

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3738395号  
(P3738395)

(45) 発行日 平成18年1月25日(2006.1.25)

(24) 登録日 平成17年11月11日(2005.11.11)

(51) Int. Cl.	F I	
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/06	Z N A
<b>A61K 39/29 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/29	
<b>A61K 47/48 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/48	
<b>A61P 31/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/12	
<b>C07K 7/08 (2006.01)</b>	C O 7 K 7/08	

請求項の数 15 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平5-504664	(73) 特許権者	エビミュン, インコーポレイティド
(86) (22) 出願日	平成4年8月26日(1992.8.26)		アメリカ合衆国, カリフォルニア 921
(65) 公表番号	特表平6-510051		21, サンディエゴ, スイート 200,
(43) 公表日	平成6年11月10日(1994.11.10)		ナンシー リッジ ドライブ 6555
(86) 国際出願番号	PCT/US1992/007218	(74) 代理人	弁理士 石田 敬
(87) 国際公開番号	W01993/003764	(74) 代理人	弁理士 岩出 昌利
(87) 国際公開日	平成5年3月4日(1993.3.4)	(74) 代理人	弁理士 戸田 利雄
審査請求日	平成11年8月26日(1999.8.26)	(74) 代理人	弁理士 西山 雅也
(31) 優先権主張番号	749, 568	(74) 代理人	弁理士 樋口 外治
(32) 優先日	平成3年8月26日(1991.8.26)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	827, 682		
(32) 優先日	平成4年1月29日(1992.1.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 H L A - 制限型 B 型肝炎ウイルスの C T L エピトープ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CTL誘発性ペプチドであって、下記の配列：

Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly (SEQ ID No.7)内、少なくとも、アミノ酸配列：Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val (SEQ ID No.8)又はアミノ酸配列：Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Proを含んで成るペプチド。

【請求項 2】

アミノ酸配列：

Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val (SEQ ID No.8)

から成る、請求項 1 記載のCTL誘発性ペプチド。

【請求項 3】

アミノ酸配列：

Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro (SEQ ID No.33)

から成る、請求項 1 記載のCTL誘発性ペプチド。

【請求項 4】

アミノ酸配列：

Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly (SEQ ID No.7)

から成る、請求項 1 記載のCTL誘発性ペプチド。

## 【請求項 5】

前記ペプチドが他のペプチドに連結されたペプチドコンジュゲートである、請求項 1 記載の CTL 誘発性ペプチド。

## 【請求項 6】

前記他のペプチドがヘルパー T リンパ球 (HTL) 誘発性ペプチドである、請求項 5 記載の CTL 誘発性ペプチド。

## 【請求項 7】

前記 HTL 誘発性ペプチドがアミノ酸配列：

Pro His His Tyr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu Leu Met Tyr Leu Ala(SEQ ID No.11)

から成る、請求項 6 記載の CTL 誘発性ペプチド。

## 【請求項 8】

前記 HTL 誘発性ペプチドがアミノ酸配列：

Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile (SEQ ID No.14)

から成る、請求項 6 記載の CTL 誘発性ペプチド。

## 【請求項 9】

前記ペプチドが他の分子に連結されたペプチドコンジュゲートである、請求項 1 記載の CTL 誘発性ペプチド。

## 【請求項 10】

前記他の分子が脂肪酸又は脂質である、請求項 9 記載の CTL 誘発性ペプチド。

## 【請求項 11】

前記ペプチドの発現のために各々作用可能式に連結された転写プロモーター、前記ペプチドをコードする DNA 配列及び転写ターミネーターを含んで成る DNA 構築体により発現された請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の CTL 誘発性ペプチド。

## 【請求項 12】

前記ペプチドコンジュゲートの発現のために各々作用可能式に連結された転写プロモーター、前記ペプチドコンジュゲートをコードする DNA 配列及び転写ターミネーターを含んで成る DNA 構築体により発現された請求項 5 ~ 8 のいずれか 1 項記載の CTL 誘発性ペプチド。

## 【請求項 13】

対象者の HBV 感染症を処置するための医薬品の製造ため、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の CTL 誘発性ペプチドを利用する方法。

## 【請求項 14】

慢性 HBV 感染症を発症し易い個体を同定するための検査薬の調製のため、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の CTL 誘発性ペプチドを利用する方法であって、その同定は当該個体に由来するリンパ系単核細胞を当該診断薬とインキュベーションして HBV に対する HLA クラス I - 制限型 CTL 応答を誘発させ、当該個体の、当該抗原に対する CTL 応答の備わる能力、それ故慢性 HBV 症の発症のし易さをそれより決定することを、含んで成る、方法。

## 【請求項 15】

前記リンパ系単核細胞が末梢血液から獲得される、請求項 14 記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

関連出願

本発明は、1991年8月26日提出のUSSN 07/749,568号の一部係属出願である、1992年1月29日提出の米国第07/827,682号の一部係属出願である、1992年4月27日提出の米国第07/874,491号の一部係属出願であり、それぞれは引用することで本明細書に組み入れている。

発明の背景

B型肝炎ウイルス (HBV) は肝細胞に感染するその性質にもかかわらず、肝細胞への損傷の直接的な原因ではないと信じられている。むしろ、非ウイルス宿主因子が肝炎の病原に

10

20

30

40

50

包括される。HBV感染に対する免疫応答における変化がHBV感染にかかわる広範囲にわたる様々な症状の原因でありうると予測される。

急性HBV感染の後、冒された成人の約90%が後遺症で伴うことなく回復し、そしてウイルスに対する免疫を発現せしめるか、しかし急性段階中の感染症の臨床経過自体はかなり様々でありうる。感染成人の5~10%において、慢性HBV感染症が樹立されてしまう。慢性HBV感染症は無候症のキャリアー状態から連鎖的な肝細胞壊死及び炎症に範囲することができ、そしてある状況においては肝細胞癌に到ることがある。HBV感染に暴露された子供、特に1歳以下の者は通常慢性感染症を発症し、そして慢性感染症の主要原因を占める。世界中で約2億人がHBVで慢性的に感染されている。そして最後に、わずかなパーセンテージ(0.1~0.5%)のHBV感染症において、急性肝炎は、これらの患者の1/5~1/3ぐ

10

らいしか生存できなくなるような肝臓における極度の細胞死をもたらしてしまう。B型肝炎ウイルスに対する免疫応答は疾患と同じように複雑である。様々な体液性及び細胞性応答がHBVのヌクレオカスピドコアが表層抗原の様々な領域に対して同定されている。T細胞媒介免疫性、特にクラスI主要組織適合性複合体(MHC)-制限型細胞障害性Tリンパ球(CTL)にかかわるそれは、肝炎及びいくつかのその他のウイルス感染症に対する耐性に重要な役割を果たすと信じられている。CTLはクラスI組織適合性分子と一体化した小さなペプチドの形状にある。この抗原-特異性CTLは、刺激されたとき、ウイルス複製を阻害し、且つ感染細胞を排除する媒介体を分泌し、それ故個体の感染症からの回復に貢献する。クラスI-制限型応答のT細胞レパートリーはウイルスタンパク質の一定の個々のイムノドミナントエピトープを焦点とすることを研究が示唆しているが(Braciale

20

ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA86:277-281(1989))、肝炎ウイルス、そして特にHBVを含む数多くのウイルスに関して、わずかなエピトープしか同定されていない。また、Barnabaら、Nature345:258(1990)はA11制限型エピトープを同定し、一方JinらJ. Exp. Med.168:293(1988)はA3制限型エピトープを同定している。AicheleはJ. Exp. Med.171:1815-1820(1990)はリンパ球の脈絡髄膜炎の核タンパク質に由来するペプチドによる、MHCクラスI依存型状態における抗ウイルスCTL応答のインビボ誘発を示している。最近になって、Kastら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA88:2283-2287(1991)は、核タンパク質由来の遊離合成ペプチドを利用するインビボでのセンダイウイルス特異的CTLを刺激して、その後のウイルス攻撃に対する保護を授けることを述べている。

30

HBV感染の際の肝細胞障害はHBV抗原に対するHLAクラスI-制限型CTL応答により媒介されることが示唆されている。HBVに対するCTL応答を明らかにする試みにおいて、急性及び慢性HBVを有する患者由来の末梢血液リンパ球がインビトロで自己の肝細胞を殺傷できることが示されているが、しかしその細胞溶解活性の特異性、そのHLA制限要素、及び細胞表現型は樹立されていない。Mondelliら、J. Immunol.129:2773(1982)及びMondelliら、Clin. Exp. Immunol. 6:311(1987)を参照のこと。より近年になって、Moriyamaら、Science248:361-364(1990)は、HBV主要エンベロップ抗原が、MHCクラスI-制限型のCD8<sup>+</sup>細胞障害性Tリンパ球により、及びエンベロップ特異性抗体により認識されることのできる形態において肝細胞表層にて発現されることを報告している。しかしながら、HBV特異性CTL活性の原因であるHBVエピトープ領域は同定されていない。

40

CD8<sup>+</sup>CTLの発生におけるリンホカイン、例えばIL-2に関する必要性はよく樹立されているが、しかしこれらのリンホカインを供するためのCD4<sup>+</sup>Tヘルパー細胞の活性化についての必要性は幾分議論の余地がある。抗体生産のための結合化Tヘルパー-B細胞認識の概念はかなり明確にされているが、CD8<sup>+</sup>CTLのインビボ誘発にとっての結合化TヘルパーCTL認識についての余儀のない証拠はない。例えば、Bullerら、Nature328:77-79(1987);Saroobeら、Eur. J. Immunol.21:1555-1558(1991);及びCassellとForman,Annals N. Y. Acad. Sci. :51-60(1991)を参照のこと。

HBVで慢性的に感染された個体は肝硬変及び/又は肝細胞癌を発症する危険にあり、そして疾患の伝染にとって非常に大きなレザーバーを成してしまう。慢性的に感染した者の免疫系を刺激して適宜のHBV抗体に応答させる及びその感染症を排除する、又は急性HBV感染

50

症から慢性段階への進行を防ぐことができることが望ましいであろう。更に、現存の承認されているHBVワクチンは免疫された者の約90%しか予防しないため、より効率的な免疫性を誘引せしめるようにワクチンの免疫原性を強める又は多様化させることによって現存のワクチンを改良することが所望される。急性HBV感染を有するどの患者が慢性HBV感染症へと進行しがちであるかを予測し、これによって適切な処置及び注意を早期に準備せしめる手段も必要とされる。比較的驚くべきことに、本発明はこれら及びその他の関連の要望を満足せしめる。

#### 発明の概要

本発明はHBV抗原に対するMHCクラスI - 制限型CTL応答を誘発するペプチドを提供する。課題のペプチドはHBV表層抗原又はヌクレオカプシドタンパク質の配列に由来する。一定の態様において、該ペプチドは6～約30個のアミノ酸を含み、そしてHBVに対するMHCクラスI - 制限型細胞障害性CTL応答を誘発することのできる少なくとも1つのエピトープを含んでおり、ここでこのエピトープは799.10(HBenv<sub>349-368</sub>) [Seq. ID No. 2] Leu-Ser-Pro-Thr-Val-Trp-Leu-Ser-Val-Ile-Trp-Met-Met-Trp-Tyr-Trp-Gly-Pro-Ser-Leu又は799.09(HBenv<sub>329-348</sub>) [Seq. ID No. 7] Ala-Ser-Ala Arg-Phe-Ser-Trp-Leu-Ser-Leu-Leu-Val-Pro-Phe-Val-Gln-Trp-Phe-Val-Glyと称される(サブタイプayw及びadwに関する)HBVエンペローブ抗原に属する。その他のペプチド態様は6～30個のアミノ酸を含んで成り、そしてHBenv配列799.08(HBenv<sub>309-328</sub>) [Seq. ID No. 1] Asn-Cys-Thr-Cys-Ile-Pro-Ile-Pro-Ser-Ser-Trp-Ala-Phe-Gly-Lys-Phe-Leu-Trp-Glu-Trp(サブタイプaywに関する)由来の少なくとも7個のアミノ酸を有している。更なる別の態様においては、ペプチドは配列Thr-Asn-Met-Gly-Leu-Lys-Phe-Arg-Gln-Leu-Leu-Trp-Phe-His-Ile-Ser-Cys-Leu-Thr-Phe(サブタイプaywに関する)を有する802.03(HBc<sub>91-110</sub>) [Seq. ID No. 4]と称するHBVコア抗原配列領域に由来する。本発明のペプチドは、HBV CTL活性を刺激する又は類似拮抗体として作用するペプチドの能力が実質的に損なわれない限り、N及びC未満の一方又は両方において任意的にフランクされている及び/又は改質されているか、このペプチドに置換、欠失及び付加がなされてよい。

様々なペプチドの態様において、該ペプチドは大きめのホモポリマーを形成するようにそれ自体に対して、又はヘテロポリマーを形成するように別のペプチドに対して、それぞれ例えば重合又は共役を介して共有結合していることができる。ある状況において、ペプチドは混合物として組成物の中に組合わされ、従って結合していないことがある。CTL誘発性ペプチドは例えばTリンパ球応答を高めることのできる脂質含有分子に連結しているか、又はTヘルパー細胞応答を誘発するTヘルパーペプチドに連結しているか、又は脂質含有分子及びTヘルパーペプチドの両者に連結してよい。脂質又はTヘルパーペプチドに対する連結はアミノ又はカルボキシ末端のいずれにおいてでよい。

本発明のペプチドを追加のペプチド、リポソーム、アジュバント及び/又は薬理的に許容されている担体と一緒に配合されて含んで成る組成物を提供する。従って、薬理組成物を急性HBV感染症の処置方法において、特にこの感染症が慢性又はキャリア状態へと進行することを予防する試みにおいて利用できる。慢性HBV感染症及びHBVキャリア状態を処置するための方法も提供し、ここで該薬理組成物を感染個体に、HBs及びHBcエピトープに対する免疫学的に有効なCTL応答を刺激するのに十分な量で投与する。これらの感染症を処置するには、HBV抗原に対するMHCクラスI制限型CTL応答を誘発するペプチドを、その他のHBV抗原に対する免疫応答を誘発するその他のペプチド又はタンパク質と組合せることが特に所望されうる。慢性又はキャリア状態の感染症を有する個体を処置するには、該組成物を初期用量で投与し、続いて一定期間にわたってそのブースティング用量を、感染症を治す又は実質的に緩和するのに必要なだけ投与してよい。

急性感染症からの慢性HBV感染症に到る進行を防ぐことを含むHBV感染症の予防のためのワクチン組成物も提供する。このワクチン組成物はMHCクラスI制限型CTL応答を誘発する免疫学的に有効な量のHBVペプチドを含んで成る。HLA-A2ハプロタイプ個体の場合、このペプチドはペプチド799.08(HBenv<sub>309-328</sub>) [Seq. ID No. 1]、799.09(HBenv<sub>329-348</sub>) [Seq. ID No. 7]、799.10(HBenv<sub>349-368</sub>) [Seq. ID No. 2] 及び/又は802.03(HBc<sub>91-110</sub>)

10

20

30

40

50

〔Seq. ID No. 4〕のいずれかに由来してよく、そして典型的には更にアジュバント、例えばフロインドアジュバント、水酸化アルミニウム等を含んで成るであろう。HBVに対する強められた予防を得るため、このワクチンはHBV抗原に対する防御性の細胞及び/又は抗体の応答を誘発せしめる追加の成分を含んで成ってよい。好ましい態様においては、CTL誘発性ペプチドを、Tヘルパーエピトープを含む1又は複数のTヘルパーペプチドと一緒に投与する。Tヘルパーペプチドの選択は、Tヘルパーペプチドを含むワクチン組成物を予防的に、又は治療的に投与するかどうかによって依存する。予防的投与の場合、TヘルパーペプチドはHBVエンベロープもしくはコアに由来する1もしくは複数のHBVペプチドであるか、又はその他の生物に由来するタンパク質、例えば破傷風トキソイド、インフルエンザ、パラインフルエンザ、マラリア、エプステインバーウィルス、単純ヘルペス及び当業者に公知のその他のものである。治療的投与の場合、Tヘルパーエピトープは好ましくはHBV以外の感染因子に由来するタンパク質が選ばれたペプチドであろう。Tヘルパーペプチドのいくつかの例はHBc 128-140, HBc 1-20, HBc 50-69及びHBc 111-125破傷風トキソイド830-843、並びにインフルエンザ307-319である。このTヘルパーペプチドはCTL誘発性ペプチドと一緒に、又は別々に投与してよいが、しかしCTL及びTヘルパーペプチドが連結していることが好ましい。ペプチドの連結はスペーサー分子、例えばアミノ酸残基、例えばアラニン、又はその他の比較的中性な残基で構成されうる。

更なる別の態様において、本発明は診断のための方法に関連し、この場合、本発明のペプチドは、個体におけるHBV表面又はヌクレオカプシド抗原に対して細胞障害性T細胞応答が可能なリンパ球の存在を決定するために利用される。かかる細胞がないことは、対象の個体が慢性HBV感染の発症に感受性であるかどうかを決定せしめる。典型的には、リンパ球は末梢血液リンパ球とし、そして対象の個体は急性HBV感染症に苦しむ者である。

#### 【図面の簡単な説明】

図1は、A2.1/K<sup>b</sup>遺伝子導入マウスに、HBVの「負荷された」同系脾臓細胞を感作せしめることによる、HBVペプチド-特異的A2.1-制限型CTLの誘発の結果を示している。パネルA-D: HBV-感作遺伝子導入マウス由来の脾細胞をインビトロで、13種のペプチドのうちの一つでそれぞれコートされた同系LPS芽細胞の4通りの混合物で再刺激せしめている。9日後、エフェクター細胞を、誘発のために用いた4通りの異なるペプチド混合物の存在下又は非存在下で、<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカット(Jurkat)A2.1/K<sup>b</sup>標的細胞に対する溶解活性についてアッセイした。パネルE-M: 4通りの異なるペプチド混合物に対して発生せしめたエフェクター細胞を同じペプチド混合物に対してインビトロで再刺激し、そして個々のペプチドの存在下又は非存在下で、<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>標的細胞に対する溶解活性をアッセイした。

図2はA2.1遺伝子導入CTLのHBVペプチド特異性を示している。HBV感作遺伝子導入マウスより高揚させ、そして4通りの異なるペプチド混合物のうちどれかで2回インビトロで再刺激せしめた遺伝子導入CTLを個々のHBVペプチドで再刺激し、そして再刺激のために用いたHBVペプチドの存在下又は非存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカット標的細胞に対する溶解活性についてアッセイした。

図3はIFA中のHBVでA2.1/K<sup>b</sup>遺伝子導入マウスを感作せしめることによるHBVペプチド特異的A2.1-制限型CTLの誘発の結果を示す。A. HBV感作遺伝子導入マウス由来の脾細胞をインビトロで、HBVペプチドでコートされた同系LPS芽細胞によって再刺激せしめた。6日後、エフェクター細胞を適当なHBVペプチドの存在下又は非存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>標的細胞に対する溶解活性についてアッセイした。各パネルは表示の標的ペプチドによって誘発されたCTL活性を示している。

