノ酸Xが存在する更なるバリエントが企図される。代表的には、これら外部アミノ酸Xは、HisでもCysでもSerでもThrでもない。

【0049】

本発明のペプチドは、試料中のクラスII拘束CD4+T細胞を検出するためのインビトロ診断方法において用いることもできる。この方法では、試料をMHCクラスII分子と本発明によるペプチドとの複合体と接触させる。CD4+T細胞は、試料中の細胞との該複合体の結合を測定することにより検出される。ここで、細胞との複合体の結合は、試料中のCD4+T細胞の存在を示す。

複合体は、ペプチドとMHCクラスII分子との融合タンパク質であり得る。

或いは、複合体中のMHC分子は、テトラマーである。複合体は、可溶性分子として提供することができ、又はキャリアに結合させることができる。

【0050】

本発明に関する使用に適切な抗原性タンパク質(又は免疫原)に相当するT細胞エピトープは、典型的には、普遍的又は無差別T細胞エピトープ(すなわち、多数のMHCクラスII分子と結合できるT細胞エピトープ)、より具体的には、風媒アレルゲン又は食物媒介アレルゲンに存在するものである。特定の実施形態では、アレルゲンは、副鼻腔炎アレルゲン、アレルギー性気管支喘息アレルゲン及びアトピー性皮膚炎アレルゲンからなる群から選択される。アレルゲンは、カビ又は様々な薬剤(例えば、ホルモン、抗生物質、酵素など)に存在する主要アレルゲンであることもできる(Clin. Exp. Allergy 26, 494-516 (1996)及びMolecular Biology of Allergy and Immunology, R. Bush編(1996)における定義も参照されたい)。特定のアレルギー疾患に関連するその他のアレルゲンも当該技術において周知であり、インターネット、例えばwww.allergome.orgで見出すことができる。

【0051】

自己免疫疾患は、広義には、2つの範疇 器官特異的及び全身性疾患に分類される。全身性自己免疫疾患の厳密な病因は、同定されていない。これに対して、器官特異的自己免疫疾患は、器官を標的にすることにより慢性的な局所炎症状態を誘導し維持するB及びT

10

20

30

40

50

細胞が関与する特異的免疫応答と関連する。器官特異的自己免疫疾患の例は、1型糖尿病、重症筋無力症、甲状腺炎及び多発性硬化症を含む。これら状態の各々で、单一又は少数の自己抗原が同定されている(それぞれ、インスリン、アセチルコリン筋肉受容体、甲状腺ペルオキシダーゼ及び主要塩基性タンパク質を含む)。この器官特異的免疫応答の抑制が有益で、器官機能の部分的又は完全な回復を導くことがよく認識されている。しかし、抗原特異的な様式で当該免疫応答を抑制できる治療はない。現在の治療は、むしろ、副腎皮質ステロイド及び免疫抑制剤の使用により得られる非特異的抑制を利用するが、副腎皮質ステロイド及び免疫抑制剤は全てが特異性の欠如に関連する著しい副作用を示し、そのために使用及び全体的な有効性が限定される。本発明に関係して企図される器官特異的自己免疫障害及びそれに関する自己抗原の非限定的な例は、以下のとおりである。

10

甲状腺疾患：サイログロブリン、甲状腺ペルオキシダーゼ、TSH受容体

1型糖尿病：インスリン(プロインスリン)、グルタミン酸デカルボキシラーゼ(GAD)、チロシンホスファターゼIA-2、熱ショックタンパク質HSP65、膵島特異的グルコース6-ホスファターゼ触媒サブユニット関連タンパク質(IGRP)

副腎炎：21-OHヒドロキシラーゼ

多腺性症候群：17-ヒドロキシラーゼ、ヒスチジンデカルボキシラーゼ、トリプトファンヒドロキシラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ

胃炎及び悪性貧血：H+/K+ ATPアーゼ内因子

多発性硬化症：ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、プロテオリピド(PLP)

20

重症筋無力症：アセチルコリン受容体

眼疾患：レチノール結合タンパク質(RBP)

内耳疾患：II型及びIX型コラーゲン

セリアック病：組織トランスグルタミナーゼ

炎症性腸疾患：pANCAヒストンH1タンパク質

アテローム動脈硬化症：熱ショックタンパク質HSP60

【0052】

本発明によると、免疫反応を誘引する能力を有する、抗原(自己又は非自己)のT細胞エピトープを含む免疫原性ペプチドが提供される。特定の実施形態では、T細胞エピトープは、ドミナントT細胞エピトープである。

30

したがって、特定の実施形態では、本発明の治療及び予防の方法は、本明細書に記載する免疫原性ペプチドの投与を含み、該ペプチドは、処置される疾患(例えば、上記の疾患)において役割を演じる抗原性タンパク質のT細胞エピトープを含む。更なる特定の実施形態では、用いるエピトープは、ドミナントエピトープである。

【0053】

本発明は更に、MHCクラスII T細胞エピトープと改変レドックスモチーフとを有するペプチドを作製する方法に関する。

第1工程では、方法は、興味対象の抗原性タンパク質の配列を準備し、抗原中のMHCクラスII T細胞エピトープ配列を同定する工程を含む。エピトープ配列は、考慮する抗原性タンパク質について記載されていることがある。或いは、エピトープ配列は、インシリコ法、インビトロ法又はインビボ法により決定される。加えて、抗原性タンパク質は、改変レドックスモチーフの存在についてスクリーニングされるが、これは、インシリコ法に限って必要となるものではない。

40

抗原性タンパク質が、その配列内で、T細胞エピトープ配列の近傍に、H-X(0,2)C-X(2)-[CST] (配列番号78、90若しくは91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、92若しくは93)モチーフを(すなわち、T細胞エピトープから7以下のアミノ酸離れて)含む蓋然性は非常に小さいが、その可能性は存在する。そうである場合、T細胞エピトープとモチーフとを含む抗原性タンパク質の断片を、本発明の方法及び使用に用いることができる。このようなタンパク質内のエピトープは、先行技術において論じられている可能性はあるが、当該改変レドックスモチーフの存在は論じられておらず、その妥当性については尚更で

50

ある。したがって、このようなペプチド断片を選択するか又は該ペプチド断片を本明細書に記載する方法に用いることについて、先行技術には動機づけがない。本ペプチドがMHCクラスII T細胞エピトープと改変レドックスモチーフとを含むタンパク質断片に基づく或る種の実施形態では、当該ペプチド配列は、エピトープと改変レドックスモチーフとの間の配列長を変更するか、リンカー配列中のアミノ酸を変更するか、該モチーフ内のSer又はThrをシステインに変更するか、又はモチーフ内の方若しくは両方のX位のアミノ酸を変更することにより更に改変してよい。

【0054】

ペプチドの設計に用いられるその他の抗原性タンパク質は、その配列内で、MHCクラスI T細胞エピトープから更に遠位に(エピトープ配列から7アミノ酸より離れて)、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、90若しくは91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、92若しくは93)配列を含んでいてよい。

その場合、エピトープとモチーフの距離のみが短縮され、モチーフの配列と隣接アミノ酸とが保存されたペプチドを作製できる。適切であれば、モチーフ外側のアミノ酸、モチーフ内のセリン若しくはトレオニン又は一方若しくは両方のX位を変更する。

より一般的には、ペプチドの設計に用いる抗原性タンパク質は、そのタンパク質配列内に、H-X(0,2)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、90若しくは91)も[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、92若しくは93)配列も含まない。本発明によるペプチドは、T細胞エピトープと改変レドックスモチーフとが0~7アミノ酸離れたペプチドを合成することにより製造される。或る種の実施形態では、改変レドックスモチーフは、当該タンパク質に現れる配列関係を保存するようにエピトープ配列の外側に1、2又は3つの変異を導入することにより得ることができる。典型的には、ノナペプチドに関して、天然配列の一部であるP-2及びP-1並びにP+10及びP+11のアミノ酸は、ペプチド配列中で保存される。これらフランギング残基は、一般的に、MHCクラスIIへの結合を安定化する。他の実施形態では、エピトープに対してN末端又はC末端側の配列は、T細胞エピトープ配列を含む抗原性タンパク質の配列に関係しない。

【0055】

他の具体的な実施形態では、ペプチドは、国際公開第2008/017517号に開示されるようなT細胞エピトープとC-X(2)-[CST] (配列番号77)又は[CST]-X(2)-C (配列番号76)モチーフとを有するペプチドの改変により作製される。ヒスチジンの付加又はヒスチジンへのアミノ酸の改変により、H-X(2,0)-C-X(2)-[CST] (配列番号78、90若しくは91)又は[CST]-X(2)-C-X(0,2)-H (配列番号79、92若しくは93)配列を有する本発明のペプチドが導かれる。

