

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4210734号
(P4210734)

(45) 発行日 平成21年1月21日(2009.1.21)

(24) 登録日 平成20年11月7日(2008.11.7)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 7/00 (2006.01)

C O 7 K 7/00

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 44 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願平9-533690
 (86) (22) 出願日 平成9年3月21日(1997.3.21)
 (65) 公表番号 特表2002-515868 (P2002-515868A)
 (43) 公表日 平成14年5月28日(2002.5.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1997/004451
 (87) 国際公開番号 W01997/034617
 (87) 国際公開日 平成9年9月25日(1997.9.25)
 審査請求日 平成16年3月22日(2004.3.22)
 (31) 優先権主張番号 60/013,833
 (32) 優先日 平成8年3月21日(1996.3.21)
 (33) 優先権主張国 米国(US)
 (31) 優先権主張番号 08/821,739
 (32) 優先日 平成9年3月20日(1997.3.20)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者

ファーマクサ インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92
 121 サン ディエゴ ナンシー リッ
 ジ ドライブ 5820 スイート 10
 O

(74) 代理人

弁理士 熊倉 禎男

(74) 代理人

弁理士 小川 信夫

(74) 代理人

弁理士 箱田 篤

(74) 代理人

弁理士 浅井 賢治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H L A結合ペプチド及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

15未満のアミノ酸残基からなる免疫原生ペプチドであって、
 該ペプチドが、配列番号2、59、65、71、73、74、76、77、88、91、
 93、95～98、100～104、108及び109からなる群より選ばれるアミノ酸
 配列を含み、C T L 応答を誘導することができる
 ことを特徴とする免疫原生ペプチド。

【請求項2】

前記ペプチドが、H L A - A 3分子に対し500nM未満のI C₅₀値を有し、かつ、前記
 アミノ酸配列が、配列番号2、59、65、71、73、74、76、77、88、91
 、93、95～98、100～104、108及び109からなる群より選ばれる、請求
 項1に記載の免疫原生ペプチド。

【請求項3】

前記アミノ酸配列が、配列番号71、76、及び101からなる群より選ばれる、請求項
 2に記載の免疫原生ペプチド。

【請求項4】

請求項1～3のいずれかに記載の免疫原生ペプチドを含むことを特徴とする組成物。

【請求項5】

更に、医薬的に許容しうる担体を含む、請求項4に記載の組成物。

【請求項6】

前記ペプチドが脂質に連結している、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記ペプチドが担体分子に連結している、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記ペプチドが、異なる連結したペプチドからなるヘテロポリマーを含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 9】

前記ペプチドが、ヘルパー T リンパ球 (H T L) エピトープに連結している、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記ペプチドが、該ペプチドとは異なる細胞障害性 T リンパ球 (C T L) エピトープに連結している、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記ペプチドが、該ペプチドからなるホモポリマーを含む、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記ペプチドがリポソームの一部として組み込まれている、請求項 4 ~ 11 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 13】

前記ペプチドが、抗原提示細胞に存在する H L A - A 3 分子と複合体を形成している、請求項 2 又は 3 に記載の免疫原生ペプチド。

【請求項 14】

発現ベクターであって、

15 未満のアミノ酸残基からなる免疫原生ペプチドをコードする核酸配列を含み、
該ペプチドが、配列番号 2、59、65、71、73、74、76、77、88、91、
93、95 ~ 98、100 ~ 104、108 及び 109 からなる群より選ばれるアミノ酸
配列を含み、C T L 応答を誘導することができる
ことを特徴とする、発現ベクター。

【請求項 15】

更に、C T L 又は H T L エピトープである第 2 のペプチドをコードする核酸配列を含む、
請求項 14 に記載の発現ベクター。

【請求項 16】

15 未満のアミノ酸残基からなる免疫原生ペプチドであって、
該ペプチドが、配列番号 1、57、58、90 及び 92 からなる群より選ばれるアミノ酸
配列からなり、C T L 応答を誘導することができる
ことを特徴とする免疫原生ペプチド。

【請求項 17】

前記ペプチドが、H L A - A 3 分子に対し 500 n M 未満の I C₅₀ 値を有し、かつ、前記
アミノ酸配列が、配列番号 1、57、58、90 及び 92 からなる群より選ばれる、請求
項 16 に記載の免疫原生ペプチド。

【請求項 18】

請求項 16 ~ 17 のいずれかに記載の免疫原生ペプチドを含むことを特徴とする組成物。

【請求項 19】

更に、医薬的に許容しうる担体を含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 20】

前記ペプチドが脂質に連結している、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 21】

前記ペプチドが担体分子に連結している、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 22】

前記ペプチドが、異なる連結したペプチドからなるヘテロポリマーを含む、請求項 18 に
記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 23】

前記ペプチドが、ヘルパーＴリンパ球（ＨＴＬ）エピトープに連結している、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記ペプチドが、該ペプチドとは異なる細胞障害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）エピトープに連結している、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 25】

前記ペプチドが、該ペプチドからなるホモポリマーを含む、請求項 18 に記載の組成物。

【請求項 26】

前記ペプチドがリポソームの一部として組み込まれている、請求項 18 ~ 25 のいずれかに記載の組成物。 10

【請求項 27】

前記ペプチドが、抗原提示細胞に存在するＨＬＡ－Ａ３分子と複合体を形成している、請求項 17 に記載の免疫原生ペプチド。

【請求項 28】

発現ベクターであって、

15未満のアミノ酸残基からなる免疫原生ペプチドをコードする核酸配列を含み、該ペプチドが、配列番号1、57、58、90及び92からなる群より選ばれるアミノ酸配列からなり、ＣＴＬ応答を誘導することができることを特徴とする、発現ベクター。 20

【請求項 29】

更に、ＣＴＬ又はＨＴＬエピトープである第2のペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項 28 に記載の発現ベクター。

【請求項 30】

15未満のアミノ酸残基からなる免疫原生ペプチドであって、

該ペプチドが、配列番号69及び94からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含み、ＣＴＬ応答を誘導することができることを特徴とする免疫原生ペプチド。

【請求項 31】

前記ペプチドが、ＨＬＡ－Ａ３分子に対し500nM未満の IC_{50} 値を有し、かつ、前記アミノ酸配列が、配列番号69及び94からなる群より選ばれる、請求項 30 に記載の免疫原生ペプチド。 30

【請求項 32】

前記アミノ酸配列が、配列番号94である、請求項 31 に記載の免疫原生ペプチド。

【請求項 33】

請求項 30 ~ 32 のいずれかに記載の免疫原生ペプチドを含むことを特徴とする組成物。

【請求項 34】

更に、医薬的に許容しうる担体を含む、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記ペプチドが脂質に連結している、請求項 33 に記載の組成物。 40

【請求項 36】

前記ペプチドが担体分子に連結している、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記ペプチドが、異なる連結したペプチドからなるヘテロポリマーを含む、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 38】

前記ペプチドが、ヘルパーＴリンパ球（ＨＴＬ）エピトープに連結している、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 39】

前記ペプチドが、該ペプチドとは異なる細胞障害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）エピトープに連 50

結している、請求項 37 に記載の組成物。

【請求項 40】

前記ペプチドが、該ペプチドからなるホモポリマーを含む、請求項 33 に記載の組成物。

【請求項 41】

前記ペプチドがリポソームの一部として組み込まれている、請求項 33 ~ 40 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 42】

前記ペプチドが、抗原提示細胞に存在する HLA - A3 分子と複合体を形成している、請求項 31 又は 32 に記載の免疫原生ペプチド。

【請求項 43】

発現ベクターであって、

15 未満のアミノ酸残基からなる免疫原生ペプチドをコードする核酸配列を含み、該ペプチドが、配列番号 69 及び 94 からなる群より選ばれるアミノ酸配列を含み、CTL 応答を誘導することができることを特徴とする、発現ベクター。

【請求項 44】

更に、CTL 又は HTLEpitope である第 2 のペプチドをコードする核酸配列を含む、請求項 43 に記載の発現ベクター。

【発明の詳細な説明】

本出願は、米国特許出願第 60 / 013 , 833 号の一部係属出願であり、この出願は、米国特許出願第 08 / 589 , 107 号、米国特許出願第 08 / 451 , 913 号及び米国特許出願第 08 / 347 , 610 号に関連し、この米国特許出願第 08 / 347 , 610 号は米国特許出願第 08 / 159 , 339 号の一部係属出願であり、この米国特許出願第 08 / 159 , 339 号は米国特許出願第 08 / 103 , 396 号の一部係属出願であり、この米国特許出願第 08 / 103 , 396 号は米国特許出願第 08 / 027 , 746 号の一部係属出願であり、この米国特許出願第 08 / 027 , 746 号は米国特許出願第 07 / 926 , 666 号の一部係属出願である。更に、本出願は、米国特許出願第 08 / 106 , 266 号にも関連する。これらは参照することにより本明細書に組み込まれる。

発明の背景

本発明は、多数の病的状態、例えばウイルス性疾患及びガン等を予防、治療又は診断するための組成物及び方法に関する。詳細には、本発明は、選択された主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 分子に結合し、免疫応答を誘導することができる新規ペプチドを提供する。

MHC 分子は、クラス I 又はクラス II 分子に分類される。クラス II MHC 分子は、免疫応答の開始及び維持に関連する細胞、例えば T リンパ球、B リンパ球、マクロファージなどにおいて主に発現する。クラス II MHC 分子はヘルパー T リンパ球により認識され、ヘルパー T リンパ球の増殖及び提示された特定の免疫原性ペプチドに対する免疫応答の増幅を誘導する。クラス I MHC 分子は、ほとんど全ての有核細胞中で発現し、細胞障害性 T リンパ球 (CTL) により認識され、該抗原を有する細胞は破壊される。CTL は、腫瘍拒絶及びウイルス感染との闘いにおいて特に重要である。CTL は、完全な外来抗原そのものよりも、MHC クラス I 分子に結合したペプチド断片形態の抗原を認識する。抗原は、普通は細胞により内生的に合成されなければならない、タンパク質抗原の一部は、細胞質中で小さいペプチド断片に分解される。これらの小さいペプチドのあるものは、プレ - ゴルジコンパートメント (pre-Golgi compartment) に転位し、クラス I の重鎖と相互作用し、適切な折り畳み及びサブユニット 2 ミクログロブリンとの結合を促進する。次いでペプチド - MHC クラス I 複合体は、発現及び特異的 CTL による可能性のある認識のために細胞表面に移動 (route) する。

ヒト MHC クラス I 分子である HLA - A2 . 1 の結晶構造の研究により、ペプチドが結合する溝は、クラス I の重鎖の 1 及び 2 ドメインの折りたたみにより生成することが示された (Bjorkman et al., Nature 329:506 (1987))。しかしながら、これらの研究

10

20

30

40

50

において、溝に結合するペプチドの正体は決定されなかった。

Buusら (Science 242:1065 (1988)) は、MHCからの結合ペプチドの酸溶出方法をはじめて開示した。続いてRammenseeら (Falk et al., Nature 351:290 (1991)) は、クラス I 分子に結合した天然に処理されたペプチドを特徴づけるアプローチを開発した。他の研究者は、質量分析法により B 型クラス I 分子 (Jardetzky et al., Nature 353:326 (1991)) 及び A 2 . 1 型クラス I 分子 (Hunt et al., Science 225:1261 (1992)) から溶出したペプチドの慣習的自動化配列決定により、種々の HPLC 画分中のより豊富なペプチドの直接のアミノ酸配列決定を行うことに成功した。MHC クラス I における天然に処理されたペプチドの特徴付けのレビューは、Rotzschke 及び Falk により示されている (Rotzschke and Falk, Immunol. Today 12:447 (1991))。