図4。図3のエフェクターCTLをペプチドコート型LPS芽細胞で再刺激し、続いて一週間の間隔において、ペプチドコート型ジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>細胞で再刺激した。最後の再刺激の6日後、エフェクター細胞を再刺激のために用いたペプチドと関連ペプチドの非存在下又は存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>標的細胞に対する細胞障害活性についてアッセイした。各パネルは図3の対応パネルに示しているペプチドにより誘発せしめたCTL活性を示している。標的ペプチドが各パネルの中に表示してある。

10

20

30

40

50

図5は、HBc 875.23 Tヘルパーエピトープ単独で感作せしめたマウスにおいてHBc 18-27-特異的CTL応答が全く検出されなかったことを示している。動物を完全フロインドアジュバント(CFA)中の100 $\mu$ gの875.23(Tヘルパーエピトープ)で皮下的に感作せしめ、続いて9日後、IFAのみで(皮下的に)感作せしめた。脾細胞の3週間後に取出し、CTLエピトープ(875.15)100 $\mu$ gと洗浄前に2時間インキュベートしておいたLPS-芽細胞の存在下で6日間培養し、次いで抗原表示細胞の起源として培養物に加えた。HBc 18-27(875.15)特異的CTLの存在を標的としてのジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>細胞による標準の6hr <sup>51</sup>Cr放出アッセイを利用して決定した。

図6はマウスをIFA中のHBc 18-27(875.15)で感作したときにHBc 18-27-特異的CTL応答が全く検出されなかったことを示す。実験のプロトコールは図5に記載のものと類似しているが、ただしマウスに、インビボCTL感作のためにIFA単独ではなく、IFA中の100 $\mu$ gの875.15を皮下的に受容せしめてある。

図7は1:1の比でHBc CTL誘発性ペプチド(875.15)と混合せしめたHBc Tヘルパーペプチド(875.23)で感作せしめたマウスの50%においてHBc 18-27-特異的CTL応答が検出されたことを示している。この実験プロトコールは図5及び6に記載のものと類似である。

図8は、HBc TヘルパーとCTL誘発性ペプチドとがペプチド結合を介して連結しているペプチド902.01で感作せしめたマウスにおいて、HBc特異的(875.15)CTL活性が検出されたことを示している。

図9は、HBc TヘルパーとCTL誘発性ペプチドとが、典型的なスパーサー、例えばアラニン-アラニン-アラニンを利用するペプチド結合を介して連結しているペプチド902.02で感作せしめたマウスにおいて、最大のHBc 18-27(875.15)特異的CTL活性が検出されたことを示している。

図10はヘルパーT細胞の事前感作が、ペプチド902.01及び902.02を利用するHBc 18-27-特異的CTL応答のインビボ感作にとって必要でないことを示している。CTL応答はCFA中でのペプチド875.23による事前感作抜きで、ペプチド902.01(図10A)又は902.02(図10B)単独によって皮下的に感作された動物から示された。

図11はHBenv<sub>360-368</sub>特異的CTL応答の誘発を示している。A2.K<sup>b</sup>遺伝子導入マウスに100mgのHBenv360-368及び100mgのHBc 128-148のエマルジョン(IFA)100 $\mu$ lを注射した。3週間後、脾細胞をペプチドHBenv 360-368でコートされた同系LPS芽細胞で再刺激せしめた。エフェクター細胞をHBenv 360-368の存在下又は非存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2/K<sup>b</sup>標的細胞に対する細胞障害性についてアッセイした。

図12は破傷風トキシノイド830-843(ヒトヘルパーT細胞エピトープ)に連結しているHBc 18-27を含むペプチドでの感作によるHBc 18-27に特異的なCTL応答の誘発を示している。エフェクター細胞を、HBc 18-27の存在下又は非存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>標的細胞に対して; HBc 18-27の存在下又は非存在下でJy標的細胞に対して、及びHBVコアのトランスフェクトされたJy細胞に対してアッセイした。

図13はHBV env 329-348ペプチド(799.09)内でのCTL認識のための最小配列をしている。CTL細胞系110及び113は、IFA中のHBVウイルスにより皮下的に感作され、そして799.09コート型刺激細胞でインビトロ活性化されたA2Kb遺伝子導入マウスより獲得した脾細胞に由来する。799.09特異的CTL細胞系110及び113を、799.09ペプチド短縮体(トランケーション)の存在下で標的としてJA2Kb細胞を用いる6hr <sup>51</sup>Cr放出アッセイにおいて溶解活性についてアッセイした(パネルA = 799.09N末端短縮体; パネルB = 799.09の重複9量体及び10量体)。

#### 特定の態様の説明

本発明はHBV感染症の処置、予防及び診断のための組成物及び方法において利用するための、HBVエンベロープ抗原(HBenv; 表層抗原又はHBsとも呼ぶ)及びヌクレオシドコア(HBc)タンパク質の配列に由来するペプチドを提供する。該ペプチドはHBV感染細胞に対するMHC HLAクラスI-制限型CTL応答が可能である。リンホカイン(例えばガンマーインターフェロン)を分泌する、並びに細胞殺傷を伴うか伴わないで感染自己細胞又は移入細胞におけるウイルス複製を阻害する生成物(例えばタンパク質分解酵素、例えばセリンエス

10

20

30

40

50

テラーゼ)を遊離する刺激化CTLは、慢性HBV感染症を妨害又は実質的に予防することができる。あらゆる状況において、効果的な細胞障害性T細胞応答と特定のHBV抗原に対する保護的抗体応答との組合せは、HBV感染症を予防又は終らせるのに最も効果的であろう。好ましい態様において、本発明のペプチドはHBV表層抗原又はヌクレオカプシドポリペプチド、コア及びプレコア内に由来する。本明細書記載のより好ましい態様において、CTL誘発性ペプチドはHBenv<sub>309-328</sub>(ペプチド799.08)、HBenv<sub>329-348</sub>(ペプチド(799.09)、HBenv<sub>349-368</sub>(ペプチド799.10)の領域、又は領域HBc<sub>91-110</sub>(ペプチド802.03)に由来し、ここでその番号は引用することで本明細書に組入れているGalibertら、Nature 281:646(1979)に従っている。

本発明の「CTL誘発性ペプチド」又は「オリゴペプチド」とは、HBenvもしくはHBcタンパク質の特定のエピトープ領域、又はその他の有効な標的抗原、例えば腫瘍関連抗原、例えば限定することなく、腎細胞癌、乳癌、癌胎児性抗原、黒色腫(MAGE-1)抗原及び前立腺癌特異的抗原、C型肝炎抗原、エプステインバーウイルス抗原、HIV-1及びHIV-2抗原、並びにパピロウイルス抗原のようなその他のエピトープ領域に由来する、少なくとも4個のアミノ酸残基、好ましくは少なくとも6個、より好ましくは8~10個、時折り11~14個の残基、そして通常は約30以下の残基、より通常には約25個以下、そして好ましくは15個以下、例えば8~14個のアミノ酸残基の鎖を意味している。

下記により詳しく説明する通り、B型肝炎に関して、前記ペプチドの通常は少なくとも4個、時折り6個、しばしば7個以上の残基、又はこのペプチドの過半数のアミノ酸が、HBenv<sub>309-328</sub>(ペプチド799.08)もしくはHBenv<sub>329-348</sub>(ペプチド799.09)もしくはHBenv<sub>349-368</sub>(ペプチド799.10)として同定されている天然のHBenv配列、又はHBcの領域HBc<sub>91-110</sub>(ペプチド802.03)の対応部分と比較したときに、同一又は相同であろう。

該ペプチドは下記の通り「合成的」に、又は組換DNA工学によって製造されうる。該ペプチドはその他の天然のHBVタンパク質及びそのフラグメントを実質的に含まないことが好ましいであろうが、ある態様においては、該ペプチドは天然のフラグメント又は粒子に合成的にコンジュゲートされていてよい。ペプチドなる語は本明細書においてポリペプチドと同義語として、一連のアミノ酸であって隣り同志のアミノ酸のアルファアミノ基とアルファカルボキシ基とのペプチド結合によって互いに接続されているものを称するように利用されている。このポリペプチド又はペプチドはあらゆる長さでよく、中性(無荷電)状態にあるか又は塩の形態であってよく、そして改質、例えばグリコシル化、側鎖酸化もしくはリン酸化を含まないか、又は該ポリペプチドの本明細書に記載の生物学的活性をその改質が損わないことを条件としてそれらの改質を含んでいてよい。

該ペプチドは、大型のペプチドの生物学的活性の実質的に全てを維持し続けながら、できるだけ小さいことが所望される。可能なら、細胞表層上のMHCクラスI分子に結合する内因的にプロセスに付されたウィルスペプチドとサイズにおいてつり合う8~12個のアミノ酸残基の長さへと本発明のペプチドを最適化することが所望されうる。一般的には本明細書に引用することで組入れるSchumacherら、Nature350:703-706(1991);Van Bleekら、Nature348:213-216(1990);Rotzschkeら、Nature348:252-254(1990);及びFalkら、Nature351:290-296(1991)を参照のこと。生物学的活性とは、適当なMHC分子に結合する能力、CTL応答を刺激するのに有用なペプチドの場合には、HBV抗原又は抗原擬態物に対するCTL応答を誘発せしめる能力を意味する。ペプチド類似体拮抗剤の場合、この類似体はもしそれがMHC分子に対する結合に関して該ペプチドと競合し、且つ天然ペプチドに比して実質的に低いCTL応答刺激能力を有するとき、それは生物学的活性を有しているであろう。CTL応答とは、課題のHBV抗原に対する特異的なCD8<sup>+</sup>Tリンパ球応答を意味し、この場合CD8<sup>+</sup>、即ち、MHCクラスI-制限型Tリンパ球は活性化される。前述した通り、活性化Tリンパ球はウィルス複製を阻害せしめ、且つHBV感染(又は移入)細胞を殺すもしくは殺さない様々な生成物を分泌するのである。

本明細書で用いている「相同性」、「実質的に相同性」及び「実質的相同」なる語は、ある配列を対照のアミノ酸配列と比較したときに少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を意味する。配列の同一性又は相同性のパーセンテージは一方を他方と、対照の配列

10

20

30

40

50

の対応領域で並べたときの比較によって計算する。

本発明のCTL誘発性HBenvペプチドは6～36個のアミノ酸を含んで成り、そして799.08ペプチド領域HBenv<sub>309-328</sub>に由来し、CTLエピトープ部位を含み、そして少なくとも7個のアミノ酸を有しており、ここで該ペプチドのアミノ酸の過半数は、天然のHBenv<sub>309-328</sub>配列の対応の領域を構成するアミノ酸と比較したとき、同一又は実質的に相同性であろう。この領域の代表的なペプチドはペプチドHBenv<sub>309-328</sub>であり、これは下記の配列（HBVサブタイプaywに関する）を有す：

799.08(HBenv<sub>309-328</sub>) [Seq. ID No. 1] Asn-Cys-Thr-Cys-Ile-Pro-Ile-Pro-Ser-Ser-Trp-Ala-Phe-Gly-Lys-Phe-Leu-Trp-Glu-Trp (ここでこのペプチドは任意的に、本明細書で更に説明する通り、所望するならば、そのN-及びC-末端の一方又は両方において、HBV配列、特にHBenvに由来するアミノ酸、担体等に連結されている別のN-及びC-末端改質体への連結を助長せしめるように付加するアミノ酸によってフランク及び/又は改質されてよい)。

10

HBVサブタイプadwに関しては、Gly<sub>322</sub>はAla、そしてPhe<sub>324</sub>はTyrに置き代わられている。このペプチドHBenv<sub>309-328</sub>は少なくともMHCクラスI分子HLA-A2により媒介されるCTL応答を誘発する。

本発明の他のHBenv CTL誘発性ペプチドの態様は、799.10ペプチド領域HBenv<sub>349-368</sub>の6～20個のアミノ酸を含んで成り、そして少なくとも7個又はそれより多くのアミノ酸のエピトープ部位を含むHBenv<sub>349-368</sub>に由来するペプチドを含み、ここで該ペプチドの過半数のアミノ酸はHBenv<sub>349-368</sub>として同定されている天然のHBenv配列の対応領域と比較したときに同一又は相同性であり、ここでHBenv<sub>349-368</sub>は下記の通りである（HBVサブタイプayw及びadwに関する）：

20

799.10 (HBenv<sub>349-368</sub>) [Seq. ID No. 2] Leu-Ser-Pro-Thr-Val-Trp-Leu-Ser-Val-Ile-Trp-Met-Met-Trp-Tyr-Typ-Gly-Pro-Ser-Leu (ここで前記領域から選ばれたペプチドは本明細書に記載の通り一方又は両方の末端においてフランク及び/又は改質されてよい)。B型肝炎ウイルスに対するMHCクラスI-制限型細胞障害性T-リンパ球応答を誘発できる少なくとも1エピトープを含む799.10(HBenv<sub>349-368</sub>)の領域由来の他のCTL誘発性ペプチドの例は：

884.02(HBenv<sub>349-358</sub>) [Seq. ID No. 3] Leu-Ser-Pro-Thr-Val-Trp-Leu-Ser-Val-Ileである。

30

本発明の更なる他のCTL誘発性ペプチド態様はHBenv領域のHBenv<sub>329-348</sub>に由来する。ペプチド799.09(HBenv<sub>329-348</sub>)に加えて、これらの態様には、HBVに対するMHCクラスI-制限型CRL応答を誘発できるHBenv<sub>329-348</sub>の配列内のエピトープ部位を含むペプチドが挙げられる。HBVサブタイプaywに関するHBenv<sub>329-348</sub>は下記の配列を有する：

799.09(HBenv<sub>329-348</sub>) [Seq. ID No. 7] Ala-Ser-Ala-Arg-Phe-Ser-Trp-Leu-Ser-Leu-Leu-Val-Pro-Phe-Val-Gln-Trp-Phe-Val-Gly。

更なる態様において、本発明のペプチドはHBc領域のHBc<sub>91-110</sub>に由来し、そして更に、ペプチド802.03(HBc<sub>91-110</sub>)は、少なくとも7個、そして好ましくは9個のアミノ酸のエピトープ部位を含むペプチドを含んでおり、ここで該ペプチドの過半数のアミノ酸は天然のHBc<sub>91-110</sub>のHBc配列の対応領域のアミノ酸と比較したときに同一又は実質的に相同性であり、ここでHBVサブタイプaywに関するHBc<sub>91-110</sub>の配列は下記の配列を有する：

40

802.03(HBc<sub>91-110</sub>) [Seq. ID No. 4] Thr-Asn-Met-Gly-Leu-Lys-Phe-Arg-Gln-Leu-Leu-Trp-Phe-His-Ile-Ser-Cys-Leu-Thr-Phe (ここで、前記領域から選ばれたペプチドは本明細書に記載の通り、一方又は両方の末端においてフランク及び/又は改質されてよい)。

HBVサブタイプadwのペプチドに関しては、Phe<sub>97</sub>はIle、そしてLeu<sub>101</sub>はTrpにより置き代わられている。このCTL誘発ペプチド802.03は、少なくともMHCクラスI分子HLA-A2.1により媒介されるCTL応答を誘発する。802.03(HBc<sub>91-110</sub>) [Seq. ID No. 4]の領域に由来し、且つB型肝炎ウイルスに対するMHCクラスI-制限型細胞障害性Tリンパ球応答を誘発できるエピトープを含むCTL誘発性ペプチドの例には以下が含まれる：

883.02(HBc<sub>92-101</sub>) [Seq. ID No. 5] Asn-Met-Gly-Leu-Lys-Phe-Arg-Gln-Leu-Leu、

50

(HBc<sub>92-100</sub>) [Seq. ID No. 9] Asn-Met-Gly-Leu-Lys-Phe-Arg-Gln-Leu及び

883.03(HBc<sub>93-102</sub>) [Seq. ID No. 6] Met-Gly-Leu-Lys-Phe-Arg-Gln-Leu-Leu-Trp。

前述した通り、オリゴペプチド又はペプチド末端に追加のアミノ酸を付加させて、本明細書に記載の理由のため、該ペプチド又はオリゴペプチドの物理的又は化学的性質を改質するため、等のために、ペプチドを互いに連結し易くようにすることができる。アミノ酸、例えばチロシン、システイン、リジン、グルタミン酸もしくはアスパラギン酸等をこのペプチド又はオリゴペプチドのC - 又はN - 末端に導入してよい。更に、このペプチド又はオリゴペプチドは、末端NH<sub>2</sub>アシル化、例えばアルカノイル(C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub>)もしくはチオグリコリルアセチル化、末端カルボキシアミド化(例えばアンモニア、メチルアミン)等によって改質されることで、天然配列と相違してよい。ある状況において、これらの改質は支持体又はその他の分子への連結のための部位を担うことができる。

CTL刺激活性を有する本発明のペプチド又はその類似体はその他の所望される特質、例えば向上した薬理学特性を供しながら、未改質ペプチドの生物学的活性を高める又は少なくともその実質的に全てを残すように改質されうる。例えば、該ペプチドは本明細書に開示している配列に由来するペプチドの例えばアミノ末端もしくはカルボキシ末端のいずれかでのアミノ酸の付加もしくは削減による、伸長、削減又はペプチドアミノ酸配列における置換によって改質されうる。下記に更に説明する通り、課題のペプチドのCTL活性は、破傷風トキソイド830-843、インフルエンザ307-319、マラリアサーカムスポロゾイト382-398及び378-389、オバルブミン323-336、並びにHBc 128-140、HBc 1-20、HBc 50-69及びHBc 111-125内に含まれているようなTヘルパー細胞を誘発できる少なくとも1エピトープを含む配列への結合によって高めることができる。

本発明において利用されるペプチドは、ペプチド799.08、799.09、799.10もしくは802.03、又は特定のHBV表層抗原もしくはヌクレオカプシドタンパク質配列とは、課題の化合物が適当なMHC分子に結合することができ、そして4種のHBVの主要サブタイプのうちの少なくとも1つに対する細胞障害性Tリンパ球活性を供することができる限り(ただしペプチド類似体拮抗体の場合、本明細書で更に説明する通り、MHC分子に結合するが、実質的に低いCTL活性刺激能力を有する)、同一である必要はない。従って、該ペプチドは様々な変化、例えば挿入、欠失及び置換(保存的又は非保存的のいずれでもよい)に付されてよく、ここでかかる変化はその用途において一定の利点を供しうる。保存的置換とは、アミノ酸残基を、生物学的及び/又は化学的に類似な別のものに交換すること、例えばある疎水性残基を別のものに、又はある極性残基を別のものに交換することを意味する。この置換は、Gly,Ala;Val,Ile,Leu;Asp,Glu;Asn,Gln;Ser,Thr;Lys,Arg;及びPhe,Tyrのような組合せが含まれる。通常、HBV CTL刺激性エピトープを実質的に擬態することを意図する配列の領域は、例えば連結又は複合化のし易さのためにペプチドの物理的又は化学的性質を改質せしめる目的のためにいずれかの末端において追加のアミノ酸が付加されている場合を除き、HBVの少なくとも1サブタイプの配列から約20%以上相違しないであろう。ペプチド配列の領域がHBVサブタイプにわたって多型性であることが見い出されている状況においては、種々のHBV株またはサブタイプの異なる細胞障害性Tリンパ球エピトープをより効果的に擬態するように1又は複数の特定のアミノ酸を変更することが所望されうる。