よって、ペプチドを設計する上記の方法に基づいて、ペプチドは、化学的ペプチド合成、組換え発現法又はより例外的な場合ではタンパク質のタンパク質分解若しくは化学的断片化により作製される。

【0056】

上記の方法により作製されるペプチドは、インビトロ及びインビボ法においてT細胞エピトープの存在について試験でき、インビトロアッセイにおいて還元活性について試験できる。最終的な品質管理として、ペプチドをインビトロアッセイにおいて試験して、該ペプチドが、エピトープ配列(改変レドックスモチーフを有する当該ペプチド内にも存在する)を含む抗原を提示する抗原提示細胞に対して、アポトーシス経路を介して細胞溶解性であるCD4+T細胞を生じさせることができるかを確認できる。

本発明に関する使用のための抗原性タンパク質からのT細胞エピトープの同定及び選択は、当業者に公知である。

本発明に関する使用に適切なエピトープを同定するために、抗原性タンパク質の単離ペプチド配列を、例えば、T細胞生物学技術により試験して、ペプチド配列がT細胞応答を誘発するかを決定する。T細胞応答を誘発すると判明したペプチド配列は、T細胞刺激活性を有すると定義される。

【0057】

ヒトT細胞刺激活性は、例えばダニアレルゲンに感作した個体(すなわち、ダニアレル

10

20

30

40

50

ゲンに対してIgE媒介免疫応答を有する個体)から得られたT細胞を、アレルゲンに由来するペプチド/エピトープと共に培養し、該ペプチド/エピトープに応答してT細胞の増殖が生じるかを、例えばトリチウム標識チミジンの細胞取込みを測定して決定することにより更に試験できる。ペプチド/エピトープに対するT細胞による応答についての刺激指数は、ペプチド/エピトープに対する応答における最大CPMを対照CPMで除して算出できる。バックグラウンドレベルの2倍以上のT細胞刺激指数(S.I.)を「陽性」とみなす。陽性の結果を用いて、試験したペプチド/エピトープの群について各ペプチド/エピトープの平均刺激指数を算出する。

【0058】

場合により、非天然(又は改変)T細胞エピトープは、MHCクラスII分子への結合親和性について更に試験することができる。試験は様々な様式で行うことができる。例えば、可溶性HLAクラスII分子を、所与のクラスII分子についてホモ接合性の細胞の溶解により得る。可溶性クラスII分子を親和性クロマトグラフィーにより精製する。可溶性クラスII分子を、当該クラスII分子についての強い結合親和性に基いて作製されたビオチン標識参照ペプチドとインキュベートする。次いで、クラスII結合について評価するペプチドを、種々の濃度にてインキュベートし、当該クラスIIとの結合について参照ペプチドと置き換わる能力を、ニュートラアビジンの添加により算出する。方法は、例えばTexierら(2000) *J. Immunology* 164, 3177-3184に見出すことができる。

本発明によると、T細胞エピトープの免疫原性は、還元性が増強された改変レドックスモチーフとT細胞エピトープを連結することにより増大する。特に、少なくとも1つのT細胞エピトープと本明細書に記載する改変レドックスモチーフとを含む本発明のペプチドは、2.0以上の平均T細胞刺激指数を有する。2.0以上のT細胞刺激指数を有するペプチドは、治療剤として有用であるとみなされている。より具体的には、本発明によるペプチドは、少なくとも2.5、少なくとも3.5、少なくとも4.0の平均T細胞刺激指数を有し、少なくとも5.0の平均T細胞刺激指数さえも有する。更に、本ペプチドは、少なくとも約100、少なくとも150、少なくとも約200又は少なくとも約250の陽性指数(P.I.)を典型的に有する。ペプチドの陽性指数は、平均T細胞刺激指数に、(例えば、イエダニに対して感受性の)免疫応答を有する個体集団(例えば少なくとも9人、少なくとも16人又は少なくとも29若しくは30人、又はそれ以上)中の該ペプチドに応答するT細胞を有する個体のパーセントを乗じることにより決定する(よって、該ペプチド/エピトープの無差別性を乗じたSIに相当する)。よって、陽性指数は、ペプチドに対するT細胞応答の強さ(S.I.)と、(例えば)イエダニに感受性の免疫応答を有する個体集団中でのペプチドに対するT細胞応答の頻度との両方を表す。

【0059】

例えば精細マッピング技術により最適T細胞エピトープを決定するために、T細胞刺激活性を有し、よってT細胞生物学的技術により決定される少なくとも1つのT細胞エピトープを含むペプチドを、該ペプチドのアミノ又はカルボキシ末端のいずれかにてアミノ酸残基の付加又は欠失により改変し、改変ペプチドに対するT細胞反応性の変化を試験して決定する。T細胞生物学的技術により決定したとき、天然型タンパク質配列内のオーバーラップ領域を共有する2又は3以上のペプチドがヒトT細胞刺激活性を有することが判明すれば、そのペプチドの全て又は一部を含む更なるペプチドを作製して、該更なるペプチドを同様の手順により試験することができる。この技術に従って、ペプチドを選択し、組換え又は合成的に作製する。T細胞エピトープ又はペプチドは、ペプチド/エピトープに対するT細胞応答の強さ(例えば、刺激指数)及び個体集団中でのペプチドに対するT細胞応答の頻度を含む様々な因子に基づいて選択される。

【0060】

加えて及び/又は或いは、1又は2以上のインビトロアルゴリズムを用いて、抗原性タンパク質内のT細胞エピトープ配列を同定できる。適切なアルゴリズムは、限定されないが、Zhangら(2005) *Nucleic Acids Res* 33, W180-W183 (PREDBALB) ; Salomon & Flower(2006) *BMC Bioinformatics* 7, 501 (MHCBN) ; Schulerら(2007) *Methods Mol. Biol.* 409,

10

20

30

40

50

75-93 (SYFPEITHI) ; Donnes及びKohlbacher(2006) Nucleic Acids Res. 34, W194-W197 (SVMHC) ; Kolaskar及びTongaonkar(1990) FEBS Lett. 276, 172-174 ; Guanら(2003) Appl. Bioinformatics 2, 63-66 (MHCpred)並びにSingh及びRaghava(2001) Bioinformatics 17, 1236-1237 (Propred)に記載されるものを含む。

より具体的には、これらアルゴリズムにより、抗原性タンパク質内の、MHC II分子の溝に嵌まる1又は2以上のオクタ又はノナペプチド配列の予測及び種々のHLAタイプについてこのような予測が可能になる。

【0061】

本発明のペプチドは、細菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞又は哺乳動物細胞において組換えDNA技術を用いて作製できる。長さの制限を考慮すれば、本発明のペプチドは、アミノ酸を互いに結合させてペプチドを生成する化学ペプチド合成により作製することができる。化学合成は、例えばD-アミノ酸、天然に存在しない側鎖を有するアミノ酸又はメチル化システインのような改変側鎖を有する天然アミノ酸を含む場合に特に適切である。

化学ペプチド合成法は、十分に記述されており、ペプチドは、企業、例えばApplied Biosystemsなどに注文することができる。

ペプチド合成は、固相ペプチド合成(SPPS)又は逆に液相ペプチド合成のいずれかとして行うことができる。最もよく知られているSPPS法は、t-Boc及びFmoc固相化学である。

【0062】

ペプチド合成中に幾つかの保護基を用いる。例えば、ヒドロキシ及びカルボキシル官能基はt-ブチル基により保護され、リジン及びトリプトファンはt-Boc基により保護され、アスパラギン、グルタミン、システイン及びヒスチジンはトリチル基により保護され、アルギニンはpbf基により保護される。適切な場合、このような保護基は、合成後にペプチドに残すことができる。Kent (Schnelzer及びKent (1992) Int. J. Pept. Protein Res. 40, 180-193)により最初に記載され、例えばTamら(2001) Biopolymers 60, 194-205により概説される、SPPSの適用範囲を超えるタンパク質合成を達成する多大な可能性をもたらすライゲーションストラテジ(2つの非保護ペプチド断片の化学選択的結合)を用いてペプチドを互いに連結してより長いペプチドを形成できる。100~300残基のサイズを有する多くのタンパク質は、この方法によって合成に成功している。合成ペプチドは、SPPSの著しい発展により、生化学、薬理学、神経生物学、酵素学及び分子生物学の研究分野においてかつてないほど重要な役割を演じ続けている。

【0063】

或いは、ペプチドは、本発明のペプチドをコードする核酸分子を用いることにより、該コーティングヌクレオチド配列を有する適当な発現ベクター中で合成することができる。このようなDNA分子は、自動化DNA合成機及び周知の遺伝子コードのコドン-アミノ酸関係を用いて容易に作製できる。このようなDNA分子は、オリゴヌクレオチドプローブ及び従来のハイブリダイゼーション法を用いて、ゲノムDNA又はcDNAとして得ることができる。このようなDNA分子は、適切な宿主、例えば細菌、例えば大腸菌(*Escherichia coli*)、酵母細胞、動物細胞又は植物細胞におけるDNA発現及びポリペプチド産生に適合した発現ベクター(プラスミドを含む)に組み込むことができる。

