(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3839483号
(P3839483)
(45)発行日　平成18年11月1日(2006.11.1)　(24)登録日　平成18年8月11日(2006.8.11)

(51)Int.Cl.		F I	
C07K 14/47	(2006.01)	C07K	14/47
A61K 39/04	(2006.01)	A61K	39/04
A61K 39/05	(2006.01)	A61K	39/05
A61K 39/07	(2006.01)	A61K	39/07
A61K 39/08	(2006.01)	A61K	39/08

請求項の数 37　(全 48 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願平8-533487
(86)(22)出願日　平成8年5月1日(1996.5.1)
(65)公表番号　特表平11-504635
(43)公表日　平成11年4月27日(1999.4.27)
(86)国際出願番号　PCT/US1996/006147
(87)国際公開番号　WO1996/034888
(87)国際公開日　平成8年11月7日(1996.11.7)
審査請求日　平成15年1月10日(2003.1.10)
(31)優先権主張番号　08/432,483
(32)優先日　平成7年5月1日(1995.5.1)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
アヴァント　イムノセラピューティクス，インコーポレーテッド
アメリカ合衆国　０２１９４　マサチューセッツ州，ニードハム，フォース　アベニュー　１１９
(74)代理人
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人
弁理士　石井　貞次
(74)代理人
弁理士　島村　直己

最終頁に続く

(54)【発明の名称】コレステリルエステル転移タンパク質（ＣＥＴＰ）活性の調節

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

コレステリルエステル転移タンパク質（ＣＥＴＰ）のB細胞エピトープ部分を含有するB細胞エピトープ部分と結合された、広域ヘルパーT細胞エピトープを含有するヘルパー細胞エピトープ部分を含んでなる単離された抗原性ペプチドであって、哺乳類宿主に投与される際に、宿主の内因性ＣＥＴＰと結合する抗体の産生を引き起こすことが可能である、上記ペプチド。

【請求項２】

ＣＥＴＰがヒトＣＥＴＰである、請求項１に記載のペプチド。

【請求項３】

Ｂ細胞エピトープ部分がＢ細胞または抗体により認識される配列番号４の少なくとも６個の連続アミノ酸からなるヒトＣＥＴＰの一部を含有する、請求項２に記載のペプチド。

【請求項４】

Ｂ細胞エピトープ部分が、配列番号４のアミノ酸３４９～３６７により規定されるアミノ酸配列、配列番号４のアミノ酸４６１～４７６により規定されるアミノ酸配列、抗原エピトープ同定アルゴリズムにより同定されたＣＥＴＰのアミノ酸配列、中性脂肪結合に関与するＣＥＴＰの領域、または中性脂肪転移活性に関与するＣＥＴＰの領域からなる群から選択される、請求項２に記載のペプチド。

【請求項５】

Ｂ細胞エピトープ部分がヒトＣＥＴＰのカルボキシル末端の２６アミノ酸（配列番号１）

の６～２６個の連続アミノ酸からなるペプチドである、請求項３に記載のペプチド。
【請求項６】
ヘルパーＴ細胞エピトープ部分が破傷風毒素、ジフテリア毒素、百日咳菌ワクチン、カルメット-ゲラン桿菌（ＢＣＧ）、ポリオワクチン、麻疹ワクチン、おたふくかぜワクチン、風疹ワクチン、ツベルクリンの精製タンパク質誘導体、キーホールリンペットヘモシアニン、ｈｓｐ７０およびこれらの組合せからなる群から選択される免疫原性ペプチドから誘導されたヘルパーＴ細胞エピトープを含有する、請求項１～５のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項７】
ヘルパーＴ細胞エピトープ部分が破傷風毒素タンパク質のアミノ酸８３０～８４３（配列番号２のアミノ酸２～１５）のアミノ酸配列、破傷風毒素タンパク質のアミノ酸９４７～９６７（配列番号３）のアミノ酸配列およびこれらの組合せを含有する、請求項１～５のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項８】
アミノ末端システイン残基を有する、請求項１～７のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項９】
Ｂ細胞エピトープ部分がヘルパーＴ細胞エピトープ部分に共有結合される、請求項１に記載のペプチド。
【請求項１０】
Ｂ細胞エピトープ部分がペプチド結合またはジスルフィド結合を介してヘルパーＴ細胞エピトープ部分に共有結合される、請求項９に記載のペプチド。
【請求項１１】
Ｂ細胞エピトープ部分が架橋剤分子を介してヘルパーＴ細胞エピトープ部分に結合される、請求項１に記載のペプチド。
【請求項１２】
Ｂ細胞エピトープ部分がアミノ酸橋を介してヘルパーＴ細胞エピトープ部分に結合される、請求項１に記載のペプチド。
【請求項１３】
配列番号２のアミノ酸配列を有する、請求項１に記載のペプチド。
【請求項１４】
１つの共通の担体分子に結合された、請求項１～５のいずれか１項に規定されるＢ細胞エピトープ部分と請求項６または７に規定されるヘルパーＴ細胞エピトープ部分とを含んでなるワクチンペプチド。
【請求項１５】
多コピー数の補体タンパク質Ｃ３ｄに共有結合された、請求項１～１３のいずれか１項に記載のペプチドまたは請求項１４に記載のワクチンペプチド。
【請求項１６】
補体タンパク質Ｃ３ｄとin vivoで共有結合するようになる炭水化物構造により誘導体化された、請求項１～１３のいずれか１項に記載のペプチドまたは請求項１４に記載のワクチンペプチド。
【請求項１７】
２以上のヘルパーＴ細胞エピトープ部分および/または２以上のＢ細胞エピトープ部分を含んでなる、請求項１～１３、請求項１５または１６のいずれか１項に記載のペプチド、あるいは請求項１４に記載のワクチンペプチド。
【請求項１８】
薬学的に許容し得る担体またはアジュバンド、ならびに請求項１～１３および１５～１６のいずれか１項に記載のペプチドおよび請求項１４に記載のワクチンペプチドから選択される１以上のペプチドを含んでなるワクチン組成物。
【請求項１９】
医薬品として使用するための、請求項１～１３および１５～１６のいずれか１項に記載の

ペプチド。
【請求項２０】
前記宿主において循環ＬＤＬ、ＶＬＤＬまたは総コレステロールに対する循環ＨＤＬの比率を高めることに使用するための、請求項１～１３および１５～１６のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項２１】
前記宿主において内因性ＣＥＴＰ活性のレベルを低下させることに使用するための、請求項１～１３および１５～１６のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項２２】
前記宿主においてＨＤＬ-コレステロールの異化作用を改変してアテローム性動脈硬化症病変の発生を低下させることに使用するための、請求項１～１３および１５～１６のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項２３】
前記宿主においてアテローム性動脈硬化症を治療的または予防的に処置することに使用するための、請求項１～１３および１５～１６のいずれか１項に記載のペプチド。
【請求項２４】
内因性ＣＥＴＰ活性を調節するための、またはアテローム性動脈硬化症を治療的もしくは予防的に処置するための抗ＣＥＴＰワクチンを調製する方法であって、
主要組織適合性遺伝子複合体(ＭＨＣ)クラスＩのＴ細胞エピトープを含まない、
ＣＥＴＰのＢ細胞エピトープを含んでなるB細胞エピトープ部分を選択し、
ＣＥＴＰに由来しない免疫原性ペプチドから誘導された広域ヘルパーＴ細胞エピトープ部分を選択し、そして
Ｂ細胞エピトープ部分と広域ヘルパーＴ細胞エピトープ部分とを結合させて抗原性部分を形成させる、
ことを含んでなる上記方法。
【請求項２５】
Ｂ細胞エピトープ部分が請求項１～５のいずれか１項に規定されるものであり、かつヘルパーＴ細胞エピトープ部分が請求項６または７に規定されるものである、請求項２４に記載の方法。
【請求項２６】
Ｂ細胞エピトープ部分が請求項１０～１５のいずれか１項に規定されるように広域ヘルパーＴ細胞エピトープ部分に結合される、請求項２４または２５に記載の方法。
【請求項２７】
ヒトまたは動物において内因性抗ＣＥＴＰ抗体を引き出すことに使用する医薬品の製造における、請求項１～１３および１５～１６のいずれか１項に記載のペプチド、請求項１４に記載のワクチンペプチド、または請求項１８に記載のワクチン組成物の使用。
【請求項２８】
医薬品として使用するための、請求項１４に記載のワクチンペプチド。
【請求項２９】
前記宿主において循環ＬＤＬ、ＶＬＤＬまたは総コレステロールに対する循環ＨＤＬの比率を高めることに使用するための、請求項１４に記載のワクチンペプチド。
【請求項３０】
前記宿主において内因性ＣＥＴＰ活性のレベルを低下させることに使用するための、請求項１４に記載のワクチンペプチド。
【請求項３１】
前記宿主においてＨＤＬ-コレステロールの異化作用を改変してアテローム性動脈硬化症病変の発生を低下させることに使用するための、請求項１４に記載のワクチンペプチド。
【請求項３２】
前記宿主においてアテローム性動脈硬化症を治療的または予防的に処置することに使用するための、請求項１４に記載のワクチンペプチド。