CTLエピトープ、例えばペプチド領域799.08(HBenv<sub>309-328</sub>)、ペプチド領域799.09(HBenv<sub>29-348</sub>)、ペプチド領域799.10(HBenv<sub>349-368</sub>)又はペプチド領域802-03(HBc<sub>91-110</sub>)を含むものとして本発明により同定されたペプチド配列領域の中には、該ペプチドにその生物学的活性、即ち、HBV表層及び/又はヌクレオカプシド抗原を発現するHBV感染細胞に対するクラスI - 制限型細胞障害性T - リンパ球応答を刺激する能力を保持させる残基(又は実質的に機能的に同等であるもの)がある。これらの残基は単一アミノ酸置換、欠失又は挿入によって同定できる。更に、残基の側鎖の機能は特定のアミノ酸(例えばAla)による系統学的なスキャンにより探り当てることができる。多重置換に耐えるペプチドは一般に小さく、比較的中性な分子、例えばAla,Gly,Pro又は類似の残基のような置換を含む。置換、付加又は削除できる残基の数及びタイプは、必須のエピトープ点と、追求される一定の

10

20

30

40

50

コンホメーション的及び機能的性質（例えば疎水性、対、親水性）との間に必要とされる間隔に依存するであろう。所望するなら、CTLへの供与のためのペプチド類似体のそのMHC分子に対する高められた結合親和力も、かかる変更によって達成されうる。一般に、エピトープ的及び/又はコンホメーション的に重要な残基間での任意のスペーサー置換、付加又は欠失は、結合性を損うことがある立体障害及び電荷干渉を避けるように選ばれるアミノ酸又はその他の成分を利用すべきである。

所望の生物学的活性を維持しながら置換に耐えるペプチドはDアミノ酸含有ペプチドとしても合成されうる。ペプチドは「インバーソ(inverso)」又は「レトロ-インバーソ(retro-inverso)」形状として、即ち、配列のL-アミノ酸をD-アミノ酸に置き換える、又はアミノ酸配列を反転させ、そしてL-アミノ酸をD-アミノ酸に置き換えることによって合成されうる。D-ペプチドはペプチダーゼに対して実質的により耐性であり、それ故L-ペプチド対応物に比して血液及び組織の中でより安定であるため、生理学的条件のもとでのD-ペプチドの安定性は対応のL-ペプチドに比してのアフィニティーの相違を補うであろう。更に、置換を有する又は有さないLアミノ酸含有ペプチドは抗原性ペプチドのエキソペプチダーゼ分解を阻止するD-アミノ酸でキャップされていてよい。

1又は複数種の患者又はHLAタイプにおいてHBV特異性CTL応答を刺激せしめるのに担う本発明の種々のペプチドを同定したら、ある状況において組成物の中で2種以上のペプチドを組合せることが所望されうる。この組成物中のペプチドは同一でも異なってもよく、そして一緒になってそれらはもとのペプチドと同等又はそれより高い生物学的活性を供するであろう。例えば、本明細書に記載の方法を利用して、2種以上のペプチドは特定領域、例えばペプチド領域799.08(HBenv<sub>309-328</sub>)、ペプチド領域799.09(HBenv<sub>329-349</sub>)、799.10(HBenv<sub>349-368</sub>)、又はペプチド領域(HBc<sub>91-110</sub>)に由来する異なる又は重複するCTLエピトープを規定しうるものであってよく、これらのペプチドCTL応答に対する高められた免疫原性を供する「カクテル」において組合せてよい。ある領域のペプチドを、別のMHC制限要素を有するペプチドと組合せてもよい。この組成物は様々な集団にわたる本発明の治療的、ワクチンの、又は診断的方法及び組成物により供される免疫適用範囲を有効に広げるために利用できる。

本発明のペプチドはポリマー（多量体）を形成するよう連結を介して組合せられうるか、又は連結抜きの混合物として組成物の中で配合されうる。同じペプチドを互いに連結させ合うとき、それ故ホモポリマーを作るとき、複数の反復エピトープ単位が供される。ペプチドが異なるとき、例えば種々のHBVサブタイプ、サブタイプ内での種々のエピトープ、種々のHLA制限特異性、又はTヘルパーエピトープを含むペプチドを供するカクテルのとき、反復単位を有するヘテロポリマーが供される。共有結合の他に、分子間又は構造内結合の形成の可能な非共有結合も考慮される。

ホモ-もしくはヘテロ-ポリマーのための、又は担体への複合化のための連結は様々な方法で供されうる。例えばシステイン残基をアミノ-及びカルボキシ末端の両方に加えてよく、この場合このペプチドはシステイン残基のコントロールされた酸化を通じて共有結合させる。更に有用なのは数多くのヘテロ二価試薬であり、これは一方の官能基末端でのジスルフィド連結及び他方でのペプチド連結を作り上げるものであり、それにはN-スクシジミジル-3-(2ピリジリジチオ)プロピオネート(SPDP)が含まれる。この試薬はそれ自体と、あるタンパク質中のシステイン残基とのジスルフィド結合、及び他のものにおけるリジン上のアミノ又はその他の遊離アミノ基を通じてのアミド結合をもたらす。様々なかかるジスルフィド/アミド形成試薬が知られている。例えば、*Immun. Rev.* 62:185(1982)を参照のこと。その他の二価カップリング試薬はジスルフィド結合ではなく、チオエーテル結合を形成する。数多くのこのようなチオエーテル形成試薬が市販されており、そして6-マレイミドカプロン酸、2-プロモ酢酸、2-ヨード酢酸、4-(N-マレイミド-メチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸等の反応性エステルが含まれる。カルボキシル基はそれらをスクシニミド又は1-ヒドロキシ-2-ニトロ-4-スルホン酸のナトリウム塩と組合せることによって活性化できうる。特に好ましいカップリング剤はスクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(SMCC)で

10

20

30

40

50

ある。むしろ、この連結は、連結されたどの基もが、例えば前記したようにHBV細胞障害性T細胞決定基として、ペプチド類似体CTL拮抗体として、又はHBV Tヘルパー決定基として機能することを実質的に妨害してはならない。

別の観点において、本発明のペプチドを、HBV Tヘルパー細胞エピトープ、即ち、エンペロープ、コア又はその他の免疫原タンパク質又はそれらの誘導体由来し、HBVに対する細胞障害性T細胞の誘発において協力するT細胞を刺激するTヘルパーエピトープを含む6~30個のアミノ酸を含んで成るTヘルパーペプチドを供するその他のペプチドと組合せる又は複合させてよい。このTヘルパー細胞は例えばTヘルパー1又はTヘルパー2表現型のいずれかでもよい。Tヘルパーペプチド及びCTLペプチドの組成物は従ってHBVに対する細胞媒介型免疫性及び保護抗体を供することによって個体の免疫性を高める。

Tヘルパーエピトープは配列Met-Asp-Ile-Asp-Pro-Tyr-Lys-Glu-Phe-Gly-Ala-Thr-Val-Glu-Leu-Leu-Ser-Phe-Leu-Pro [Seq. ID No. 10] を有するHBC<sub>1-20</sub>として同定された。その他のTヘルパーエピトープは、配列Pro-His-His-Tyr-Ala-Leu-Arg-Gln-Ala-Ile-Leu-Cys-Trp-Gly-Glu-Leu-Met-Tyr-Leu-Ala [Seq. ID No. 11] を有する領域HBC<sub>50-69</sub>、並びに配列Leu-Leu-Trp-Phe-His-Ile-Ser-Cys-Leu-Thr-Phe-Gly-Arg-Glu-Thr-Val-Ile-Glu-Tyr-Leu [Seq. ID No. 12] (ここでIle 116はHBV adwサブタイプにおいてはLeuである) を有するHBC<sub>100-119</sub>配列Glu-Tyr-Leu-Val-Ser-Phe-Gly-Val-Trp-Ile-Arg-Thr-Pro-Pro-Ala [Seq. ID No. 13] を有するHBC<sub>117-131</sub>、及び配列Val-Ser-Phe-Gly-Val-Trp-Ile-Arg-Thr-Pro-Pro-Ala-Tyr-Arg-Pro-Pro-Asn-Ala-Pro-Ile [Seq. ID No. 14] を有するペプチドHBC<sub>120-139</sub>を含むHBC<sub>100-139</sub>の領域に由来するペプチドにより供される。Ferrariら、*J. Clin. Invest.* 88:222(1991)、及び米国特許第4,882,145号を参照のこと(それぞれ引用することで本明細書に組入れる)。その他のTヘルパーエピトープは、例えば配列Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu(QYIKANSKFIGITE) [Seq. ID No. 15] を有する破傷風トキシノイド<sub>830-843</sub>; マラリヤサーカムスポロゾイト<sub>382-398</sub>Lys-Ile-Ala-Lys-Met-Lys-Ala-Ser-Ser-Val-Phe-Asn-Val-Val-Asn-Ser(KIAKMEKASSVFNVNS) [Seq. ID No. 16]; マラリヤサーカムスポロゾイト<sub>378-398</sub>Asp-Ile-Glu-Lys-Lys-Ile-Ala-Lys-Met-Lys-Ala-Ser-Ser-Val-Phe-Asn-Val-Val-Asn-Ser(DIEKKIAKMEKASSVFNVNS) [Seq. ID No. 17]; オパルブミン<sub>323-336</sub>Ile-Ser-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His-Ala-Glu-Ile-Asn-Glu [Seq. ID No. 35] 及びインフレンザエピトープ<sub>307-319</sub>Pro-Lys-Tyr-Val-Lys-Gln-Asn-Thr-Leu-Lys-Leu-Ala-Thr [Seq. ID No. 18] のようなペプチドにより供される。

好ましい態様において、本発明のCTL誘発性ペプチドはTヘルパーペプチドに共有結合している。特に好ましくは、CTL誘発性ペプチド/Tヘルパーコンジュゲートはスペーサー分子によって連結されている。他方、CTLペプチドはスペーサー抜きでTヘルパーペプチドに連結されていてよい。このスペーサーは典型的には比較的小さい中性分子、例えばアミノ酸又はアミノ酸擬態物であって、生理学的な条件のもとでは実質的に無電荷であり、そして線形又は枝分れ側鎖を有するものを含んで成る。これらのスペーサーは典型的には例えばAla, Gly、又はその他の非極性アミノ酸もしくは中性極性アミノ酸の中性スペーサーより選ばれる。本明細書の一定の好ましい態様において、中性スペーサーはAlaである。任意的に存在するスペーサーは同じ残基より構成されている必要はなく、従ってヘテロ-又はホモ-オリゴマーであってよいことが理解されるであろう。好ましい典型的なスペーサーはAlaのホモ-オリゴマーである。存在しているなら、このスペーサーは通常は少なくとも1又は2個の残基数、より通常には3~6個の残基数であろう。別の態様において、該ヘルパーペプチドはCTLペプチドにコンジュゲートされており、好ましくはそのTヘルパーペプチドはアミノ末端に位置している。このペプチドは中性リンカー、例えばAla-Ala-Ala等によって連結されていてよく、そして好ましくは脂質残基、例えばパルミチン酸等を更に含んでおり(下記に更に詳しく説明する)、それらはLys残基のアルファ-及びエプシロンアミノ基に付加されており((PAM)<sub>2</sub>Lys)、ここでこのLys残基は典型的にはSer-Ser結合等を通じてペプチドコンジュゲートのアミノ末端に付加されている。

CTL誘発性ペプチドはCTLペプチドのアミノ又はカルボキシ末端のいずれかに、直接的又はスペーサーを介してのいずれかでTヘルパーペプチドに連結されていてよい、CTL誘発性

10

20

30

40

50

ペプチド又はTヘルパー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よい。更に、CTLペプチド/Tヘルパーコンジュゲートは下記に説明する通り、1又は複数の連結残基、例えば、Gly, Gly-Gly, Ser, Ser-Serを介して一定のアルカノイル(C<sub>1</sub> - C<sub>20</sub>)脂質に連結されていてよい。

下記の典型的な態様において、実質的にHBc<sub>128-140</sub>(Thr-Pro-Pro-Ala-Tyr-Arg-Pro-Pro-Asn-Ala-Pro-Ile-Leu) [Seq. ID No. 19] 内に由来するTヘルパーペプチドは、CTLペプチド(HBc18-27)に連結しているとき、試験した全ての動物における動物の特異的なCTL感作を誘発し、そしてそのレベルは、投与したCTLペプチドとTヘルパーペプチドとが連結されていないときよりも高かった。Tヘルパー及びCTL HBVペプチドがAla-Ala-Alaスペーサーにより連結されているとき、その特異的なCTL活性はスペーサー抜きで連結させたペプチドによる特異的なCTL活性の誘発より高い。これらの結果は、免疫原として、HBV Tヘルパーエピトープを含むペプチドにスペーサーを介して連結されているCTLエピトープを含むペプチドを用いたときの、HBV抗原を表示する細胞に対する強いCTL応答を示唆している。

本発明のペプチドは様々な方法で調製できる。その比較的短い長さのため、これらのペプチドは常用の技術に従って溶液中又は固相支持体上で合成されうる。様々な自動合成装置が市販されており、そして公知のプロトコールに従って利用されうる。例えば、引用することで本明細書に組入れる、StewartとYoung, Solid Phase Peptide Synthesis, 第2版., Pierce Chemical Co.(1984); Tamら、J. Am. Chem. Soc. 105:6442(1983); Merrifield, Science 232:341-347(1986); 及びBaranyとMerrifield, The Peptides, GrossとMeienhofer, 編., Academic Press, New York, 頁1-284(1979)を参照のこと。

他方、組換DNA技術を利用することができ、この場合、課題のCTLペプチド及び/又はTヘルパー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の中に挿入し、適当な宿主細胞の中に形質転換又はトランスフェクトし、そして発現にとって適切な条件のもとで培養する。これらの手順は当業界に一般的に知られており、開示内容を引用することで本明細書に組入れている、例えばSambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York(1982)及びAusubelら、(編) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., New York(1987), 並びに米国特許第4,237,224、4,273,875、4,431,739、4,363,877及び4,428,941号に記載されている。従って、本発明の1又は複数のペプチド配列を含んで成る融合タンパク質はHBV細胞障害性T細胞決定基を供するように利用できる。例えば、組換HBV表層抗原であって、そのHBenvアミノ酸配列が、CTL応答を刺激する本明細書に記載のペプチド領域のエピトープをより効率的に提供するように変更されているものを調製する。このことは、複数のT細胞エピトープを含むポリペプチドを利用することを意味する。

本明細書で考慮している長さのペプチドに関するコード配列は化学的技法、例えばMatteucciら、J. Am. Chem. Soc. 103:3185(1981)のホスホトリエステル法により合成できるので、天然ペプチド配列をコードするものについての適当な塩基の置換によって改質は簡単に行うことができる。従って、コード配列に適当なリンカーを施し、そして当業界において一般に入手できる発現ベクターへとリゲートせしめ、次いで所望の融合タンパク質を生成するように適当な宿主を形質転換させるためにこのベクターを利用する。数多くのかかるベクター及び適当な宿主系は現在入手できる。融合タンパク質の発現のためには、コード配列に作動連結型開始及び停止コドン、プロモーター及びターミネーター領域、並びに通常は所望の細胞宿主の中での発現のための発現ベクターを供する複製系が施されるであろう。むしろ、適当なベクター及びコントロール配列を利用して、酵母又は哺乳動物細胞宿主を利用してよい。

本発明のペプチド並びにその薬理的及びワクチンの組成物はHBV感染症を処置及び/又は予防するための哺乳動物、特にヒトへの投与にとって有用である。このペプチドはHBV感染細胞に対する細胞障害性Tリンパ球応答を刺激するように利用されるため、この組成物は急性及び/又は慢性HBV感染症を処置又は予防するのに利用できる。

薬理組成物に関しては、該ペプチド、即ち上記した本発明のCTLペプチド又はCTL/Lヘルパ

10

20

30

40

50

ーペプチドはHBVで既に感染されている個体に投与されるであろう。感染のインキュベーション段階又は急性段階にある者は、適宜、他の処置と独立して、又は一緒にこの免疫原ペプチドによって処置してよい。治療的用途においては、組成物をHBVに対する効果的なCTL応答を誘発する、且つその症状及び/又は合併症を治す又は少なくとも部分的に抑制するのに十分な量で患者に投与する。これを成し遂げるのに適切な量を「治療的に有効な量」と定義する。この使用にとって有効な量は、例えばペプチド組成、投与方法、処置すべき疾患の段階及び重症度、患者の体重及び一般的な健康状態、かかり付けの医師の判断に依存するであろうが、しかし一般的には初期免疫（即ち、治療的又は予防的投与）に関する範囲は70kgの患者に関して約1.0 $\mu$ g～約500 $\mu$ gのペプチドに範囲し、患者の血液における特異的なCTL活性の測定による患者の応答及び状態に応じて、数週間から数ヶ月にわたるブースティング療法に従う約1.0 $\mu$ g～約100 $\mu$ gのペプチドのブースティング投与がそれに続く。本発明のペプチド及び組成物は重症な疾患状態、即ち生命の脅かされている又は潜在的に生命の脅かされている状況において一般に利用されうることを念願におかなくてはならない。かかるケースにおいて、最少限の外生物質及びペプチドの比較的無毒な性質の見地において、処置する医師がかなり大量のこれらのペプチド組成物を投与することが可能であり、且つ所望されうると思われる。

該組成物の一回又は数回の投与が、処置する医師により選ばれる投与レベル及びパターンに従って実施されうる。あらゆる状況において、この薬理製剤は本発明の細胞障害性Tリンパ球刺激ペプチドは患者を有効に処置するのに十分な量で供すべきである。

治療的用途のため、投与はHBV感染症の一次徴候で始めるか、又は急性感染症の場合は診断されたすぐ後に始めるべきであり、少なくとも症状が実質的に緩和するまで、更にはその後一定期間にわたるブースティング投与を続ける。慢性感染症においては、負荷投与、それに続くブースティング投与が必要とされうる。急性肝炎の処置の際のHBVに対する効果的なCTL応答の誘発は、慢性肝炎、HBVキャリアー段階、及び続発性肝細胞癌へのその後の進行の可能性を低くするであろう。

本発明の組成物による感染個体の処置は、急性感染個体における感染症の治癒を早めることができる。慢性感染症に進行し易い（又は予測される）個体にとって、該組成物は急性から慢性感染症に至る進行を防ぐのための方法において特に有用である。例えば本明細書に記載の通り、感受性個体が感染前又は中に同定されたとき、該組成物をその者を標的とすることができ、大量の人々への投与の必要性を小さくする。