興味対象のペプチドの物理化学的特性(例えば溶解性、安定性)を調べて、ペプチドが治療用組成物での使用に適切であるか/適切と考えられるかを決定する。代表的には、このことは、ペプチドの配列を調整することにより最適化される。場合により、ペプチドは、合成後に、当該技術分野において公知の技術を用いて改変することができる(化学的改変、例えば官能基の付加/欠失)。

【0064】

T細胞エピトープ自体は、抗原提示細胞の表面の適切なHLA分子と結合し、関係するT細胞亜集団を刺激することにより、Tヘルパー細胞レベルの初期イベントを誘引すると考えられる。これらイベントは、T細胞増殖、リンホカイン分泌、局所炎症反応、当該部位への更なる免疫細胞の動員、及び抗体産生に至るB細胞カスケードの活性化を導く。これら抗体の1つのアイソタイプであるIgEは、アレルギー症状の発生において基本的に重要

10

20

30

40

50

であり、その產生は、Tヘルパー細胞レベルのイベントカスケードの早期に、分泌されるリンホカインの性質により促される。T細胞エピトープは、T細胞受容体による認識の基本的要素又は最小単位であり、タンパク質のアミノ酸配列中で連続する、受容体認識に必須なアミノ酸残基を含む。

しかし、T細胞エピトープとレドックスモチーフとを有するペプチドの投与の際には、以下のイベントが生じると考えられる：MHCクラスII分子が提示する抗原由来ペプチドとの同種相互作用に起因する抗原(i)特異的T細胞の活性化；レダクターゼ配列は、T細胞表面タンパク質(例えば、第2ドメインが拘束性ジスルフィドブリッジを含むCD4分子)を還元する。このことにより、シグナルがT細胞に伝達される。増大した酸化経路に関連する一連の結果のうち、重要なイベントは、カルシウム流入の増加及びNF-KB転写因子の核への移動である。後者は、IFN- γ 及びグランザイムの転写の増加をもたらし、このことにより、アポトーシス誘導機序により細胞は細胞溶解性を獲得することができる；細胞溶解性は、グランザイムB分泌が関与する機序及びFas-FasL相互作用によりペプチド提示細胞に影響する。細胞死滅効果がアポトーシス経路により得られるので、これら細胞については、細胞溶解性細胞が細胞傷害性細胞より適切な用語である。抗原を提示する標的細胞の破壊は、同じ抗原に位置するエピトープ又は同じ抗原提示細胞によるプロセシングを受けるであろう無関係の抗原に特異的な他のT細胞の活性化を妨げる；T細胞活性化の更なる結果は、細胞間接触依存性機序により、バイスタンダート細胞の活性化を抑制することである。この場合、細胞溶解性細胞とバイスタンダート細胞とが、近傍で、すなわち、同じ抗原提示細胞の表面で活性化されるならば、異なる抗原提示細胞が提示する抗原により活性化されるT細胞も抑制される。

【0065】

上記の仮定の作用機序は、上記で引用した、本発明者のPCT出願及び刊行物に開示される実験データから実証される。

本発明は、インビボ又はインビトロのいずれかで抗原特異的細胞溶解性CD4+T細胞を作製する方法、及びそれとは独立して、特徴的発現データに基づいて、他の細胞集団(例えば、Foxp3+Treg)と細胞溶解性CD4+T細胞とを弁別する方法を提供する。

【0066】

本発明は、抗原特異的CD4+T細胞を製造するインビボ方法を記載する。特定の実施形態は、本明細書に記載する本発明のペプチドで動物(ヒトを含む)を免疫後、免疫動物からCD4+T細胞を単離することによる、CD4+T細胞を製造又は単離する方法に関する。本発明は、APCに向けられた抗原特異的細胞溶解性CD4+T細胞のインビトロ製造法を記載する。本発明は、APCに向かう抗原特異的細胞溶解性CD4+T細胞を作製する方法を提供する。

1つの実施形態では、末梢血細胞の単離、本発明による免疫原性ペプチドによる細胞集団のインビトロ刺激、及び(より具体的には、IL-2の存在下での)刺激細胞集団の拡大を含む方法が提供される。本発明による方法は、多数のCD4+T細胞が作製され、(抗原特異的エピトープを含むペプチドを用いることにより)抗原性タンパク質に特異的なCD4+T細胞を作製できるという利点を有する。

代替の実施形態では、CD4+T細胞は、インビボで、すなわち、本明細書に記載する免疫原性ペプチドの対象への注射及びインビボで生じた細胞溶解性CD4+T細胞の回収により作製することができる。

【0067】

本発明の方法により得ることができるAPCに向けられた抗原特異的細胞溶解性CD4+T細胞は、免疫治療のための哺乳動物への投与、アレルギー反応の予防及び自己免疫疾患の治療に特に興味深い。同種及び自己発源の両方の細胞の使用が企図される。

細胞溶解性CD4+T細胞集団は、本明細書の以下に記載するようにして得られる。

本明細書に記載する抗原特異的細胞溶解性CD4+T細胞は、医薬、特に養子細胞治療に使用する医薬、より具体的には急性アレルギー反応及び自己免疫疾患(例えば、多発性硬化症)の再発の治療に使用する医薬として用いることができる。単離細胞溶解性CD4+T細胞又は細胞集団、より具体的には記載するようにして作製された抗原特異的細胞溶解性CD4+

10

20

30

40

50

T細胞集団は、免疫障害の予防又は治療用の医薬の製造に用いられる。単離又は作製された細胞溶解性CD4+T細胞を用いることによる治療方法が開示される。

【0068】

国際公開第2008/017517号に説明されるように、APCに向けられた細胞溶解性CD4+T細胞は、細胞の発現特性に基づいて天然Treg細胞と区別できる。より具体的には、細胞溶解性CD4+T細胞集団は、天然Treg細胞集団と比較して、以下の特徴の1つ又は2以上を示す：

活性化に際し、CD103、CTLA-4、FasI及びICOSを含む表面マーカーの発現が増加する、CD25の中間発現、

CD4、ICOS、CTLA-4、GITRを発現し、CD127(IL7-R)を発現しないか又はその発現量は低く、CD27を発現しない、

転写因子T-bet及びegr-2(Krox-20)を発現し、転写リプレッサーFoxp3を発現しない、IFN- γ を高産生し、IL-10、IL-4、IL-5、IL-13及びTGF- β を産生しないか又は痕跡量でしか産生しない。

更に、細胞溶解性T細胞は、CD45RO及び/又はCD45RAを発現し、CCR7、CD27を発現せず、高レベルのグランザイムB及びその他のグランザイム並びにFasリガンドを示す。

【0069】

本発明のペプチドは、生存動物(代表的には、ヒト)への投与により、バイスタンダーT細胞の抑制活性を奏する特異的T細胞を誘発する。

この機序は、本発明のペプチドが、或る抗原の特異的T細胞エピトープを含んでいるにもかかわらず、同じ抗原の他のT細胞エピトープに対する免疫反応により誘発される障害の予防又は治療用いることができ、ある状況では、本発明のペプチドが活性化するT細胞の近傍で、当該他のT細胞エピトープがMHCクラスII分子により同じ機構で提示される場合には、他の異なる抗原の他のT細胞エピトープに対する免疫反応により誘発される障害の治療にさえ用いることができる意味し、実験結果はそのことを実証している。

上記の特徴を有することに加え、抗原特異的である、すなわち、抗原特異的免疫応答を抑制することができる細胞タイプの単離細胞集団が開示される。

【0070】

本発明のペプチドは、当該技術分野において周知の遺伝子治療法にも用いることができる。本発明によるペプチドの使用を説明する本明細書で用いる技術用語は、本発明による免疫原性ペプチドをコードするか又は発現する核酸の使用も含む。

本発明は、本発明のペプチドをコードする核酸配列及びその使用の方法を記載する。遺伝子治療により、哺乳動物において、インビボで、本発明によるペプチド、そのホモログ又は誘導体のレベルを達成する様々な方法が、本発明の範囲内で企図される。