【請求項３３】
医薬品として使用するための、請求項１８に記載のワクチン組成物。
【請求項３４】
前記宿主において循環ＬＤＬ、ＶＬＤＬまたは総コレステロールに対する循環ＨＤＬの比率を高めることに使用するための、請求項１８に記載のワクチン組成物。
【請求項３５】
前記宿主において内因性ＣＥＴＰ活性のレベルを低下させることに使用するための、請求項１８に記載のワクチン組成物。
【請求項３６】
前記宿主においてＨＤＬ-コレステロールの異化作用を改変してアテローム性動脈硬化症病変の発生を低下させることに使用するための、請求項１８に記載のワクチン組成物。
【請求項３７】
前記宿主においてアテローム性動脈硬化症を治療的または予防的に処置することに使用するための、請求項１８に記載のワクチン組成物。
【発明の詳細な説明】
本出願は、1995年５月１日付けの米国特許出願第08/432,483号の一部継続出願である。
発明の一般的な利用分野
本発明は、一般的に、ヒトおよび他の動物の循環系におけるアテローム形成活性を制御し、治療し、またはそのリスクを軽減するための、ペプチドに基づくワクチンの分野に関するものである。特に、本発明は、心臓血管疾患を予防的にまたは治療的に処置するための、あるいはリポタンパク質の相対レベルを調節してアテローム性動脈硬化症のような心臓血管疾患のリスクの低下と相関した状態を生じさせるための、内因性コレステリルエステル転移タンパク質（cholesterylester transfer protein：ＣＥＴＰ）活性を抑制する手段を提供する組成物および方法を提供するものである。
発明の背景
コレステロールは、主に、アポリポタンパク質（Ａｐｏ）と呼ばれるタンパク質部分と、リン脂質、トリグリセリド、コレステロール、コレステリルエステルを含めた種々の脂質とから成るリポタンパク質粒子（リポタンパク質）の成分として体内を循環している。アポリポタンパク質の主要なクラスは１０種類存在している。すなわち、Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV, Apo B-48, Apo B-100, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo DおよびApo Eである。リポタンパク質は密度と組成により分類されている。例えば、高密度リポタンパク質（ＨＤＬ）は、その一つの働きは末梢組織から肝臓へのコレステロールの輸送を調節することであるが、通常約1.063～1.21g/mlの範囲の密度を有する。ＨＤＬはApo A-I, Apo A-II, Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III, Apo D, Apo Eをさまざまな量で含むだけでなく、コレステロール、コレステリルエステル、リン脂質、トリグリセリドなどの脂質をさまざまな量で含有する。
ＨＤＬと対照的に、低密度リポタンパク質（ＬＤＬ）は、一般に約1.019～1.063g/mlの密度を有するものであるが、種々の脂質と結合したApo B-100を含有する。特に、脂質とコレステロールとコレステリルエステルの量は、乾燥質量の百分率として測定したとき、ＨＤＬよりもＬＤＬの方が相当に高い。ＬＤＬはコレステロールを末梢組織へ運ぶという点で特に重要である。
超低密度リポタンパク質（ＶＬＤＬ）は約0.95～1.006g/mlの密度をもち、この場合もそのタンパク質含量と脂質含量の両方の点で他のクラスのリポタンパク質と組成が異なっている。ＶＬＤＬは一般にＨＤＬやＬＤＬよりもかなり多量のトリグリセリドを含み、特に内因的に合成されたトリグリセリドを肝臓から脂肪組織とその他の組織に運搬するという点で重要である。各種のリポタンパク質の特徴および機能が検討されてきた（例えば、Mathews, C.K. and van Holde, K.E., Biochemistry, pp. 574-576, 626-630(The Benjamin/Cummings Publishing Co., Redwood City, California, 1990); Havel, R.J.ら, “Introduction:Structure and metabolism of plasma lipoproteins（序論：血漿リポタンパク質の構造と機能）”, In The Metabolic Basis of Inherited Disease,第６版, pp. 1129

-1138（Scriver, C.R.ら編）(McGraw-Hill, Inc., New York, 1989); Zannis, V.I.ら, “Genetic mutations affecting lipoproteins, their receptors, and their enzymes(リポタンパク質、その受容体およびその酵素に影響を及ぼす遺伝子変異)”, In Advances in Human Genetics, Vol. 21, pp. 145-319（Plenum Press, New Yoyk, 1993)を参照のこと）。

一般に、アテローム性動脈硬化症のような心臓血管疾患を発生しにくいことは、循環ＨＤＬの絶対レベルの増加と、さらにＶＬＤＬやＬＤＬのような比較的低密度のリポタンパク質の循環レベルと比べたときのＨＤＬレベルの増加にも相関している（例えば、Gordon, D.J.ら, N. Engl. J. Med., 321: 1311-1316(1989); Castelli, W.P.ら, J. Am. Med. Assoc., 256: 2835-2838(1986); Miller, N.E.ら, Am. Heart J., 113: 589-597(1987); Tall, A.R., J. Clin. Invest., 89: 379-384(1990); Tall, A.R.ら, J. Internal Med., 237: 5-12(1995)を参照のこと）。

コレステリルエステル転移タンパク質（ＣＥＴＰ）は、ＨＤＬからＴＧに富むリポタンパク質（例えば、ＶＬＤＬやＬＤＬ）へのコレステリルエステルの転移を媒介し、また、ＶＬＤＬからＨＤＬへのＴＧの逆交換をも媒介する（Tall, A.R., J. Internal Med., 237: 5-12(1995); Tall, A.R., J. Lipid Res., 34: 1255-1274(1993); Hesler, C.B.ら, J. Biol. Chem., 262: 2275-2282(1987); Quig, D.W.ら, Ann. Rev. Nutr., 10: 169-193(1990)）。ＣＥＴＰは種々のクラスのリポタンパク質と関連したコレステリルエステルおよびトリグリセリドのレベルを調節する上で、ある役割を果たしている可能性がある。ＣＥＴＰの高コレステリルエステル転移活性は、心臓血管疾患のリスクの増加と関係があるＬＤＬ関連コレステロールおよびＶＬＤＬ関連コレステロールのレベルの増加と相関している（例えば、Tato, F.ら, Arterioscler. Thromb. Vascular Biol., 15: 112-120(1995)を参照のこと）。

以後、本明細書においては、コレステリルエステルおよび／または非エステル化コレステロールを含めて、低密度リポタンパク質と関連した総コレステロールを表すためにＬＤＬ－Ｃを用いることにする。また、コレステリルエステルおよび／または非エステル化コレステロールを含めて、超低密度リポタンパク質と関連した総コレステロールを表すためにＶＬＤＬ－Ｃを用いることにする。ＨＤＬ－Ｃは、コレステリルエステルおよび／または非エステル化コレステロールを含めて、高密度リポタンパク質と関連した総コレステロールを表すために用いられる。

ヒト血漿から単離されたＣＥＴＰは、４７６個のアミノ酸から成る疎水性の糖タンパク質で、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）－ポリアクリルアミドゲルで測定した分子量は約66,000～74,000ダルトンである（Albers, J.J.ら, Arteriosclerosis, 4: 49-58(1984); Hesler, C.B.ら, J. Biol. Chem., 262: 2275-2282(1987); Jarnagin, S.S.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1854-1857(1987)）。ヒトＣＥＴＰをコードするｃＤＮＡはクローニングされて配列決定されている（Drayna, D.ら, Nature, 327: 632-634(1987)）。ヒトＣＥＴＰの多形性が最近報告され、脂質代謝の疾患と関係している可能性がある（Fumeronら, J. Clin. Invest., 96: 1664-1671(1995); Juvonenら, J. Lipid Res., 36: 804-812(1995)）。ＣＥＴＰはＣＥ、ＴＧ、リン脂質（Barter, P.J.ら, J.Lipid Res., 21: 238-249(1980)）およびリポタンパク質（例えば、Swenson, T.L.ら, J. Biol. Chem., 264: 14318-14326(1989)を参照）と結合することがわかっている。より最近では、カルボキシ末端の２６個のアミノ酸により規定されるＣＥＴＰの領域、とりわけアミノ酸４７０～４７５、は中性脂肪転移に関係する中性脂肪結合にとって特に重要である（Hesler, C.B.ら, J. Biol. Chem., 263: 5020-5023(1988)）が、リン脂質結合には重要でない（Wang, S.ら, J. Biol. Chem., 267: 17487-17490(1992); Wang, S.ら, J. Biol. Chem., 270: 612-618(1995)を参照）ことが明らかにされた。

ＣＥＴＰのコレステリルエステルおよびトリグリセリド転移活性を完全に阻害し、そしてリン脂質転移活性をより低度に阻害するモノクローナル抗体（Ｍａｂ）であるＴＰ２（正式には文献中で５Ｃ７と称される）が作られている（Hesler, C.B.ら, J. Biol. Chem., 263: 5020-5023(1988)）。ＴＰ２のエピトープは、74,000ダルトンのヒトＣＥＴＰ分子の

カルボキシ末端の２６アミノ酸、すなわちアルギニン４５１からセリン４７６までのアミノ酸に位置することが決定された（Hesles, C.B.ら, (1988)参照）。ＴＰ２はヒトとウサギのＣＥＴＰ活性をin vitroで阻害し、ウサギのＣＥＴＰをin vivoで阻害することが報告された（Yen, F.T.ら, J. Clin. Invest., 83: 2018-2024(1989)（ヒトＣＥＴＰと反応するＴＰ２）; Whitlockら, J. Clin. Invest., 84: 129-137(1989)（ウサギＣＥＴＰと反応するＴＰ２））。ＴＰ２と結合するＣＥＴＰ領域のさらなる解析により、フェニルアラニン４６３とロイシン４７５の間のアミノ酸がＴＰ２結合および中性脂肪（例：コレステリルエステル）転移活性にとって必須であることが明らかにされた（Wang, Sら, 1992参照）。