該ペプチド組成物は慢性肝炎の処置のため、及びウイルス感染細胞を排除するようにキャリアー免疫系を刺激するためにも利用できる。慢性肝炎を有する者は感染後約3～6ヶ月経て、ウイルスについての陽性を試験することにより同定できる。個体はその感染症の急性段階の際の不適切なCTL応答（又はそれが無いこと）によって慢性HBV感染症に進行しうるため、細胞障害性T細胞応答を有効に刺激するのに十分なる、製剤中での免疫可能ペプチドの量及び投与態様を施すことが重要である。従って、慢性肝炎の処置のためには、代表的な投与量は一回の投与当り、70kgの患者にとって約1.0 $\mu$ g～約500 $\mu$ g、好ましくは約5 $\mu$ g～100 $\mu$ gの範囲にある。投与は少なくとも臨床症状又は実験室指標が、HBV感染症が排除又は実質的に緩和するまで、そしてその後もしばらく続けるべきである。免疫投与、それに続く確立された間隔、例えば1～4週間の間隔でのブースティング投与が、感染症を治癒せしめるのに必要なだけ、可能としては長期にわたって必要とされる。慢性及びキャリアーHBV感染症の処置のためには、CTLペプチドを、その他のHBV抗原、例えばHBsAgに対する免疫応答を誘発するその他のペプチド又はタンパク質と組合せることも所望されうる。

本発明の別の態様において、慢性活性型肝炎は拮抗剤としての抗原性エピトープ類似体を利用して処置する。この類似体は適当なMHCクラスI抗原に結合するが、しかしCTL活性化及び増殖を阻止し、従ってHBV感染化肝細胞及びT細胞媒介型肝炎に対するダメージを下げる。このペプチド拮抗剤はCTLエピトープペプチドであって、例えばアミノ酸置換により、そのペプチドがクラスI MHC分子に有効に結合するが、そのエピトープ特異的T細胞を刺激する能力が実質的に低められているように改質されているものを含んで成る。

10

20

30

40

50

類似体拮抗剤は少なくとも1個のHLAクラスIエピトープを含むようにペプチドを改質することによって同定される。好ましい態様において、改質すべきペプチドはクラスI - 制限型CTLエピトープを含んで成るであろう。置換又はその他の特定の改質をペプチドに導入し、このペプチド類似体を次に無関係の抗原エピトープ、例えばインフルエンザペプチドの同じクラスI分子により制限されたインフルエンザ - 特異的T細胞クローンへの提供を阻止する能力についてスクリーンする。例えば本明細書に記載のHLA-A2制限型CTLペプチドを、例えば1又は数箇所の置換により改質し、次いでHLA-A2により制限されたインフルエンザ - 特異的T細胞クローンへのHLA-A2 - 制限型インフルエンザCTLマトリックスペプチド(例えば56-58)の提供を阻止する能力について試験する。拮抗類似体は、抗原提供細胞/標的細胞を、刺激用量の抗原性ペプチドに暴露せしめた後に拮抗ペプチドに暴露したとき

10

に、T細胞増殖及び/又は細胞障害活性を阻害するであろう。本発明の拮抗類似体は例えば米国特許第4,882,145号及びFerrariら、*J. Clin. Invest.*、前掲、に記載されているものを含む様々なHBVクラスIエピトープに対して同定されうる。治療的処置のための該薬理組成物は非経口、塗布、経口又は局所投与を意図している。好ましくは、該薬理組成物は非経口的に、例えば静脈内的、皮下的、経皮的又は筋肉内的に投与される。従って、本発明は、許容されている担体、好ましくは水性担体の中に溶かされている、又は懸濁されているCTL刺激性ペプチドの溶液を含んで成る非経口投与用組成物を提供する。様々な水性担体、例えば水、緩衝水、0.4%の食塩水、0.3%のグリシン、ヒアルロン酸等が利用されうる。これらの組成物は常用の公知の滅菌技術で滅菌されうるか、又は滅菌濾過されてよい。得られる水性溶液はそのまま利用されるように包装されうるか、又は凍結乾燥され、凍結乾燥調製品は投与前に滅菌溶液と組合せる。この組成物は適当な生理学的条件にするのに必要な薬理的に許容されている補助剤、例えばpH調整及び緩衝剤、等張性調節剤、湿潤剤等、例えば酢酸ナトリウム、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、モノラウリン酸ソルビタン、オレイン酸トリエタノールアミン等を含んでよい。

20

ある態様においては、この薬理組成物の中にCTLを感作せしめる少なくとも一成分を含ませることが所望されうる。脂質はインビボでウィルス抗原に対してCTLを感作せしめることの可能な試薬として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をLys残基のアルファー及びエプシロン残基に付加し、次いで例えば典型的には1又は複数の連結残基、例えばGly, Gly-Gly-, Ser, Ser-Ser等を介して、クラスI - 制限型CTLエピトープを含んで成る合成ペプチドに連結させてよい。本明細書で更に説明する通り、この脂質化ペプチドは次にアジュバント、例えば不完全フロインドアジュバントの中に乳濁しておいたりポソームの中に一体化させることができる。好ましい態様において、特に有効な免疫原は、T細胞決定基、例えば本明細書に記載のようなペプチド、及びかかる決定基を有するものとして同定されたその他のペプチドを有するクラスI制限型ペプチドのアミノ末端に、連結基、例えばSer-Serを介して付加されているLysのアルファー及びエプシロンアミノ基に付加されているパルミチン酸を含んで成る。

30

CTL応答を感作する脂質の他の例としてのE. コリ(*E. coli*)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<sub>3</sub>CSS)が、適当なペプチドと共有結合させるときに、特異的CTLを感作せしめるのに利用できる。引用することで本明細書に組入れるDeresら、*Nature* 342:561-564(1989)を参照のこと。本発明のペプチドは例えばP<sub>3</sub>CSSにカップルさせてよく、そしてHBVに対するCTL応答を特異的に感作せしめるように個体にこのリポペプチドを投与する。更に、中和抗体の誘発も、適当なエピトープ、例えばHBs Agエピトープを表示するペプチドにコンジュゲートされたP<sub>3</sub>CSSで感作されるため、HBV感染症、に対する体液性及び細胞媒介型応答を共により有効的に誘発せしめるようにこの二つの組成物を組合せてよい。CTL応答を感作する脂質の更なる例は、CTL/Tヘルパー - ペプチド - コンジュゲートを、適当なカルボン酸無水物を介して酢酸からステアリン酸に至る範囲の種々の鎖長及び不飽和度の無荷電脂肪酸残基、並びに陰荷電スクシニル残基にコンジュゲートすることによって成し遂げられる。

40

様々なその他の抗原に対するCTL応答は、CTL誘発性ペプチド/Tヘルパー誘発性ペプチド

50

コンジュゲートを脂質と組合せることによって高めることができる。このCTL誘発性ペプチドは、標的タンパク質、例えばとりわけ腎細胞癌、乳癌、癌胎児性抗原、黒色腫(MAGE-1)抗原、前立腺癌特異的抗原(PSA)、C型肝炎抗原、エプステインバーウイルス抗原、HIV-1及びHIV-2抗原、並びにパピロマウイルス抗原から選ばれうる。脂質は、Tヘルパーエピトープを供し、脂質と組合されるその他のペプチドに連結されていてよい。CTL誘発性ペプチド/Tヘルパーペプチド/脂質を含んで成るコンジュゲートの成分の配列は変えてよい。ある場合、脂質成分をCTL誘発性ペプチドのアミノ末端に連結させ、次にそのカルボキシ末端においてTヘルパーペプチドに連結させてよい。別の場合、脂質をTヘルパーペプチドのアミノ末端に連結させ、このTヘルパーペプチドをそのカルボキシ末端においてCTL誘発性ペプチドに連結させてよい。どちらのケースでも、脂質成分とCTL又はTヘルパーペプチドとの間に、及びTヘルパーとCTL誘発性ペプチドとの間にスペーサー分子を選択的に挿入してよい。脂質とTヘルパー又はCTL誘発性ペプチドとの間のスペーサーの場合、好ましい例はLys-Ser-Serを含んで成るが、他のスペーサーも本明細書に記載してある。TヘルパーとCTL誘発性ペプチドとの間のスペーサーの例はAla-Ala-Alaであり、本明細書に更に詳しく述べてある。CTL誘発性ペプチドはHBcもしくはHBs領域、又は前記した他のCTL誘発性抗原に由来しうる。

10

薬理製剤中の本発明のCTL刺激ペプチドの濃度は広範囲、即ち約1重量%以下、通常は少なくとも約10重量%から、20~50重量%以上にわたることができ、そしてそれは主として流体容量、粘度に応じて、選ばれた投与の特定の態様に従って選択されるであろう。

静脈内点滴のための典型的な薬理組成物は250mlまでの滅菌リンガー溶液及び100mgのペプチドを含むように作られていることができる。非経口投与用化合物を調製するための実際の方法は当業者に公知又は明らかであり、そして例えば引用することで本明細書に組入れる Remington's Pharmaceutical Science, 第17版、Mack Publishing Company, Easton, PA(1985)により詳しく説明してある。

20

本発明のペプチドはリポソームを介して投与してもよく、これは該ペプチドを特定の組織、例えばリンパ系組織を標的とするように働かさせるか、又はHBV感染化肝細胞を特異的に標的化させ、更には該ペプチド組成物の半減期を長期化する。リポソームには、エマルション、フォーム、ミセル、不溶性単層、液晶、リン脂質分散体、層板の層、等が含まれる、このような調製物の中に、導入すべきペプチドはリポソームの一部として、単独で、あるいは例えばリンパ系細胞にわたって広がっているレセプターに結合する分子、例えばCD45抗原に結合する抗体と一緒に、又はその他の治療用もしくは免疫原組成物と一緒に含まれている。これによって、本発明の所望のペプチドの詰まっているリポソームはリンパ系細胞の部位に導かれることができ、そこでこのリポソームは特定の治療用/免疫原ペプチド組成物を導入せしめる。本発明において利用するためのリポソームは標準の小胞形成用脂質から作られ、これらには一般に中性及び陰性荷電リン脂質、並びにステロール、例えばコレステロールが含まれる。脂質の選別は一般に、例えばリポソームのサイズ及び血流中でのリポソームの安定性を考慮して決められる。リポソームを調製するための様々な方法が有用であり、例えば引用することで本明細書に組入れる Szokaら、Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467(1980)、米国特許第4,235,871、4,501,728、4,837,028及び5,019,369号に記載されている。免疫細胞を標的とするためのリポソームの中に含ませるべきリガンドには例えば所望の免疫系細胞の細胞表層決定基に特異的な抗体又はそのフラグメントが含まれる。ペプチドを含んでいるリポソーム懸濁物は、静脈内的に、局所的に、塗布的に、等により、とりわけ投与方法、導入すべきペプチド、及び処置すべき疾患の段階に従って変わる投与量において投与できる。

30

40

固体組成物に関しては、常用の無毒固形担体を利用することができ、これには例えば薬理学グレードのマンニトール、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、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム等が含まれる。経口投与のためには、薬理的に許容されている無毒な組成物を、任意の通常利用されている賦形剤、例えば前述した担体と、一般に10~95%、そしてより好ましくは25%~75%の濃度の活性成分、即ち本発明の1又は複数種のペプチドとを一体化させる

50

ことによって形成する。

エアゾール投与のためには、該CTL刺激性ペプチドを界面活性剤及び噴射剤に、細く分割した状態で供給することが好ましい。ペプチドの典型的なパーセンテージは0.01~20重量%、好ましくは1~10重量%とする。この界面活性剤は当然無毒でなくてはならず、そしてこの噴射剤中で可溶性であることが好ましい。かかる試薬の代表例は6~22個の炭素原子を含む脂肪酸のエステル又は部分エステル、例えば脂肪族多価アルコール又はその環状無水物を有するカブロン酸、オクタノン酸、ラウリル酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレン酸、オレステリン酸及びオレイン酸である。複合エステル、例えば複合させた、又は天然のグリセリドも利用できうる。この界面活性剤は該組成物の0.1~20重量%、好ましくは0.25~5重量%を占める。該組成物の残りは通常噴射剤とする。必要ならば担体も、例えば経鼻導入のためのレシチンと一緒に含ませてよい。

別の観点において、本発明はワクチンに向けられ、これは免疫学的に有効な量の本明細書に記載のCTL刺激性ペプチドを活性成分として含んでいる。このペプチドはその担体に結合した状態で、又は活性ペプチド単位ホモポリマーもしくはヘテロポリマーとしてヒトを含む宿主に導入してよい。かかるポリマーは強い免疫反応の長所を有し、そしてポリマーを作るために異なるペプチドを利用したとき、HBVの様々な抗原決定部位と反応する抗体及び/又は細胞障害T細胞を誘発せしめる追加の能力を有する。有用な担体は当業界に公知であり、そして例えばサイログロブリン、アルブミン、例えばヒト血清アルブミン、破傷風トキソイド、ポリアミノ、例えばポリ(D-リジン: D-グルタミン酸)、インフレンザ、B型肝炎ウィルスコアタンパク質、B型肝炎ウィルス組換ワクチン等が含まれる。このワクチンは生理学的に寛容(許容)されている希釈剤、例えば水、リン酸緩衝食塩水、又は食塩水をも含んでよく、そして更に典型的にはアジュバントを含む。アジュバント、例えば不完全フロインドアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム又はみょうばんが当業界に公知な材料である。更に、前述した通り、CTL応答は本発明のペプチドを脂質、例えばP<sub>3</sub>CSSにコンジュゲートせしめることによって感作されうる。本明細書に記載のペプチド組成物による注射、エアゾール、経口、経皮又はその他のルートを紹介する免疫化により、宿主の免疫系はHBV表層及び/又はヌクレオカスピド抗原に特異的な大量のCTLを生成せしめることによってこのワクチンに反応し、そしてこの宿主はHBV感染症に対して少なくともある程度免疫化されるか、又は慢性HBV感染症の進行に対して耐性となる。

本発明のペプチドを含むワクチン組成物は、HBV感染症の感受性であるか又はそうでなければその危険性にある患者に、その患者自身の免疫応答能力を高めるように投与する。その量は「免疫学的に有効な投与量」と定義する。この利用において、その正確な量も、患者の健康状態及び体重、投与方法、製剤の種類、等に依存し、しかしながら一般には70kgの患者当たり1.0µg~約500µg、より一般的には70kgの体重当たり約50µg~約100µgに範囲する。該ペプチドは適宜のHLA型の個体に投与され、例えばペプチドHBenv<sub>309-328</sub>、HBenv<sub>349-368</sub>及びHBC<sub>91-110</sub>のワクチン組成物については、HLA-A2個体に投与されるであろう。

ある状況において、本発明のペプチドワクチンを、HBV、特にHBVエンベロープ抗原、例えば組換HBV env-コード化抗原に反応する中和抗体を誘発するワクチンと、又はHBV-感染化個体より獲得した精製血漿調製品から調製したワクチンと組合せることが所望されうる。様々なHBVワクチン調製品が述べられており、そしてそれらはHBs Ag及びそのポリペプチドフラグメントを主として基礎とする。本発明のペプチドと一緒に配合できるワクチンの例については、それぞれ引用することで本明細書に組入れるヨーロッパ特許公開EP 154,902及びEP 291,586、並びに米国特許第4,565,697、4,624,918、4,599,230、4,599,231、4,803,164、4,882,145、4,977,092、5,017,558及び5,019,386号を参照のこと。これらのワクチンは組合せて一緒に投与するか、又は別の調製品として投与してよい。

治療的又は免疫的目的のため、本発明のペプチドは弱毒化ウィルス宿主、例えば痘疹又は鶏痘によって発現されることもできる。このアプローチは痘疹ウィルスを、本発明のペプチド又はコンジュゲートをコードするヌクレオチド配列を発現せしめるベクターとして利

10

20

30

40

50

用することを包括する。急性又は慢性HBV感染宿主への、又は非感染宿主への導入により、この組換え痘疹ウイルスはHBs及び/又はHBcペプチドを発現し、そしてこれによりHBVに対する宿主CTL応答が誘発される。免疫プロトコールにおいて有用な痘疹ベクター及び方法は例えば引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,722,848号に記載されている。他のベクターはBCG(カルメットゲラン桿菌)である。BCGベクターは引用することで本明細書に組入れるStoverら(Nature 351:456-460(1991))に記載されている。本発明のペプチドの治療用投与又は免疫化にとって広範囲にわたる様々な他のベクター、例えばサルモネラチフイ(Salmonella typhi)ベクター等が有用であることが、本明細書により当業者にとって明らかとなるであろう。

該ペプチドは診断試薬としての有用性も見い出された。例えば、本発明のペプチドは該ペプチド又は関連のペプチドを利用する処置療法に対する特定の個体の感受性を決定するために利用でき、従って現存の処置プロトコールを改良するうえで、又は冒された個体にとっての予後を決定するうえで役立つ。更に、該ペプチドは慢性HBV感染に進行する実質的な危険性にある個体を予測するのにも利用できる。

下記の実施例は例示のために提供し、限定するものではない。

#### 実施例 I

##### CTL-特異的HBVエピトープの同定

マウス-ヒト キメラクラス I 分子を発現する遺伝子導入マウス系列を、HBVコア、及びCTL特異的エピトープを表わす表層抗原配列を決定するために用いた。

Scripps Clinic and Research Foundationより獲得した遺伝子導入マウス系列66は、ヒト HLA-A2.1抗原の 1 及び 2 ドメインと、H-2K<sup>b</sup>の 3 トランスメンブラン及び細胞質ドメインとより成るキメラクラス I 分子を発現する。遺伝子導入マウスは、引用することで本明細書に組入れるVitielloら、J. Exp. Med. 173:1007-1015(1991)に一般に記載の通りに調製した。これらのマウスをインビボでインフルエンザウイルスで感作せしめたとき、それらはヒトインフルエンザ-特異的CTLにより認識されるものと事実上同じエピトープに特異的なCTL応答を発生せしめた。従って、これらの遺伝子導入マウスはヒトT細胞により認識されるHBVエピトープを決定するのに利用することができた。

HBV表層及びコアタンパク質のうちのどの配列領域がCTLエピトープを示しているかを決定するため、これらの2つのタンパク質に由来する合成ペプチドを作り、そしてヒトHLA-A2.1に結合するその能力について試験した。結合は、インフルエンザマトリックスペプチド57-68の存在下でのCTL系列219によるA2.1標的細胞の認識を阻害する様々なペプチド濃度の相対能力により決定し、それは細胞からのセリンエステラーゼの放出の阻害によって決定した。この219系列はA2.1遺伝子マウスに由来し、そしてHLA-A2.1内のマトリックスペプチド57-68に特異的である。