【0071】

タンパク質配列をコードする組換え核酸分子は、ネイキッドDNAとして、又は標的細胞への送達用のリポソームその他の脂質系において用いることができる。プラスミドDNAを細胞内に直接移入する他の方法は、ヒト遺伝子治療における使用のために当業者に周知であり、プラスミドDNAとタンパク質とを複合体化することにより、DNAを細胞の受容体に標的付けることを含む。最も単純な形では、遺伝子移入は、微量のDNAを、マイクロインジェクション法により、細胞核に単純に注入することにより行うことができる。組換え遺伝子は、細胞に一旦導入されると、細胞に認識され、通常の転写及び翻訳機構により遺伝子産物が発現される。DNAを多数の細胞に導入するために他の方法も試みられている。これら方法には、DNAをリン酸カルシウムで沈殿させ、ピノサイトーシスにより細胞に取り込まれるトランスフェクション；細胞を高電圧パルスに曝露して膜に孔を導入するエレクトロポレーション；DNAを親油性ベシクルに包み込み、これを標的細胞と融合させるリポフェクション/リポソーム融合；並びに、小発射体と結合したDNAを用いる粒子ボンバードメントが含まれる。細胞にDNAを導入する別の方法は、化学改変タンパク質にDNAを結合させることである。アデノウイルスタンパク質は、エンドソームを不安定化し、細胞へのDNAの取込みを増強できる。DNA複合体を含む溶液とアデノウイルスを混合すること、又はタンパク質架橋剤を用いてアデノウイルスと共有結合したポリリジンにDNAを結合させること

10

20

30

40

50

とにより、組換え遺伝子の取込み及び発現が実質的に改善される。アデノ随伴ウイルスベクターも、血管細胞への遺伝子送達に用いることができる。本明細書で用いる場合、「遺伝子移入」は、細胞に外来核酸分子を導入するプロセスを意味し、遺伝子によりコードされる特定産物の発現を可能にするために一般的に行われる。産物は、タンパク質、ポリペプチド、アンチセンスDNA若しくはRNA又は酵素活性RNAを含み得る。遺伝子移入は、培養細胞において、又は哺乳動物への直接投与により行うことができる。別の実施形態では、本発明によるペプチドをコードする核酸分子配列を含むベクターが提供される。特定の実施形態では、ベクターは、核酸分子配列が特定の組織でのみ発現されるように作製される。組織特異的遺伝子発現を達成する方法は、当該技術分野において周知である。このことは、例えば、本発明によるペプチドをコードする配列を、1又は2以上の特定の組織での発現を駆動するプロモーターの制御下に配置することにより達成できる。

【0072】

ウイルス、例えばレトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、RNAウイルス又はウシパピローマウイルスに由来する発現ベクターは、本発明によるペプチド、そのホモログ又は誘導体をコードするヌクレオチド配列(例えばcDNA)を標的組織又は細胞集団に送達するために用いてよい。当業者に周知の方法を用いて、そのようなコード配列を含む組換えウイルスベクターを構築できる。

したがって、本発明は、本発明のペプチドをインビボで発現することができる核酸の、外来又は自己の抗原に対する免疫応答が引き起こす疾患の治療及び/又は予防のための使用を開示する。1つの実施形態によると、本発明によるペプチドをインビボで発現することができる核酸は、プロモーターと作動可能に連結した、当該ペプチドをコードする配列である。そのような配列は、直接又は間接的に投与できる。例えば、本発明によるペプチドのコード配列を含む発現ベクターを細胞に挿入し、その後、細胞をインビトロで増殖させた後、患者に注射又は注入することができる。或いは、本発明によるペプチドをインビボで発現することができる核酸は、細胞の内因性発現を改変する配列である。遺伝子治療法は、本発明によるペプチド、そのホモログ若しくは誘導体をコードするヌクレオチド配列を含むアデノウイルスベクター、又は本発明によるペプチドをコードするネイキッド核酸分子の使用を含むことがある。或いは、本発明によるペプチドをコードする核酸分子を含む工学的に操作された細胞を注射してよい。

【0073】

本発明による1又は2以上のペプチドの投与が遺伝子移入(すなわち、投与に際して本発明によるペプチドのインビボでの発現をもたらす核酸の投与)による場合、核酸の適当な投与量は、核酸の結果として発現されるペプチドの量に基づいて、例えば、投与後の血中のペプチド濃度を測定することにより決定することができる。よって、特定の実施形態では、本発明のペプチドは、発現ベクター中であるか否かに関わらず該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて投与される。よって、本発明は、遺伝子治療法にも関する。別の特定の実施形態は、免疫障害の治療又は予防のための、本発明のペプチドの局所的過剰発現を誘導する方法の使用に関する。

本発明は、本発明による1又は2以上のペプチドを含み、薬学的に許容されるキャリとを更に含む医薬組成物を提供する。上記で詳述したように、本発明は、医薬品として用いる組成物、又は該組成物を用いて免疫障害の哺乳動物を治療する方法、及び免疫障害の予防又は治療用医薬の製造のための該組成物の使用にも関する。医薬組成物は、例えば、免疫障害、特に風媒及び食物媒介アレルギー並びにアレルギーを起源とする疾患を治療又は予防するために適切なワクチンであり得る。本明細書に更に記載する医薬組成物の例として、本発明によるペプチドを、哺乳動物への投与に適切なアジュバント、例えば水酸化アルミニウム(ミョウバン)に吸着させる。代表的には、ミョウバンに吸着した50 μgのペプチドを、2週間間隔で3回、皮下経路により注射する。経口、経鼻又は筋内を含むその他の投与経路が可能であることが、当業者に自明である。また、注射回数及び注射量は、治療すべき病的状態に依存して可変である。更に、ミョウバン以外のその他のアジュバントは、MHCクラスII提示でのペプチド提示及びT細胞活性化を容易にすることを条件として

10

20

30

40

50

、用いることができる。よって、本活性成分は、単独で投与することも可能であるが、典型的には、医薬製剤として提供される。獣医学用及びヒト用の本発明の製剤はいずれも、少なくとも1つの上記活性成分を、1又は2以上の薬学的に許容されるキャリアと共に含む。本発明は、活性成分として1又は2以上の本発明によるペプチドを、薬学的に許容されるキャリアとの組合せで含む医薬組成物に関する。本発明の医薬組成物は、治療有効量の活性成分(例えば、治療法又は予防法に関して下記するもの)を含むべきである。場合により、本組成物は、他の治療成分を更に含む。適切な他の治療成分(及び該成分が属するクラスに応じた通常の投与量)は、当業者に周知であり、免疫障害の治療に用いられるその他の既知の薬物から選択できる。

【0074】

10

用語「薬学的に許容されるキャリア」は、本明細書で用いる場合、例えば本組成物を溶解し、分散若しくは拡散させることにより、治療部位への活性成分の送達を容易にし、及び/又はその効力を損なうことなく活性成分の貯蔵、輸送若しくは取扱いを容易にするために活性成分と共に製剤化される任意の材料又は物質を意味する。これらは、あらゆる溶剤、分散媒、コーティング、抗菌及び抗真菌剤(例えば、フェノール、ソルビン酸、クロロブタノール)、等張化剤(例えば、糖又は塩化ナトリウム)などを含む。組成物中の免疫原性ペプチドの作用期間を制御するために更なる成分を含めてよい。薬学的に許容されるキャリアは、固体、液体又は液体を形成するように圧縮された気体であってよく、すなわち、本発明の組成物は、適切には、濃縮物、エマルジョン、溶液、顆粒、粉末(dusts)、スプレー剤、エアゾール、懸濁物、軟膏、クリーム、タブレット、ペレット又は散剤であり得る。医薬組成物及びその製剤での使用に適切な薬学的キャリアは、当業者に周知であり、その選択について本発明において特に限定されない。薬学的キャリアは、添加剤、例えば、湿潤剤、分散剤、展着剤、接着剤、乳化剤、溶剤、コーティング、抗菌及び抗真菌剤(例えば、フェノール、ソルビン酸、クロロブタノール)、等張化剤(例えば、糖又は塩化ナトリウム)などを含むこともある(但し、医薬実務と矛盾しないこと、すなわち、キャリア及び添加剤は哺乳動物を永続的に損傷しないことを条件とする)。本発明の医薬組成物は、任意の既知の様式で製造してよく、例えば、単一工程又は多工程手順で、活性成分を、選択されたキャリア材料と、適切であればその他の添加剤(例えば、表面活性剤)と均質に混合し、それらでコートし及び/又は粉碎することにより製造してよい。本発明の医薬組成物は、例えば、約1~10μmの直径を通常有するマイクロスフェアの形で得られるように、すなわち、活性成分の制御放出又は持続放出用のマイクロカプセル剤を製造するために、微粒子化により製造してもよい。