10

Setteら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3296 (1989)) は、MHC 対立遺伝子特異的モチーフは MHC 結合能力の予想に使用することができることを示した。Schaefferら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:4649 (1989)) は、MHC 結合は免疫原性に関連していることを示した。数名の研究者 (De Bruijn et al., Eur. J. Immunol., 21:2963-2970 (1991); Pamer et al., 991 Nature 353:852-955 (1991)) は、クラス I 結合モチーフを、動物モデルにおける可能性のある免疫原性ペプチドの同定へ適用することができるという予備的な証拠を示した。与えられたクラス I アイソタイプの多数のヒト対立遺伝子に特異的なクラス I モチーフは未だ報告されていない。これらの異なる対立遺伝子の組み合わせた頻度が、ヒトの非近交系群 (human outbred population) の大部分、おそらくは過半数をカバーするのに十分に高いことが望ましい。

20

当該技術分野における発展にもかかわらず、先行技術は、この研究結果に基づく、有用なヒトペプチドを基本とするワクチン又は治療薬を未だ提供していない。本発明は前記のワクチン及び治療薬並びにその他の利点を提供する。

発明の概要

本発明は、MHC クラス I 分子に対する結合モチーフを有する免疫原性ペプチドを提供する。免疫原性ペプチドは、通常その長さが 8 残基 ~ 約 11 残基であり、適切な MHC 対立遺伝子によりコードされるタンパク質との結合に関係する保存された残基を含む。多数の対立遺伝子特異的モチーフが同定された。

例えば、HLA - A 3 . 2 に対するモチーフは、N 末端から C 末端に向かって、2 番目の部位に L、M、I、V、S、A、T 又は F である第一の保存された残基を含み、C 末端に K、R 又は Y である第二の保存された残基を含む。その他の第一の保存された残基は、C、G 又は D であり、代替としては E である。その他の第二の保存された残基は、H 又は F である。第一及び第二の保存された残基は、好ましくは 6 ~ 7 残基離れている。

30

HLA - A 1 に対するモチーフは、N 末端から C 末端に向かって、S 又は M である第一の保存された残基を含み、D 又は E である第二の保存された残基を含み、Y である第三の保存された残基を含む。その他の第二の保存された残基は、A、S 又は T である。第一及び第二の保存された残基は隣接しており、好ましくは 6 ~ 7 残基離れている。第二のモチーフは、E 又は D である第一の保存された残基及び Y である第二の保存された残基から構成され、この場合第一及び第二の保存された残基は 5 ~ 6 残基離れている。

HLA - A 1 1 に対するモチーフは、N 末端から C 末端に向かって、2 番目の部位に T 又は V である第一の保存された残基を含み、C 末端に K である保存された残基を含む。第一及び第二の保存された残基は、好ましくは 6 ~ 7 残基離れている。

40

HLA - A 2 4 . 1 に対するモチーフは、N 末端から C 末端に向かって、2 番目の部位に Y、F 又は W である第一の保存された残基を含み、C 末端に F、I、W、M 又は L である第二の保存された残基を含む。第一及び第二の保存された残基は、好ましくは 6 ~ 7 残基離れている。

多数の可能性のある標的タンパク質上のエピトープを、本発明の方法を使用して同定することができる。本発明のペプチドは、病原体 (例えば、ウイルス病原体、真菌病原体、細菌病原体、原生動物病原体など)、又はガン関連抗原に由来する抗原性タンパク質の配列に基づいて製造することができる。適切な抗原の例には、前立腺特異的抗原 (PSA)、

50

B型肝炎コア又は表面抗原(HBVc、HBVs)、C型肝炎抗原、悪性黒色腫抗原(MAGE-1)、エプスタイン・バーウイルス抗原、ヒト免疫不全ウイルス1型(HIV1)及びパピローマウイルス抗原が含まれる。したがって、ペプチド又はこれをコードする核酸は、インビボ及びエキソビボにおける治療及び診断への適用のための医薬組成物に有用である。

定義

「ペプチド」という用語は、本明細書においては、「オリゴペプチド」と互換的に用いられ、通常は隣接するアミノ酸の - アミノ基とカルボニル基との間のペプチド結合により、互いに結合した残基、通常はL-アミノ酸の連続物を意味する。本発明のオリゴペプチドはその長さが約15残基未満であり、通常は約8~11残基、好ましくは9又は10残基からなる。

10

「免疫原性ペプチド」は、MHC分子に結合し、CTL応答を誘導することができる対立遺伝子特異的モチーフを含むペプチドである。したがって、免疫原性ペプチドは、適切なクラスI MHC分子に結合し、該免疫原性ペプチドが由来する抗原に対しての細胞障害性T細胞応答を誘導することができる。

個別のペプチドのエピトープのMHCクラスI分子に対する結合親和性と、免疫原性との間の関係が、2つの異なる実験的アプローチにおいて解析されている(Sette, et al., *J. Immunol.*, 153:5586-5592 (1994))。第一のアプローチにおいては、10,000倍の範囲のMHC結合親和性を有する、可能性のあるエピトープの免疫原性を、HLA-A*0201トランスジェニックマウスにおいて解析した。第二のアプローチにおいては、B型肝炎ウイルス(HBV)に由来する約100の異なる可能性のあるエピトープ(全てA*0201結合モチーフを有する)の抗原性を、急性肝炎患者のPBLを使用して評価した。両ケースともに、約500nM(好ましくは500nM以下)の結合閾値が、ペプチドのエピトープのCTL応答を誘発する能力を決定していることを見出した。これらのデータは、天然に処理されたペプチド又は既述のT細胞エピトープのいずれかについてのクラスI結合親和性測定と十分に関連している。これらのデータは、T細胞応答の形成における決定基選択の重要な役割を示している。

20

「保存された残基」とは、ペプチドの特定の部位において不規則分布により予想される頻度よりも有意に高い頻度で存在するアミノ酸のことである。通常、保存された残基とは、免疫原性ペプチドにおいてMHC構造との接触点を提供している残基である。定義された長さのペプチド内の1~3、好ましくは2つの保存された残基が、免疫原性ペプチドに対するモチーフを定義している。通常、これらの残基は、ペプチド結合溝、溝の特異的ポケットに埋められた側鎖と密接に接触している。通常、免疫原性ペプチドは3つまでの保存された領域、より通常には2つの保存された領域を含んでいるだろう。

30

本明細書で使用する時、「負の結合残基」とは、特定の部位に存在する場合に、非結合性又は低結合性であり、ペプチド内に適切な保存された残基が存在するにもかかわらずCTL応答を誘導しないペプチドを生じさせる残基のことである。

「モチーフ」という用語は、定義された長さ、通常は約8~約11アミノ酸のペプチドにおける残基のパターンであって、特定のMHC対立遺伝子産物により認識されるものを意味する。通常ペプチドモチーフは、ヒトMHC対立遺伝子の各々で異なり、高度に保存された残基のパターンにおいて異なる。

40

対立遺伝子産物に対する結合モチーフは、正確性(precision)の増加する程度を用いて定義することができる。ある場合においては、保存された残基の全てが、ペプチド内の正しい位置に存在し、負の残基が存在しない。

「単離された」又は「生物学的に純粋な」という句は、天然状態において見出されたときに通常伴っている成分が実質的又は本質的に存在していない物質のことを意味する。したがって、本発明のペプチドは、自然環境で関係している物質、例えば抗原提示細胞上のMHC I分子を含んでいない。たとえタンパク質を均一又は有力なバンド(dominant band)に単離した場合であっても、天然タンパク質の5~10%の範囲で、所望のタンパク質と同時に精製された微量混入物が存在する。本発明の単離されたペプチドは、そのような

50

同時精製された内因性のタンパク質を含まない。

「残基」という用語は、アミド結合又は擬似アミド結合によりオリゴヌクレオチドに組み込まれた、アミノ酸又は擬似アミノ酸を意味する。

好ましい態様の説明

本発明は、ヒト クラス I MHC (HLA と呼ばれる場合もある) の対立遺伝子サブタイプに対する対立遺伝子特異的ペプチドモチーフの決定に関する。次いでこれらのモチーフを使用して、可能性のある抗原又は自己抗原標的のアミノ酸配列が既知である、あらゆる所望の抗原、特にヒトのウイルス性疾患、ガン又は自己免疫疾患と関連する抗原から T 細胞エпитープを定義する。

多数の可能性のある標的タンパク質上のエピトープをこの方法で同定することができる。適切な抗原の例には、前立腺特異的抗原 (PSA)、B 型肝炎コア及び表面抗原 (HBVc、HBVs)、C 型肝炎抗原、エプスタイン・バーウイルス抗原、メラノーマ抗原 (例えば、MAGE-1)、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 抗原及びヒトパピローマウイルス (HPV) 抗原が含まれる。

本発明のペプチドを用いて病状を軽減し、発症又は再発を処置又は予防してもよい自己免疫関連疾患には、例えば多発性硬化症 (MS)、関節リウマチ (RA)、シェーグレン症候群、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、全身性エリテマトーデス、若年性関節リウマチ、強直性脊椎炎、重症筋無力症 (MG)、水疱性類天疱瘡 (真皮-表皮接合部における基底膜に対する抗体)、天疱瘡 (ムコ多糖タンパク質複合体又は細胞内セメント物質に対する抗体)、糸球体腎炎 (糸球体基底膜に対する抗体)、グッドパスチャー症候群、自己免疫性溶血性貧血 (赤血球に対する抗体)、橋本病 (甲状腺に対する抗体)、悪性貧血 (内因子に対する抗体)、特発性血小板減少性紫斑病 (血小板に対する抗体)、グレーブス病及びアジソン病 (サイログロブリンに対する抗体) などが含まれる。

多数の疾患に関連した自己抗原が同定されている。例えば、実験的に誘導した自己免疫疾患においては、病原に関連する抗原が特徴付けされている。関節炎を患うラット及びマウスにおいては、コラーゲン誘導関節炎では天然タイプ II コラーゲンが、アジュバント関節炎ではマイコバクテリア熱ショックタンパク質が同定され、マウスにおいては、実験的アレルギー性甲状腺炎 (EAT) でサイログロブリンが同定され、実験的アレルギー性重症筋無力症 (EAMG) ではアセチルコリン受容体 (AChR) が同定され、マウス及びラットにおける実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) ではプロテオリピドタンパク質 (PLP) が同定された。更に、ヒトにおいても標的抗原が同定され、ヒト関節リウマチではタイプ II コラーゲンが同定され、重症筋無力症ではアセチルコリン受容体が同定された。理論に束縛されることを望まないけれども、HLA クラス I による抗原提示は、CD8+ サプレッサー T 細胞による自己反応性 T 細胞の抑制を媒介すると考えられる (例えば、Jiang et al. *Science* 256:1213 (1992) を参照のこと)。そのようなサプレッサー T 細胞は、自己反応性 T 細胞を特異的に阻害するサイトカイン、例えばトランスフォーミング成長因子- (TGF-) を放出する (Miller et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 421-425 (1992))。