動物モデルやヒトを用いた多くのin vivo研究から、ＣＥＴＰ活性化は循環しているコレステロール含有ＨＤＬのレベルに影響を及ぼし得ることが示された。ＣＥＴＰのコレステリルエステル転移活性の増加は、ＬＤＬ－Ｃおよび／またはＶＬＤＬ－Ｃのレベルと比べてＨＤＬ－Ｃレベルの低下をもたらし、ひいてはアテローム性動脈硬化症を発生しやすくなることと相関している。部分的に精製されたヒトＣＥＴＰをラット（通常はＣＥＴＰ活性を欠く）に注入すると、ＨＤＬからＶＬＤＬへのコレステリルエステルの移動が生じ、このことはＨＤＬからＶＬＤＬへのコレステリルエステルのＣＥＴＰ促進転移と一致する（Ha, Y.C.ら, Biochim. Biophys. Acta, 833: 203-211(1985); Ha, Y.C.ら, Comp. Biochem. Physiol., 83B: 463-466(1986); Gavish, D.ら, J. Lipid Res., 28: 257-267(1987)）。ヒトＣＥＴＰを発現するトランスジェニックマウスは、ＨＤＬと関連したコレステロールのレベルの有意な低下を示すことが報告された（例えば、Hayek, T.ら, J. Clin. Invest., 90: 505-510(1992); Breslow, J.L.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8314-8318(1993)）。さらに、野生型のマウスは通常アテローム性動脈硬化症に対して高度に抵抗性である（Breslow, J.L.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 8314-8318(1993)）のに、サルＣＥＴＰを発現するトランスジェニックマウスは、リポタンパク質と関連したコレステロールの分布の変化、つまり、ＬＤＬ－ＣとＶＬＤＬ－Ｃのレベルの上昇およびＨＤＬ－Ｃのレベルの低下を示すことが報告された（Marotti, K.R.ら, Nature, 364: 73-75 81993)）。また、サルＣＥＴＰを発現するトランスジェニックマウスは、サルＣＥＴＰを発現していない対照マウスと比べて、餌により誘発される重症のアテローム性動脈硬化症にかかりやすく、対照動物で見られたものよりも面積が著しく大きく、かつヒトのアテローム硬化病変で見られるものに特有の大きな病巣の外観を呈するアテローム硬化病変を大動脈に発生していた（Marottiら, 前掲）。ハムスターおよびウサギへの抗ヒトＣＥＴＰモノクローナル抗体（Ｍａｂ）の静脈内注入は、ＣＥＴＰ活性をin vivoで阻害し、かつＨＤＬ－Ｃレベルの顕著な増加、ＨＤＬトリグリセリドレベルの低下、およびＨＤＬサイズの増加をもたらし、この場合も循環リポタンパク質中のコレステロールの分布におけるＣＥＴＰの重要な役割を示唆している（Gaynor, B.J.ら, Atherosclerosis, 110: 101-109(1994)（ハムスター）; Whitlock, M.E.ら, J. Clin. Invest., 84: 129-137(1989)（ウサギ））。

ＣＥＴＰ欠損症もヒトで研究されている。例えば、日本のある家族の研究において、ＣＥＴＰ遺伝子の非機能的対立遺伝子に関してホモ接合性である同胞は検出可能なＣＥＴＰ活性をもっていなかった。事実上、これらの個体はじゅく状斑をまったく示さず、さらにその家族は長寿の傾向も示した（例えば、Brown, M.L.ら, Nature, 342: 448-451(1989); Inazu, A.ら, N. Engl. J. Med., 323: 1234-1238(1990); Bisgaier, C.L.ら, J. Lipid Res., 32: 21-23(1991)）。このようなホモ接合性ＣＥＴＰ欠損個体はまた、コレステリルエステルに富む循環ＨＤＬのレベルの上昇、並びに全体的なＨＤＬレベルの上昇および異常に大きなＨＤＬ（すなわち、通常のＨＤＬのサイズの４～６倍）により証明されるように、抗アテローム形成リポタンパク質のプロフィールを有することが示された（Brown, M.L.ら, 1989, p. 451）。日本におけるこの突然変異の頻度は比較的高く、このことが日本の人口のかなりの割合でＨＤＬレベルが上昇していることの説明になるかもしれない。

上記の研究は、ＣＥＴＰがコレステリルエステルをＨＤＬからＶＬＤＬとＬＤＬに転移し、それにより循環リポタンパク質の相対的なプロフィールを心臓血管疾患のリスクの増加

と関連したプロフィール（例えば、ＨＤＬ－Ｃレベルの低下とＶＬＤＬ－ＣおよびＬＤＬ－Ｃレベルの増加）に変えるという点で、主要な役割を担っていることを示している。Marottiら（前掲）は彼らのデータを次のことを示すものであると解釈した。すなわち、コレステロール分布のＣＥＴＰ誘導変化が、両グループにアテローム形成食餌を与えたとき、動脈障害が非トランスジェニック対照マウスよりもＣＥＴＰ発現トランスジェニックマウスにおいて速やかに発生したことの主な理由となる、というものである。これらを合わせて考えると、既存の証拠から、ＣＥＴＰ活性レベルの上昇は心臓血管疾患のリスクの増加を予告しうることが示唆される。かくして、内因性ＣＥＴＰ活性の調節または抑制は、リポタンパク質の相対レベルを調節してアテローム性動脈硬化症などの心臓血管疾患を減らし、その進行をくい止め、またはその症状の軽減を引き出すための魅力的な治療法となる。

したがって、心臓血管疾患の予防または治療に役立つと思われるＣＥＴＰ活性を制御する組成物および方法を見つけ出すことが有利であるだろう。有効な薬理学的治療薬であるためには、化合物は、大多数のレシピエントに投与したとき、理想的には、その治療用化合物の有利な活性または効果を中和する免疫応答を引き出さず、その治療用化合物を受け取る個体において過敏状態を進行させず、かつ望ましくない副作用を生じさせないものである。また、こうした化合物および方法が連続的な治療または頻繁な反復治療の必要性を回避するならば、さらに有利であるだろう。

発明の概要

本発明は、コレステリルエステル転移タンパク質（ＣＥＴＰ）活性の調節または抑制に有用な化合物および方法を提供する。特に、哺乳動物に投与したとき、その哺乳動物自身の内因性ＣＥＴＰに対する抗体応答を引き出し、その結果アテローム性動脈硬化症などの心臓血管疾患に対する予防的または治療的効果を促進するワクチンペプチドを記載する。このようなワクチンペプチドは、ＣＥＴＰ由来の１以上のＢ細胞エピトープ（例えば、中性脂肪の結合またはＣＥＴＰの転移活性に関与するヒトＣＥＴＰタンパク質のカルボキシル末端部分に存在するもの）を含有するＢ細胞エピトープ部分に結合された、好ましくは共有結合された、「普遍」（universal）または「広域」（broad range）免疫原性ヘルパーＴ細胞エピトープを含有するヘルパーＴ細胞エピトープ部分を含んでなる。ＣＥＴＰ由来の他のＢ細胞エピトープを使用してもよい。本発明のワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分に用いるＣＥＴＰ由来のＢ細胞エピトープは、ＣＥＴＰ機能をブロックするか、または血中の循環ＣＥＴＰのクリアランスをもたらす内因性ＣＥＴＰに対する抗体（自己反応性抗体）を誘導することが好ましい。加えて、本発明のワクチンペプチドで用いるＢ細胞エピトープは、Ｔ細胞により媒介される自己免疫肝障害を回避するように、ＣＥＴＰのＴ細胞エピトープを含まないことが好ましい。

本発明のワクチンペプチドはさまざまな「多価」の実施態様を含む。例えば、多価ペプチドは１より多い普遍または広域ヘルパーＴ細胞またはＢ細胞エピトープを免疫系に提示する。このような多価ワクチンペプチドとしては、多コピー数（２以上）の同一または異なる普遍または広域免疫原性ヘルパーＴ細胞エピトープおよび／または多コピー数のＣＥＴＰタンパク質由来の同一または異なるＢ細胞エピトープをもつものがある。異なる抗体と結合可能な１より多いユニークなＢ細胞エピトープをもつペプチドは免疫複合体の形成を促進して、循環系からＣＥＴＰを効果的にクリアランスする可能性がある。

好適な実施態様において、本発明のワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープ部分は、普遍（広域）免疫原性ヘルパーＴ細胞エピトープ、例えば、破傷風およびジフテリア毒素に存在するもの、または百日咳菌ワクチン、カルメット-ゲラン桿菌（ＢＣＧ）、ポリオワクチン、麻疹ワクチン、おたふくかぜワクチン、風疹ワクチン、ツベルクリンの精製タンパク質誘導体（purified protein derivative：ＰＰＤ）、ヒト型結核菌ｈｓｐ－７０、およびキーホールリンペットヘモシアニンからの既知の抗原性ペプチドに存在するもの、のアミノ酸配列から誘導される。さらに、種々の普遍（つまり広域）抗原性ヘルパーＴ細胞エピトープは、本発明のワクチンペプチドの多重（すなわち、多価）普遍抗原性のヘルパーＴ細胞エピトープ部分を形成させるために、互いと結合させることができる。

本発明のワクチンペプチドのより好適な実施態様では、アミノ末端システイン残基を破傷風毒素の広域または普遍抗原性ヘルパーＴ細胞エピトープのアミノ酸配列に共有結合させて配列ＣＱＹＩＫＡＮＳＫＦＩＧＩＴＥ（配列番号２のアミノ酸１～１５）を形成し、この配列をカルボキシル末端ＣＥＴＰアミノ酸配列ＦＧＦＰＥＨＬＬＶＤＦＬＱＳＬＳ（配列番号２のアミノ酸１６～３１）をもつワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分に共有結合させる。

もう一つの好適な実施態様では、多価ワクチンペプチドが、ＣＥＴＰの２つのＢ細胞エピトープからなるＢ細胞エピトープ部分に共有結合された、破傷風毒素の広域または普遍抗原性ヘルパーＴ細胞エピトープのアミノ酸配列を含んでなる。本発明のこのような好適な実施態様において、多価ワクチンペプチドは配列番号８、すなわちＣＱＹＩＫＡＮＳＫＦＩＧＩＴＥＬＦＰＲＰＤＱＱＨＳＶＡＹＴＦＥＥＤＩＦＧＦＰＥＨＬＬＶＤＦＬＱＳＬＳのアミノ酸配列を有し、この配列では、アミノ末端システインが、ヒトＣＥＴＰの２つのＢ細胞エピトープ、すなわち成熟ヒトＣＥＴＰ（配列番号４）のアミノ酸配列のアミノ酸３４９～３６７およびアミノ酸４６１～４７６、を含むアミノ酸配列に結合された、破傷風毒素由来のＴ細胞エピトープ（配列番号８のアミノ酸２～１５）に結合されている。本発明のさらに別の好適な実施態様において、本発明の多価ワクチンペプチドはウサギＣＥＴＰの相同領域からのＢ細胞エピトープ（すなわち、配列番号６のアミノ酸３５０～３６８およびアミノ酸４８１～４９６）を含み、かつ配列番号９、すなわちＭＱＹＩＫＡＮＳＫＦＩＧＩＴＥＲＦＰＲＰＤＧＲＥＡＶＡＹＲＦＥＥＤＩＦＧＦＰＫＨＬＬＶＤＦＬＱＳＬＳのアミノ酸配列を有する。配列番号９のアミノ酸配列では、アミノ末端メチオニンが、ウサギＣＥＴＰ由来の２つのＢ細胞エピトープを含むアミノ酸配列に結合された、破傷風毒素由来のＴ細胞エピトープ（配列番号８のアミノ酸２～１５）に結合されている。