【0075】

20

30

40

本発明の医薬組成物に用いられる適切な表面活性剤(乳化剤としても知られる)は、良好な乳化、分散及び/又は濡れ特性を有する非イオン性、カチオン性及び/又はアニオン性の材料である。適切なアニオン性界面活性剤は、水溶性せっけん及び水溶性合成表面活性剤の両方を含む。適切なせっけんは、高級脂肪酸(C10~C22)のアルカリ金属若しくはアルカリ土類金属塩、非置換若しくは置換アンモニウム塩(例えば、オレイン酸若しくはステアリン酸のナトリウム若しくはカリウム塩)、又は、ココナツ油若しくは獣脂から得ることができる天然脂肪酸混合物のアルカリ金属若しくはアルカリ土類金属塩、非置換若しくは置換アンモニウム塩である。合成界面活性剤は、ポリアクリル酸のナトリウム若しくはカルシウム塩；スルホ脂肪酸塩及び脂肪酸硫酸塩；スルホン化ベンズイミダゾール誘導体及びアルキルアリールスルホン酸塩を含む。スルホ脂肪酸塩又は脂肪酸硫酸塩は、通常、アルカリ金属又はアルカリ土類金属塩、非置換アンモニウム塩又は8~22の炭素原子を有するアルキル若しくはアシル基で置換されたアンモニウム塩(例えば、リグノスルホ酸若しくはドデシルスルホ酸のナトリウム若しくはカルシウム塩)、或いは天然脂肪酸から得られる脂肪アルコール硫酸塩の混合物、硫酸若しくはスルホン酸エステルのアルカリ金属若しくはアルカリ土類金属塩(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)並びに脂肪アルコール/エチレンオキシド付加物のスルホン酸の形である。適切なスルホン化ベンズイミダゾール誘導体は、代表的には8~22の炭素原子を含む。アルキルアリールスルホン酸塩の例は

50

、ドデシルベンゼンスルホン酸若しくはジブチル-ナフタレンスルホン酸のナトリウム、カルシウム若しくはアルカノールアミン塩又はナフタレン-スルホン酸/ホルムアルデヒド縮合生成物である。対応するリン酸塩(例えば、リン酸エステルの塩)及びp-ノニルフェノールとエチレン及び/又はプロピレンオキシドとの付加物、又はリン脂質も適切である。この目的に適切なリン脂質は、セファリン又はレシチン型の天然(動物又は植物細胞起源)又は合成リン脂質、例えばホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、リゾレシチン、カルジオリビン、ジオクタニルホスファチジルコリン、ジバルミトイルホスファチジルコリン及びそれらの混合物である。

【0076】

適切な非イオン性界面活性剤は、分子中に少なくとも12の炭素原子を含むアルキルフェノール、脂肪アルコール、脂肪酸、脂肪族アミン又はアミド、アルキルアレンスルホン酸塩(alkylarene sulphonates)及びジアルキルスルホスクシネートのポリエトキシル化及びポリプロポキシル化誘導体、例えば脂肪族及び脂環式アルコール、飽和及び不飽和脂肪酸及びアルキルフェノールのポリグリコールエーテル誘導体、アルキルフェノールの(脂肪族)炭化水素部分に3~10のグリコールエーテル基及び8~20の炭素原子とアルキル部分に6~18の炭素原子とを典型的に含む誘導体を含む。更に適切な非イオン性界面活性剤は、ポリエチレンオキシドとポリプロピレングリコール、アルキル鎖に1~10の炭素原子を含むエチレンジアミノ-ポリプロピレングリコールとの水溶性付加物(付加物は、20~250のエチレングリコールエーテル基及び/又は10~100のプロピレングリコールエーテル基を含む)である。このような化合物は、通常、プロピレングリコール単位あたり1~5のエチレングリコール単位を含む。非イオン性界面活性剤の代表的な例は、ノニルフェノール-ポリエトキシエタノール、ひまし油ポリグリコールエーテル、ポリプロピレン/ポリエチレンオキシド付加物、トリブチルフェノキシポリエトキシエタノール、ポリエチレングリコール並びにオクチルフェノキシポリエトキシエタノールである。ポリエチレンソルビタン(例えばポリオキシエチレンソルビタントリオレエート)、グリセロール、ソルビタン、ショ糖及びペンタエリスリトールの脂肪酸エステルも、適切な非イオン界面活性剤である。適切なカチオン界面活性剤は、ハロ、フェニル、置換フェニル若しくはヒドロキシで場所によって置換された4つの炭化水素基を有する第4級アンモニウム塩、特にハロゲン化物; 例えばN置換基として少なくとも1つのC8C22アルキル基(例えばセチル、ラウリル、パルミチル、ミリスチル、オレイルなど)、更なる置換基として非置換若しくはハロゲン化低級アルキル、ベンジル及び/若しくはヒドロキシ-低級アルキル基を含む第4級アンモニウム塩を含む。

【0077】

この目的に適切な表面活性剤のより詳細な説明は、例えば「McCutcheon's Detergents and Emulsifiers Annual」(MC Publishing Corp., Ridgewood, New Jersey, 1981)、「Tensid-Taschenbuch」、第2版(Hanser Verlag, Vienna, 1981)及び「Encyclopaedia of Surfactants」、(Chemical Publishing Co., New York, 1981)で見出すことができる。本発明によるペプチド、そのホモログ又は誘導体(及びその生理的に許容される塩又は医薬組成物(全てが用語「活性成分」に含まれる))は、治療する病的状態及び投与する化合物(ここでは、タンパク質及び断片)に適切な任意の経路により投与できる。可能な経路は、局所(regional)、全身、経口(固形又は吸入)、直腸、経鼻、局部(topical)(点眼、口腔粘膜及び舌下を含む)、膣及び非経口(皮下、筋内、静脈内、皮内、動脈内、髄腔内及び硬膜外を含む)を含む。好みの投与経路は、例えばレシピエントの状態及び治療すべき疾患により変わり得る。本明細書に記載するように、キャリアは、最適には、製剤中の他の成分と適合性であり、レシピエントに対して有害でないという意味で「許容される」。製剤は、経口、直腸、経鼻、局部(口腔粘膜及び舌下を含む)、膣又は非経口(皮下、筋内、静脈内、皮内、動脈内、髄腔内及び硬膜外を含む)投与に適切なものを含む。製剤は、簡便には、単位剤形にあり、製剤技術分野において周知の任意の方法により製造してよい。このような方法は、活性成分を、1又は2以上の副成分を構成するキャリアと接触させる工程を含む。一般に、製剤は、活性成分を、液体キャリア若しくは微粉化固体キャリア又はそ

10

20

30

40

50

の両方と均一かつ十分に接触させ、その後必要であれば、生成物を成形することにより製造される。経口投与に適切な本発明の製剤は、別個の単位、例えば所定量の活性成分を各々含むカプセル剤、カシェ剤若しくは錠剤；散剤若しくは顆粒剤；水性液体若しくは非水性液体中の液剤若しくは懸濁剤；又は水中油型エマルジョン若しくは油中水型エマルジョンであってよい。活性成分は、ボーラス剤、舐剤又はペースト剤であってもよい。錠剤は、場合により1又は2以上の副成分と共に圧縮又は成形により作製できる。圧縮錠剤は、結合剤、滑沢剤、不活性希釈剤、保存剤、表面活性又は分散剤と混合されていてもよい自由流動形態(例えば、粉末又は顆粒形態)の活性成分を、適切な機械で圧縮することにより製造できる。成形錠剤は、不活性液体希釈剤で湿らせた粉末化合物の混合物を適切な機械で成形することにより作製できる。錠剤は、場合によりコーティングするか又は刻み目を入れてよく、その中の活性成分の遅延放出又は制御放出をもたらすように製剤化できる。
10

【0078】

局所治療、例えば皮膚上での(例えば関節の)局所治療のために、製剤は、場合により、例えば0.075~20% w/w(0.1% w/wの増分で0.1%~20%の範囲(例えば0.6% w/w、0.7% w/wなど)の活性成分を含む)、特に0.2~15% w/w、より具体的には0.5~10% w/wの量で活性成分を含む局部軟膏又はクリームとして塗布される。軟膏に製剤化する場合、活性成分は、パラフィン性又は水混和性の軟膏基剤と共に用いてよい。或いは、活性成分は、水中油型クリーム基剤と共にクリームに製剤化できる。所望により、クリーム基剤の水相は、例えば少なくとも30% w/wの多価アルコール、すなわち2以上のヒドロキシ基を有するアルコール、例えばプロピレンギリコール、ブタン1,3-ジオール、マンニトール、ソルビトール、グリセロール及びポリエチレンギリコール(PEG400を含む)並びにそれらの混合物を含んでよい。局部製剤は、望ましくは、皮膚又はその他の患部を通じての活性成分の吸収又は浸透を増進する化合物を含んでよい。そのような皮膚浸透増進剤の例は、ジメチルスルホキシド及び関連する類似体を含む。本発明のエマルジョンの油相は、公知成分から公知の様式で構成してよい。油相は単に乳化剤を含んでよいが、望ましくは、少なくとも1種の乳化剤と、脂肪若しくは油又は脂肪及び油の両方との混合物を含む。場合により、親水性乳化剤を、安定化剤として作用する親油性乳化剤と共に、典型的には油及び脂肪の両方を含ませることにより含ませる。まとめると、乳化剤は、安定化剤あり又はなしで、いわゆる乳化ワックスを形成し、油及び脂肪と共に乳化ワックスは、いわゆる乳化軟膏基剤を形成し、これがクリーム製剤の油性分散相を形成する。
20