これらの抗原由来のエピトープを含むペプチドを合成し、次いで、例えば精製したクラス I 分子及び放射性ヨウ素化ペプチド及び/又は空の (empty) クラス I 分子を発現している細胞を使用しての、例えば免疫蛍光染色及び流動微小蛍光測定、ペプチド依存性クラス I アセンブリアッセイ (assembly assay) 及びペプチド競合による CTL 認識阻害により、適切な MHC 分子に結合する能力について試験した。更に、クラス I 分子に結合するペプチドを、ウイルス感染した標的細胞又は腫瘍細胞と反応することができる CTL 群を提供することができる、インビトロ又はインビボにおける一次 CTL 応答を誘導する可能性のある治療薬としての能力だけでなく、感染又は免疫化個体に由来する CTL に対する標的として役立つ能力についても評価した。

MHC クラス I 抗原は HLA-A、B 及び C 遺伝子座によりコードされている。HLA-A 及び B 抗原は、ほぼ均等な密度で細胞表面上に発現するが、HLA-C の発現はきわめて低い (おそらく 10 倍程低い)。各遺伝子座は多数の対立遺伝子を有する。本発明のペ

10

20

30

40

50

ペプチド結合モチーフは、各対立遺伝子のサブタイプに対して比較的特異的である。ペプチドを基礎とするワクチンについて、本発明のペプチドは、好ましくはヒトにおいて広い分布を有しているMHC I分子により認識されるモチーフを含んでいる。MHC対立遺伝子は、異なる民族及び人種において異なる頻度で発現するので、標的MHC対立遺伝子の選択は標的人種に依存するだろう。表1は、異なる人種間のHLA-A遺伝子座産物における種々の対立遺伝子の頻度を示している。例えば、コーカソイド人の大多数は、4つのHLA-A対立遺伝子サブタイプ、すなわちHLA-A2.1、A1、A3.2及びA24.1に結合するペプチドによりカバーすることができる。同様に、アジア人の大多数は、追加の5番目の対立遺伝子HLA-A11.2に結合するペプチドを含んでいる。

表 1

A対立遺伝子／サブタイプ	N(69)*	A(54)	C(502)
A1	10.1(7)	1.8(1)	27.4(138)
A2.1	11.5(8)	37.0(20)	39.8(199)
A2.2	10.1(7)	0	3.3(17)
A2.3	1.4(1)	5.5(3)	0.8(4)
A2.4	-	-	-
A2.5	-	-	-
A3.1	1.4(1)	0	0.2(0)
A3.2	5.7(4)	5.5(3)	21.5(108)
A11.1	0	5.5(3)	0
A11.2	5.7(4)	31.4(17)	8.7(44)
A11.3	0	3.7(2)	0
A23	4.3(3)	-	3.9(20)
A24	2.9(2)	27.7(15)	15.3(77)
A24.2	-	-	-
A24.3	-	-	-
A25	1.4(1)	-	6.9(35)
A26.1	4.3(3)	9.2(5)	5.9(30)
A26.2	7.2(5)	-	1.0(5)
A26V	-	3.7(2)	-
A28.1	10.1(7)	-	1.6(8)
A28.2	1.4(1)	-	7.5(38)
A29.1	1.4(1)	-	1.4(7)
A29.2	10.1(7)	1.8(1)	5.3(27)
A30.1	8.6(6)	-	4.9(25)
A30.2	1.4(1)	-	0.2(1)
A30.3	7.2(5)	-	3.9(20)
A31	4.3(3)	7.4(4)	6.9(35)

10

20

30

40

A32	2.8(2)	-	7.1(36)
Aw33.1	8.6(6)	-	2.5(13)
Aw33.2	2.8(2)	16.6(9)	1.2(6)
Aw34.1	1.4(1)	-	-
Aw34.2	14.5(10)	-	0.8(4)
Aw36	5.9(4)	-	-

10

表は、B. Dupont, *Immunobiology of HLA*, Vol. I, Histocompatibility Testing 1987, Springer-Verlag, New York 1989 より編集した。

*N=ネグロイド人、A=アジア人、C=コーカソイド人。括弧内の数字は、分析に含まれる人数を表す。

ペプチド化合物を記載するために使用した命名法は、慣習にしたがい、各アミノ酸残基のアミノ基を左側（N末端）に示し、カルボキシル基を右側（C末端）に示す。選択された本発明の特定の態様を表す式においては、詳細には示さないけれども、アミノ末端基及びカルボキシル末端基は、特別に述べないかぎり、生理的 pH 値において想定される形態をとる。アミノ酸構造式において、通常、各残基は、標準的な 3 文字又は 1 文字名称により表される。アミノ酸残基の L 型は、1 つの大文字又は 3 文字記号の最初の文字における大文字により表され、D 型アミノ酸は、1 つの小文字又は 3 文字記号の最初の文字における小文字により表される。グリシンは不斉炭素を有さないもので、単に「Gly」又は G として記載される。

20

本発明のペプチドを同定するために使用する手順は、Falk et al., *Nature* 351:290 (1991) に開示された方法にしたがう。この文献は参照することにより本明細書に組み込まれる。簡潔に述べると、この方法には、通常は免疫沈降又は親和性クロマトグラフィーによる、適切な細胞又は細胞系からの MHC クラス I 分子の大規模単離が含まれる。当業者に周知の、所望の MHC 分子単離のためのその他の方法の例には、イオン交換クロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、サイズ排除、高性能リガンドクロマトグラフィー及び前記すべての技術の組み合わせが含まれる。

30

定義された MHC 分子、特に MHC クラス I 分子を有する多数の細胞が既知であり、容易に入手することができる。例えば、ヒト EBV 形質転換 B 細胞系は、クラス I 及びクラス II MHC 分子の調製用単離の優れた供給源であることが示されている。十分に特徴付けされた細胞系が、個人的又は商業的供給源、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 6th edition (1988) Rockville, Maryland, U. S. A.)、National Institute of General Medical Sciences 1990/1991 Catalog of Cell Lines (NIGMS) Human Genetic Mutant Cell Repository, Camden, NJ, and ASH1 Repository, Brigham and Women's Hospital, 75 Francis Street, Boston, MA 02115 などから入手することができる。表 2 は、HLA - A 対立遺伝子源としての使用に適するいくつかの B 細胞系を列挙している。これらの細胞系の全ては、大規模なバッチ中で増殖させることができ、それゆえ MHC 分子の大規模生産に有用である。これらは単なる例示的な細胞系であり、その他の多数の細胞源を使用することができることを当業者は認識しているだろう。HLA - B 及び HLA - C にホモ接合性の類似 EBV B 細胞系は、HLA - B 及び HLA - C 対立遺伝子それぞれの供給源として役立つことができるだろう。

40

表2

ヒト細胞系 (HLA-A供給源)

HLA-A対立遺伝子	B細胞系
A1	MAT COX (9022) STEINLIN (9087)
A2.1	JY
A3.2	EHM (9080) HO301 (9055) GM3107
A24.1	KT3 (9107)、TISI (9042)
A11	BVR (GM6828A)
	WT100 (GM8602) WT52 (GM8603)

10

20

典型的には、免疫沈降を使用して所望の対立遺伝子産物を単離する。使用する抗体の特異性に依存して、多数のプロトコルを使用することができる。例えば、HLA-A、HLA-B及びHLA-C分子の親和性精製のために、対立遺伝子産物特異的mAb試薬を使用することができる。HLA-A分子単離用の数種のmAb試薬が入手可能である(表3)。すなわち、標的となるHLA-A対立遺伝子のそれぞれについては、HLA-A分子の直接単離に使用する試薬を入手することができる。標準的な技術を使用して調製したこれらのmAbを有する親和性カラムを、首尾よく使用して各HLA-A対立遺伝子産物を精製する。

30

表3

抗体試薬

抗-HLA	名称
HLA-A1	12/18
HLA-A3	GAPA3 (ATCC, HB122)
HLA-11, 24.1	A11.1M (ATCC, HB164)
HLA-A, B, C	W6/32 (ATCC, HB95)
単型性	B9.12.1 (INSERM-CNRS)
HLA-B, C	B.1.23.2 (INSERM-CNRS)
単型性	

40

50

対立遺伝子特異的 m A b に加えて、反応性の広い抗 H L A - A、B、C m A b、例えば W 6 / 3 2 及び B 9 . 1 2 . 1 並びに抗 H L A - B、C m A b である B 1 . 2 3 . 2 を、以下に示す実施例に記載したようにして、代替の親和性精製プロトコルに使用することができる。

単離した M H C 分子のペプチド結合溝に結合したペプチドを、通常は酸処理により溶離する。標準的変性方法、例えば熱、p H、界面活性剤、塩、カオトロピック剤又はこれらの組み合わせにより、ペプチドをクラス I 分子から分離することができる。

逆相高速液体クロマトグラフィー (H P L C) によりペプチド画分を M H C 分子から更に分離し、次いで配列決定した。ペプチドは、当業者に周知の種々の標準的方法により分離することができ、この方法にはろ過、限外ろ過、電気泳動、サイズクロマトグラフィー、特異的抗体を用いての沈降、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動法などが含まれる。

単離したペプチドの配列決定は、エドマン分解などの標準的技術にしたがい行うことができる (Hunkapiller, M.W., et al., Methods Enzymol. 91, 399 [1983])。配列決定に適したその他の方法には、既報 (Hunt, et al., Science 225:1261 (1992) (参照することにより本明細書に組み込まれる)) にしたがう個々のペプチドの質量分析配列決定が含まれる。通常、異なるクラス I 分子からなるバルクの不均一ペプチド (例えば、プールした (pooled) H P L C 画分) のアミノ酸配列決定により、各クラス I 対立遺伝子に対して特徴的な配列モチーフが明らかになる。

異なるクラス I 対立遺伝子に特異的なモチーフの定義は、アミノ酸配列が既知の抗原性タンパク質からの可能性のあるペプチドエピトープの同定を許容する。通常、可能性のあるペプチドエピトープの同定は、最初に所望の抗原のアミノ酸配列を、モチーフの存在についてコンピューターを使用してスキャンすることにより行われる。次いでエピトープ配列を合成する。M H C クラス分子に結合する能力を種々の異なる方法で測定する。例えば、前記の関連出願に記載されているクラス I 分子結合アッセイは 1 つの方法である。文献に記載されたその他の代替の方法には、抗原提示の阻害 (Sette, et al., J. Immunol. 141:3893 (1991))、インビトロアセンブリアッセイ (Townsend, et al., Cell 62:285 (1990)) 及び突然変異細胞、例えば R M A . S を使用しての F A C S を基本とするアッセイ (Melief, et al., Eur. J. Immunol. 21:2963 (1991)) が含まれる。

次に、M H C クラス I 結合アッセイにおいて陽性であることを試験したペプチドを、インビトロにおける特異的 C T L 応答を誘導する能力についてアッセイする。例えば、ペプチドとともにインキュベートした抗原提示細胞を、応答細胞群における C T L 応答を誘導する能力についてアッセイすることができる。抗原提示細胞は、正常細胞、例えば末梢血単核細胞又は樹枝状細胞などであることができる (Inaba, et al., J. Exp. Med. 166:182 (1987) ; Boog, Eur. J. Immunol. 18:219 (1988))。