簡単に述べると、CTLエピトープについてアッセイするペプチドをDMSOの中に20mg/mlの濃度で溶かす。アッセイの直前に、ペプチドを25µMのHepesで緩衝され、そして0.05%のBSAを含むRPMI 1640(アッセイ培地)の中に希釈する。200µg/ml, 66µg/ml又は22µg/mlのペプチド溶液50µlを、50µlの容量アッセイ培地中に4×10<sup>5</sup>のジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>細胞を含んでいる96穴丸底プレートのウェルに加える。このプレートを37°Cで30min.インキュベートする。次に指標ペプチド(PR8インフルエンザウイルス由来のマトリックスペプチド57-68)の2.5µg/mlの溶液50µlをこの細胞に加え、続いて5×10<sup>4</sup>の系列219 CTLを含むもの50µlを加え、ここで利用した指標ペプチドの濃度は、このペプチドの力価により決定される、CTL 219からの75%のセリンエステラーゼの放出を誘発するような濃度とする。37°Cで4時間のインキュベーションの後、プレートを1000 RPMで5分遠心し、そして20µlの上清液を平底96穴プレートに移した。上清液中のエステラーゼ活性を、0.2MのトリスHCl pH8.1, 2.0×10<sup>-4</sup>のN-ベンジルオキシカルボニル-L-リジンチオベンジルエステル(BLT)及び2.2×10<sup>-4</sup>Mのジチオビス(ニトロ安息香酸)より成る反応混合物180µlを加えて測定する。プレートを37°Cで1時間インキュベートし、そして412nmの吸光値を測定する。パーセント阻害は下記の式より計算する：

10

20

30

40

$$\% \text{阻害} = 100 \times \frac{A_{412} (\text{試験} + \text{指標}) \text{ペプチド} - A_{412} \text{試験ペプチドのみ}}{A_{412} \text{指標ペプチド} - A_{412} \text{ペプチドなし}} \times 100$$

A2.1に結合し、且つ細胞による24%より多くのセリンエステラーゼ放出を起こさせるペプチドを、インビトロで、HBV感作A2.1遺伝子導入マウスに由来する脾細胞からのCTL応答を再刺激せしめる能力についてアッセイ化した。(Sette, A. ら、*J. Immunol.* 147:3893(1991))。HBV感作は、CarboneとBevan, *J. Exp. Med.* 171:377-387(1990)に記載の通りにHBVウイルスの「負荷」されているA2.1脾臓細胞を注射することによって実施した。

簡潔すると、赤血球除去脾細胞を、200 $\mu$ lのHBV精製ウイルス及び200 $\mu$ lの2Xの高張溶液(0.5Mのスクロース、10% w/vのポリエチレングリコール1000, 10mMのHepes, pH7.2, RPMI 1640培地中)より成る溶液0.4mlの中に、37 $^{\circ}$ Cで10分懸濁した。この細胞懸濁物を次に予め温めておいた高張培地(60%のHBSS及び40%の水)の中にす早く希釈し、37 $^{\circ}$ Cで2分インキュベートし、ペレット化し、HBSSで2回洗い、そして照射せしめた(1,000rad)。次にマウスに200 $\mu$ lの容量中の5.0 $\times$ 10 $^6$ の負荷細胞を注射した。10日後、マウスHBV-負荷脾臓細胞でブーストに付した。

約2週間後、感作マウス由来の脾臓細胞(24穴プレートにおいて5 $\times$ 10 $^6$ 細胞/ウェル)を13種の異なるペプチドで個別にコートされている同系照射化(3000rad)LPS芽細胞(2 $\times$ 10 $^6$ 細胞/ウェル)の4種の異なる混合物と一緒に培養した。コーティングは、チューブの中の25 $\times$ 10 $^6$ のLPS芽細胞のアリコート、1ml中の13種のHBP合成ペプチドのうちのいづれか100 $\mu$ gと共に、37 $^{\circ}$ Cで1~2hrインキュベートとすることによって行った。次にそれぞれのチューブの中身をプールして4種の混合物を得た。

混合物No.	ペプチドNo.	ペプチドの位置
1	800.04	HBenv47-63
	802.01	HBc11-27
	802.06	HBc162-176
2	801.02	HBenv141-157
	799.02	HBenv194-213
	802.03	HBc91-110
3	799.09	HBenv329-348
	799.10	HBenv349-368
	802.04	HBc111-125
4	799.04	HBenv234-253
	799.05	HBenv246-265
	799.08	HBenv309-328
	800.05	HBenv63-77

細胞の混合物を一回洗い、所望の濃度に希釈し、そしてプレートに付した。培養のために用いた培養は、10%のFCS、50 $\mu$ g/mlのゲンタマイシン、2mMのグルタミン及び5 $\times$ 10 $^{-5}$ Mの2-メルカプトエタノールの添加したRPMI 1640(R10)である。9日後、エフェクター細胞を、培養物中において用いたものに対応する種々のペプチド混合物の存在下において、ジャーカットA $_2$ /K $^b$ 標的細胞に対する細胞障害性についてアッセイした。得られた結果を図1、パネルA~Dに示した。これらの培養物から得たエフェクター細胞(0.2 $\times$ 10 $^6$

細胞/ウェル)を、照射に付した(20,000rad)ペプチドコート化ジャーカットA<sub>2</sub>/K<sup>b</sup>細胞(0.2×10<sup>6</sup>細胞/ウェル)によって、5%のラットConA上清液の添加されたR10中で、3×10<sup>6</sup>フィーダー細胞/ウェル(C57 BL/6照射化脾臓細胞)の存在下で再刺激せしめた。6日後、これらのエフェクター細胞を13種の個々のペプチドの存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA<sub>2</sub>/K<sup>b</sup>標的細胞に対する細胞障害性についてアッセイした。バックグランドより高いジャーカットA<sub>2</sub>/K<sup>b</sup>標的細胞のCTL溶解を誘発せしめたペプチド(図1のE~H)、即ち、HBenv 47-63、HBc 11-27(パネルE)、HBenv 141-157、HBenv 194-213、HBc 91-110(パネルF)、HBenv 329-348及び349-368(パネルG)、並びにHBenv 309-328(パネルH)をそれぞれ、ペプチド混合物により発生するエフェクター細胞を再刺激するために用いた。培養物中で6日後、これらのエフェクター細胞を再刺激のために用いたペプチドの存在下で、<sup>51</sup>CrジャーカットA<sub>2</sub>/K<sup>b</sup>細胞に対する細胞障害性について試験した(図1)。本実施例で概略した一連の実験は、HBVペプチドHBc 11-27(図1パネルA, E; 図2パネルJ) HBc 91-110(図1パネルB, F; 図2パネルM)、HBenv 329-348(図1パネルC, G; 図2パネルN) HBenv 349-368(図1パネルC, G; 図2パネルO)及びHBenv 309-328(図1パネルD, H; 図2パネルP)がはっきりとCTLエピトープを提供していることを我々に決定させた。

10

#### 実施例II

#### 不完全フロインドアジュバント(IFA)中の精製HBVによる皮下感作によるA2.1-制限型CTLの誘発

皮下的なIFA中のオバルミン(OVA)の注射は、マウスにおけるオバルミン-特異的CTL応答を誘発し、一方、i. v. 又はi. p. のいずれかによるOVAの注射はCTLの発生を一般的にもたらさない。この技術を、A2.1遺伝子導入マウス中でのHBV特異的CTLの誘発に利用した。感作及びインビトロ再刺激: A2.1/K<sup>b</sup>遺伝子導入マウスに、不完全フロインドアジュバント(IFA)中の精製HBVウイルスのエマルジョン100µlを注射した。このエマルジョンはHBS Sの中で1:5に希釈した精製HBV(1mgのタンパク質/ml)を、等容量のIFAと混合することによって調製した。感作の7日後、これらの動物から獲得した脾細胞(24穴プレート中、5×10<sup>6</sup>細胞/ウェル)を下記のペプチドそれぞれでコートされた同系照射化LPS芽細胞(2×10<sup>6</sup>/ウェル)で再刺激した:

20

799.09	HBenv 329-348	802.03	HBc 91-110
875.20	HBenv 335-343	883.02	HBc 92-101
875.21	HBenv 338-347	883.03	HBc 93-102
799.10	HBenv 349-368	875.15	HBc 18-27
884.01	HBenv 348-357	875.18	HBc 107-115
884.02	HBenv 349-358	875.19	HBc 139-148

30

これらのペプチドを選んだ理由は: 1) それらが実施例IにおけるCTLエピトープを含むと決定されたから(ペプチド799.10、799.09、802.03); 2) それらが大きめのエピトープにより認識される実施例Iにおいて決定したペプチドの短縮体を代表するから(即ち、ペプチド875.15、844.02、883.02、883.03); 又は3) それらがFalkら(Nature 351:290-296(1991))に記載のA2.1結合性モチーフ、即ち、位置2におけるロイシンもしくはメチオニン、及び位置9におけるロイシンもしくはバリン、又は位置10におけるバリンのいずれかを含むから(即ち、ペプチド884.01、875.20、875.21及び875.19); である。コーティングは各ペプチド50µgを、12×10<sup>6</sup>のLPS芽細胞と、10%のFCSの添加された容量の0.4mlのRPMI培地の中で37℃で1hインキュベートすることにより行った。これらの細胞を一回洗った。6日後、エフェクター細胞を適宜のペプチドの存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>細胞に対する細胞障害毒性についてアッセイした。その結果を図3に示す。

40

これらのエフェクター細胞(0.2×10<sup>6</sup>細胞/ウェル)を週の間隔で再刺激した。最初の再刺激に関しては、ペプチドコート化LPS芽細胞を使用し、続いてペプチドコート化ジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>細胞を使用した。再刺激の6日後、エフェクター細胞を適宜のペプチドの存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>標的細胞に対する細胞障害性についてアッセイした。得られた結果を図4に示す。

50

HBV感作マウスの脾細胞からインビトロCTLを明らかに誘発可能なペプチドは図3及び4、パネルA：HBc 18-27；図3及び4、パネルB：HBenv 349-368；図3及び4、パネルD：HBenv 349-358；図3及び4、パネルF：HBenv 329-348；図3及び4、パネルI：HBc 91-110；図3及び4、パネルJ：HBc 92-102；並びに図3及び4、パネルK：HBc 93-102である。大きめのペプチドに対して発生せしめたCTLにより認識され、そしてCTLエピトープの少なくとも一部を含むであろう短縮ペプチドは：図3F，4F：HBenv 335-343及びHBenv 338-347である。

#### 実施例III

##### ペプチドの合成

ペプチドをApplied Biosystems(Foster City, CA)の430Aペプチド合成装置で、Fmoc保護化アミノ酸、及びアミノ酸の活性化のための2-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)エステルを用いて合成した。各アミノ酸を通常通りに三重カップル化させた。Fmoc保護化アミノ酸及びヒドロキシベンゾトリアゾールはBurdick and Johnsonより購入した。HBTUはRiche lieu Biotechnologies(St-Hyacinthe, Canada)より購入した。ピペリジン及びトリフルオロ酢酸、無水酢酸、及びエタンジオールはSigma Chemical Corporationより購入した。

a. ペプチドPhe-Leu-Pro-Ser-Asp-Phe-Phe-Pro-Ser-Val-OH [Seq. ID No. 23]

Sasrin(商標)樹脂(Bachem Biosciences)にカップルさせたL-バリンをペプチド合成反応槽に入れ、そしてN-メチルピロリドン(NMP)で一回洗った。次に下記の操作を順に行った：

1. Fmoc保護基をNMP中の25%のピペリジンによる樹脂結合アミノ酸の処理によって除去した。
2. この樹脂をNMPで5回洗った。
3. Fmoc-セリン、ジイソプロピルエチルアミン、HBTU及びNMPを含む混合物を反応槽に加え、そしてボルテックス攪拌のもとで30分間反応させた。
4. 溶媒を排出させ、そして樹脂をNMPで3回洗った。
5. 段階(3)と(4)を更に2回繰り返した。
6. この樹脂をNMPで更に4回洗った。

段階1-6をペプチドの各アミノ酸に関して繰り返した。

最後のカップリングサイクルに続き、樹脂結合ペプチドをNMP中の25%のピペリジンとの反応により脱保護し、NMPで7回洗い、次いでジクロロメタンで2回洗った。

この樹脂を真空中で24時間乾かした。このペプチドをSasrin(商標)樹脂から、2.5%のエタンジオール及び5%の水を含むトリフルオロ酢酸による処理によって切断した。このポリスチレン樹脂を濾過によってこのトリフルオロ酢酸溶液から除去した。トリフルオロ酢酸は真空エバポレーションにより除去した。粗ペプチドをジエチルエーテルで粉碎し、そして水に溶かした。この水を凍結乾燥により除去した。次にこのペプチドをC<sub>8</sub>カラム(VYDAC)での逆相HPLCにより、それぞれ0.1%のTFAを改質剤として含むアセトニトリルと水の勾配を利用して精製した。

b. ペプチド(Pal)<sub>2</sub>-Lys-Ser-Ser-Phe-Leu-Pro-Ser-Asp-Phe-Phe-Pro-Ser-Val-OH [Seq. ID No. 24]

段落aに記載の樹脂結合ペプチドを、上記の手順に従って2個のセリン残基の付加により伸長せしめた。次に下記の操作を作った：

1. Fmoc保護基をNMP中の25%のピペリジンによる樹脂結合アミノ酸の処理によって除去した。
2. この樹脂をNMPで5回洗った。
3. ビス-Fmoc-リジンにNMP中のジイソプロピルカルボジイミドによる処理によって対応の対称性無水物に変換させた。この樹脂結合ペプチドを、得られる無水物と反応させた。
4. この樹脂をNMPで5回洗った。
5. Fmoc保護基をNMP中の25%のピペリジンによる樹脂結合アミノ酸の処理によって除去

10

20

30

40

50

した。

6. パルミチン酸をNMP中のヒドロキシベンゾトリアゾール及びジイソプロピルカルボジイミドと反応させた。

7. この樹脂をNMPで5回洗った。

最後に、このペプチドを上記の通りに樹脂から切断せしめた。

c. ペプチドGln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Phe-Leu-Pro-Ser-Asp-Phe-Phe-Pro-Ser-Val-OH [Seq. ID No. 25]。

段落 a に記載の樹脂結合化ペプチドは、段落 a に記載の手順に従う、Glu, Thr, Ile, Gly, Ile, Phe, Lys, Ser, Asn, Ala, Lys, Ile, Tyr及びGln残基の付加により伸長させた鎖である。切断及び精製は上記の通りに実施した。

10

d. ペプチドGln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Ala-Ala-Ala-Phe-Leu-Pro-Ser-Asp-Phe-Phe-Pro-Ser-Val-OH [Seq. ID No. 26]。

段落 a に記載の樹脂結合化ペプチドは、段落 a に記載の手順に従う、Ala, Ala, Glu, Thr, Ile, Gly, Ile, Phe, Lys, Ser, Asn, Ala, Lys, Ile, Tyr及びGln残基の付加により伸長させた鎖である。切断及び精製は上記の通りに実施した。

e. ペプチドAc-Gln-Tyr-Ile-Lys-Ala-Asn-Ser-Lys-Phe-Ile-Gly-Ile-Thr-Glu-Ala-Ala-Ala-Phe-Leu-Pro-Ser-Asp-Phe-Phe-Pro-Ser-Val-OH [Seq. ID No. 27]。

段落 d に記載の樹脂結合ペプチドを、NMP中の無水酢酸との反応によりアセチル化させた。切断及び精製は上記の通りに実施した。

実施例 IV

20

CTLとTヘルパーエпитープとの組合せによるCTL誘発

本実施例は、HBV CTLエピトープのみ、Tヘルパーエピトープを含むペプチドと複合したCTLエピトープ、又はTヘルパーエピトープに物理的に連結されているCTLエピトープを発現するペプチドの相対的なインビボHBV特異的CTL感作効率を決定する実験を記す。

遺伝子導入マウス(HLA-A2.1/K<sup>b</sup>)を完全フロインドアジュバント(CFA)中のペプチド875.23 (Ia<sup>b</sup>-制限型ヘルパーエピトープHBc 128-140 TPPAYRRPNAPIL) 100 µgで皮下的に(尾の根元)感作せしめた。9日後、下記のペプチドそれぞれを不完全フロインドアジュバント(IFA)中で100 µg / マウスで、2匹の未感作及び2匹のヘルパー感作マウスに皮下注射した。

<u>ペプチド</u>	<u>Tヘルパー (HBc 128-140)</u>	<u>CTL (HBc 18-27)</u>
1. 875.23	TPPAYRPPNAPIL	
2. 875.15		FLPSDFPPSV
3. 875.23 + 875.15	TPPAYRPPNAPIL	+ FLPSDFPPSV
4. 902.01 =	TPPAYRPPNAPILFLPSDFPPSV-NH <sub>2</sub>	
5. 902.02	TPPAYRPPNAPILAAARFLPSDFPPSV-NH <sub>2</sub>	

30

#### 6. ペプチドなし

40

CTLエピトープで感作して3週間後、脾細胞をHBc 18-27でコートしたLPS芽細胞(コーティングは、30 × 10<sup>6</sup>のLPS芽細胞を、1 mlの培地中のHBc 18-27 100 µgとインキュベートすることにより行い、37 °Cで1 ~ 2 hr後、その細胞を洗浄した)でインビトロ再刺激した。6日後、エフェクター細胞をHBc 18-27の存在下又は非存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2/K<sup>b</sup>標的細胞に対する溶解活性についてアッセイした。

結果が示すには、TヘルパーとCTLエピトープペプチドとを単純に混合し(即ち、連結させていない)、そして免疫用量で投与した場合に試験した動物の50%において、バックグラウンド殺傷のレベルより若干高い検出可能な抗原-特異的CTL活性の誘発が認められた。検出された応答の例を図7に示す。驚くべきことに、動物をCTLエピトープに連結してあるTヘルパーエピトープで感作すると、100%が特異的感作の証拠を示し(図8)、その

50

度合いは未連結で投与したエピトープの場合に検出されたもの(図7)より高かった。かなり驚くべきことに、図9に示す通り、アラニン-アラニン-アラニンSpacerを介するTヘルパーとCTLエピトープとの連結(即ち、TヘルパーAAA-CTL)は、TヘルパーとCTL決定基をそれのみで連結させたことにより検出されるものより高い特異的なCTL活性の誘発をもたらした。Tヘルパーペプチド又はCTLペプチド単独での感作はHBc特異的なCTLを誘発しなかった(図5及び6)。また、Tヘルパー特異的な免疫性の誘発のための動物の事前免疫は、TヘルパーとCTLとの混合物、又はTヘルパーCTLコンジュゲートのいずれかを利用するCTLについての感作のために必須でないと認められ、なぜなら無垢の動物を適宜のコンジュゲートで感作せしめたときに免疫が検出させたからである(図10A及びB)。