【0079】

製剤に適切な油及び脂肪の選択は、所望の外観性の達成に基づく。なぜなら、薬学的エマルジョン製剤に用いられる可能性があるほとんどの油における当該活性化合物の溶解性は、非常に低いからである。よって、クリームは、場合により、チューブ又はその他の容器からの漏れを回避するに適切な調度を有する、ベタつきのない非染色性で洗浄可能な製品であるべきである。直鎖若しくは分岐鎖でモノ若しくはジ塩基性アルキルエステル、例えばジイソシアジペート、ステアリン酸イソセチル、ヤシ脂肪酸のプロピレンギリコールジエステル、ミリスチン酸イソプロピル、オレイン酸デシル、パルミチン酸イソプロピル、及び特にステアリン酸ブチル、パルミチン酸2-エチルヘキシル又はCrodamol CAPとして知られる分岐鎖エステルのブレンドを用いてよい。これらは、所望の特性に応じて単独又は組み合わせて用いることができる。或いは、高融点脂質、例えば白色軟パラフィン及び/若しくは流動パラフィン又はその他の鉛油を用いることができる。目への局部投与に適切な製剤は、活性成分が、該活性成分に適切なキャリア(特に、水性溶剤)に溶解又は懸濁された点眼剤も含む。活性成分は、場合により、当該製剤において、0.5~20%、有利には0.5~10%、特に約1.5% w/wの濃度であってよい。口腔への局部投与に適切な製剤は、風味付けされた基剤、通常、ショ糖及びアカシア又はトラガカント中に活性成分を含むゼンジ；不活性基剤、例えばゼラチン及びグリセロール又はショ糖及びアカシア中に活性成分を含む香錠；並びに適切な液体キャリア中に活性成分を含む口内洗浄剤を含む。直腸投与用の製剤は、例えばカカオ脂又はサリチル酸塩を含む適切な基剤を含む坐剤であってよい。キャリアが固体である経鼻投与に適切な製剤は、粒子サイズ、例えば20~500ミク
30
40
50

ロン(5ミクロンの増分で20~500ミクロンの範囲(例えば、30ミクロン、35ミクロンなど)の粒子サイズを含む)の範囲の粒子サイズを有する粗粉末を含む固体を含み、これは、嗅剤を摂取する様式で、すなわち、鼻近傍に保持した粉末容器から経鼻経路による迅速吸入により投与される。キャリアが液体である、例えば経鼻スプレー又は点鼻薬としての投与に適切な製剤は、活性成分の水性又は油性溶液を含む。エアゾール投与に適切な製剤は、従来方法に従って製造してよく、他の治療剤と共に送達してよい。腔投与に適切な製剤は、活性成分に加えて、当該技術分野において適切であることが知られているキャリアを含むペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレー剤であってよい。非経口投与に適切な製剤は、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤及び意図するレシピエントの血液と製剤を等張にする溶質を含み得る水性及び非水性滅菌注射液、並びに懸濁化剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性の滅菌懸濁剤を含む。製剤は、単位用量又は複数用量の容器(例えば、密閉アンプル及びバイアル)で提供されてよく、使用の直前に滅菌液体キャリア(例えば、注射用水)の添加のみを必要とする凍結乾燥状態で貯蔵してよい。即時注射溶液及び懸濁液は、上記の滅菌散剤、顆粒剤及び錠剤から調製してよい。

【0080】

代表的な単位投薬製剤は、上記のような日用量若しくは単位日準用量(unit daily subdose)又はその適切な分割量の活性成分を含むものである。本発明の製剤は、上記で特に言及した成分に加え、目的の製剤のタイプに関して当該技術分野において慣習的なその他の物質を含んでよく、例えば経口投与に適切なものは、香味剤を含み得る。本発明によるペプチド、そのホモログ又は誘導体は、活性成分として本発明の1又は2以上の化合物を含む制御放出医薬製剤(「制御放出製剤」)であって、投薬頻度を少なくするか又は所与の本発明の化合物の薬物動態若しくは毒性プロフィールが改善されるように、活性成分の放出が制御及び調節された製剤の提供に用いることができる。別々の単位が本発明の1又は2以上の化合物を含む経口投与に適合する制御放出製剤は、従来法に従って作製できる。組成物中の活性成分の作用期間を制御するために、更なる成分を含めることができる。よって、制御放出組成物は、適切な重合体キャリア(例えば、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニルピロリドン、エチレン-酢酸ビニル共重合体、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、硫酸プロタミンなど)の選択により達成できる。薬物放出速度及び作用期間は、重合体物質(例えば、ヒドロゲル、ポリ乳酸、ヒドロキシメチルセルロース、ポリメタクリル酸メチル)及びその他の上記重合体の粒子(例えば、マイクロカプセル)中に活性成分を組み込むことによっても制御できる。この方法は、コロイド薬物送達系、例えばリポソーム、マイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、ナノカプセルなどを含む。医薬組成物は、投与経路に応じて、保護コーティングを必要とすることがある。注射に適切な医薬形態は、即時調製用の滅菌水性液剤又は分散剤及び滅菌散剤を含む。よって、この目的の典型的なキャリアは、生体適合性水性緩衝剤、エタノール、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど及びその混合物を含む。幾つかの活性成分を組み合わせて用いる場合、それら活性成分は、直ちに、治療すべき哺乳動物において同時に共同の治療効果を必ずしも発揮しない事実を考慮して、対応する組成物は、当該二成分を、医薬キット、又は隣接する別個の貯蔵部又は区画に含むパッケージの形であってもよい。したがって、この関係では、各活性成分は、他の成分のものとは異なる投与経路に適切な様式で、例えば一方が経口又は非経口製剤の形であり、他方が静脈内注射用のアンプル又はエアゾール剤の形である様式で、製剤化されてよい。

【0081】

本発明において得られる細胞溶解性CD4+T細胞は、インビトロ及びインビボで証明されるように、樹状細胞及びB細胞の両方に影響するMHCクラスII依存性の同種活性化の後にA PCアポトーシスを誘導し、(2)IL-10及び/又はTGF- の非存在下で接触依存性機序によりバイスタンダーT細胞を抑制する。細胞溶解性CD4+T細胞は、国際公開第2008/017517号で論じられるように、天然及び適応Tregの両方から区別できる。

【0082】

ここで、本発明を、如何なる限定も伴わない下記の実施例を用いて説明する。更に、本

10

20

30

40

50

明細書に記載する全ての参考文献は、参照により本明細書に明示的に含まれる。

【実施例】

【0083】

実施例1：ペプチドの還元活性を評価する方法

ペプチドのレダクターゼ活性は、Tomazzoliら(2006) Anal. Biochem. 350, 105-112に記載される蛍光を用いて決定する。FITC標識を有する2つのペプチドは、ジスルフィドブリッジを介して互いに共有結合する場合、自己消光性になる。本発明によるペプチドでの還元に際して、還元された個別のペプチドは、再び蛍光性になる。

「通常の」還元性ペプチドを有するペプチド、すなわちレドックスモチーフを有するがヒスチジンが追加されていないペプチドと、レドックスモチーフを含まないペプチドとを用いて対照実験を行った。

【0084】

実施例2：細胞活性化の測定

本発明のペプチドにより得られる抗原特異的細胞溶解性細胞は、抗原提示細胞をアポトーシスに駆り立てることができる。この活性化を評価し、究極の細胞溶解性細胞の過剰活性化(当該細胞自体をアポトーシスに駆り立て得る)を防止するため、Akt及びShpのリン酸化状態が、細胞の活性化(アポトーシスを生じさせる)と細胞の過剰活性化(自己アポトーシス)との間の相関関係を導くことを可能にする。

【0085】

実施例3：MOG由来ペプチドの設計。

本発明のペプチドの例は、配列HCPYCSRVVHLYRNGKD(配列番号1)を有するペプチドである。このペプチドは、ヒトMOGタンパク質(ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質)(uniprot Q16653アクセション番号)のSRVVHLYRNGKD(配列番号2)断片を含み、これ自体は、VVHLYRNGKノナペプチドのMHCクラスII T細胞エピトープ配列(配列番号3)を含む。