代わりに、内部的に処理されたペプチドを有するクラス I 分子をロード (load) する能力を欠いており、適切なヒトクラス I 遺伝子を形質移入した突然変異哺乳動物細胞系、例えばマウス細胞系 R M A - S (Karre, et al., Nature, 319:675 (1986) ; Ljunggren, et al., Eur. J. Immunol. 21:2963-2970 (1991)) 及びヒト体細胞 T 細胞ハイブリッド、T 2 (Cerundolo, et al., Nature 345:449-452 (1990)) を都合よく使用し、ペプチドを添加したときの、インビトロでの一次 C T L 応答を誘導するペプチドの能力について試験した。使用することができるその他の真核細胞系には、種々の昆虫細胞、例えば蚊の幼虫 (A T C C 細胞系 C C L 1 2 5、1 2 6、1 6 6 0、1 5 9 1、6 5 8 5、6 5 8 6)、カイコ (A T C C C R L 8 8 5 1)、ヨトウムシ (A T C C C R L 1 7 1 1)、蛾 (A T C C C C L 8 0) 及びショウジョウバエ細胞系、例えばシュナイダー細胞系 (Schneider, J. Embryol. Exp. Morphol., 27:353-365 (1927)) が含まれる。これらを、適切なヒトクラス I M H C 対立遺伝子産物をコードする遺伝子及びヒト B₂ミクログロブリン遺伝子を用いて形質移入した。

末梢血リンパ球を、正常ドナー又は患者の単純静脈穿刺又は白血球除去血輸血にしたがい都合よく単離し、C T L 前駆体の応答細胞源として使用した。ある態様においては、適切

10

20

30

40

50

な抗原提示細胞を、 $10 \sim 100 \mu\text{M}$ のペプチドとともに、無血清培地中、適切な培養条件下で4時間インキュベートした。次いで、ペプチドをロードした抗原提示細胞を、応答細胞群とともに、インビトロで、最適化培養条件下で7～10日間インキュベートした。陽性のCTL活性化は、放射性標識化標的細胞、すなわち特異的ペプチドパルス化標的(specific peptide-pulsed targets)及びペプチド配列が由来する関連ウイルス又は腫瘍抗原の内生的に処理された形態を発現している標的細胞を殺すCTLの存在を培養についてアッセイすることにより測定することができる。

CTLの特異性及びMHC制限を、適切又は不適切なヒトMHCクラスIを発現している異なるペプチド標的細胞を試験することにより測定した。MHC結合アッセイにおいて陽性について試験し、特異的CTL応答を生じたペプチドを、本明細書においては免疫原性ペプチドと呼ぶ。

10

免疫原性ペプチドは、合成により若しくは組換えDNA技術により製造するか又は天然源、例えば全ウイルス又は腫瘍から単離することができる。好ましくはペプチドには、その他の天然の宿主細胞タンパク質及びその断片が実質的に存在しないが、ある態様においては、ペプチドを、天然の断片又は粒子に合成により結合させることができる。ポリペプチド又はペプチドは、種々の長さを有することができ、中性(非荷電)形態又は塩形態のいずれかの形態をとることができ、例えばグリコシル化、側鎖酸化若しくはリン酸化などの修飾なし又はこれらの修飾を含むことが可能であり、本明細書に記載するようなポリペプチドの生物学的活性を破壊しない修飾条件に付することができる。

望ましくは、大きいペプチドの生物学的活性の実質的に全てを維持しつつ、ペプチドはできる限り小さい。可能であるならば、本発明のペプチドの長さを9又は10アミノ酸残基に最適化し、細胞表面上のMHCクラスI分子に結合する内生的に処理されたウイルス性ペプチド又は腫瘍細胞ペプチドと大きさにおいて同一であることが望ましい。

20

所望の活性を有するペプチドを、必要に応じて修飾し、ある所望の属性、例えば改善された薬理特性を与えてもよいが、所望のMHC分子に結合し、適切なT細胞を活性化するという未修飾ペプチドの生物学的活性の実質的に全てを増加させるか又は少なくとも維持していなければならない。例えば、ペプチドを、種々の改変、例えば保存的又は非保存的置換に付してもよく、この場合そのような改変は、その使用において、改善されたMHC結合などの利点を提供するだろう。保存的置換とは、アミノ酸残基を、生物学的及び/又は化学的に類似の別のアミノ酸残基で置換すること、例えば疎水性残基をべつの残基で、又は極性残基を別の残基で置換することを意味する。置換には、Gly、Ala; Val、Ile、Leu、Met; Asp、Glu; Asn、Gln; Ser、Thr; Lys、Arg; 及びPhe、Tyrなどの組み合わせが含まれる。1つのアミノ酸置換の影響を、D-アミノ酸を使用して調査してもよい。そのような修飾は、例えば、Merrifield, *Science* 232:341-347 (1986), Barany and Merrifield, *The Peptides*, Gross and Meienhofer, eds. (N.Y., Academic Press), pp. 1-284 (1979); and Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, (Rockford, Ill., Pierce), 2d Ed. (1984)に記載される周知のペプチド合成手順を使用することにより行うことができるだろう。これらの文献は参照することにより本明細書に組み込まれる。ペプチドは、例えばアミノ酸の付加又は削除によるアミノ酸配列の延長又は短縮により修飾することができる。本発明のペプチド又はその類似体を、特定の残基の順番又は組成を改変することにより修飾することができるが、生物学的活性に必須の特定のアミノ酸残基、例えば決定的な接触部位に存在する残基又は保存された残基は、生物学的活性に悪影響を与えることなしに通常改変しないことは容易に理解されるだろう。決定的でないアミノ酸は、タンパク質内で天然に存在しているもの、例えばL-アミノ酸又はそのD-異性体に限定する必要はなく、L-アミノ酸の多数の誘導体だけではなく非天然アミノ酸、例えばD-アミノ酸を含んでいてもよい。

30

40

通常は、1つのアミノ酸置換を有する一連のペプチドを使用して、静電電荷、疎水性などの結合に対する影響を測定する。例えば、ペプチドの長さに関する一連の正荷電アミノ酸置換(例えば、Lys若しくはArg)又は負荷電アミノ酸置換(例えばGlu)により、種々のMHC分子及びT細胞受容体に対する感受性の異なるパターンが明らかになった。更に、

50

小さい比較的中性の残基、例えばAla、Gly、Pro又は類似の残基を使用した複数の置換を用いてもよい。置換はホモオリゴマー又はヘテロオリゴマーであってもよい。置換又は付加される残基の数及び種類は、必須の接触点間に必要な間隔及び求められる特定の機能属性（疎水性対親水性）に依存する。親ペプチドの結合親和性と比較して増加した、MHC分子又はT細胞受容体に対する親和性を、前記の置換により達成してもよい。あらゆる場合において、そのような置換は、結合を破壊する静電及び電荷障害を避けるように選択されたアミノ酸残基又はその他の分子断片を使用しなければならない。

アミノ酸置換は通常1残基である。置換、削除、挿入又はこれらのあらゆる組み合わせを組み合わせ、最終のペプチドを製造してもよい。置換変異体は、ペプチドの少なくとも1つの残基が除去され、異なる残基がその位置に挿入されているものである。ペプチドの性質を細かく調節することが望まれる場合、置換は通常以下に示す表4にしたがい行われる。

表4

元の残基 例示的な置換

Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln; his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn; gln
Ile	leu; val
Leu	ile; val
Lys	arg
Met	leu; ile
Phe	met; leu; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp; phe
Val	ile; leu

機能上の実質的な変化（例えば、MHC分子又はT細胞受容体に対する親和性）は、表4に示す置換よりも保存的でない置換を選択、例えば（a）置換領域におけるペプチドバックボーンの構造、例えばシート構造又はらせん構造としての維持、（b）標的部位における分子の電荷又は疎水性の維持、又は（c）側鎖のバルク（bulk）の維持に対する影響に

10

20

30

40

50

において有意に異なる残基を選択することにより行われる。ペプチドの特性において最大の変化を生じることを通常期待される置換は、(a) 親水性残基、例えばセリル基の疎水性残基、例えばロイシル基、イソロイシル基、フェニルアラニル基、バリル基又はアラニル基での置換、(b) 正に荷電した側鎖を有する残基、例えばリシル基、アルギニル基又はヒスチジル基の負に帯電した側鎖を有する残基、例えばグルタミル基又はアスパルチル基での置換、又は(c) 大きい側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンの、側鎖を有さない残基、例えばグリシンでの置換であろう。

ペプチドは、免疫原性ペプチド内に2つ以上の残基のイソステール(isostere)を含んでもよい。本明細書で定義するイソステールとは、第一の配列の立体構造が第二の配列に特異的な結合部位に適合しているため、第二の配列で置換することができる、2以上の残基からなる配列のことである。この用語は、特に当業者に周知のペプチドバックボーン修飾を含んでいる。そのような修飾には、アミド窒素、 α -炭素、アミドカルボニルの修飾、アミド結合の完全な置換、延長、削除又はバックボーンの架橋が含まれる。一般的には、Spatola, Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, peptides and Proteins, Vol. VII (Weinstein ed., 1983) を参照のこと。

種々の擬似アミノ酸又は非天然アミノ酸を用いてのペプチドの修飾は、インビボにおけるペプチドの安定性の増加に特に有用である。安定性は多数の方法によりアッセイすることができる。例えば、ペプチダーゼ及び種々の生物学的媒体、例えばヒト血漿及び血清などを使用して、安定性を試験してきた。例えば、Verhoef et al., Eur. J. Drug Metab. Pharmacokin. 11:291-302 (1986) を参照のこと。本発明のペプチドの半減期は、25%ヒト血清(v/v)アッセイを使用して都合よく測定した。プロトコルは通常以下に示す通りである。プールしたヒト血清(AB型、熱不活化せず)を、使用前に遠心分離により脱脂した。次いで血清をRPMI組織培養培地を用いて25%に希釈し、ペプチド安定性の試験に使用した。予定の時間間隔で、少量の反応溶液を採取し、6%水性トリクロル酢酸又はエタノールに添加した。濁った反応サンプルを15分間冷却(4℃)し、遠心(spun)して沈澱した血清タンパク質をペレット化した。次いで、安定性-特異的クロマトグラフィー条件を用いた逆相クロマトグラフィーにより、ペプチドの存在を測定した。

本発明のペプチド又はCTL刺激活性を有するその類似体を修飾して、改善された血清中半減期以外の所望の属性を与えてもよい。例えば、CTL活性を誘導するペプチドの能力は、ヘルパーT細胞応答を誘導することができる少なくとも1つのエピトープを含んでいる配列への結合により増強することができる。特に好ましい免疫原性ペプチド/ヘルパーT結合物は、スペーサー分子により連結されている。通常スペーサーは、比較的小さい中性分子、例えば生理学的条件下で実質的に荷電していないアミノ酸又は擬似アミノ酸を含んでいる。通常スペーサーは、例えばAla、Gly又は非極性アミノ酸若しくは中性の極性アミノ酸からなるその他の中性スペーサーから選ばれる。任意に存在するスペーサーは、同一の残基を含んでいることを必要とせず、それゆえヘテロ-又はホモ-オリゴマーであってもよいことは理解されるだろう。スペーサーが存在する場合、通常、スペーサーは少なくとも1又は2つの残基であり、より一般的には3~6つの残基である。代わりに、CTLペプチドはスペーサーなしにヘルパーTペプチドに結合してもよい。

免疫原性ペプチドは、CTLペプチドのアミノ末端又はカルボキシル末端において、ヘルパーTペプチドに、直接又はスペーサーを介して結合していてもよい。免疫原性ペプチド又はヘルパーTペプチドのいずれかのアミノ末端はアシル化されていてもよい。