10

実施例V  
HBenv<sub>360-368</sub>に特異的なA2.1制限型CTLの誘発

A2/K<sup>b</sup> 遺伝子導入マウスに、不完全フロインドアジュバント(IFA)中の100µgのHBenv<sub>360-368</sub>及び100µgのHBc<sub>128-140</sub>ヘルパーエピトープのエマルジョン100µlを注射した。(このエマルジョンは、PBS中の両ペプチド500µgを等容量のIFAと混合することによって調製した)。感作の21日後、これらの動物から獲得した脾細胞(24穴プレート中、5×10<sup>6</sup>細胞/ウェル)を、ペプチドHBenv<sub>360-368</sub>でコートした同系LPS芽細胞(2×10<sup>6</sup>/ウェル)で再刺激した。これらのエフェクター細胞(0.2×10<sup>6</sup>/ウェル)を週の間隔で再刺激した。第1及び第2回目の再刺激に関しては、HBenv<sub>360-368</sub>コート化LPS芽細胞を利用し、続いてHBenv<sub>360-368</sub>コート化ジャーカットA2.1/K<sup>b</sup>細胞を利用した。再刺激の6日後、エフェクター細胞をHBenv<sub>360-368</sub>の存在下又は非存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2/K<sup>b</sup>標的細胞に対する細胞障害性についてアッセイした(図11参照のこと)。

20

実施例VI

インビボ感作に関する連結された破傷風トキソイドとHBc細胞障害性T細胞エピトープの試験

遺伝子導入マウス(HLA-A2.1/K<sup>b</sup>)を200mg(0.07mM)のペプチド934.02によって皮下的に(尾の根元)感作した。

ペプチド	破傷風トキソイド830-843 Tヘルパーエピトープ	リンカー	HBVコア18-27 CTL エピトープ
------	-------------------------------	------	-------------------------

934.02	AC-QYIKANSKFIGITE	AAA	FLPSDFFPSV
--------	-------------------	-----	------------

30

感作して3週間後、脾細胞をHBc 18-27でコートしたLPS芽細胞でインビトロ再刺激した(実施例Iに記載の通り)。7日後、細胞をHBc 18-27でコートしたジャーカットA2/Kb細胞で再刺激した(実施例Iに記載の通り) - 6日後、これらのエフェクター細胞をHBc 18-27の存在下又は非存在下で<sup>51</sup>Crラベル化ジャーカットA2/K<sup>b</sup>標的細胞に対する、HBc 18-27の存在下又は非存在下でのJy標的細胞に対する、及びHBVコアでトランスフェクトされたJy細胞に対する細胞障害性についてアッセイした。図12に示す結果は、ペプチド934.02がHBc 18-27に特異的なCTLを効果的に誘発することを示唆している。更に、これらのCTLは内因的に提供される抗原(Jyコア)を認識及び殺傷する。

実施例VII

ペプチド免疫により誘発されるCTL免疫性の比較

40

抗原性CTLペプチドの様々な改質体及び配合体を、その免疫原性を強める効果において試験した。BALB/cマウスを尾の根元において下記のペプチド又はペプチド混合物のいずれかを皮下的に感作した。

番 号	ペプチド	投与量 μM / マウス	配 合	
932.01	CTL (Flu NP 147-155) TYQRTRALV	0.1, 0.01	食塩水、 みょうばん、IFA	
932.07	(PAM) <sub>2</sub> KSS-CTL (PAM) <sub>2</sub> KSSTYQRTRALV	0.1, 0.01	食塩水、 みょうばん、IFA	
932.01 +577.01	CTL + Tヘルパー (OVA 323-336) TYQRTRALV- ISQAVHAAHAEINE	0.1, 0.01 ea.	食塩水、 みょうばん、IFA	10
932.07 +577.01	(PAM) <sub>2</sub> KSS-CTL + IFA Tヘルパー (PAM) <sub>2</sub> KSSTYQRTRALV- ISQAVHAAHAEINE	0.1, 0.01	食塩水、 みょうばん	
932.02	Tヘルパー-CTL ISQAVHAAHAEINE- TYQRTRALV	0.1, 0.01	食塩水、 みょうばん、IFA	
932.04	(PAM) <sub>2</sub> KSS- Tヘルパー-CTL (PAM) <sub>2</sub> KSSISQAVHAAHAEINE- TYQRTRALV	0.1, 0.01	食塩水、 みょうばん、IFA	20
932.03	Tヘルパー-AAA-CTL ISQAVHAAHAEINE-AAA- TYQRTRALV	0.1, 0.01	食塩水、 みょうばん、IFA	
932.05	(PAM) <sub>2</sub> KSS- Tヘルパー -AAA-CTL (PAM) <sub>2</sub> KSS-ISQAVHAAHAEINE- AAA-TYQRTRALV	0.1, 0.01	食塩水、 みょうばん、IFA	

免疫の3週間後、脾細胞を取出し、そしてflu 147-155ペプチドでインビトロ刺激した。1週間後、標的として<sup>51</sup>Cr-ラベル化B10.D2繊維芽細胞を利用してCTL活性をアッセイした。標的細胞を抗原の非存在下で、Flu 147-155ペプチドの存在下で、又はインフルエンザP88ウィルスの感染の後に試験した。4回の個別に実施した実験のうちの1つより獲得した代表的な結果を表Iにまとめている。

30

表 I

PR8-NP 148-155の様々な改質体及び配合体のCTL 免疫原性						
ペプチド	配 合					
	食塩水		みょうばん		I F A	
	0.01 <sup>a</sup>	0.1	0.01	0.1	0.01	0.1
932.01	-b	-	-	-	+	+++
932.07	++	+	-	-	-	-
932.01 + 577.01	-	++	-	-	+++	++
932.07 + 577.01	+	-	-	-	-	±
932.02	-	-	-	+++	+++	+++
932.04	+++	+++	+++	+++	+++	+++
932.03	-	-	-	±	+++	++
932.05	+++	+++	+++	+++	+++	+++

a = 投与量 ( $\mu\text{m}$  / マウス)

b = NP 148-155 (PR8 インフルエンザウィルスの核タンパク質) の様々な改質体及び配合体のCTL 免疫原性。各記号は単一のBalb/c マウス由来の脾臓細胞より得た結果を代表し、そしてND 148-155ペプチドの存在下での<sup>51</sup>Crラベル化B10 D2標的細胞の40%抗原特異的溶解を誘発せしめるのに必要なエフェクター、対、標的の比 (E : T) を反映する ; +++ E : T, 10 : 1 以下 ; ++ E + T, 10 + 1 と 30 : 1 の間 ; + E : T, 30 : 1 以上 ; - 試験したどの E : T でも未達成。

構築体 (PAM<sub>2</sub>KSS-TヘルパーCTLと(PAM)<sub>2</sub>KSS-TヘルパーAAA-CTL) は他の組合せ全てに比して、食塩水又はみょうばんの中で注射したときに優れていた。ペプチドTヘルパーCTLとTヘルパーAAA-CTLは、Tヘルパー+CTLの混合 (即ち未連結) に対して優れ、そしてIFA中でよく働いたが、食塩水又はみょうばんの中ではよく働かなかった。従って、ワクチンの開発のためには、(PAM)<sub>2</sub>KSSを、CTLペプチドに連結してあるTヘルパーペプチドに連結するのがCTL免疫性を誘発するのに有利であることが明らかである。

#### 実施例VIII

##### CTLペプチドエピトープ799.09による最小の最適配列の決定

遺伝子導入マウス (A2-1/K<sup>b</sup>) を実施例IIに実質的に記載してある通りにIFA中のHBVウィルスで感作せしめた。感作の7日後、これらの動物から獲得した脾細胞をペプチド799.09でコートされた同系照射LPS芽細胞で再刺激した (実施例Iに記載の通り)。6サイクルの799.09コート化細胞による再刺激の後 (実施例IIに記載の通り)、エフェクター細胞をペプチド799.09でコートされた同系照射LPS芽細胞と10%のラットCon A上清液の添加された培地とを利用して限界希釈によってクローンした。2つのCTL系、系110及び系113が得られ、それらはペプチド799.09でコートされたJA2Kb標的細胞を殺した。これらの系は、799.09N末端短縮ペプチド、並びに799.09配列全体をカバーする重複の量体及び10量体のパネルで試験した。図13のパネルAに示す通り、系113及び110により認識される最小N末端短縮ペプチドはそれぞれHBV env. 333-348(923.09)及び335-348(923.07)であった。図13のパネルBは、この9量体及び10両体のいづれも、系113により認識されないことを示しており、このCTL系による認識のためにはもっと長いペプチドが最小配列として必要とされることを意味している。系110により認識される最小配列はペプチドHBV env. 333-341(923.26)及びHBV env 335-343(923.22)により表わされ、可能として2つの異なる、しかし

10

20

30

40

50

ながら重複しているペプチドが799.09特異的CTLのための抗原決定基として働きうることが示唆される。

以上より、本発明の特定の態様を例示したが、その様々な改良が本発明の範囲を逸脱することなくなされることが明らかであろう。従って、本発明は請求の範囲を除き、限定されることはない。

#### 配列表

##### (1) 一般情報

(i) 出願人：ビスチエロ、マリア エーチェストナッツ、ロバート ダブリュー

(ii) 発明の名称：HLA制限型B型肝炎ウィルスのCTLエピトープ

(iii) 配列の数：35

10

(iv) 連絡先：

(A) 宛先：タウンセンド アンド タウンセンド

(B) 通り：ワン マーケット プラザ、スチュアートストリート タワー

(C) 市：サンフランシスコ

(D) 州：カルフォルニア

(E) 国：米国

(F) 郵便番号：94105

(v) コンピューター読み取り方式：

(A) 媒体のタイプ：フロッピーディスク

(B) コンピューター：IBM PC コンパチブル

(C) 作動システム：PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア：パテントイン リリース#1.0、バージョン#1.25

20

(vi) 現出願人のデータ：

(A) 出願番号：US

(B) 出願日：1992年8月26日

(C) 分類：

(vii) 先の出願のデータ

(A) 出願番号：US 07/749,568

(B) 出願日：1991年8月26日

(vii) 先の出願のデータ

(A) 出願番号：US 07/827,682

(B) 出願日：1992年1月29日

(vii) 先の出願のデータ

(A) 出願番号：US 07/874,491

(B) 出願日：1992年4月27日

(viii) 代理人/代理店情報：

(A) 名称：スミス、ウィリアム エム

(B) 登録番号：30,223

(C) 参照/処理番号：14137-26-3

(iv) 通信情報：

(A) 電話：415-326-2400

(B) テレファックス：415-543-5043

40

##### (2) SEQ ID NO: 1 の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20個のアミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：ペプチド

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO: 1

50

Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Gly Lys  
 1 5 10 15

Phe Leu Trp Glu Trp  
 20

( 2 ) SEQ ID NO : 2 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 20個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 2

Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr  
 1 5 10 15

Trp Gly Pro Ser Leu  
 20

( 2 ) SEQ ID NO : 3 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 10個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 3

Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile  
 1 5 10

( 2 ) SEQ ID NO : 4 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 20個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 4

Thr Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp Phe His Ile  
 1 5 10 15

Ser Cys Leu Thr Phe  
 20

( 2 ) SEQ ID NO : 5 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 10個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 5

10

20

30

40

Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu  
1 5 10

( 2 ) SEQ ID NO : 6 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 10個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 6

10

Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu Leu Trp  
1 5 10

( 2 ) SEQ ID NO : 7 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 20個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 7

20

Ala Ser Ala Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val  
1 5 10 15

Gln Trp Phe Val Gly  
20

( 2 ) SEQ ID NO : 8 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 9個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 8

30

Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val  
1 5

( 2 ) SEQ ID NO : 9 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 9個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 9

40

Asn Met Gly Leu Lys Phe Arg Gln Leu  
1 5

( 2 ) SEQ ID NO : 10 の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 20個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

50

- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ii ) 分子の種類 : ペプチド
- ( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 10

Met Asp Ile Asp Pro Tyr Lys Glu Phe Gly Ala Thr Val Glu Leu  
 1 5 10 15

Leu Ser Phe Leu Pro  
 20

- ( 2 ) SEQ ID NO : 11の情報

- ( i ) 配列の特徴 :

10

- ( A ) 長さ : 20個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状

- ( ii ) 分子の種類 : ペプチド

- ( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 11

Pro His His Tyr Ala Leu Arg Gln Ala Ile Leu Cys Trp Gly Glu  
 1 5 10 15

Leu Met Tyr Leu Ala  
 20

20

- ( 2 ) SEQ ID NO : 12の情報

- ( i ) 配列の特徴 :

- ( A ) 長さ : 20個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状

- ( ii ) 分子の種類 : ペプチド

- ( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 12

Leu Leu Trp Phe His Ile Ser Cys Leu Thr Phe Gly Arg Glu Thr  
 1 5 10 15

30

Val Ile Glu Tyr Leu  
 20

- ( 2 ) SEQ ID NO : 13の情報

- ( i ) 配列の特徴 :

- ( A ) 長さ : 15個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状

40

- ( ii ) 分子の種類 : ペプチド

- ( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 13

Glu Tyr Leu Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala  
 1 5 10 15

- ( 2 ) SEQ ID NO : 14の情報

- ( i ) 配列の特徴 :

- ( A ) 長さ : 20個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖

- ( D ) トポロジー : 直鎖状

50

(ii) 分子の種類：ペプチド

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：14

Val Ser Phe Gly Val Trp Ile Arg Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro  
1 5 10 15

Pro Asn Ala Pro Ile  
20

(2) SEQ ID NO：15の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：14個のアミノ酸

10

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：ペプチド

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：15

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu  
1 5 10

(2) SEQ ID NO：16の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：16個のアミノ酸

20

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：ペプチド

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：16

Lys Ile Ala Lys Met Lys Ala Ser Ser Val Phe Asn Val Val Asn  
1 5 10 15

Ser

(2) SEQ ID NO：17の情報

30

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：20個のアミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：ペプチド

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：17

Asp Ile Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Lys Ala Ser Ser Val Phe  
1 5 10 15

Asn Val Val Asn Ser  
20

40

(2) SEQ ID NO：18の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：13個のアミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：ペプチド

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：18

50

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr  
1 5 10

( 2 ) SEQ ID NO : 19の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 13個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : タンパク質

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 19

10

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu  
1 5 10

( 2 ) SEQ ID NO : 20の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 23個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : タンパク質

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 20

20

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Phe Leu  
1 5 10 15

Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val  
20

( 2 ) SEQ ID NO : 21の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 26個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : タンパク質

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 21

30

Thr Pro Pro Ala Tyr Arg Pro Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ala Ala  
1 5 10 15

Ala Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val  
20 25

( 2 ) SEQ ID NO : 22の情報

( i ) 配列の特徴 :

( A ) 長さ : 10個のアミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 一本鎖

( D ) トポロジー : 直鎖状

( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 22

40

Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu  
1 5 10

( 2 ) SEQ ID NO : 23の情報

( i ) 配列の特徴 :

50

- ( A ) 長さ : 10個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 23

**Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val**  
**1 5 10**

( 2 ) SEQ ID NO : 24の情報

( i ) 配列の特徴 :

10

- ( A ) 長さ : 13個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 24

**Lys Ser Ser Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val**  
**1 5 10**

( 2 ) SEQ ID NO : 25の情報

( i ) 配列の特徴 :

20

- ( A ) 長さ : 24個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 25

**Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Phe**  
**1 5 10 15**

**Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val**  
**20**

30

( 2 ) SEQ ID NO : 26の情報

( i ) 配列の特徴 :

- ( A ) 長さ : 27個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状
- ( ii ) 分子の種類 : ペプチド

( xi ) 配列の詳細 : SEQ ID NO : 26

**Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Ala**  
**1 5 10 15**

40

**Ala Ala Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val**  
**20 25**

( 2 ) SEQ ID NO : 27の情報

( i ) 配列の特徴 :

- ( A ) 長さ : 27個のアミノ酸
- ( B ) 型 : アミノ酸
- ( C ) 鎖の数 : 一本鎖
- ( D ) トポロジー : 直鎖状

50

(ii) 分子の種類：ペプチド

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：27

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val  
20 25

(2) SEQ ID NO：28の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：27個のアミノ酸

10

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：タンパク質

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：28

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu Ala  
1 5 10 15

Ala Ala Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val  
20 25

20

(2) SEQ ID NO：29の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：30個のアミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：タンパク質

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：29

Lys Ser Ser Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
1 5 10 15

30

Thr Glu Ala Ala Ala Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val  
20 25 30

(2) SEQ ID NO：30の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：14個のアミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：タンパク質

40

(xi) 配列の詳細：SEQ ID NO：30

Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu  
1 5 10

(2) SEQ ID NO：31の情報

(i) 配列の特徴：

(A) 長さ：24個のアミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 分子の種類：タンパク質

50

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 31

Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val Gln Tyr Ile Lys Ala  
 1 5 10 15

Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu  
 20

(2) SEQ ID NO: 32の情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 27個のアミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: タンパク質

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 32

Lys Ser Ser Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile  
 1 5 10 15

Thr Glu Phe Leu Pro Ser Asp Phe Phe Pro Ser Val  
 20 25

(2) SEQ ID NO: 33の情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 10個のアミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: ペプチド

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 33

Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro  
 1 5 10

(2) SEQ ID NO: 34の情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 10個のアミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: ペプチド

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 34

Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val  
 1 5 10

(2) SEQ ID NO: 35の情報

(i) 配列の特徴:

(A) 長さ: 14個のアミノ酸

(B) 型: アミノ酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 分子の種類: ペプチド

(xi) 配列の詳細: SEQ ID NO: 35

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu  
 1 5 10

10

20

30

40

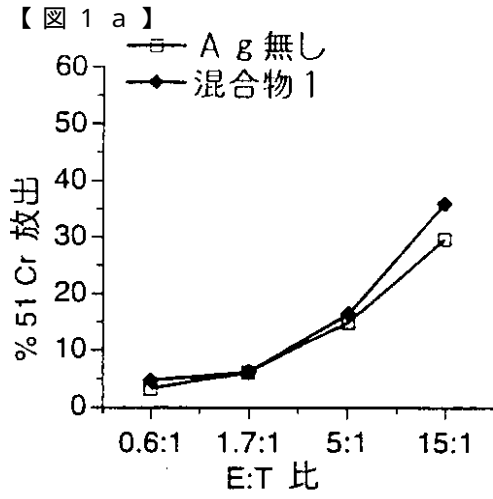


FIG. 1a

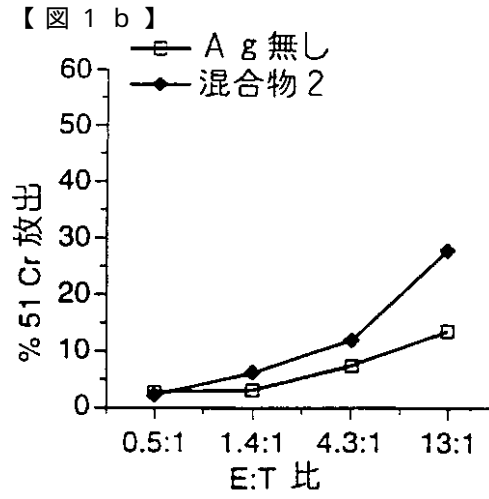


FIG. 1b

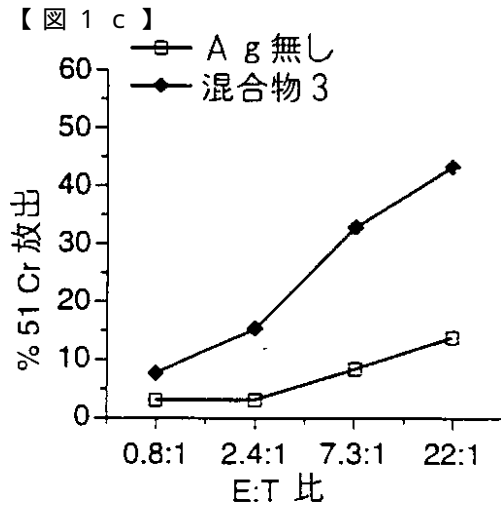


FIG. 1c

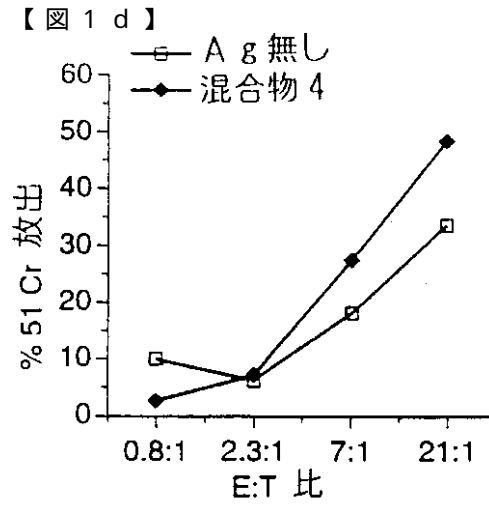


FIG. 1d

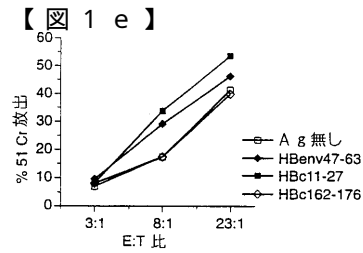


FIG. 1e

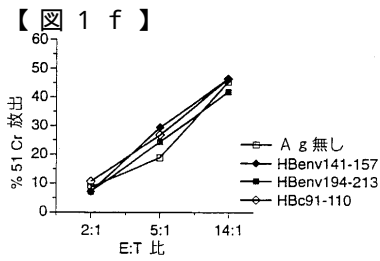


FIG. 1f

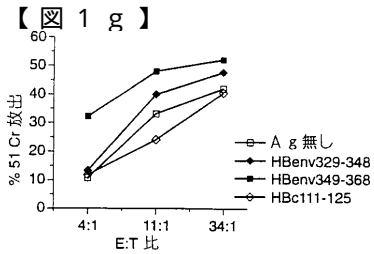


FIG. 1g

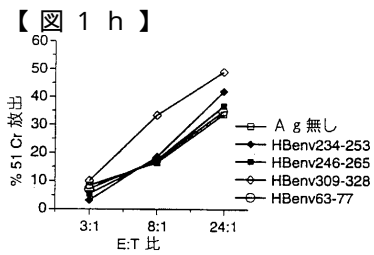


FIG. 1h

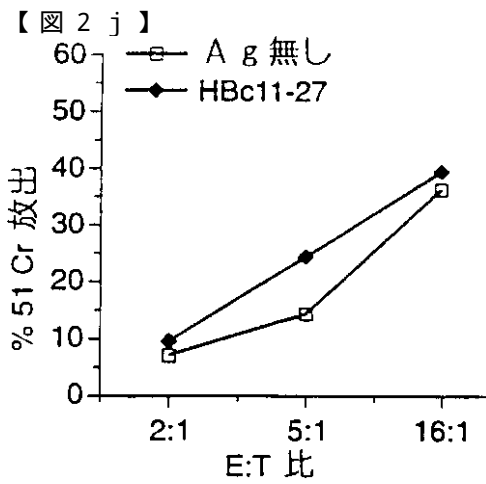


FIG. 2j

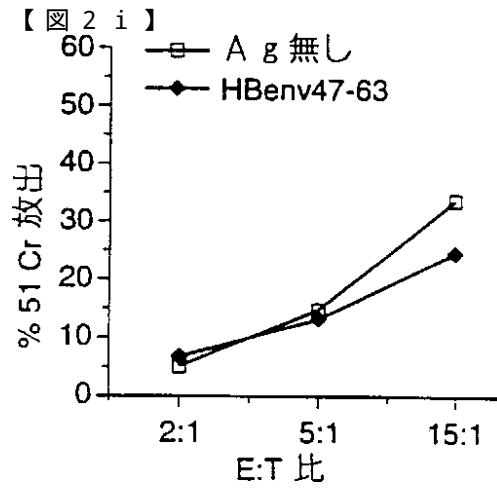


FIG. 2i

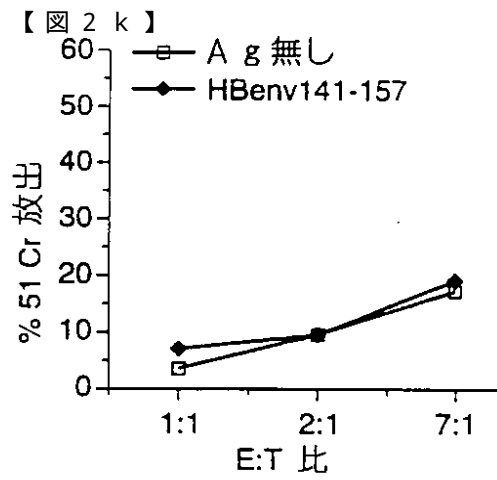


FIG. 2k

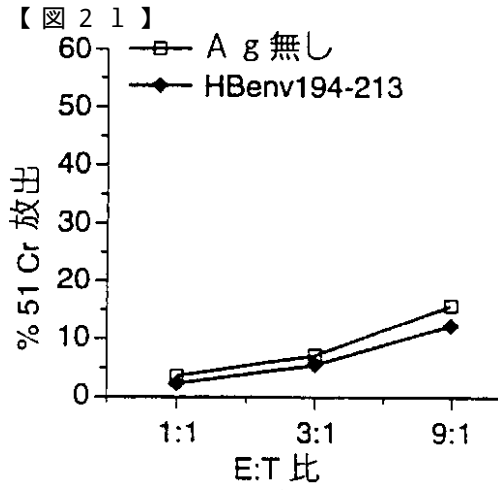


FIG. 2l

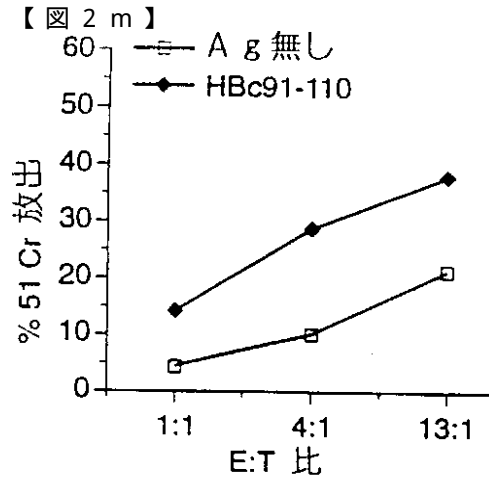


FIG. 2m

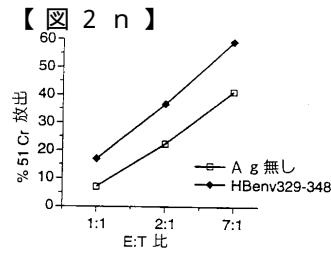


FIG. 2n

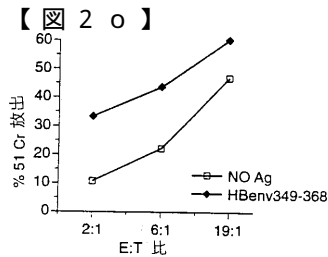


FIG. 2o

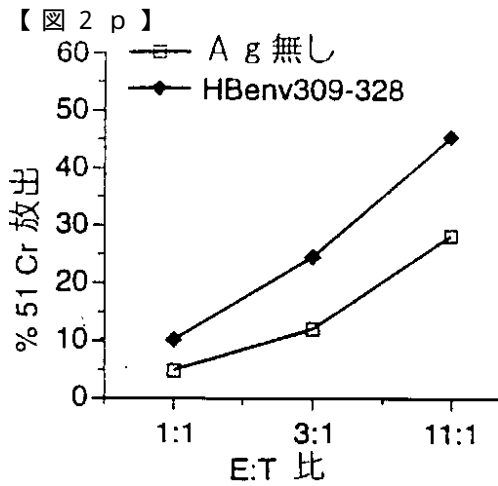


FIG. 2p

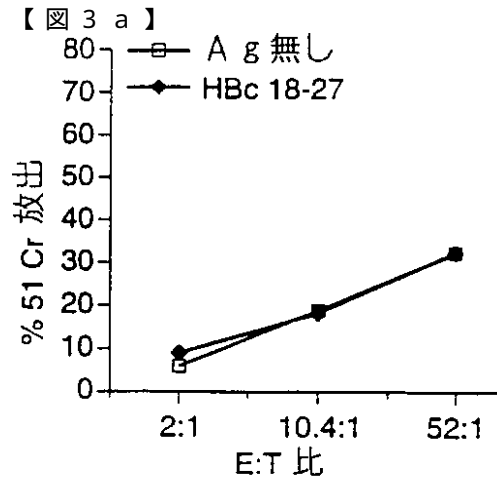


FIG. 3a

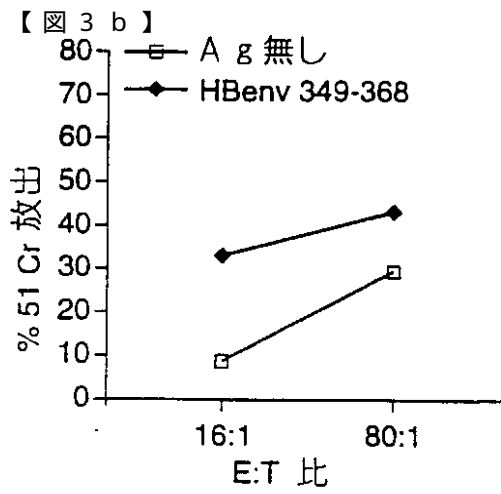


FIG. 3b

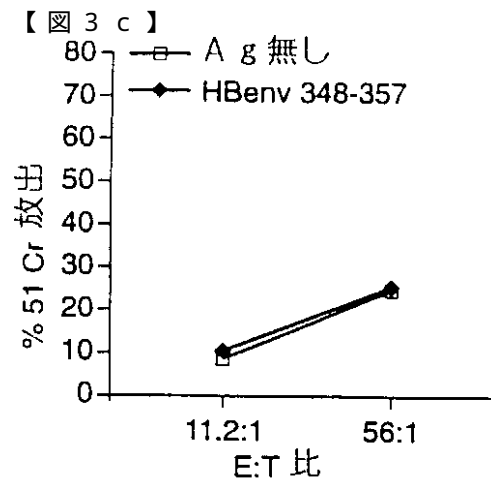


FIG. 3c

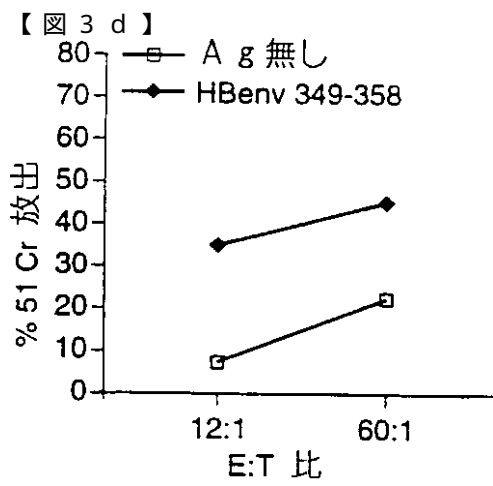


FIG. 3d

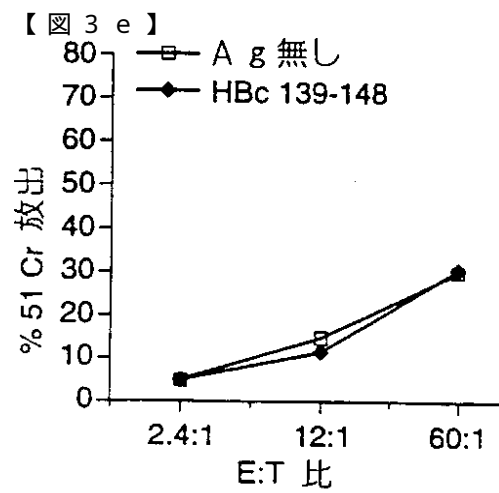


FIG. 3e

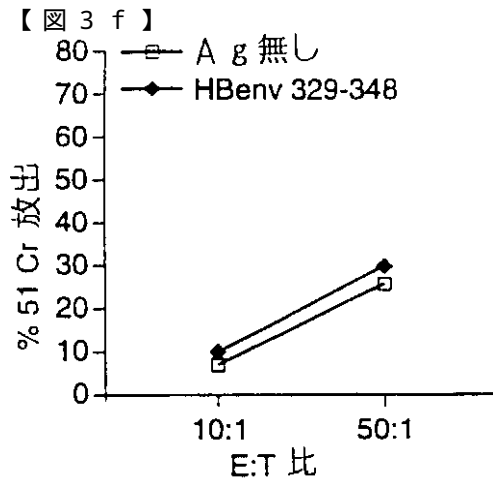


FIG. 3f

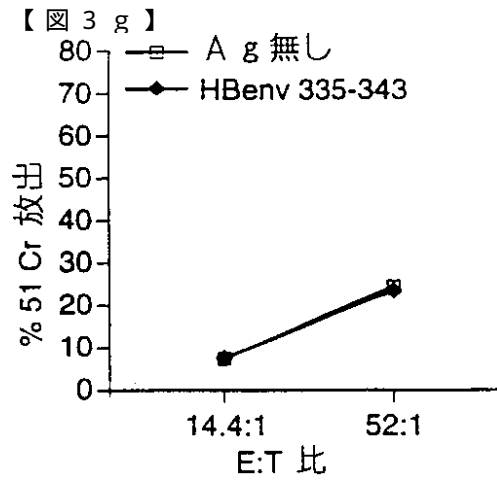


FIG. 3g

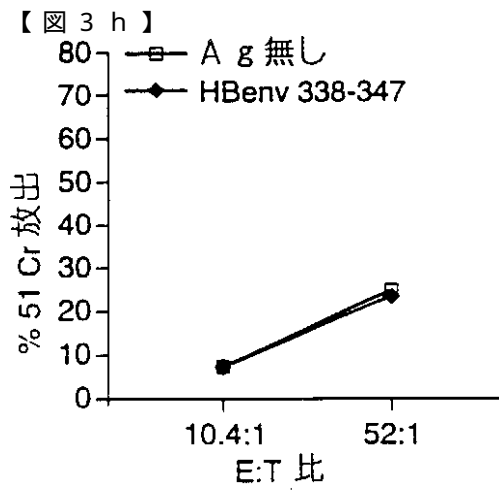


FIG. 3h

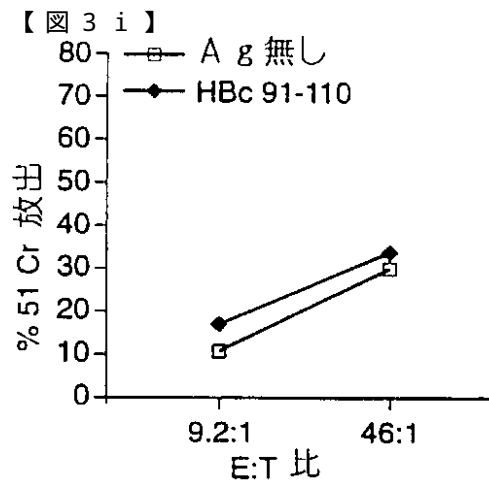


FIG. 3i

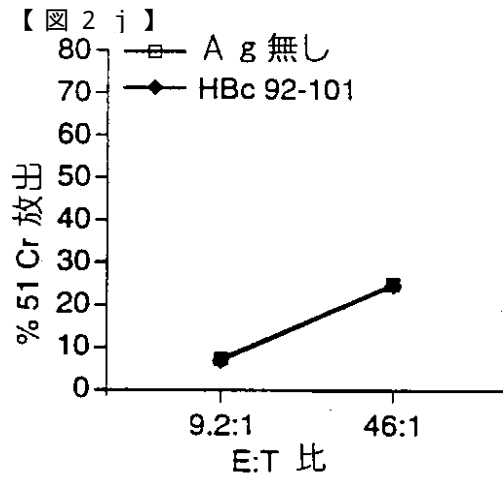


FIG. 3j

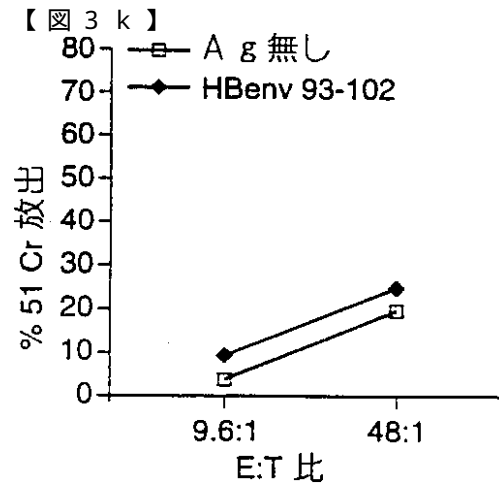


FIG. 3k

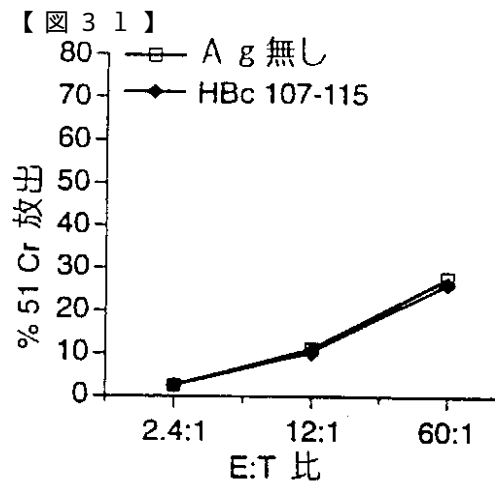


FIG. 3l

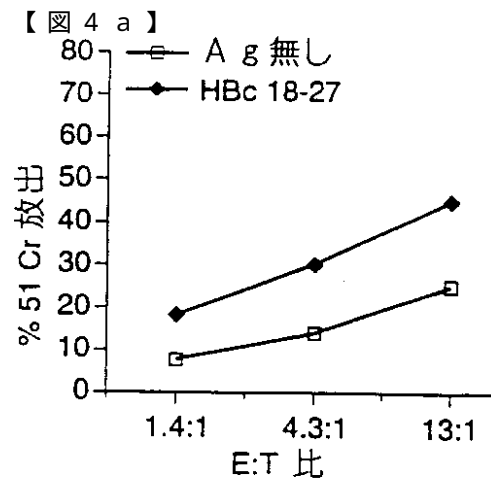


FIG. 4a

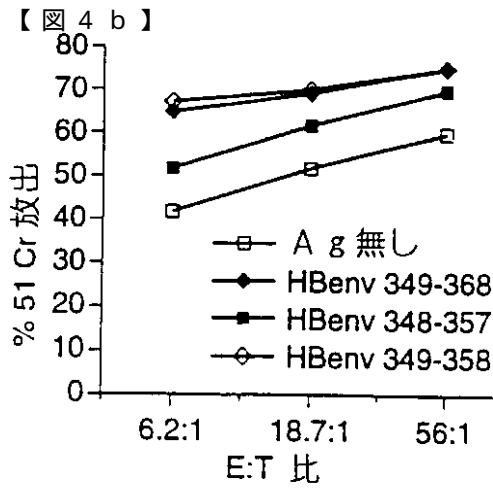


FIG. 4b

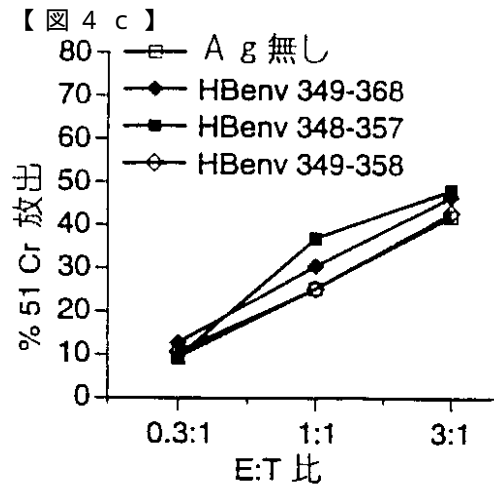