本出願で言及する定義によると、この17AAペプチドは、以下を含む：

- xとしてPro及びTyrを有する変更レドックスモチーフH-C-X(2)-C(配列番号80)、
- モチーフとT細胞エピトープ配列との間の2アミノ酸(Ser、Arg)のリンカー、
- 配列VVHLYRNGK(配列番号3)の9アミノ酸のMHCクラスII T細胞エピトープ、
- エピトープに対してC末端側に1アミノ酸のフランкиング配列(Asp)。

【0086】

MOGペプチド断片YRPPFSRVVHLYRNGKD(配列番号4)の配列と比較して、該配列内のYRPPF(配列番号5)は、配列HCPYC(配列番号6)で置き換えられている。

対照ペプチドは、以下のとおりである：

YRPPFSRVVHLYRNGKD(配列番号4)、すなわちMOGの上記断片。

C(X)2モチーフ(配列番号71)を有するが、追加のヒスチジンを欠くCPYCSRVVHLYRNGKD(配列番号7)、

C(X)2Cモチーフ(配列番号71)も欠くSRVVHLYRNGKD(配列番号2)。

ペプチドは、CONH₂修飾カルボキシ末端を用いるペプチド合成により製造し、質量分析及びHPLCにより純度を調べる。

【0087】

実施例4：細胞株のインビトロ拡大

MOGのT細胞エピトープとレドックスモチーフとを有し、追加のヒスチジンを有さないペプチド(図1の右側バー)(配列番号7)及び有するペプチド(図1の左側バー)(配列番号1)に対するナイーブヒトCD4+T細胞株の応答。

等量の両ペプチドを、異なるナイーブヒトCD4+T細胞株に加えた。結果は、細胞溶解性を有する分化T細胞を生じる臨床スケールプロセスの終時での細胞数を(当初播種した細胞の%として)表す。

インビトロでの細胞転換の顕著な増加は、追加のヒスチジンが付加された場合に、DR2ハプロタイプを示す個体の細胞株についてのみ得られ、他のハプロタイプでは得られない。

10

20

30

40

50

よって、このようなペプチドの使用は、DR2+集団(MS集団の70%)について特に興味深い。his含有ペプチドを用いることの明確な(かつ予期せぬ)利点がある。

【0088】

実施例5：多発性硬化症インビオモデルでのMOGタンパク質T細胞エピトープの使用。

多発性硬化症は、T細胞エピトープを有するミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)ペプチドでの免疫により実験モデルにおいて誘導できる。

C57BL/6マウスの群に、CD4+ MOG特異的エフェクターT細胞クローンを養子移入し、続10
いて多発性硬化症様症候群を誘導するプロトコールを行う。この手順には、完全フロイントアジュバント中のMOGペプチドの投与及び百日咳毒素の2回の注射が含まれる。このプロトコールは、エフェクターT細胞クローンの拡大を誘発し、その結果、MOGペプチド投与後12日以内に多発性硬化症と適合する兆候を生じる。第2のC57BL/6マウス群には、先ず、(配列番号1を有するペプチドを用いて得られた)MOG特異的細胞溶解性T細胞クローンを養子移入し、1日後に完全な疾患誘導プロトコールを行う。

配列番号2、4及び7を有するペプチドを対照として用いる。

【0089】

実施例6：多発性硬化症の予防及び抑制。

水酸化アルミニウムに吸着させた、改変配列モチーフを含む実施例1のペプチド(配列番号1)又は対照ペプチド(配列番号2、4又は7)で、C57BL/6マウスの群を皮下(20μg)免疫する。2週間間隔で3回注射する。最後の免疫の10日後にマウスを犠牲にし、CD4+T細胞(2×10⁶細胞)を、磁性ビーズを用いて脾臓から調製する。次いで、CD4+T細胞を、接着性脾臓細胞(2×10⁶細胞)により提示されるMOG T細胞エピトープ(20μg/ml)によりインビトロで刺激する。

4回の再刺激後、有効なEAE(実験的自己免疫性脳脊髄炎)動物から得たポリクローン性CD4+CD25⁻細胞を標的細胞として用いるバイスタンダー抑制アッセイでT細胞株を試験する。HC(X)2C(配列番号80)又はC(X)2C(配列番号71)配列モチーフを含む配列番号1及び7のペプチドで免疫した動物から得た細胞のみが、対照と比較して、EAE動物からのエフェクターCD4+CD25⁻である標的細胞の細胞死を誘導する能力を有する。

【0090】

C57BL/6マウスの群に、CD4+ MOG特異的CD4+T細胞クローンを養子移入し、1日後に多発性硬化症様症候群を誘導するプロトコールを行う。この手順には、完全フロイントアジュバント中のMOGペプチドの投与及び百日咳毒素の2回の注射が含まれる。このプロトコールは、エフェクターT細胞クローンの拡大を誘発し、その結果、MOGペプチド投与後12日以内に多発性硬化症と適合する兆候を生じる。臨床スコアを、細胞溶解性T細胞クローンで前処置したマウスと完全な疾患誘導プロトコールのみを受けたマウスとで比較する。

【0091】

実施例7：ペプチド免疫による多発性硬化症の予防。

モデル群では、0日目に、C57BL/6マウスに、CFA中100μgのMOGペプチド/400μgのマイコバクテリウム・ブチリカム(Mycobacterium butyricum)のsc注射及びNaCl中300ngの百日咳菌(Bordetella pertussis)のip注射を施した。2日目に、2回目の百日咳菌注射を行う。

【0092】

予防群では、IFA中20μgの配列番号1のペプチド(配列モチーフHC(X)2C(配列番号80)を含む)を14日間隔で5回注射してC57BL/6マウスを免疫した後、モデル群と同様に疾患を誘導する。対照実験は、配列番号2、4及び7を有するペプチドを用いて行う。

スコアは次のとおりとする 0：疾患なし、1：尾の下垂、2：尾の下垂及び10%を超える体重減少、3：後肢の部分的麻痺。

【0093】

実施例9

合成ペプチドに対するレダクターゼ活性の評価

FITC-NH-Gly-Cys-Asp-COOHペプチドを合成し(Eurogentec、Belgium)、DMSO中に可溶化

10

20

40

50

することにより自己消光させた((FITC-Gly-Cys-Asp)ox)。2.5 μMの(FITC-Gly-Cys-Asp)oxの還元を、96ウェルプレートで、下記の表に列挙するペプチド(25 μM)又は2 mMジチオトレイイトール(DTT)とのPBS中のインキュベーション後40分間追跡した(25)。還元は、CytoFluor(登録商標)マルチプレートリーダ(Applied Biosystems)を用いて、494nmでの励起後、530nmで読み取った蛍光の増加の閑数として測定した。結果は、実施例10の表に、「レダクターゼ活性」の欄に示す。

【0094】

実施例10

ヒト組換えCD4の重合体形成

ヒト組換えCD4(300ng)を、Hepes緩衝液中で、表に列挙するペプチド(50 μM)と68にて15分間インキュベートする。50 μMのDTTを同条件下の陽性対照として用いる。次いで、LDSサンプル緩衝液(7.5 μl；非還元性)を15 μlのペプチド/CD4混合物に加える。次いで、この混合物を非還元PAGEに供する。クーマシーブルー染色後、ゲル中の泳動能力低減により同定される単量体、二量体又は多量体のrecCD4の存在についてタンパク質バンドを分析する。表は、重合体形成が生じた(+)か否かを示す。

【0095】

【表1】

配列番号	N末端	モチーフ	リンカー	エピトープ	C末端	レダクターゼ活性(%)	CD4重合体形成
------	-----	------	------	-------	-----	-------------	----------

108	H	CPYC	VRSLQP	LAEGSLQK	RG	68	+
109	HAA	CPYC	VRSLQP	LAEGSLQK	RG	0	+
110	AHA	CPYC	VRSLQP	LAEGSLQK	RG	13	+
111	AAA	CPYC	VRSLQP	LAEGSLQK	RG	6	+
112	AAA	CHPC	VRSLQP	LAEGSLQK	RG	75	+
113	AAH	CHPC	VRSLQP	LAEGSLQK	RG	64	+
114	AAA	CHGC	VRSLQP	LAEGSLQK	RG	22	低い

【0096】

表は、ヒトプロインスリンのクラスII拘束エピトープのアミノ末端に付加したアミノ酸配列の様々な組み合わせを示す。これら配列は、チオレダクターゼ含有モチーフの最初のシステインの前のアミノ末端配列(「N末端」)、モチーフ自体、リンカー、エピトープ及びC末端の端(「C末端」)で構成される。レダクターゼ活性は、実施例1に記載するように、%で表す。ヒト組換えCD4の重合体形成は、実施例2に従って測定する。