ある態様においては、本発明の医薬組成物は、CTLの初回刺激(prime)を援助する少なくとも1つの成分を含んでいることが望ましい。脂質は、ウイルス抗原に対するインビボでのCTLの初回刺激を援助することのできる薬剤として同定されている。例えば、パルミチン酸残基を、Lys残基の ϵ 及び アミノ基に結合し、次いで例えばGly、Gly-Gly-、Ser、Ser-Serなどの1つ以上の結合残基を介して、免疫原性ペプチドに結合することができる。次いで、脂質化(lipidated)ペプチドは、ミセル形態で直接注射、リボソームへ組み込み又はアジュバント、例えばフロイントアジュバント中で乳化することができる。好ましい態様においては、特に有効な免疫原は、Lysの ϵ 及び アミノ基に結合し、次い

10

20

30

40

50

で例えばSer-Serの連結を介して免疫原性ペプチドのアミノ末端に結合しているパルミチン酸を含んでいる。

C T L 応答の脂質による初回刺激の別の例として、大腸菌リポタンパク質、例えばトリパルミトイル-S-グリセリルシステイニルセリル-セリン ($P_3C S S$) を、適切なペプチドに共有結合して、ウイルス特異的 C T L の初回刺激に使用することができる。Deres et al., *Nature* 342:561-564 (1989) を参照のこと。本文献は参照することにより本明細書に組み込まれる。例えば、本発明のペプチドを $P_3C S S$ に結合することができ、リポペプチドを個体に投与し、標的抗原に対する C T L 応答を特異的に初回刺激する。更に、適切なエピトープを示すペプチドに結合した $P_3C S S$ を用いて中和抗体の誘導をも初回刺激することができるときには、2つの組成物を組み合わせ、感染に対する体液性応答及び細胞性応答の両者をより効率的に誘導することができる。

更に、追加のアミノ酸を、ペプチドの末端に追加して、別のペプチドへの結合の容易性、キャリア担体又は大きなペプチドへの結合、ペプチド又はオリゴペプチドの物理的又は化学的特性の修飾などを提供することができる。例えばチロシン、システイン、リジン、グルタミン酸又はアスパラギン酸などのアミノ酸を、ペプチド又はオリゴペプチドの C - 又は N - 末端に導入することができる。ある場合においては、C 末端における修飾がペプチドの特性を改変するかもしれない。更に、ペプチド又はオリゴヌクレオチド配列は、末端の NH_2 アシル化、例えばアルカノイル ($C_1 \sim C_{20}$) 又はチオグリコリルアセチル化、末端カルボニルアミド化、例えばアンモニア、メチルアミンなどにより修飾することにより、天然の配列と差別化することができる。ある場合においては、これらの修飾により、担体又はその他の分子への結合のための部位を提供してもよい。

本発明のペプチドは、多種の方法により製造することができる。その比較的小さい大きさのため、慣習的な技術にしたがい、溶液中又は個体担体上でペプチドを合成することができる。種々の自動合成機を商業的に入手し、既知のプロトコルにしたがい使用することができる。例えば、前出 Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2d. ed., Pierce Chemical Co. (1989) を参照のこと。

代わりに、組換え DNA 技術を使用してもよい。この技術では、興味の対象となる免疫原性ペプチドをコードするヌクレオチド配列を発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞に形質転換又は形質移入し、発現に適切な条件下で培養する。これらの技術は当該技術分野において一般的に知られており、Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1982) に記載されている。この文献は参照することにより本明細書に組み込まれる。したがって、本発明のペプチドの1以上を含む融合タンパク質を使用して、適切な T 細胞エピトープを提供することができる。

本明細書で意図する長さを有するペプチドをコードする配列を、化学的技術、例えば Matteucci et al., *J. Am. Chem. Soc.* 103:3185 (1981) のホスホトリエステル法により合成することができる。天然のペプチド配列をコードする塩基を適切な塩基で置換することにより、簡単に修飾することができる。次いでコード配列を適切なリンカーへ提供し、当該技術分野において商業的に入手することができる発現ベクターに結合し、ベクターを適切な宿主への形質転換に使用して、所望の融合タンパク質を生産する。多数のベクター及び適切な宿主系を入手することができる。融合タンパク質の発現については、コード配列を、操作可能に結合した開始コドン、終止コドン、プロモーター領域及びターミネーター領域並びに通常は複製系に提供し、所望の細胞宿主における発現用の発現ベクターを提供する。例えば、細菌宿主と適合するプロモーター配列を、所望のコード配列を挿入するために都合のよい制限部位を含むプラスミドに提供する。得られた発現ベクターで適切な細菌宿主を形質転換する。適切なベクター及び制御配列を使用することにより、酵母又は哺乳類細胞宿主を使用してもよい。

本発明のペプチド、医薬組成物及びワクチンは、ウイルス感染及びガンを治療及び/又は予防するための、哺乳類、特にヒトへの投与に有用である。本発明の免疫原性ペプチドを使用して治療することができる疾患の例には、前立腺ガン、B型肝炎、C型肝炎、A I D

10

20

30

40

50

S、腎臓ガン、子宮ガン、リンパ腫、CMV及びコンドリローマ・アクミナタム (condly loma acuminatum) が含まれる。

医薬組成物については、本発明の免疫原性ペプチドを、既にガンを患っている個体又は興味の対象となるウイルスに感染した個体に投与する。感染の潜伏期又は急性期にある個体を、免疫原性ペプチドを適宜その他の治療と別々又は組み合わせて用いることにより治療することができる。治療応用においては、組成物を、ウイルス又は腫瘍抗原に対する効果的なCTL応答を誘導し、病状及び/又は合併症を治癒又は少なくとも部分的に抑えるのに十分な量で患者に投与する。これを達成するのに適切な量を、本明細書においては「治療学的有効投与量」と定義する。この用途に有効な量は、例えば、ペプチド組成物、投与方法、治療対象疾患の段階及び重症度並びに処方する医師の判断に依存するが、（治療用投与又は予防用投与）のための初回免疫化についての通常範囲は、70kgの患者に対してペプチド約1.0μg～約5000μgであり、続く追加免疫では、患者の血液中的の特異的CTL活性の測定による患者の応答及び状態に依存する数週間から数ヶ月の追加投与計画にしたがいその投与量はペプチド約1.0μg～約1000μgである。本発明のペプチド及び組成物は、重症状態、すなわち生命を危うくする状態又は生命を危うくする可能性のある状態において通常使用されることに留意すべきである。そのような場合、外来性物質の最小化及びペプチドの相対的に無毒の性質を考慮して、治療を行う医師が実質的に過剰量のペプチド組成物を投与することが可能であり、望ましいであろう。

治療用途については、ウイルス感染の最初の徴候時、検出時、腫瘍の手術的除去時又は急性感染の場合は診断直後に投与を開始すべきである。これに続いて、少なくとも徴候が実質的に軽減し、その後もその状態が続くようになるまで、追加免疫投与を行う。慢性感染においては、初回量に続く追加投与量が要求されるだろう。

本発明の組成物を用いての感染個体の治療は、急性感染した個体の感染の回復を早めるだろう。慢性感染の発生が疑われる（又は慢性感染しやすい）個体について、本発明の組成物は、急性から慢性感染への展開を予防する方法において特に有用である。例えば、感染前又は感染中に、疑わしい個体が同定された場合、本明細書に記載されるように、組成物に個体を標的とさせ、大集団への投与の必要性を最小化することができる。

ペプチド組成物を、慢性感染の治療に使用して、免疫系を刺激し、保菌者のウイルス感染細胞を除去することができる。細胞障害性T細胞応答を効果的に刺激するのに十分な製剤中の免疫賦活ペプチドの量及び投与様式を提供することが重要である。したがって、慢性感染の治療については、70kgの患者に対して、1回の投与あたり、約1.0μg～約5000μg、好ましくは約5μg～1000μgが代表的な範囲である。免疫化投与に続く追加免疫投与が、確立した間隔、例えば1～4週間、あるいは個体を効果的に免疫化するための延長期間の間、要求されてもよい。慢性感染の場合、少なくとも臨床症状又は臨床検査が、ウイルス感染が除去又は実質的に軽減し、その後のその状態であることを示すまでは、投与を続けるべきである。

治療学的処置用の医薬組成物は、非経口、表面、経口又は局所投与を意図している。好ましくは医薬組成物は、非経口、例えば静脈内、皮下、皮内又は筋肉内に投与する。したがって、本発明は、許容しうる担体、好ましくは水性担体中に溶解又は懸濁した免疫原性ペプチド溶液を含む非経口投与用組成物を提供する。例えば、水、緩衝化水、0.9%生理的食塩水、0.3%グリシン、ヒアルロン酸などの種々の水性担体を使用してもよい。組成物を、慣習的な周知の滅菌技術により滅菌又は無菌的にろ過してもよい。得られた水性溶液をそのまま使用するために包装又は凍結乾燥してもよい。凍結乾燥製剤は使用前に滅菌液と組み合わせる。組成物は、生理学的状態に近づくために要求される薬学的に許容される補助物質、例えばpH調節剤及び緩衝剤、張度調節剤 (tonicity adjusting agent)、湿潤剤など、具体的には酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、オレイン酸トリエタノールアミンなどを含んでいてもよい。

医薬製剤中の本発明のCTL刺激ペプチド濃度は、広範囲で変化させることができ、すなわち重量基準で約0.1%未満、通常は約2%又は少なくとも約2%から20%～50%

10

20

30

40

50

又はそれ以上までであり、選択した特定の投与様式にしたがい、主に液量、粘度などにより選択されるだろう。

本発明のペプチドをリポソームを介して投与してもよい。リポソームはペプチドに特定の組織、例えばリンパ組織を標的とさせる。リポソームはペプチドの半減期の増加においても有用である。リポソームには、エマルジョン、フォーム、ミセル、不溶性単分子膜、液晶、リン脂質分散液、ラメラ層などが含まれる。これらの製造においては、送達するペプチドを、単独又はリンパ球間に普及している受容体に結合する分子、例えばCD45抗原に結合するモノクローナル抗体又はその他の治療用又は免疫原性組成物とともにリポソームの一部に組み込む。これにより、本発明の所望のペプチドで満たされたリポソームをリンパ球部位に向けることができる。この場合リポソームは選択された治療用/免疫原性ペプチド組成物を送達する。本発明における使用のためのリポソームは、標準的な小胞形成脂質から形成され、通常これには中性又は負に荷電したリン脂質及びステロール、例えばコレステロールが含まれる。脂質の選択は、例えばリポソームの大きさ、酸不安定性及び血液流中におけるリポソームの安定性への配慮により通常左右される。リポソーム製造のために種々の方法が利用可能である。例えば、Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980), U.S. Patent Nos. 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028 and 5,019,369に記載されており、これらの文献は参照することにより本明細書に組み込まれる。

免疫細胞を標的にするために、所望の免疫系細胞の細胞表面決定因子に特異的な抗体又はその断片などを含むリガンドをリポソームに組み込むことができる。ペプチドを含有するリポソーム懸濁液を、特に投与様式、送達するペプチド及び治療対象疾患の段階にしたがい変化する投与量で、非経口的、局所的、表面的に投与してもよい。

個体組成物については、慣習的な無毒性固体担体を使用することができ、これらには、例えば医薬品品質のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウムなどが含まれる。経口投与のための、薬学的に許容しうる無毒性組成物は、通常使用されるあらゆる賦形剤、例えば前記の担体を、通常活性成分、すなわち本発明の1以上のペプチドの10~95%、好ましくは25~75%の濃度で組み込むことにより形成する。