また、本発明のペプチドは、２官能性リンカー分子または免疫原性が最小であるかもしくは免疫原性がないペプチドリンカー分子を介して互いと結合させることができる。さらに、複数のペプチドを１つの共通の分子に結合させて、多コピー数のペプチドが互いに接近して配置されているペプチドアセンブリーを形成させることもできる。このような多コピー（多価）ペプチドアセンブリーはより高い免疫原性を有し、未結合の個々のペプチドを含むワクチンよりも内因性ＣＥＴＰに対してより効果的な免疫応答を生じる可能性がある。

本発明のワクチン化合物は薬学的に許容されるアジュバントと共に使用することもできる。

本発明の免疫原性ワクチンペプチドは、内因性ＣＥＴＰと反応するかまたは内因性ＣＥＴＰを認識する抗体の産生を引き出す。試験動物にワクチンペプチドを投与すると、総コレステロールとＨＤＬ－Ｃの相対レベルが低下し、アテローム性動脈硬化症病変の発生が減少した。かくして、誘導された内因性抗ＣＥＴＰ抗体は、心臓血管疾患のリスクの低下と関連した生理的状態を促進し、アテローム性動脈硬化症プラークの形成を防止または減少させるのに直接的な作用を及ぼすようである。

【図面の簡単な説明】

図１：ウサギ（のワクチン接種）に対してワクチンペプチドを投与し、ワクチン効力を分析するために血液サンプルを回収するためのプロトコールの流れ図。対照のウサギにはワクチンペプチドを投与しなかった。

図２：70日後にウサギ（rb#1～#4）から採取した希釈血漿サンプル中の組換えＣＥＴＰに結合する抗ＣＥＴＰ抗体に対するＥＬＩＳＡに基づく450nmでの光学密度（O.D.）対血漿希釈度。白の四角（ウサギrb#4）は、ワクチンペプチドを投与しなかったウサギの血漿を表す（対照）。黒の四角、丸および菱形は各々、配列番号２のアミノ酸配列を有するワクチンペプチドを投与したウサギrb#1、#2および#3を表す。

図３：70日後に採取したウサギ希釈血漿サンプル中の組換えヒトＣＥＴＰに結合するモノクローナル抗体(Mab)TP2の抗ＣＥＴＰ抗体による阻害に対する競合ＥＬＩＳＡに基づく、ウサギ（rb#1～#4、上記図２の説明を参照）の血漿サンプルに対する450nmでの光学密度（O.D.）対血漿希釈度。

図４：ワクチン接種プロトコールにおけるウサギ（rb#1～#4、上記図２の説明を参照）の血漿サンプルの総コレステロールの濃度(mg/dl)対時間（日数）。
図５：ワクチン接種プロトコールにおけるウサギ（rb#1～#4、上記図２の説明を参照）の血漿サンプルのＨＤＬ－Ｃの濃度(mg/dl)対時間（日数）。
図６：70日後のNew Zealand白ウサギにおける非ＨＤＬ／ＨＤＬの比。対照のワクチン接種していないウサギ（Ｎ＝１）rb#4（白）とワクチン接種したウサギrb#1、２および３の平均（Ｎ＝３）（斜線）である。
図７：ワクチン接種プロトコールにおける70日後にヒトＣＥＴＰ－トランスジェニックマウスから採取した希釈血漿サンプル中の組換えＣＥＴＰに結合する抗ＣＥＴＰ抗体に対するＥＬＩＳＡに基づく450nmでの光学密度（O.D.）対血漿希釈度（半対数グラフ）。配列番号２のアミノ酸配列を有するワクチンペプチドを投与した各マウスのデータは、「＋」と実線で示す。各対照のマウスのデータは、「ｘ」と破線で示す。血漿希釈度は、1:10～1:1,000,000(1E+1～1E+6)の範囲であった。
図８Ａおよび８Ｂ：成熟ヒトＣＥＴＰの親水性、表面確率、抗原指数および両親媒性螺旋（図８Ａ）ならびに両親媒性シートおよび二次構造（図８Ｂ）。
図９：ＥＬＩＳＡに基づく、アテローム性動脈硬化症モデルの第Ｉ群および第II群由来の組換えヒトＣＥＴＰに対する抗体力価。405nmでのＯＤ対ウサギ血漿希釈度。
図１０Ａおよび１０Ｂ：ＥＬＩＳＡに基づく、アテローム性動脈硬化症モデルでのウサギＣＥＴＰに対するウサギ血漿抗体力価。ワクチン接種前の血漿（図１０Ａ）およびワクチン接種後の血漿（図１０Ｂ）であり、405nmでのＯＤ対ウサギ血漿希釈度を示す。
図１１：アテローム性動脈硬化症モデルでのワクチン接種前および後の動物における総コレステロール。総コレステロール(mg/dl)対日付および群を示す。
図１２：アテローム性動脈硬化症モデルでのワクチン接種前および後の動物におけるＨＤＬ－Ｃを示す。ＨＤＬ－Ｃ(mg/dl)対日付および群を示す。
図１３：コレステロールを補充した食餌に対するワクチン接種したウサギおよび対照のウサギのアテローム性動脈硬化症病変のある大動脈の全面積に対する平均割合（％）の棒グラフ。個々のデータ点（菱形）、病変のある大動脈面積の平均％（斜線の棒）、データ点の標準偏差（白の棒）、ｐ＜0.01は棒グラフ間の統計的有意差を示す。

発明の詳細な説明

上記したように、アテローム性動脈硬化症の危険性の減少は、ＬＤＬおよびＶＬＤＬの循環レベルが比較的低く、ＨＤＬレベルが比較的高いことと関連している。そのような循環リポタンパク質のレベルは、少なくとも一部は、内因性レベルのＣＥＴＰ活性によって直接影響を受ける。特に、高ＣＥＴＰ活性は、コレステリルエステルなどの中性脂肪のＨＤＬからＶＬＤＬおよびＬＤＬへの転移を促進する。従って、ＣＥＴＰは、循環系においてＬＤＬ、ＶＬＤＬおよびＨＤＬの相対レベルを変えるための、ヒトおよび他の動物における比較的正確な標的である（例えば、Tato, F.ら、Arteriosclero. Thromb. Vascular Biol., 15: 112-120(1995); Tall, A. R., J. Internal Med., 237: 5-12(1995)参照）。本発明は、個々の内因性ＣＥＴＰに対する免疫応答を促進するために有用なＣＥＴＰワクチンペプチドを提供することによる、内因性ＣＥＴＰ活性の制御に関し、それによって、アテローム性動脈硬化症の危険性の減少に関する生理学的条件、例えば高められたレベルのＨＤＬまたは低められたレベルのＬＤＬを促進する。さらに、本発明のワクチンペプチドを使用することによる、内因性ＣＥＴＰに対する免疫応答の促進により、アテローム性動脈硬化症の疑いのある組織における病変の進行に備え、予防し、または阻害することができる。

１．ＣＥＴＰ活性を調節するためのペプチドおよび組成物

本明細書で使用するＣＥＴＰワクチンペプチドとは、広域の（すなわち、範囲が広い）抗原ヘルパーＴ細胞エピトープのアミノ酸配列を含むヘルパーＴ細胞エピトープ部分、および中性脂肪結合および／または中性脂肪転移活性に関するＣＥＴＰのカルボキシル末端領域などのＣＥＴＰのＢ細胞エピトープのアミノ酸配列を含むＢ細胞エピトープ部分を含むペプチドである。該ＣＥＴＰワクチンペプチドは、抗原性である、すなわち内因性ＣＥＴ

Ｐに結合するペプチドに対して特異的な抗体の産生を引き出す。すなわち、本発明のＣＥＴＰワクチンペプチドは、内因性ＣＥＴＰに特異的に結合し、および／または内因性ＣＥＴＰ活性を阻害する抗体の生成を刺激する能力を有する、免疫原性成分である。

Ａ．ワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープ部分

本発明の組成物および方法に有用なペプチドは、ヘルパーＴ細胞エピトープ部分およびＢ細胞エピトープ部分を含む。ヘルパーＴ細胞エピトープ部分（簡単には「Ｔ細胞エピトープ部分」）は、少なくとも一つの広域抗原性（あるいは、広域免疫原性または範囲の広い）ヘルパーＴ細胞エピトープ（免疫原性担体ペプチドとも言う）から誘導されるアミノ酸配列を有し、それは、多主要組織適合遺伝子複合体（ＭＨＣ）ハプロタイプによって与えることができ、それにより、ヘルパーＴ細胞を活性化し、次いでＢ細胞の増殖および分化を刺激することができるペプチドまたはその誘導体として定義される。下記でさらに説明するように、本明細書に記載するワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分（また、ＣＥＴＰ関連ペプチド部分とも言う）は、中性脂肪結合および／または中性脂肪転移に関与する酵素ＣＥＴＰのカルボキシル末端領域の一部など、ＣＥＴＰタンパク質のＢ細胞エピトープを含むアミノ酸配列を有する。

ヒトのワクチン接種に対する免疫原性担体ペプチドとして使用されている、「広域」または「範囲の広い」抗原性ヘルパーＴ細胞エピトープと呼ばれるものの例は、当業者には周知である。これらには、例えば、破傷風毒素（tt）およびジフテリア毒素（dt）のエピトープが含まれる（例えば、Panina-Bordignon, P.ら, Eur. J. Immunol., 19: 2237-2242(1989)（広域破傷風毒素ヘルパーＴ細胞エピトープペプチドの解析）；Etlinger, H., Immunol. Today, 13: 52-55(1992); Valmori, D.ら、J. Immunol., 149: 717-721(1992)（候補の抗マラリアワクチンにおける広域ttエピトープの使用）；Talwar, G.P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8532-8536(1994)（抗ヒト慢性ゴナドトロピンワクチンにおける万能エピトープとしてのttおよびdtの使用）；Talwar, G.P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8532-8536(1994)を参照）。ttおよびdtの他に、本発明に有用な他のヘルパーＴ細胞エピトープ配列としては、百日咳菌ワクチン、カルメットーゲラン桿菌（ＢＣＧ）、ポリオワクチン、麻疹ワクチン、おたふくかぜワクチン、風疹ワクチンおよびツベルクリンの精製タンパク質誘導体（ＰＰＤ）から公知の抗原ペプチドから誘導されるものが挙げられる（例えば、Etlinger, H., Immunol. Today, 13: 52-55(1992)（参考として本明細書に組み入れる。）参照）。さらに、同一または種々の異なる広域抗原性ヘルパーＴ細胞エピトープの２個以上のコピーを互いに連結して、本発明のワクチンペプチドの多重または多価ヘルパーＴ細胞エピトープを形成することもできる。例えば、本発明のワクチンペプチドは、ttヘルパーＴ細胞エピトープおよびdtヘルパーＴ細胞エピトープのアミノ酸配列を含む多重または多価ヘルパーＴ細胞エピトープ部分を含むように合成することができる。