【0097】

本出願で開示するペプチド

下記の配列1～70において、×が存在する場合、×はシステインでもヒスチジンでもない。

開示するペプチド配列の概要

【0098】

10

20

30

40

【表 2 - 1】

HCPYCSRVVHLYRNGKD	[配列番号 1]	
SRVVHLYRNGKD	[配列番号 2]	
VVHLYRNGK	[配列番号 3]	
YRPPFSRVVHLYRNGKD	[配列番号 4]	
YRPPF	[配列番号 5]	
HCPYC	[配列番号 6]	
CPYCSRVVHLYRNGKD	[配列番号 7]	
HCPYCSRVVHLYRNGK	[配列番号 8]	
CGFSSNYCQIYPPNANKIR	[配列番号 9]	
HCGFSSNYCQIYPPNANKIR	[配列番号 10]	10
HCGFCSNYCQIYPPNANKIR	[配列番号 11]	
CHGSEPCIIHRGKPF	[配列番号 12]	
HCHGSEPCIIHRGKPF	[配列番号 13]	
HCHGCEPCIIHRGKPF	[配列番号 14]	
HCxGSEPCIIHRGKPF	[配列番号 15]	
HCxGCEPCIIHRGKPF	[配列番号 16]	
CHGCAQKKIIAEK	[配列番号 17]	
HCHGCAQKKIIAEK	[配列番号 18]	
HCxGCAQKKIIAEK	[配列番号 19]	
CGPCMNEELTERL	[配列番号 20]	
HCGPCMNEELTERL	[配列番号 21]	20
CGPSAALTWVQTH	[配列番号 22]	
HCGPSAALTWVQTH	[配列番号 23]	
CHGCPTLLYVLFEV	[配列番号 24]	
HCHGCPTLLYVLFEV	[配列番号 25]	
HCxGCPTLLYVLFEV	[配列番号 26]	
CGPCGGYVPFHIQVP	[配列番号 27]	
HCGPCGGYVPFHIQVP	[配列番号 28]	
CGHCDKHIEQYLK	[配列番号 29]	
HCGHCDKHIEQYLK	[配列番号 30]	
HCGxCDKHIEQYLK	[配列番号 31]	30
CGHCEKKICKMEK	[配列番号 32]	
HCGHCEKKICKMEK	[配列番号 33]	
HCGxCEKKICKMEK	[配列番号 34]	

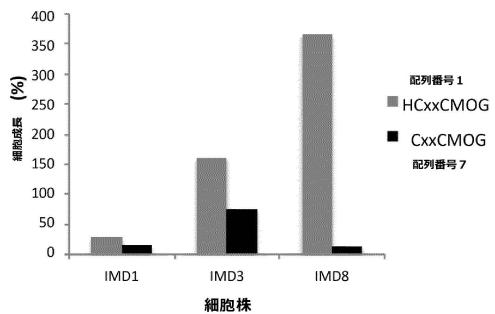
【表 2 - 2】

CGHCKYVKQNTLK	[配列番号 35]	
HCGHCKYVKQNTLK	[配列番号 36]	
HCGxCKYVKQNTLK	[配列番号 37]	
CGHCEHPIVVSGS	[配列番号 38]	
HCGHCEHPIVVSGS	[配列番号 39]	
HCGxCEHPIVVSGS	[配列番号 40]	
CGHCRAMYAPPIA	[配列番号 41]	
HCGHCRAMYAPPIA	[配列番号 42]	
HCGxCRAMYAPPIA	[配列番号 43]	10
CHGCYCAVPDDPDA	[配列番号 44]	
HCHGCYCAVPDDPDA	[配列番号 45]	
HCxGCYCAVPDDPDA	[配列番号 46]	
CGHCGGIRLHPTHYSIR	[配列番号 47]	
HCGHCGGIRLHPTHYSIR	[配列番号 48]	
HCGxCGGIRLHPTHYSIR	[配列番号 49]	
CHGCYRQVPGSDP	[配列番号 50]	
HCHGCYRQVPGSDP	[配列番号 51]	
HCxGCYRQVPGSDP	[配列番号 52]	
CHGCFVALCATDV	[配列番号 53]	20
HCHGCFVALCATDV	[配列番号 54]	
HCxGCFVALCATDV	[配列番号 55]	
CHGCFKELEGWEP	[配列番号 56]	
HCHGCFKELEGWEP	[配列番号 57]	
HCxGCFKELEGWEP	[配列番号 58]	
CHGCVASSYAAQ	[配列番号 59]	
HCHGCVASSYAAQ	[配列番号 60]	
HCxGCVASSYAAQ	[配列番号 61]	
CHGCFNSNRANSS	[配列番号 62]	30
HCHGCFNSNRANSS	[配列番号 63]	
HCxGCFNSNRANSS	[配列番号 64]	
CGHCLVLAPTRREL	[配列番号 65]	
HCGHCLVLAPTRREL	[配列番号 66]	
HCGxCLVLAPTRREL	[配列番号 67]	
CGHCPEFLEQKRA	[配列番号 68]	
HCGHCPEFLEQKRA	[配列番号 69]	
HCGxCPEFLEQKRA	[配列番号 70]	
CXXC	[配列番号 71]	
CXXS	[配列番号 72]	
CXXT	[配列番号 73]	40
SXXC	[配列番号 74]	
TXXC	[配列番号 75]	
XXXC	[配列番号 76]	
CXXX	[配列番号 77]	
HCXXX	[配列番号 78]	
XXXCH	[配列番号 79]	
HCXXC	[配列番号 80]	
HCXXS	[配列番号 81]	
HCXXT	[配列番号 82]	
CXXCH	[配列番号 83]	

【表 2 - 3】

SXXCH	[配列番号 84]	
TXXCH	[配列番号 85]	
HCXXCH	[配列番号 86]	
XXXXLX	[配列番号 87]	
DXXLL	[配列番号 88]	
YXXX	[配列番号 89]	
 HX (0,2) CXX [CST] :		
H CXX [CST]	[配列番号 78]	
HX CXX [CST]	[配列番号 90]	
HXXCXX [CST]	[配列番号 91]	10
 [CST] xxC (0,2) H:		
[CST] XXCH	[配列番号 79]	
[CST] XxCXH	[配列番号 92]	
[CST] XxCXXH	[配列番号 93]	
 CXXCX (0,2) H:		
CXXC H	[配列番号 83]	
CXXCX H	[配列番号 94]	
CXXCXXH	[配列番号 95]	
 H (0,2) CXXC:		
H CXXC	[配列番号 83]	20
H XCXXC	[配列番号 96]	
HXXCXXC	[配列番号 97]	
 HX (0,2) XCXXS:		
H CXXS	[配列番号 81]	
H XCXXS	[配列番号 98]	
HXXCXXS	[配列番号 99]	
 HX (0,2) XCXXT:		
H CXXT	[配列番号 82]	
H XCXXT	[配列番号 100]	
HXXCXXT	[配列番号 101]	
 SXXCX (0,2) H		30
SXXC H	[配列番号 84]	
SXXCX H	[配列番号 102]	
SXXCXXH	[配列番号 103]	
 TXXCX (0,2) H:		
TXXC H	[配列番号 85]	
TXXCX H	[配列番号 104]	
TXXCXXH	[配列番号 105]	
 HCHXC	[配列番号 106]	
CXXHCH	[配列番号 107]	
 H CPYCVRSLQPLALEGSLQKRG	[配列番号 108]	40
HAACPYCVRSLQPLALEGSLQKRG	[配列番号 109]	
AHACPYCVRSLQPLALEGSLQKRG	[配列番号 110]	
AAACPYCVRSLQPLALEGSLQKRG	[配列番号 111]	
AAACHPCVRSLQPLALEGSLQKRG	[配列番号 112]	
AAAHCHPCVRSLQPLALEGSLQKRG	[配列番号 113]	
AAACHGCVRSLQPLALEGSLQKRG	[配列番号 114]	
 HX CPYCSRVVHLYRNGKD	[配列番号 115]	
HXXCPYCSRVVHLYRNGKD	[配列番号 116]	

【図1】



【配列表】

0006655626000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/00
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00 Z N A
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	A 6 1 K 35/17 Z

(74)代理人 100166936

弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100174883

弁理士 富田 雅己

(72)発明者 サン - レミ , ジャン - マリー

ベルギー、ビー - 1390 グレ - ドイゾー、リュ デュ ランベ 79

(72)発明者 カルリエ , ヴァンサン

ベルギー、ビー - 1350 エニーヌ、リュ ボワ デ フォセ 15

(72)発明者 ヴァンデルエルスト , リュック

ベルギー、ビー - 6230 オベ、リュ デュ ヴィラージュ 48

(72)発明者 パークハート , デビッド

アメリカ合衆国、モンタナ 59875、ピクター、シーフマン クリーク ロード 307

審査官 伊藤 基章

(56)参考文献 特表2010-500308 (JP, A)

国際公開第2013/113076 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0

A 6 1 K 3 5 / 0 0

C 0 7 K 9 / 0 0

C 1 2 N 5 / 0 0

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)