エアロゾル投与について、免疫原性ペプチドは、界面活性剤及び噴霧剤とともに、微粉化して供給する。ペプチドの典型的な百分率は、重量基準で0.01~20%、好ましくは1~10%である。界面活性剤は当然無毒性でなければならず、好ましくは噴霧剤に可溶性である。そのような薬剤の代表例は、炭素数6~22の脂肪酸、例えばカプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリック酸(olestic acid)及びオレイン酸と脂肪族多価アルコール又はその環無水物とのエステル又は部分エステルである。混合したエステル、例えば天然グリセリドと混合したエステルを使用してもよい。界面活性剤は、組成物重量の0.1~20%、好ましくは0.25~5%を構成する。組成物の均衡は、通常噴霧剤である。所望により、担体は、鼻腔内送達用にレシチンを含むこともできる。

本発明の別の態様は、活性成分として本明細書に記載した免疫原性ペプチドを、免疫原性的有効量で含むワクチンに向けられる。ペプチドを、担体に結合させて又は活性ペプチド単位ホモポリマー又はヘテロポリマーとして、ヒトを含む宿主に導入してもよい。そのようなポリマーは、免疫反応の増加という利点を有し、異なるペプチドを使用してポリマーを作成したときには、ウイルス又は腫瘍細胞の異なる抗原決定基と反応する抗体及び/又はCTLを誘導する追加の能力という利点を有する。有用な担体は当該技術分野において周知であり、例えばサイログロブリン、アルブミン、例えばウシ血清アルブミン、破傷風トキソイド、ポリアミノ酸、例えばポリ(リジン:グルタミン酸)、B型肝炎コアタンパク質、B型肝炎組換えワクチンなどが含まれる。ワクチンは、生理学的に耐えられる(許容しうる)希釈剤、例えば水、リン酸緩衝生理食塩水又は生理食塩水などを含むことができ、更にアジュバントを含むこともできる。不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム又はミョウバンなどのアジュバントは、当該技術分野において周知の物質である。前記したように、CTL応答は、本発明のペプチドをP₃

10

20

30

40

50

CSSなどの脂質に結合することにより初回刺激することができる。前記のペプチド組成物を注射、エアロゾル、経口、経皮又はその他の経路で用いて免疫化したとき、宿主の免疫系は、所望の抗原に特異的な多量のCTLを産生することによりワクチンに応答し、宿主はその後の感染に対して少なくとも部分的に免疫性になるか又は慢性感染の発達に対して耐性になる。

本発明のペプチドを含むワクチン組成物を、ウイルス感染又はガンが疑われる又はそれらの危険性のある患者に投与し、抗原に対する免疫応答を誘導し、患者自身の免疫応答能力を増強する。そのような量を「免疫原性的有効量」と定義する。この用途においては、正確な量は、患者の健康状態及び体重、投与様式、製剤の性質などに依存するが、通常その範囲は、70kgの患者あたり約1.0μg～約5000μg、より一般的には70kgの患者あたり約10μg～約500μgである。

ある場合においては、本発明のペプチドワクチンと、興味の対象になるウイルス、特にウイルスエンベロープ抗原に反応する中和抗体を誘導するワクチンとを組み合わせることが好ましい。

治療又は免疫化目的には、本発明のペプチドを、弱毒化ウイルス宿主、例えばワクシニア又は鶏痘により発現させることができる。このアプローチには、本発明のペプチドをコードする核酸配列を発現するベクターとしてのワクシニアウイルスの使用が含まれる。急性感染若しくは慢性感染した宿主又は感染していない宿主へ導入したとき、組換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、これにより宿主のCTL応答を誘導する。免疫化プロトコルにおいて有用なワクシニアベクター及び方法は、例えば米国特許第4,722,848号明細書に記載されており、これは参照することにより本明細書に組み込まれる。別のベクターはBCG(カルメット-ゲラン桿菌)である。BCGベクターはStover et al. (Nature 351:456-460 (1991))に記載されており、これは参照することにより本明細書に組み込まれる。本発明のペプチドの治療的投与又は免疫化に有用な多種のその他のベクター、例えばサルモネラ・チフスベクターなどは、本明細書の記載より当業者に明らかであろう。

1以上の本発明のペプチドをコードする核酸を患者に投与することもできる。このアプローチについては、例えばWolff et al., Science 247:1465-1468 (1990)、米国特許第5,580,859号及び第5,589,466号明細書に記載されている。

本発明のペプチドをコードする核酸を投与する好ましい方法では、本発明の複数のエピトープをコードするミニ遺伝子構築物を使用する。ヒト細胞における発現のために選択したCTLEピトープ(ミニ遺伝子)をコードするDNA配列を作成するために、エピトープのアミノ酸配列を逆転写する。ヒトコドン用の表を使用して、各アミノ酸のコドン選択を導いた。これらのエピトープをコードするDNA配列を直接隣接させ、連続的ポリペプチド配列を作成した。発現及び/又は免疫原性を最適化するために、追加の要素をミニ遺伝子の設計に組み込むことができる。逆転写され、かつミニ遺伝子配列に含まれるアミノ酸配列の例には、ヘルパーTリンパ球エピトープ、リーダー(シグナル)配列及び小胞体保存シグナルが含まれる。更に、合成(例えばポリアラニン)又はCTLEピトープに隣接する天然フラッキング配列を含むことにより、CTLEピトープのMHC提示を改善させてもよい。

ミニ遺伝子のプラス鎖及びマイナス鎖をコードするオリゴヌクレオチドを組み立てることにより、ミニ遺伝子配列をDNAに転換する。重複オリゴヌクレオチド(長さ30～100塩基)を、周知の技術を使用して適切な条件下で合成し、リン酸化し、精製し、アニールした。T4 DNAリガーゼを使用して、オリゴヌクレオチドの末端を結合する。次いでCTLEピトープポリペプチドをコードする合成ミニ遺伝子を、所望の発現ベクターにクローニングする。

当業者に周知の標準的な制御配列をベクターに含ませ、標的細胞における発現を確保する。数種のベクター要素、すなわちミニ遺伝子挿入のための下流クローニング部位を有するプロモーター、効率的な転写終結のためのポリアデニル化シグナル、大腸菌の複製起点及び大腸菌の選択マーカー(例えば、アンピシリン又はカナマイシン耐性)が要求される。

この目的に対して、多数のプロモーター、例えばヒトサイトメガロウイルス (hCMV) プロモーターを使用することができる。その他の適切なプロモーター配列については、米国特許第 5,580,859 号及び第 5,589,466 号明細書を参照のこと。

ミニ遺伝子の発現及び免疫原性を最適化するために、追加のベクター修飾が要求されてもよい。ある場合においては、効率的な遺伝子発現のために、イントロンが要求され、1 以上の合成又は天然イントロンを、ミニ遺伝子の転写領域に組み込むことができる。ミニ遺伝子発現を増加させるために、mRNA 安定化配列の包含も考慮することができる。最近、免疫賦活配列 (ISS 又は CpG) は、DNA ワクチンの免疫原性の役割を果たすことが提唱された。免疫原性を増強させることが見出されるならば、これらの配列をベクター中の配列をコードするミニ遺伝子の外側に含ませることができる。

10

ある態様においては、ミニ遺伝子にコードされたエピトープ及び免疫原性を増強又は低下させるために含ませる第二のタンパク質の生成を許容する二頭発現ベクターを使用することができる。同時発現する場合、免疫応答を有利に増強させることができるタンパク質又はポリペプチドの例には、サイトカイン (例えば、IL2、IL12、GM-CSF)、サイトカイン誘導分子 (例えば、LEIF) 又は同時刺激分子が含まれる。ヘルパー (HTL) エピトープを、細胞内標的シグナルに結合し、CTL エピトープとは別々に発現させることができる。これにより、HTL エピトープを CTL エピトープとは異なる細胞コンパートメント (cell compartment) に向けることが可能になるだろう。所望により、MHC クラス II 経路への HTL エピトープのより効率的なエンタリーを促進し、CTL 誘導を改善させることができる。CTL 誘導とは対照的に、免疫抑制分子 (例えば、TGF-) の同時発現による免疫応答の特異的減少は、特定の疾患においては有利であるだろう。

20

発現ベクターを選択したら、ミニ遺伝子をプロモーター下流のポリリンカー領域にクローニングする。このプラスミドで適切な大腸菌株を形質転換し、標準的な技術を用いて DNA を調製する。ミニ遺伝子の配向及び DNA 配列並びにベクターに含まれるその他の要素を、制限マッピング (restriction mapping) 及び DNA 配列解析を使用して確認した。正しいプラスミドを有する細菌細胞を、マスターセルバンク (master cell bank) 及びワーキングセルバンク (working cell bank) として保存することができる。

プラスミド DNA の治療量は、大腸菌の発酵、続く精製により生成する。ワーキングセル由来のアリコートを使用して、発酵培地 (例えばテリフィックブロス (Terrific Broth)) に接種し、周知の技術にしたがい振盪フラスコ又はバイオリアクター中で飽和になるまで増殖させる。プラスミド DNA を、キアゲン (Qiagen) により供給される固相アニオン交換樹脂などの標準的生態分離技術を使用して精製することができる。必要ならば、ゲル電気泳動又はその他の方法を使用してスーパーコイル DNA を開環及び直鎖形態から分離することができる。

30

種々の製剤を使用しての注射用の精製プラスミド DNA を製造することができる。これらのなかのもっとも単純なものは、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中での凍結乾燥 DNA の再構成である。「裸の DNA」として知られるこのアプローチは、現在、臨床試験における筋肉内 (IM) 投与に使用されている。ミニ遺伝子 DNA ワクチンの免疫療法的効果を最大にするためには、精製プラスミド DNA を製剤化する代替の方法が望ましいだろう。種々の方法が文献に記載されているが、新技術が利用可能であろう。カチオン性脂質を製剤中で使用することができる (Debs and Zhu (1993) WO93/246640; Mannino and Gould-Fogerite (1988) Bio Techniques 6 (7):682-691; Rose U.S. Pat No. 5,279,833; Brigham (1991) WO91/06309; and Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84:7413-7414 を参照のこと)。更に、糖脂質、融合リポソーム (fusogenic liposome)、ペプチド及び保護性、相互作用性、非縮合的集合物 (PINC) と呼ばれる化合物を、精製プラスミド DNA に合成 (complex) し、安定性、筋肉内分散性または特異的器官又は細胞型への輸送に影響を与えることもできる。

40

例えば、米国特許第 5,204,253 号明細書に記載されたようにして、バリスティック送達 (ballistic delivery) を使用して核酸を投与することもできる。DNA のみを含

50

む粒子を投与することもできる。代わりに、DNAを、金などの粒子に付着させることもできる。

標的細胞の感作を、ミニ遺伝子にコードされたCTLエピトープの発現及びMHCクラスI提示の機能的アッセイとして使用することができる。プラスミドDNAを、標準的CTLクロム放出アッセイの標的として適切な哺乳類細胞系に導入する。使用するトランスフェクション方法は、最終の製剤に依存するだろう。「裸の」DNAについてはエレクトロポレーションを使用することができるが、カチオン性脂質では直接のインビトロトランスフェクションが可能である。緑色蛍光タンパク質(GFP)を発現するプラスミドを同時トランスフェクトして、蛍光発色セルソーター(FACS)を用いての感染細胞の濃縮に使用することが可能である。次いで細胞をクロム-51を用いて標識し、エピトープ特異的CTL系に対する標的細胞として使用する。51Cr放出により検出された細胞溶解は、ミニ遺伝子にコードされたCTLエピトープのMHC提示の生成を示している。