さらに、本発明のワクチンペプチドの免疫原性は、ヘルパーＴ細胞エピトープ部分を外因性ＣＥＴＰのペプチド配列またはＣＥＴＰに相同的な関連タンパク質に結合させることによりさらに高めることができる。そのような方法は、以前に、ヒト絨毛性ゴナドトロピンに対するヒトワクチンにおいて使用された（Talwar, G.P.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8532-8536(1994)参照；ヒト絨毛性ゴナドトロピンのβサブユニット由来のアミノ酸配列およびヒツジ黄体形成ホルモンのαサブユニットのアミノ酸配列の間に形成される異種二量体）。この方法で使用できるＣＥＴＰに関連するタンパク質の例としては、例えば、リン脂質転移タンパク質および好中球殺菌性タンパク質が挙げられる（Day, J.R.ら、J. Biol. Chem., 269: 9388-91(1994); Gray, P.W.ら、J. Biol. Chem., 264: 9505-9509(1989)参照）。

キーホールリンペットヘモシアニン（ＫＬＨ）などの他の免疫原性担体分子も、単独または他の広域抗原性ヘルパーＴ細胞エピトープと組み合わせて使用することができる。例えば、ＫＬＨは、そのアミノ酸配列に多重リシン残基を含む。これらのリシンの各々は、本明細書に記載するワクチンペプチドが結合する可能性のある部位である（例えば、マレイミドー活性化ＫＬＨ、カタログNo. 77106, Pierce, Rockford, IL）。そのような配列は

、ヘルパーＴ細胞エピトープ（すなわち、結合した多コピーのワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープと結合したＫＬＨアミノ酸配列のヘルパーＴ細胞エピトープ）およびＣＥＴＰのＢ細胞エピトープ（すなわち、ＫＬＨアミノ酸配列に結合した多コピーのワクチンペプチドにおけるＣＥＴＰのＢ細胞エピトープ）の両方に対してかなり多価であるワクチンペプチド集合体である。

最近、別の免疫原性担体分子であるMycobacterium tuberculosis由来のhsp70が、多重ＢおよびＴ細胞エピトープを含む特に効力のある抗原であることが示された(SuzueおよびYoung, Ｊ. Immunol., 156: 873-879(1996))。hsp70タンパク質は、標準的な架橋試薬によって本発明のワクチンペプチドに結合し、免疫原性を高めることができる。あるいは、本発明のワクチンペプチドをコードする核酸分子を、hsp70のアミノ末端に融合したワクチンペプチドから成る組換えタンパク質の発現を可能にする発現ベクターに挿入することができる。

好ましくは、本発明のワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープ部分は、広域抗原性ttまたはdtヘルパーＴ細胞エピトープを含む。より好ましい態様では、本出願のペプチドは、アミノ酸配列ＱＹＩＫＡＮＳＫＦＩＧＩＴＥ（配列番号２のアミノ酸２～15）およびＦＮＮＦＴＶＳＦＷＬＲＶＰＫＶＳＡＳＨＬＥ（配列番号３）を有する広域抗原性ttヘルパーＴ細胞エピトープを使用する。最も好ましくは、本発明のペプチドは、アミノ酸配列ＱＹＩＫＡＮＳＫＦＩＧＩＴＥ（配列番号２のアミノ酸２～15）を有する広域抗原性ttヘルパーＴ細胞エピトープを使用する。

上記したヘルパーＴ細胞エピトープの種々の例の他に、別のペプチドまたはタンパク質が本発明のワクチンペプチドのＴ細胞エピトープ部分に対するヘルパーＴ細胞エピトープとして有用であるかどうかは、クラスII（ヘルパー）Ｔ細胞エピトープに対する標準的な増殖アッセイを使用して決定できる（例えば、頁3.12.9～3.12.14, Current Protocols in Immunology, Vol. 1（Coliganら編）(John Wiley & Sons, Inc., New York, New York, 1994)。

Ｂ．ワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ（ＣＥＴＰ－関連）部分

本明細書に記載したワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分は、ワクチン接種した哺乳類に対して内因性のＣＥＴＰタンパク質の１個以上のＢ細胞エピトープ、または内因性ＣＥＴＰとは異なるが、内因性ＣＥＴＰと免疫学的に（抗体）交差反応するＣＥＴＰの１個以上のＢ細胞エピトープを含む。

本発明のワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分は、内因性ＣＥＴＰ活性を抑制する抗体を高めるためにワクチン接種すべき個々の内因性ＣＥＴＰの１個以上のＢ細胞エピトープを含み得る。しかし、本発明のワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分が、ワクチン接種すべき個々の内因性ＣＥＴＰと類似しているが同一ではないＣＥＴＰ分子のＢ細胞エピトープを含むことも本発明の範囲内である。そのような類似した、しかし同一ではないＣＥＴＰタンパク質のある種のＢ細胞エピトープは、ワクチン接種した個々の免疫応答を高めるエピトープを含み得る。一般に、内因性ＣＥＴＰと少なくとも約80%が相同であるアミノ酸配列を有するＣＥＴＰ分子は、本発明のワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分におけるＢ細胞エピトープ源として使用できる。例として、ウサギおよびヒトのＣＥＴＰタンパク質は、約80%のアミノ酸配列相同性を有する。成熟したウサギＣＥＴＰは、配列番号６のアミノ酸配列を有し、肝臓由来の成熟ヒトＣＥＴＰは、配列番号４のアミノ酸配列を有する。従って、本発明のワクチンペプチドのそのような態様の例では、Ｂ細胞エピトープ部分は、ウサギおよび／またはヒトＣＥＴＰの１個以上のＢ細胞エピトープを含み、そのようなワクチンペプチドは、ウサギまたはヒトにおいて使用して内因性ＣＥＴＰ活性を阻害することができる。

さらに、本発明のワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分は、少なくとも６個のアミノ酸配列の長さから成り、in vitroでのＴ細胞増殖を刺激するとしてもあまりしない、成熟ＣＥＴＰタンパク質（配列番号４）のアミノ酸配列の一部を含む。

好ましい態様では、本発明のワクチンペプチドは、ＣＥＴＰの２個以上の異なるＢ細胞エピトープを含む、本発明のワクチンペプチドの多価Ｂ細胞エピトープ部分を有する。その

ような多価ヘルパーＴ細胞エピトープ部分は、誘導された抗体が内因性ＣＥＴＰに結合し得る多重標的部位をもたらし、それによって、より広範な免疫複合体の生成、および／またはＣＥＴＰコレステリル転移活性を阻害する可能性を促進するので、特に好ましい。
さらに、ワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分は、内因性ＭＨＣクラスＩ分子によって与えられ得るＴ細胞エピトープも含むＢ細胞エピトープは含まないのが好ましい。ＣＥＴＰのそのようなＴ細胞エピトープは、ＭＨＣクラスＩの関係において肝細胞の表面上にもたらされ、細胞障害性Ｔ細胞反応を引き出し、それによって肝組織に障害を起こしうると考えられる。特定のＣＥＴＰ　Ｂ細胞エピトープがクラスＩのＴ細胞エピトープを含むかどうかは、標準的な細胞障害性Ｔ細胞アッセイ（例えば、頁3.11.4～3.11.7, Current Protocols in Immunology, Vol.1(John Wiley & Sons, Inc., New York, New York, 1994)を参照）を使用して決定できる。
別の態様では、本発明のワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分は、ヒトＣＥＴＰのカルボキシル末端の26アミノ酸（配列番号１）またはＣＥＴＰのカルボキシル末端の26アミノ酸領域の立体配置もしくは活性を保持したその断片（例えば、長さが少なくとも６個の連続したアミノ酸であり、ＣＥＴＰの特異的中性脂肪結合および／または特異的中性脂肪転移活性に関与するＣＥＴＰカルボキシル末端の断片）を含む。より好ましくは、本発明のワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ（またはＣＥＴＰ関連）部分は、長さが少なくとも11個の連続したアミノ酸であり、ＣＥＴＰのカルボキシル末端の26アミノ酸領域の立体配置を保持し、ＣＥＴＰの中性脂肪結合および／または転移活性に関与し、抗体結合を受けやすい、ＣＥＴＰのカルボキシル末端領域の断片を含む（例えば、Wang, S.ら、J. Biol. Chem., 267: 17487-17490(1992); Wang, S.ら、J. Biol. Chem., 268: 1955-1959(1003)参照）。さらに、ヒトＣＥＴＰの機能およびウサギＣＥＴＰの機能も阻害する、Mab TP2などのいくつかのMabがこの領域に対して生成しており、このことは、このエピトープがヒトおよびウサギＣＥＴＰタンパク質によって保存されることを意味する（Whitlockら、J. Clin. Invest., 84: 129-137(1989)）。これは、ヒトおよびウサギＣＥＴＰのカルボキシル末端の22アミノ酸が一つの位置でのみ異なる、すなわち配列番号４のヒトＣＥＴＰのアミノ酸配列の465の位置のグルタミン酸が、ウサギの配列（配列番号６；Nagahimaら、J. Lipid Res., 29: 1643-1649(1988)も参照）の相同的位置（485の位置）ではリシンで置き換えられていることにより確認される。
あるいは、Ｂ細胞エピトープ部分は、ＣＥＴＰの中性脂肪結合または転移活性をあまり変えない、または破壊しないアミノ酸の変化（欠失、付加または置換）を含む、ＣＥＴＰのカルボキシル末端の26アミノ酸領域の誘導体を含む（Wangら、同上(1992); Wangら、同上(1993)参照）。標的とされる内因性ＣＥＴＰのアミノ酸配列におけるそのような変化は、それらに限定されないが、一般に保存性アミノ酸置換として知られるもの、例えば、ＣＥＴＰ配列の１個のアミノ酸を、構造、電荷または疎水性が類似した別のアミノ酸で置換したものが挙げられる。中性脂肪結合及び／または転移活性を維持するが、in vivoまたはin situでの安定性が改善され、精製が改善され、または架橋部位（例えば、システイン－システインジスルフィド結合の生成による）を与える、ＣＥＴＰ配列に対する付加または置換も、本発明のワクチンペプチドの設計に有用である。
中性脂肪のＣＥＴＰ－媒介転移は、中性脂肪の結合（例えば、トリグリセリド、コレステリルエステル）を必ず必要とするので、中性脂肪結合に関与するＣＥＴＰのアミノ酸配列の部分も、本発明のワクチンペプチドの設計に有用である。本発明のワクチンペプチドの設計に使用されるＣＥＴＰのアミノ酸配列のいくつかの部分は、中性脂肪結合およびＣＥＴＰの実際の触媒中性脂肪転移部位に関与すると考えられる。最近の証拠は、ＣＥＴＰが、コレステリルエステルおよびトリグリセリドに対して個々の結合部位を含むことを示唆している（Melchior, G.W.ら、J. Biol. Chem., 270: 21068-21074(1995)）。従って、特定の脂肪結合部位に対するアミノ酸配列をワクチンペプチドに挿入することにより、その特定の脂肪とのＣＥＴＰ相互作用を調節する手段が与えられ、それにより、たとえＣＥＴＰに対して誘導された抗体が循環ＣＥＴＰのクリアランス（血清半減期の短縮）を促進しないとしても、抗アテローム発生性を促進すると考えられる。例えば、特にＨＤＬのトリ