FIG. 4c

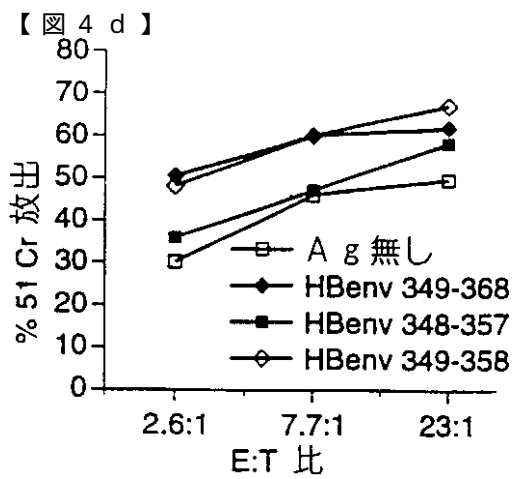


FIG. 4d

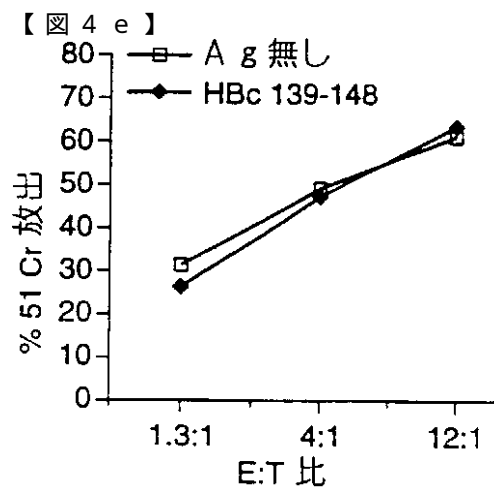


FIG. 4e

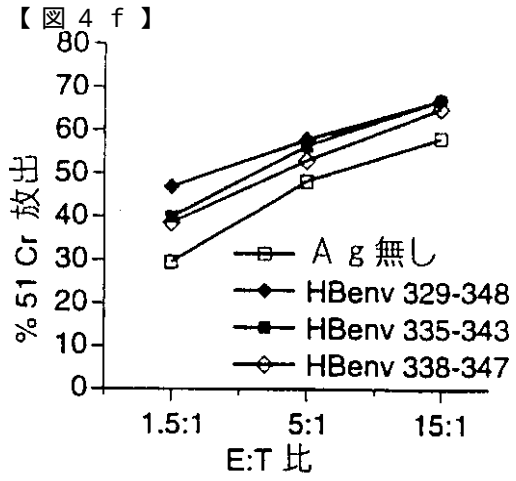


FIG. 4f

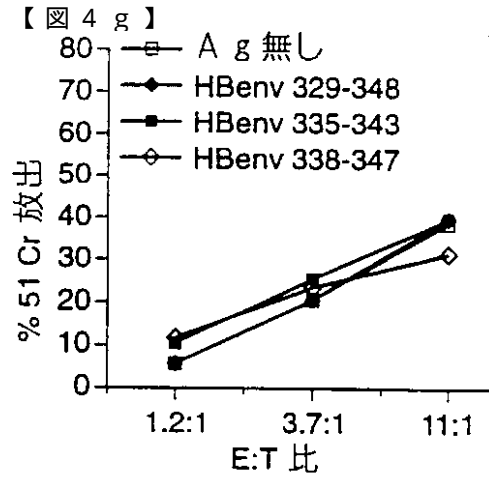


FIG. 4g

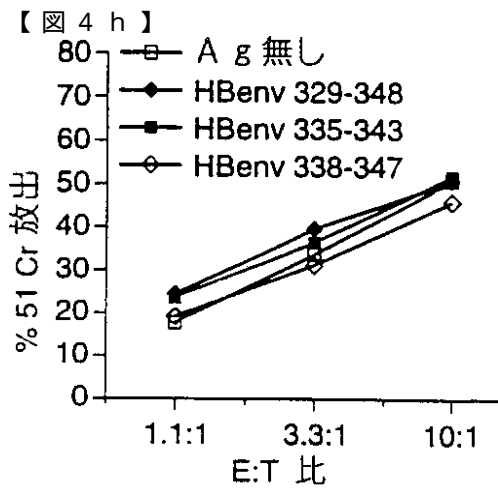


FIG. 4h

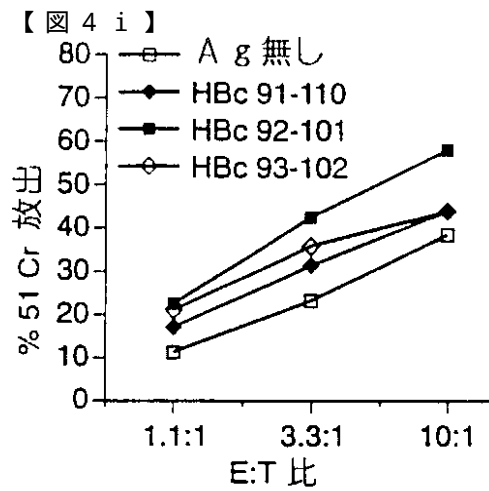


FIG. 4i

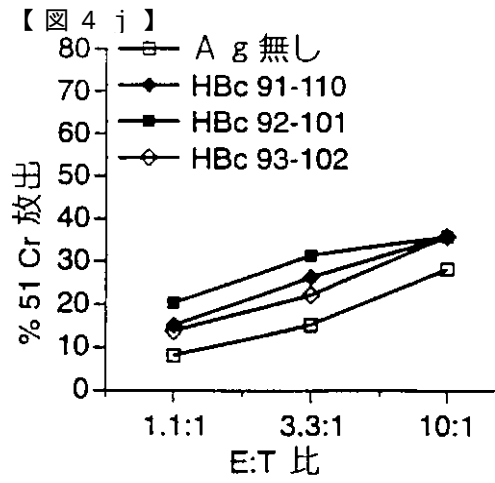


FIG. 4j

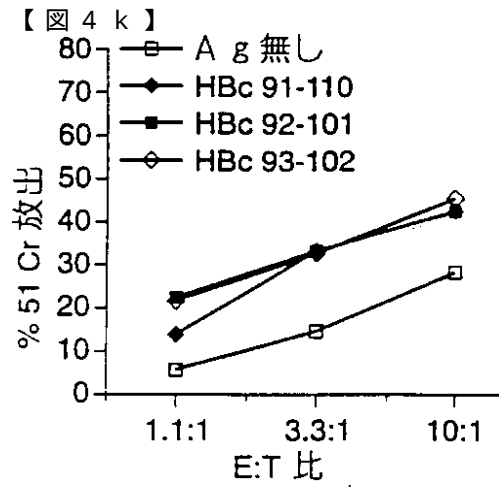


FIG. 4k

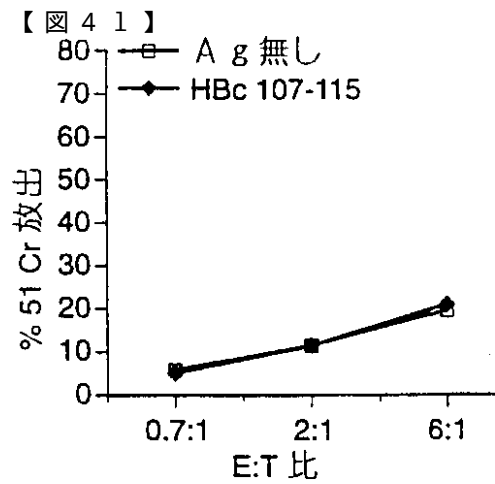


FIG. 4l

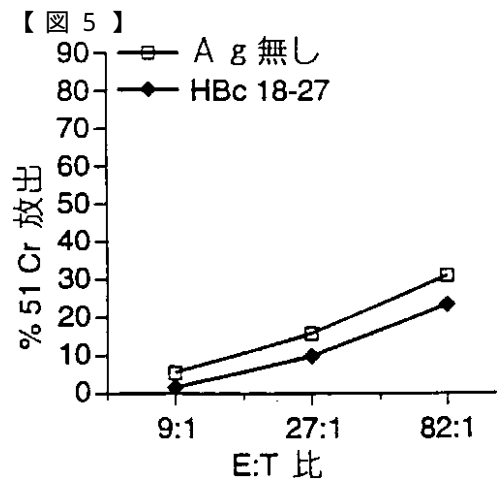


FIG. 5

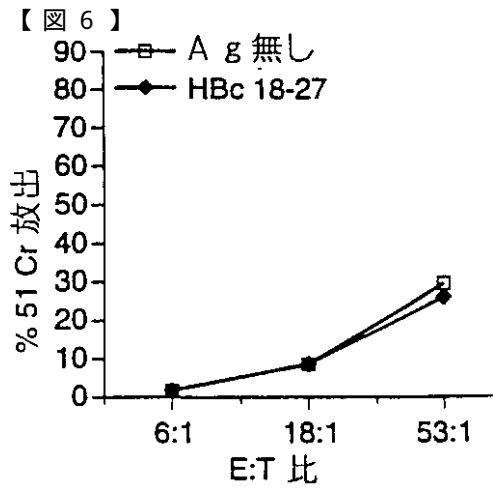


FIG. 6

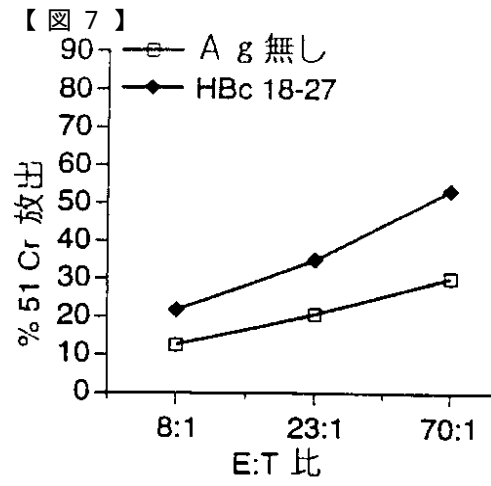


FIG. 7

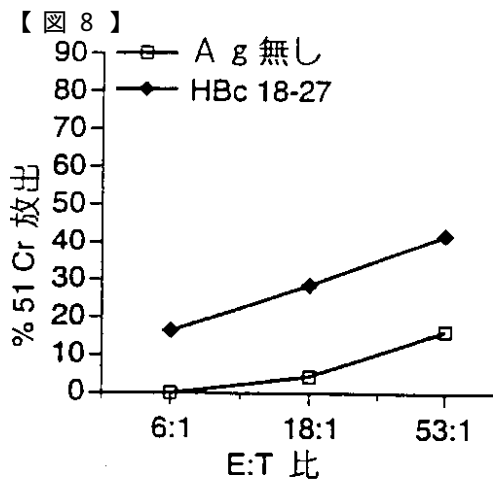


FIG. 8

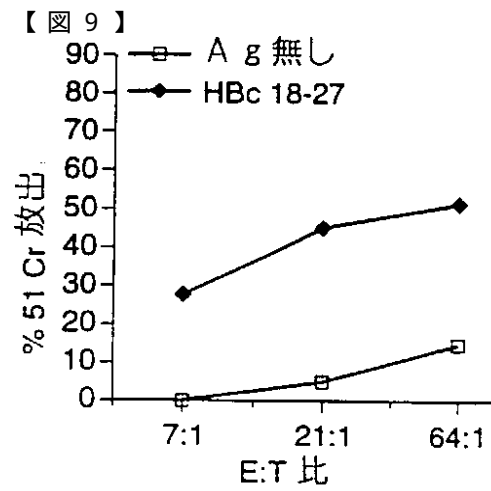


FIG. 9

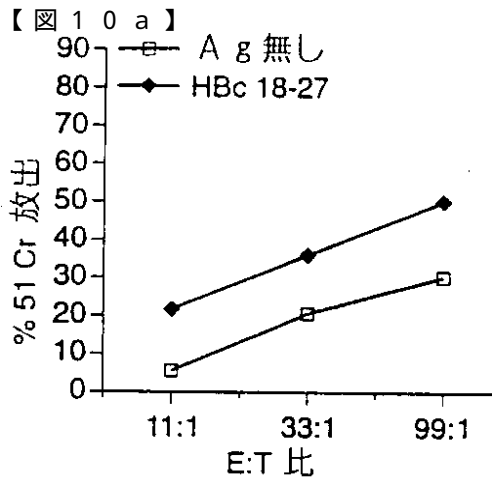


FIG. 10a

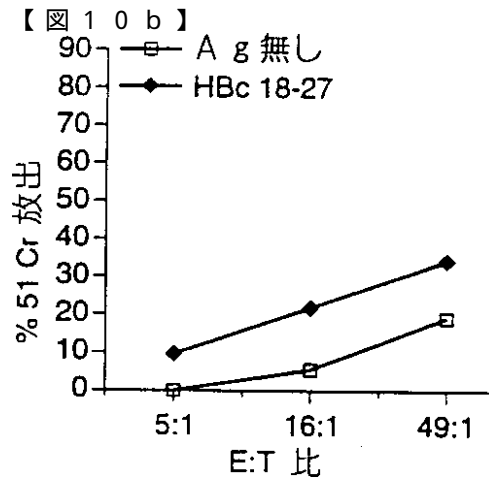


FIG. 10b

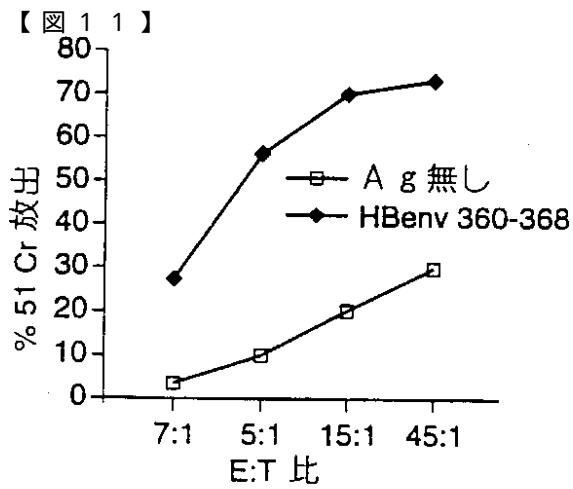


FIG. 11

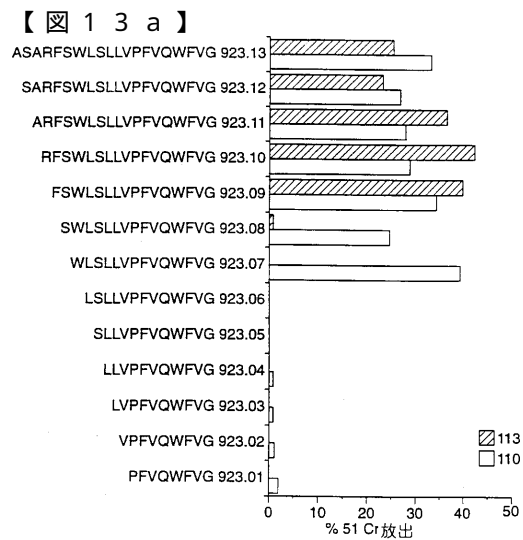


FIG. 13a

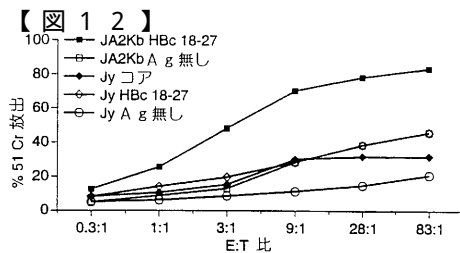


FIG. 12

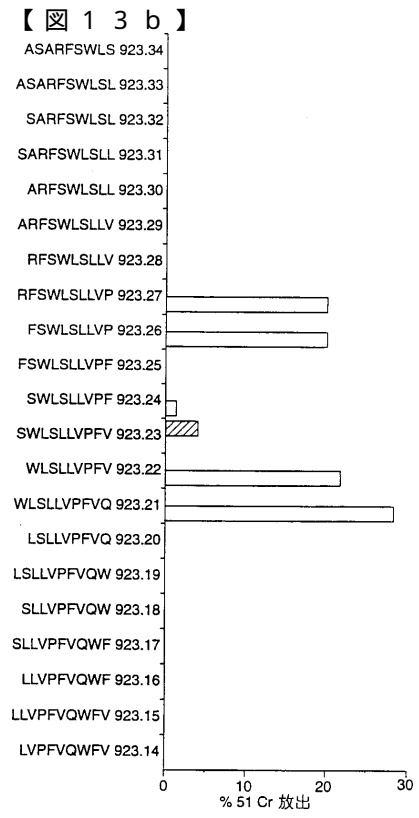


FIG. 13b

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I  
C 0 7 K 14/02 (2006.01) C 0 7 K 14/02  
C 0 7 K 17/02 (2006.01) C 0 7 K 17/02  
C 0 7 K 19/00 (2006.01) C 0 7 K 19/00  
G 0 1 N 33/50 (2006.01) G 0 1 N 33/50

(31)優先権主張番号 874,491  
(32)優先日 平成4年4月27日(1992.4.27)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 ビティエロ, マリア エー .  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 3 7 , ラ ジョラ, ハイ アベニュー 7 5 2 2  
(72)発明者 チェスナット, ロバート ダブリュ .  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 0 7 , カーディフ バイ ザ シー, キングス クロス  
ドライブ 1 4 7 3

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 Science, 1 9 9 0 年, 248, 361-364

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)  
C07K 7/00 - 19/00  
CA(STN)  
BIOSIS/WPI(DIALOG)  
SwissProt/PIR/GeneSeq