インビボでの免疫原性は、ミニ遺伝子DNA製剤の機能的試験についての第二のアプローチである。適切なヒトMHC分子を発現しているトランスジェニックマウスをDNA産物で免疫化する。投与量及び投与経路は製剤に依存する(例えば、PBS中のDNAについてはIM、脂質合成DNAについてはIP)。免疫化21日後、脾細胞を収穫し、試験する各エピトープをコードするペプチドの存在下で1週間再刺激した。これらのエフェクター細胞(CTL)を、標準的な技術を使用して、ペプチドをロードしたクロム-51標識化標的細胞の細胞溶解についてアッセイした。ミニ遺伝子にコードされるエピトープペプチドのMHCによるロードにより感作された標的細胞の溶解は、CTLのインビボ誘導に対するDNAワクチンの機能を示している。

更に、抗原性ペプチドを使用して、エキソビボでCTLを誘導してもよい。得られたCTLを使用して、従来型の治療に応答しない又はペプチドワクチンアプローチに応答しない患者の慢性感染(ウイルス性又は細菌性)又は腫瘍を治療することができる。特定の病原体(病原菌又は腫瘍抗原)に対するエキソビボでのCTL応答を、患者のCTL前駆体細胞(CTLp)と抗原提示細胞(APC)源及び適切な免疫原性ペプチドとを組織培養中でインキュベートすることにより誘導する。CTLpが活性化され、十分に成長し、エフェクターCTLへ発達するのに適切なインキュベーション時間(通常は1~4週間)後、細胞を患者に戻す。そこでは、特異的標的細胞(感染細胞又は腫瘍細胞)が破壊されるだろう。特異的細胞障害性T細胞の生成のためのインビトロ条件を最適化するために、刺激化細胞(stimulator cell)培養物を、適切な無血清培地中で維持する。

刺激化細胞と活性化される細胞、例えば前駆体CD8+細胞とのインキュベーションの前に、抗原性ペプチドを、ヒトクラスI分子にロードされ、刺激化細胞の表面上に発現するのに十分な量で刺激化細胞培養物に添加する。本発明において、ペプチドの十分な量とは、約220、好ましくは200より多くの、ペプチドを有するヒトクラスI MHC分子が刺激化細胞の各表面上に発現することを許容する量のことである。好ましくは、刺激化細胞と $> 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドとをインキュベートする。

次いで、休止又は前駆体CD8+細胞と、適切な刺激化細胞とを、培養物中、CD8+細胞を活性化するのに十分な時間インキュベートする。好ましくは、CD8+細胞を、抗原特異的方法で活性化する。休止又は前駆体CD8+(エフェクター)細胞対刺激化細胞の割合は、個体によって変化してもよく、更に変数、例えば培養条件に対する各リンパ球の従順性並びに病状又は本明細書に記載する治療方法を使用するその他の状態の性質及び重症度に依存する。しかしながら、好ましくはリンパ球:刺激化細胞の割合は、約30:1~300:1である。エフェクター細胞/刺激化細胞培養物を、CD8+細胞の治療学的に有用な量又は有効量を刺激するのに必要な時間維持してもよい。

インビトロにおけるCTL誘導は、APC上の対立遺伝子特異的MHCクラスI分子に結合するペプチドの特異的認識を必要とする。APCあたりの特異的MHC/ペプチド複合体の数は、特に一次免疫応答におけるCTLの刺激化にとって重要である。少量の細胞あたりのペプチド/MHC複合体が、細胞をCTLにより溶解させる又は二次CTL応答の刺激に対して感受性にするのに十分であるときは、初期応答の間のCTL前駆体(pC

10

20

30

40

50

T L)の活性化の成功には、かなりの数のM H C / ペプチド複合体を必要とする。細胞上の空の主要組織適合複合体分子へのペプチドのロードは、細胞障害性Tリンパ球一次応答の誘導を可能にする。細胞の空の主要組織適合複合体分子へのペプチドのロードは、細胞障害性Tリンパ球の一次応答の誘導を可能にする。あらゆるヒトM H C 対立遺伝子についての突然変異細胞系は存在しないので、A P C 表面からの内因性M H C 結合分子を取り出し、次いで得られた空のM H C 分子を興味の対象になる免疫原性ペプチドを用いてロードする技術を使用することは有利である。非形質転換(非腫瘍化)、非感染細胞、好ましくは患者の自家細胞をA P C として使用することは、エキソビボC T L 治療の開発に向けられるC T L 誘導プロトコルの設計にとって望ましい。本出願は、A P C 表面から内因性M H C 結合ペプチドを取り出し、所望のペプチドをロードする方法を開示する。

10

安定なM H C クラスI 分子は、以下に示す要素: 1) 通常は8 ~ 10 残基のペプチド、2) 1 及び 2 ドメインにペプチド結合部位を有する膜貫通型多型性タンパク質重鎖及び3) 非共有結合的に結合した非多型性軽鎖、すなわち α_2 ミクログロブリンから形成される三量体複合体である。結合したペプチドの除去及び/又は α_2 ミクログロブリンの複合体からの分離により、M H C クラスI 分子は非機能的及び不安定になり、結果として急速に分解する。P B M C から単離したすべてのM H C クラスI 分子は、それらに結合する内因性のペプチドを有している。それゆえ、第一工程は、外因性ペプチドを添加する前の、A P C 上のM H C クラスI 分子に結合する全ての内因性ペプチドを、その分解を引き起こすことなしに取り除くことである。

結合したペプチドをM H C クラスI 分子から取り除く2つの可能性のある方法には、一晩、培養温度を37 °C から26 °C へ低下させ、 α_2 ミクログロブリンを不安定化させ、次いで穏やかな酸処理を用いて内因性ペプチドを細胞から取り除く方法が含まれる。既に結合しているペプチドを細胞外環境に遊離させるこの方法により、新規外因性ペプチドが空のクラスI 分子に結合することを可能にする。低温インキュベーション法により、外因性ペプチドをM H C 複合体に効率的に結合させることができるが、この方法は、細胞の代謝速度を低下させる26 °C での一晩のインキュベートを要求する。M H C 分子を活発に合成しない細胞(例えば休止P B M C)は、低温手順によっても、大量の空の表面M H C 分子を生じないだろう。

20

厳しい酸分離法は、トリフルオロ酢酸(p H 2)を用いてのペプチドの抽出又は免疫親和性的に精製したクラスI - ペプチド複合体の酸変性を含む。これらの方法は、C T L 誘導を可能にしない。なぜならば、A P C 生存性及び抗原提示にとって重要な最適の代謝状態を維持しながら、内因性ペプチドを取り除くことが重要であるからである。p H 3の穏やかな酸溶液、例えばグリシン又はクエン酸-リン酸緩衝液を使用して、内因性ペプチドを同定し、主要関連T細胞エピトープを同定する。M H C クラスI 分子のみが不安定化され、(かつ関連するペプチドが遊離され)、M H C クラスII分子を含むその他の表面抗原は完全なままであるという点で、これらの方法は特に有効である。最も重要なことは、穏やかな酸溶液を用いての細胞の処理は、細胞の生存性または代謝状態に影響しないということである。内因性ペプチドの分離は、4 下2分間で起こるので、穏やかな酸処理は迅速であり、それゆえ適切なペプチドがロードされた後、A P C は機能する準備ができている。この技術を本発明で利用して、一次抗原特異的C T L を生成するためのペプチド特異的A P C を作成する。得られたA P C はペプチド特異的C D 8 + C T L を効率的に誘導する。

30

活性化C D 8 + 細胞を、種々の既知の方法の1つを使用して、刺激化細胞から効率的に分離してもよい。例えば、刺激化細胞に特異的なモノクローナル抗体、刺激化細胞にロードされたペプチドに特異的なモノクローナル抗体、又はC D 8 + 細胞(又はその断片)に特異的なモノクローナル抗体を利用して、その適切な相補的リガンドに結合させてもよい。次いで適切な方法、例えば既知の免疫沈降法又は免疫測定法により、抗体で標識された分子を、刺激化細胞-エフェクター細胞混合物から抽出してもよい。

40

活性化C D 8 + 細胞の細胞障害に有効な量は、インビトロでの使用及びインビボでの使用の間で変化し、更にキラー細胞の最終標的である細胞の量及び型でも変化する。量は、患

50

者の状態に依存して変化し、全ての適切な因子を考慮した医師により決定されるべきである。しかしながら、好ましくは、ヒト成人については、約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ 、より好ましくは約 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{11}$ 、更に好ましくは約 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ の活性化 CD8 + 細胞を使用する。マウスにおいては、約 $5 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ の細胞を使用する。

好ましくは、前記したように、CD8 + 細胞を治療対象の個体に投与する前に、活性化 CD8 + 細胞を細胞培養物から集菌する。しかしながら、その他の現存及び提唱されている処理方法とは異なり、腫瘍形成性でない細胞培養物を使用する本発明の方法に注目することは重要である。それゆえ、刺激化細胞と活性化 CD8 + 細胞の完全な分離を達成できない場合でも、少量の刺激化細胞の投与に関連して知られている固有の危険は存在しない。一方、哺乳類腫瘍促進細胞の投与は非常に危険である。

細胞成分を再導入する方法は、当該技術分野において既知であり、例えば米国特許第 4,844,893 号明細書 (Honsik et al.) 及び米国特許第 4,690,915 号明細書 (Rosenberg) に例示されている手順が含まれる。例えば、静脈注射による活性化 CD8 + 細胞の投与は適切である。

本発明の免疫原性ペプチドを使用して、モノクローナル抗体を作成してもよい。そのような抗体は、可能性のある診断薬又は治療薬として有用であろう。

本発明のペプチドは診断薬としての使用が見出されるだろう。例えば、本発明のペプチドを使用して、ペプチド又は関連ペプチドを用いる治療方法に対する特定の個体の感受性を測定してもよい。したがって、現在の治療プロトコルの修飾又は病気に罹った個体の予後の測定において有用であろう。更に、ペプチドを使用して、個体に慢性感染の発生の実質的な危険性があるか否かを予測してもよい。

本発明のペプチドを同定するための、クラス I 抗原の単離並びに天然に処理されたペプチドの単離及び配列決定は、関連出願に記載されているようにして行った。次いでこれらのペプチドを使用して、対立遺伝子 A3.2、A1、A1.1 及び A2.4.1 の各々に対する特異的結合モチーフを定義した。これらのモチーフは関連出願に記載されており、以下に示す表 5 ~ 8 に要約する。

表 5

要約

HLA-A3.2 対立遺伝子特異的モチーフ

位置 保存された残基

1	—
2	V, L, M
3	Y, D
4	—
5	—
6	—
7	I
8	Q, N
9	K
10	K

表6

要約

HLA-A1 対立遺伝子特異的モチーフ位置 保存された残基

1	—	
2	S, T	
3	D, E	10
4	P	
5	—	
6	—	
7	L	
8	—	
9	Y	20

表7

要約

HLA-A11 対立遺伝子特異的モチーフ位置 保存された残基

1	—	
2	T, V	30
3	M, F	
4	—	
5	—	
6	—	
7	—	
8	Q	40
9	K	
10	K	

表8

要約

HLA-A24.1対立遺伝子特異的モチーフ位置 保存された残基

1	—
2	Y
3	I, M
4	D, E, G, K, P
5	L, M, N
6	V
7	N, V
8	A, E, K, Q, S
9	F, L
10	F, A

10

20

実施例 1免疫原性ペプチドの同定

種々のMHCクラスI対立遺伝子について同定した前記のモチーフを使用して、種々のウイルス及び腫瘍関連タンパク質のアミノ酸配列を、これらのモチーフの存在について分析した。スクリーニングを、関連出願に記載されたようにして行った。表9は抗原の検索の結果を示している。