グリセリド含量を調節するには、ＣＥＴＰのトリグリセリド結合領域から誘導されるＢ細胞エピトープを本発明のワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分に組み込むことができる。同様に、特にＨＤＬのコレステリルエステル含量を調節するには、ＣＥＴＰのコレステリルエステル結合領域から誘導されるＢ細胞エピトープを本発明のワクチンペプチドの設計に組み込むことができる。すなわち、そのようなワクチンペプチドは、ＣＥＴＰ上の特定の脂肪結合部位を阻止し、それによってＨＤＬとＣＥＴＰとの間で転移する特定の脂肪に影響を及ぼす抗体を誘導するように設計される。

また、長さが、タンパク質中の最小の大きさのエピトープである（例えば、Watsonら、Molecular Biology of the Gene,第４版、836頁（The Benjamin/Cummings Publishing Co., Inc., Menlo Park, CA, 1987)参照）少なくとも６個の連続したアミノ酸である、ＣＥＴＰのアミノ酸配列も有用であり、より好ましくは、長さが、ＣＥＴＰ遺伝子の天然に存在する多形性によってコードされるＣＥＴＰのカルボキシル末端の26アミノ酸領域の少なくとも11個の連続したアミノ酸である。

アミノ酸配列が既知のＣＥＴＰ分子は、そのアミノ酸配列の潜在的抗原モチーフを同定することができるアルゴリズムを使用して、潜在的Ｂ細胞エピトープの位置を分析することができる。例えば、親水性、表面確率、両親媒性螺旋、両親媒性シート、および二次構造のプロットの分析を組み合わせることにより（図８Ａおよび８Ｂ）、タンパク質のアミノ酸配列全体の抗原指数が誘導され、潜在的に本発明のワクチンペプチドに有用なＢ細胞エピトープを同定することができる。

ＣＥＴＰ分子の中性脂肪結合またはその中性脂肪転移に対する影響を試験する方法は当業者に周知である。例えば、Swenson, T.L.ら、J. Biol. Chem., 263: 5150-5157(1988)（脂肪結合に対するアッセイ）；Hesler, C.B.ら、J. Biol. Chem., 262: 2275-2282(1987)（脂肪転移に対するアッセイ）；Bisgaier, C.L.ら、J. Lipid Res., 34:1625-1634(1993)（ＣＥＴＰ媒介コレステリル転移活性アッセイにおける蛍光コレステリルエステル微小エマルジョンの使用）；Gaynor, B.J.ら、Atherosclerosis, 110: 101-109(1994)（ＣＥＴＰ脂肪転移に対するアッセイ）；Wangら、(1992)（ＣＥＴＰの欠失変異体の転移活性に対するアッセイ）；Wangら、(1993)（ＣＥＴＰのアミノ酸１個の変異体形のアッセイ）参照（以上、参考として本明細書に組み入れる。）。ＣＥＴＰの転移活性に対するアッセイは、市販もされている（例えば、Diagnescent Technologies(Yonkers, New York)製のＣＥＴＰ機能アッセイ）。

好ましくは、本発明のＣＥＴＰワクチンペプチドのＢ細胞エピトープ部分は、アミノ酸配列ＬＦＰＲＰＤＱＱＨＳＶＡＹＴＦＥＥＤＩ（配列番号８のアミノ酸16～34）および／またはアミノ酸配列ＦＧＦＰＥＨＬＬＶＤＦＬＱＳＬＳ（配列番号８のアミノ酸35～50）を含む。

Ｃ．ワクチンペプチドの産生

本発明のＣＥＴＰワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ（ＣＥＴＰ関連）部分を一緒に結合して免疫原成分を形成する。このヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分は、（例えば、ペプチド結合により）直接又は架橋分子によって共有結合させることができる。架橋分子が用いられる場合には、それらは、ワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分を、そのペプチドを毒性にすることなく、又はそのワクチンペプチドの全体的な免疫原性を大きく妨害したり低減させることなく、一緒に結合しなければならない。適切な架橋分子にはアミノ酸が含まれ、例えば、１以上のグリシン残基を用いて本発明のワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープとＢ細胞エピトープ部分との間に“グリシン橋”を形成させることができる。また、ヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分に付加されたシステイン残基間でジスルフィド結合を形成したり、あるいはグルタルアルデヒド（Korn, A.H.ら, J. Mol. Biol., 65: 525-529(1072)）及びEDC（ピアース(Pierce)、ロックフォード、IL）のような架橋剤分子又は他の二官能性架橋剤分子を用いてヘルパーＴ細胞エピトープ部分とＢ細胞エピトープ部分を結合させることも含まれる。二官能性架橋剤分子は２つの異なる反応性部位を有する。これらの反応性部位の一方はヘルパーＴ細胞エピトープ部分の官能

基と反応して共有結合を形成することが可能であり、他方の反応性部位はＢ細胞エピトープ部分の官能基と反応して別の共有結合を形成することが可能であって、これにより２つの部分を一体化する。分子同士を架橋する一般的な方法はMeans及びFeeneyによって論評されている（Bioconjugate Chem., 1: 2-12(1990)）。

ホモ二官能性架橋剤分子は化学的に同一の２つの反応部位を有する。ホモ二官能性架橋剤分子の例には、グルタルアルデヒド；N, N’－ビス（３－マレイミド－プロピオニル）－２－ヒドロキシ－1, 3－プロパンジオール（スルフヒドリル特異的ホモ二官能性架橋剤）；いくつかのN－スクシンイミドエステル、例えば、ジスクシンイミジルスベレート及びジチオ－ビス－（スクシンイミジルプロピオネート）並びにそれらの可溶性ビススルホン酸及び塩（例えば、ピアース・ケミカル社（Pierce Chemicals）、ロックフォード、イリノイ州；シグマ・ケミカル社（Sigma Chemicals Co.）、セントルイス、ミズーリ州から入手可能）が含まれる。この態様については、ヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分の相対濃度を調整して、一緒に結合されるヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分の数を最大にし、かつ同一のエピトープ部分が互いに結合するのを最小とするようにすべきである（すなわち、例えば、ヘルパーＴ細胞エピトープ－ヘルパーＴ細胞エピトープホモダイマー又はＢ細胞エピトープ－Ｂ細胞エピトープホモダイマーの形成を避けるようにする）。

好ましくは、二官能性架橋剤分子はヘテロ二官能性リンカー分子であり、これはそのリンカー分子がＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープに別々に共有結合することが可能な少なくとも２つの反応性部位を有することを意味する。このようなヘテロ二官能性リンカー分子の使用は、そのリンカー分子の反応性部位の各々を、ワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞及びＢ細胞エピトープ部分へ化学的に別個に段階的に付加（ベクトル結合）することを可能にする。ヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分を一緒に結合させるために用いることができるヘテロ二官能性架橋剤分子には、m－マレイミドベンゾイル－N－ヒドロキシスクシンイミドエステル（Green, N.ら, Cell, 28: 477-487(1982);Palkerら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 2479-2483(1987)を参照）；m－マレイミド－ベンゾイルスルホスクシンイミドエステル；γ－マレイミド酪酸N－ヒドロキシスクシンイミドエステル；及びN－スクシンイミジル3－（2－ピリジル－ジチオ）プロピオネート（Carlsson, J.ら, Biochem. J., 173: 723-737(1978)を参照；シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリ州）などがある。

さらに、ヘルパーＴ細胞及びＢ細胞エピトープ部分は、血清アルブミン又は樹脂もしくはポリマービーズのような共通の担体分子に結合させることが可能である。ヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分の共通の担体への結合は、グルタルアルデヒド又は他の二官能性架橋剤分子（上記参照）のような架橋剤分子を用いて達成することができる。この態様については、ヘルパーＴ細胞エピトープ部分、Ｂ細胞エピトープ部分及び共通の担体分子の相対濃度を調整して、共通の担体に結合されるヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分の数が最大となり、かつ同一分子同士の結合（すなわち、ホモダイマーの形成）並びにヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分の互いとの結合（すなわち、ヘテロダイマーの形成）がどちらも最小となるようにすべきである。ヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分の別の分子又は表面（例えば、樹脂又はポリマービーズの表面）への結合は、普遍抗原性ヘルパーＴ細胞エピトープ部分又はＢ細胞エピトープ（ＣＥＴＰ関連）部分配列の免疫原性を大きく壊滅させ、又は低減させるべきではない。このような二官能性架橋剤分子を用いる正味に効果は、ワクチンペプチドの多コピー数のヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分が免疫応答及び内因性ＣＥＴＰに結合する抗体の産生を増強し得る共通の担体に結合することにある。