前記の実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するためのものではない。本発明のその他の変形は、当業者に容易に理解され、これらは請求の範囲に含まれる。本明細書において引用したすべての刊行物、特許及び特許出願は参照することにより本発明に組み込まれる。

30

表9

配列番号	AA	配列	起源	起源又はモチーフ
1	9	HSNLNDTTY	FLU A NP 140	A03
2	9	FVEALFQEY	P.falciparum CSP	A03/A11
3	9	AADAAAAAY	A1 ポリ-A	A01
4	9	DADAAAAAY	A1 ポリ-A	A01
5	9	AADSAAAAAY	A1 ポリ-A	A01
6	9	AADAPAAAY	A1 ポリ-A	A01
7	9	AADAAAQAY	A1 ポリ-A	A01
8	9	QADAAAAAY	A1 ポリ-A	A01
9	9	AADADAAAY	A1 ポリ-A	A01
10	9	AADAGAAAY	A1 ポリ-A	A01
11	9	AADAAKAAY	A1 ポリ-A	A01
12	9	AADAAAPAY	A1 ポリ-A	A01
13	9	AADAAAAPY	A1 ポリ-A	A01
14	9	ATAAAAAAY	A1 ポリ-A	A01
15	9	DTAAAAAAY	A1 ポリ-A	A01
16	9	ATASAAAAAY	A1 ポリ-A	A01
17	9	ATAAPAAAY	A1 ポリ-A	A01
18	9	ATAAAAQAY	A1 ポリ-A	A01
19	9	ATAAAAAKY	A1 ポリ-A	A01
20	9	QTAAAAAAY	A1 ポリ-A	A01
21	9	ATAADAAAY	A1 ポリ-A	A01
22	9	ATAAGAAAY	A1 ポリ-A	A01
23	9	ATAAAKAAY	A1 ポリ-A	A01
24	9	ATAAAAPAY	A1 ポリ-A	A01
25	9	ATAAAAAPY	A1 ポリ-A	A01
26	9	TYLISSIPL	GCDFP-15 70	A24
27	9	FYTNRTVQI	GCDFP-15 102	A24

10

20

30

40

28	10	PLQGAFFNYKY	GCDFP-15 77	A01
29	10	LCDDNPCKTFY	GCDFP-15 90	A01
30	9	TTNLRPTTY	GAD 21	A01
31	9	CLELAELY	GAD 483	A01
321	9	LLSPRPISY	HCV NS3 1157	A01
33	9	LLSPRPVSY	HCV N53 1157	A01
34	9	PTVTVFHVV	HSV-1 POL 142	A01
35	9	ETAGRHVGY	HSV-1 POL 688	A01
36	9	GSGPELLFY	HSV-1 TERM 612	A01
37	9	LSPQWVADY	HSV-1 ENV 143	A01
38	9	VVERTDVYY	HSV-1 POL 252	A01
39	9	SLEHTLCTY	HSV-1 ENV 587	A01
40	9	PSQRHGSKY	Hu MBP 6	A01
41	9	CSAVPVYIY	Hu PLP 169	A01
42	9	LTFMIAATY	Hu PLP 255	A01
43	9	GTASFFFLY	Hu PLP 74	A01
44	9	GTEKLIETY	Hu PLP 42	A01
45	9	TTWCSQTSY	LCMV GP 217	A01
46	9	RTWENHCTY	LCMV GP 233	A01
47	9	QSSINISGY	LCMV NUC 232	A01
48	9	ITEMLRKDY	LCMV GP 417	A01
49	9	QSSFYSDWY	M. Tuberc. 85A/3	A01
50	9	SSALTLAIY	M. Tuberc. 85A/3	A01
51	9	ATWLGDDGY	M. Tuberc. cat/p	A01
52	9	QSTSINLPY	M. Tuberc. DNAK	A01
53	9	QSSFYSDWY	M. Tuberc. 75	A01
54	9	YAEMLTADY	M. Tuberc. POL	A01
55	9	STNEVTRIY	PSM 348	A01
56	9	RVDCTPLMY	PSM 463	A01

10

20

30

40

57	9	RGRRQPIPK	HCV CORE 59	A03/A11
58	9	KTKRNTNRR	HCV CORE 10	A03/A11
59	9	LGFGAYMSK	HCV NS3 1267	A03/A11
60	9	VAGALVAFK	HCV NS4 1864	A03/A11
61	9	NFISGIQYL	HCV NS4 1772	A24
62	9	FWAKHMWNF	HCV NS4 1765	A24
63	10	EVDGVRLHRY	HCV NS5 2129	A01
64	10	DLSGWFFVAGY	HCV NS5 2999	A01
65	10	AACNWTRGER	HCV NS1/E2 647	A03/A11
66	9	KVYLAWVPA	HIV-1 POL 74	A03
67	9	TLFCASDAK	HIV-1 ENV 82	A03/A11
68	9	ISLWDQSLK	HIV-1 ENV 78	A03/A11
69	9	RIVELLGRR	HIV-1 ENV 53	A03/A11
70	9	MVHQAI SPR	HIV-1 GAG 45	A03/A11
71	9	TIKIGGQLK	HIV-1 POL 65	A03/A11
72	9	KLVSAGIRK	HIV-1 POL 57	A03/A11
73	9	KGLGISYGR	HIV-1 TAT 77	A03/A11
74	9	GLGISYGRK	HIV-1 TAT 77	A03/A11
75	9	VMIVWQVDR	HIV-1 VIF 83	A03/A11
76	9	QMAVFIHNF	HIV-1 POL 92	A03/A24
77	9	SMTKILEPF	HIV-1 POL 87	A03/A24
78	9	IWGCSGKLI	HIV-1 ENV 69	A24
79	9	LYKYKVVKI	HIV-1 ENV 49	A24
80	9	VWKEATTTL	HIV-1 ENV 47	A24
81	9	GWMTNPPPI	HIV-1 GAG 31	A24
82	9	RFAVNPGLL	HIV-1 GAG 26	A24
83	9	PYNTPVFAI	HIV-1 POL 74	A24
84	9	WWAGIKQEF	HIV-1 POL 70	A24
85	9	LWQRPLVTI	HIV-1 POL 61	A24

10

20

30

40

86	9	IYETYGDTW	HIV-1 VPR 92	A24
87	9	PYNEWTLEL	HIV-1 VPR 56	A24
88	10	ILQQLLF IHF	HIV-1 VPR 72	A03
89	10	TTLFCASDAK	HIV-1 ENV 81	A03/A11
90	10	LLGIWGCSSGK	HIV-1 ENV 73	A03/A11
91	10	IISLWDQSLK	HIV-1 ENV 66	A03/A11
92	10	LLQLTVWGIK	HIV-1 ENV 61	A03/A11
93	10	SILDIRQGPK	HIV-1 GAG 72	A03/A11
94	10	QMVHQAI SPR	HIV-1 GAG 45	A03/A11
95	10	TAVQMAVFIH	HIV-1 POL 88	A03/A11
96	10	ISPIETVPVK	HIV-1 POL 87	A03/A11
97	10	LGIPHPAGLK	HIV-1 POL 87	A03/A11
98	10	PAIFQSSMTK	HIV-1 POL 78	A03/A11
99	10	KVYLAWVPAH	HIV-1 POL 74	A03/A11
100	10	DIIATDIQTK	HIV-1 POL 67	A03/A11
101	10	VTIKIGGQLK	HIV-1 POL 65	A03/A11
102	10	KAACWWAGIK	HIV-1 POL 65	A03/A11
103	10	VSQIIEQLIK	HIV-1 POL 61	A03/A11
104	10	KGLGISYGRK	HIV-1 TAT 77	A03/A11
105	10	VWKEATTTLF	HIV-1 ENV 47	A24
106	10	YWQATWIPEW	HIV-1 POL 96	A24
107	10	VYYDPSKDLI	HIV-1 POL 70	A24
108		ALAAGAAAR	A3 ポリ-A	A03
109		AAAAGAAAK	A3 ポリ-A	A03
110	9	AFLPWHRLF	チロシナーゼ	A24
111	9	AYGLDFYIL	p15	A24

10

20

30

40

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 平山 孝二

(72)発明者 クボ ラルフ ティー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サン ディエゴ フテューラ ストリート 1
2 6 3 5

(72)発明者 グレイ ハワード エム

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 3 7 ラ ジョラ ラ ジョラ ストリート 9 0 6
6

(72)発明者 セット アレッサンドロ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 0 3 7 ラ ジョラ リンダ ロサ アベニュー 5 5
1

(72)発明者 セリス エステバン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 2 1 3 0 サン ディエゴ ランドフェア ロード 1 3
6 4 4

審査官 引地 進

(56)参考文献 国際公開第 9 5 / 0 0 4 8 1 7 (WO, A 1)

国際公開第 8 9 / 0 0 2 2 7 7 (WO, A 1)

欧州特許出願公開第 0 0 2 7 3 7 1 6 (EP, A 1)

国際公開第 9 5 / 0 2 9 9 3 8 (WO, A 1)

国際公開第 8 7 / 0 0 6 0 0 5 (WO, A 1)

国際公開第 9 2 / 0 2 2 5 7 7 (WO, A 1)

Eur. J. Immunol., 1 9 9 1 年, Vol.21, pp.1371-1377

Eur. J. Immunol., 1 9 9 4 年, Vol.24, pp.1496-1502

J. Virol., 1 9 9 4 年, Vol.68, No.5, pp.3145-3153

J. Immunol., 1 9 9 4 年, Vol.153, No.12, pp.5586-5592

Human Immunology, 1 9 9 5 年, Vol.43, No.1, pp.13-18

AIDS, 1 9 9 5 年, Vol.9, No.2, pp.121-127

International Immunology, 1 9 9 6 年 5 月, Vol.8, No.5, pp.651-659

Immunology Letters, 1 9 9 6 年 8 月, Vol.52, pp.23-30

Immunology, 1 9 9 6 年 3 月, Vol.87, pp.414-420

Annu. Rev. Immunol., 1 9 9 3 年, Vol.11, pp.213-244

J. Immunol., 1 9 8 9 年, Vol.143, No.9, pp.3007-3014

Hybridoma, 1 9 9 4 年, Vol.13, No.1, pp.9-13

J. Immunol., 1 9 9 3 年, Vol.151, No.12, pp.7005-7015

AIDS-Forschung, 1 9 9 1 年, Vol.6, No.9, pp.467-473

J. Infect. Diseases, 1 9 8 7 年, Vol.156, No.2, pp.261-267

Mol. Immunol., 1 9 9 4 年, Vol.31, No.8, pp.1423-1430

J. Med. Virol., 1 9 9 4 年, Vol.43, pp.62-68

Immunology Letters, 1 9 9 4 年, Vol.41, pp.147-153

J. Neurol. Sci., 1 9 9 0 年, Vol.100, pp.31-36

Current Opinion in Immunology, 1 9 9 4 年, Vol.6, pp.13-23

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C07K 1/00 - 19/00

C12N 15/00 - 15/90

A61K 38/00

A61P 37/04
A61P 43/00
JSTPlus(JDreamII)
BIOSIS/WPI(DIALOG)
CA/REGISTRY(STN)
Science Direct
PubMed