多抗原性ペプチド（multiple antigenic peptide:MAP）配列も非常に有効な抗原及び免疫原であることが示されている（例えば、Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5409-5413(1988);Wang, C. Y.ら, Science, 254: 285-288(1991);Marguerite, M.ら, Mol. Immunol., 29: 793-800(1992)を参照）。ここに説明されるワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分が共通のコア分子に結合するこのMAP技術

は、内因性ＣＥＴＰに対する抗体を誘発する多価ペプチドアセンブリーを作製する別の方法を提供する。
好ましくは、本発明のワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ部分は、末端と末端とを共有結合的に結合させて連続ペプチドを形成させる。より好ましくは、選択された普遍抗原性のヘルパーＴ細胞エピトープ部分がワクチンペプチドのアミノ末端部を形成し、そのカルボキシル末端アミノ酸残基がそのワクチンペプチドの選択されたＣＥＴＰ関連アミノ酸配列（Ｂ細胞エピトープ部分）のアミノ末端アミノ酸にペプチド結合で共有結合される。しかしながら、その逆の順序を用いることも可能であり、すなわち、本発明のワクチンペプチドのＣＥＴＰ関連アミノ酸配列（Ｂ細胞エピトープ部分）がワクチンペプチドのアミノ末端領域を形成するように位置し、普遍抗原性ヘルパーＴ細胞エピトープ又は免疫原性担体アミノ酸配列がそのワクチンペプチドのカルボキシル末端部を構成していてもよい。
本発明のワクチンペプチドは、それらを多コピー数の補体タンパク質C3dに共有結合させることによって、より免疫原性を高めることができる（Dempseyら, Science, 271: 348-350(1996)）。あるいは、ワクチンペプチドを、補体を活性化してC3dと共有結合するようになる炭水化物構造により誘導体化してもよい（Fearonら, Science, 272: 50-54(1996)）。例えば、ある種の変異体チャイニーズハムスター卵巣宿主細胞において発現されたタンパク質は特定の炭水化物構造によりグリコシル化され得る（Stanley, Mol.Cell. Biol., 9: 377-383(1989)）。最近、C3dは、強い免疫応答を誘導する獲得免疫系による抗原の認識を高めることが実証されている（Dempseyら、1996）。
本発明のペプチドは、規定されたアミノ酸配列を有するペプチドを産生することが当該技術分野において知られているあらゆる利用可能な方法によって得ることができる。例えば、自動ペプチドシンセサイザー（例えば、アプライド・バイオシステムズ（Applied Biosystems）によるシナジー^{TM}ペプチドシンセサイザー（Synergy^{TM} Peptide Synthesizer）；アビメド（Abimed）、ランゲンフェルト、ドイツによるAMS422）に用いることにより、当業者は自動ペプチド合成を利用することが可能である。このような要望通りのペプチドの合成は、多くの商業ペプチド合成サービス企業、例えば、クォリティ・コントロールド・バイオケミカルズ社（Quality Controlled Biochemicals, Inc.）（ホプキントン、マサチューセッツ州）；キロン・ミモトペス・ペプチド・システムズ（Chiron Mimotopes Peptide Systems）（サンディエゴ、カリフォルニア州）；ベイケム・バイオサイエンス社（Bachem Bioscience, Inc.）（フィラデルフィア、ペンシルバニア州）；セバーン・バイオテク社（Severn Biotech Ltd.）（キドミンスター、イギリス）により商業的サービスとして行われている。
これとは別に、本発明のペプチドは合成及び組換え核酸技術を用いて産生させることも可能である。例えば、当業者は、既知の遺伝子コードから本発明のペプチドをコードする5’から3’の核酸配列を設計することができる。ヒト肝臓に由来する成熟ＣＥＴＰのアミノ酸配列は知られており（配列番号4）、その対応ＤＮＡ配列（配列番号5）も既知である（Draynaら, Nature, 327: 632-634(1987)を参照）。さらに、様々な広域の、すなわち「普遍」Ｔ細胞エピトープのアミノ酸配列も既知である（例えば、Panina-Bordignonら, Eur. J. Immunol., 19: 2232-2242(1989), Etlingerら(1990), Pillaiら, Infect. Immun., 63: 1535-1540(1995)を参照）。
ヘルパーＴ細胞エピトープ及び１以上の選択されたＢ細胞エピトープ部分のコーディング配列（及び、所望であれば、ポリグリシンのような架橋性ペプチド、又はアミノ及び／又はカルボキシル末端システインのような他の追加の残基（１個もしくは複数））を含むＤＮＡ分子は、自動ＤＮＡシンセサイザー（例えば、オリゴ1000ＤＮＡシンセサイザー、ベックマン社（Beckman Corp.））を用いて、又は商業的ＤＤＡ合成サービス（例えば、ジェンセット社（Genset Corp.）、ラホラ、カリフォルニア州）と契約することにより容易に合成することができる。その後、合成されたＤＮＡ分子を、当該技術分野において利用可能な標準法（例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)）を用いて

、及び／又は特定の市販遺伝子発現系（例えば、pPROEX^{TM}－1細菌細胞発現系；SFV真核細胞発現系；BAC－TO－BAC^{TM}バキュロウイルス発現系；ライフ・テクノロジース社（Life Technologies, Inc.）、ガイザースブルグ、メリーランド州）の製造業者が指示する通りに、多種多様な入手可能な遺伝子発現系のいずれか（例えば、細菌性プラスミド；バクテリオファージ発現ベクター、レトロウイルス発現ベクター、バキュロウイルス発現ベクター）に挿入することができる。次に、発現したペプチドを、ペプチド精製の標準法を用いて発現系から単離する。本発明のペプチドの精製は、本発明のワクチンペプチドの特定のヘルパーＴ細胞エピトープ又はＢ細胞エピトープ（ＣＥＴＰ関連部分）アミノ酸配列に対する抗体の使用に基づくアフィニティクロマトグラフィー又は免疫沈澱を使用することにより促進することが可能である。例えば、Mab TP2はヒトＣＥＴＰのカルボキシル末端の26アミノ酸と結合し、精製スキームにおける１以上のイムノアフィニティ工程において有用であり得る（Hesler, C. B.ら, J. Biol. Chem., 263: 5020-5023(1988)）。

もちろん、特定のワクチンペプチドのＴ細胞及びＢ細胞エピトープの各々をコードするＤＮＡ分子を入手することができる場合には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を含む標準組換え核酸法を用いてワクチンペプチドをコードする組換え核酸分子を生成することが可能である。このような組換え核酸分子は、適切な宿主細胞にトランスフェクト又は形質転換して培養物中にワクチンペプチドを発現させることが可能な様々な発現ベクターのいずれかに挿入することができる（例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3(Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989)を参照）。例えば、肝臓に由来する成熟ヒトＣＥＴＰをコードするＤＮＡ配列は配列番号5のヌクレオチド配列を有し、成熟ウサギＣＥＴＰをコードするＤＮＡ配列は配列番号7のヌクレオチド配列を有する。これらのＣＥＴＰタンパク質の各々の様々なＢ細胞エピトープをコードする特定の配列を、選択されたＴ細胞エピトープ（１つもしくは複数）をコードするヌクレオチド配列と再結合させ、適切な宿主細胞において発現させるために発現ベクターに挿入することができる。

ワクチンペプチドの産生に用いることができる組換えプラスミドの例は、CMVプロモーターが配列番号9：MQYIKANSKFIGITERFPRPDGREAVAYRFEEDIFGFPKHLLVDFLQSLSのアミノ酸配列を有するワクチンペプチドをコードする配列の転写を指示するプラスミドpCMV－ＣＥＴＰ／TTである。ここでは、アミノ末端のメチオニンが破傷風毒素Ｔ細胞エピトープ（配列番号2のアミノ酸2～15）及びウサギＣＥＴＰに由来する２つのＢ細胞エピトープ（配列番号6のアミノ酸350～368及び481～496）に結合されている。プラスミドpCMV－ＣＥＴＰ／TTはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC、ロックビル、MD）に寄託され、受託番号98038を指定されている。

好ましい態様において、本発明のペプチドは、ペプチドをそれ自体に結合もしくはカップリングしてワクチンペプチドの二量体を形成すること、又は担体もしくは架橋剤分子のような他の分子に結合もしくはカップリングすることに用いるため、本発明のワクチンペプチドのヘルパーＴ細胞エピトープ部分のアミノ末端アミノ酸に共有結合的に結合されたアミノ末端システイン、又は他の残基も含む。より好ましくは、本発明のワクチンペプチドはアミノ酸配列CQYIKANSKFIGITEFGFPEHLLVDFLQSLS（配列番号2）を有する。ＣＥＴＰの少なくとも２つのＢ細胞エピトープを有する本発明のワクチンペプチドがさらに好ましい。そのようなワクチンペプチドの例は配列CQYIKANSKFIGITELFPRPDQQHSVAYTFEEDIFGFPEHLLVDFLQSLS（配列番号8）を有する。

Ｄ．ワクチンの調製

本発明のペプチドは、ＣＥＴＰに特異的に結合し、及び／又は内因性ＣＥＴＰ活性を調節（すなわち、低減もしくは抑制）する内因性抗体の産生を誘発するワクチンの調製に用いられる。本発明の抗ＣＥＴＰワクチンは、１種もしくは数種の異なる本発明のペプチドを含む。例えば、異なるヘルパーＴ細胞エピトープ部分（例えば、異なる普遍ヘルパーＴ細胞エピトープ）及び／又は異なるＢ細胞エピトープ部分（例えば、ＣＥＴＰのカルボキシル末端の26アミノ酸を有する異なるＣＥＴＰ関連部分）を有するペプチドを組み合わせ、単一のワクチン組成物として投与することができる。

ミョウバンのような薬学的に許容し得るアジュバントをここに記載されるワクチンペプチドと混合して本発明のワクチンを調製することができる。ミョウバンは、ヒトへのワクチン投与において現在使用が認められている唯一のアジュバントである（Eldrige, J. H.ら, In Immunobiology of Proteins and Peptide V: Vaccines: Mechanisms, Design, and Applications, Atassi, M. Z.編（Plenum Press, New York, 1989),192頁を参照）。近年、ミョウバンが、リポ多糖のナトリウムフタリル誘導体と組み合わせて、ヒト絨毛性ゴナドトロピンに対して有効であることが示されたワクチンをヒトに投与するために用いられた（Talwar, G.P.,ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:8532-8536(1994)を参照）。

他の貫用のアジュバントも、それらが特定の用途について承認される限り、用いることができる。例えば、ポリ（DL－ラクチド－コ－グリコリド）から構成された生分解性微小球がワクチンの経口又は非経口投与のためのアジュバントとして研究されている（Eldrige, J. H.ら, In Immunobiology of Proteins and Peptide V: Vaccines: Mechanisms, Design, and Applications, Atassi, M. Z.編（Plenum Press, New York, 1989), 191-202頁）。

他のアジュバントが非ヒトの動物へのワクチンの投与に用いられている。例えば、フロイント完全アジュバント（シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリ州）、フロイント不完全アジュバント（シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリ州）、及びRIBI^{TM}アジュバント・システム（RAS；RIBIイムノケム・リサーチ社（ImmunoChem Research, Inc.）、ハミルトン、モンタナ州）が、ヒト以外の動物に抗原を投与するのに日常的に用いられる公知のアジュバントである。加えて、アジュバント構造を、本発明のペプチドと混合したり、又は、好ましくは、本発明のペプチドに、例えばそのペプチドのアミノもしくはカルボキシル末端アミノ酸残基に、共有結合的に組み込むこともできる。そのような組込まれるアジュバントとしては、本発明のペプチドのアミノ末端での親油性N－パルミトイル－S－［2, 3－ビス（パルミトイルオキシ）－プロピル］－システイン（“Pam_3－Cys－OH”）；Pam_3－Cys－Ser－Lys_4及びPam_3－Cys－Ser－Glu_4のような両親媒性水溶性リポペプチド；N－アセチル－グルコサミニル－N－アセチルムラミル－アラニル－D－イソグルタミン（“GMDP”）、ムラミルジペプチド、及びアラニル－N－アダマンチル－D－グルタミンのようなグリコペプチド；並びにin vitro化学合成の間に容易にペプチドに結合させることが可能なポリアミドゲルベースのアジュバントがある（Synthetic Vaccines, Nicholson, B. H.編（Black well Scientific Publications, Cambridge, Massachusetts, 1994）, pp.236-238を参照）。

加えて、本発明のワクチンペプチドを、このペプチドの免疫原性を高め得る他の分子に結合させることができる。例えば、本発明のペプチドを血清アルブミンのような大分子の表面に結合させると、このワクチンペプチドのエピトープが隣接する複数の繰り返しコピーとして個体の免疫系に提示されることから、免疫原子が増強される（例えば、Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5409-5413(1988);Wang, C.Y.ら, Science, 254: 285-288(1991);Marguerite, M.ら, Mol. Immunol., 29: 793-800(1992)を参照）。このような本発明のワクチンペプチドの「多重」又は「多価」配置は、架橋剤分子を用いて作製することができる（上記参照）。例えば、上述のように、二官能性架橋剤分子は２つの反応性部位を有し、それらの部位の一方は該リンカーを本発明のワクチンペプチドに結合させることができ、他方の部位は異なる分子、例えば、血清アルブミンのような大タンパク質又は樹脂もしくはポリマービーズとの反応に利用することができる。このように、共有結合性架橋剤分子を用いて、ワクチンペプチドを他のタンパク質又は基質に結合させ、このペプチドの多コピー配置（多コピーペプチドアセンブリー）を形成することができる。

本発明のワクチンペプチドの別の分子又は表面への結合は、このワクチンペプチドの結合されたヘルパーＴ細胞エピトープ及びＢ細胞エピトープ（ＣＥＴＰ関連）部分の免疫原性を大きく壊滅又は低減しないような方法で行うべきである。このようなリンカー分子の使用は、例えば、結合していないワクチンペプチドを個体に投与する場合よりもすみやかな抗ＣＥＴＰ抗体力価の上昇及び／又は高親和性の抗ＣＥＴＰ抗体の産生によって立証されるように、本発明のワクチンペプチドの免疫原性を高めることが好ましい。このような架

橋剤分子は、特異的抗腫瘍抗体を産生させる上で有効な免疫原性増強剤として役立つことが示されている（例えば、Tao, M. H.ら, Nature, 362: 755-758(1993)）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM－CSF）のような「免疫原性増強剤」分子に本発明のペプチドを結合させるのに用いることもできる。別のこのような免疫原性増強剤はキーホールリンペットヘモシアニン（KLH）である（Ada, G. L., In Fundamental Immunology, third edition, W. E. Paul編（Raven Press Ltd., New York, 1993）, pp. 1309-1352を参照）。上述のように、KLHを用いる多価配置の例は、ジスルフィド結合の形成によるKLH分子の幾つかのシステイン残基のいずれかへのワクチンペプチドの結合である。

２．ワクチンペプチドの使用

ワクチンを投与及び試験する一般的な方法は当業者に公知である（例えば、Talwar, G. P.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8532-8536(1994)を参照）。本発明のペプチドは、とりわけ、単独で、又は１以上の薬学的に許容し得る担体もしくはアジュバンドと共に、ワクチン受容者の内因性ＣＥＴＰに対する抗体応答を誘発するワクチンとして投与するように設計されている。本発明の幾つかの態様においては、このワクチンペプチドは他の疾患又は障害用のワクチンと組み合わせて投与することもできる。

内因性ＣＥＴＰに対する免疫応答は、有意にＣＥＴＰの活性を抑制し、ＣＥＴＰの血清半減期を変更し、免疫複合体の形成を介してＣＥＴＰのクリアランスを誘起し、ＨＤＬコレステロールの輸送を変更し、リポタンパク質のコレステロール含量の平衡を移動させ、コレステロール異化作用を変更し、及び／又はアテローム性動脈硬化症病変の発生を低減するはずである。LDL、VLDL及び／又はＨＤＬレベルの制御は、これらのレベルが心臓血管性疾患のリスクの低下又はそのような疾患のさらなる進行の抑制と相関することから、心臓血管性疾患の治療における許容された指標又は終末点である（Mader, S. S., In Human Biology, 4th ed., pp. 83, 102（Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, Iowa, 1995））。したがって、本発明による所望の予防又は治療効果は、個体においてＣＥＴＰに結合する及び／又はＣＥＴＰ活性を抑制する抗体を誘発することにより、又は内因性ＣＥＴＰに対する抗体の力価の上昇に伴うＨＤＬレベルと比較したLDL及び／又はVLDLレベルの相対的な減少により、又は抗ＣＥＴＰ抗体の産生に伴う循環ＨＤＬの絶対レベルの上昇により、又は心臓血管組織におけるアテローム性動脈硬化症病変の発生の抑制もしくは減少により立証される。

ここに示されるように、アテローム性動脈硬化症のウサギモデルにワクチンペプチドを投与すると、コレステロールを補給した餌を与えた動物においてアテローム性動脈硬化症プラークの発生が大いに低減した。この証拠により、内因性ＣＥＴＰに対する抗体を誘発するためのワクチン接種がアテローム性動脈硬化症を治療又は予防する有用な方法であり得ることがわかる。これは、ＣＥＴＰに対する免疫応答の誘発がアテローム性動脈硬化症の発症を抑制し得ることの最初の証拠である。

このように内因的に産生された個体自身のＣＥＴＰに対する抗体は、他の可能性のある治療アプローチよりも有利である。例えば、近年ヒヒから単離されたもの（例えば、WO93／11782; Kushwaha, R. S.ら, J. Lipid Res., 34: 1285-1297(1993); Genetic Engineering News, 14: 44(1994); Science, 262: 1974-1975(1993)を参照）のようなＣＥＴＰのポリペプチド阻害剤の使用、又はＣＥＴＰ活性を阻害する外因的に産生された（外来）抗ＣＥＴＰ抗体の注入は、いずれも、そのような外来のＣＥＴＰ阻害分子に対する免疫応答を誘発するように思われる。そのような免疫応答は、その外因的に供給されたＣＥＴＰ阻害剤を急速に不活性化し、及び／又は体内から一掃するだろう。理論的には、そのような外因的に供給されたＣＥＴＰ阻害剤に対する免疫応答は、その阻害剤の用量を増加させて投与することにより克服することができるだろう。しかしながら、外来ＣＥＴＰ阻害剤の用量の複数回投与、特に、そのような外来分子の常に増加する量の複数回投与は、治療中の個体の健康を危険にさらす過敏反応の可能性を提示する。外因的に産生されたＣＥＴＰ阻害剤を用いることに関連したそのような問題は、個体自身の免疫系抗体を集めて内因性ＣＥＴＰを特異的に阻害する本発明のペプチドベースのワクチンを用いることにより回避される。反復投与、段階的投与、及び（ヒト抗マウス抗体（HAMA）応答のような）望ましく

ない副作用は、ここに記載される抗ＣＥＴＰワクチンアプローチを用いることにより回避される。

本発明のＣＥＴＰワクチンペプチド組成物は、腹腔内、腹膜間、皮内（皮下）、筋肉内、静脈内のような非経口又は経口を含む、ワクチン接種に用いられるいかなる経路によっても投与することができる。好ましくは、本発明のワクチンは非経口投与、例えば、腹腔内、腹膜間、皮内、筋肉内、又は静脈内投与する。ワクチンペプチドの経口投与が望まれる場合には、例えば、セービン経口ポリオワクチンにおいて用いることが認可されている溶液のような、薬学的に許容し得る経口賦形剤を本発明のワクチンペプチドと混合することができる。破傷風ワクチンのような特定の他のワクチンと同様に、内因性ＣＥＴＰの調節又は阻害の所望のレベルを維持するためにＣＥＴＰワクチンペプチド組成物の予備の追加免疫投与が必要となることがある。上述のように、ポリ（DL－ラクチド－コ－グリコリド）から構成されるような生分解性微小球は、有効なワクチン送達及び経口もしくは非経口経路による免疫化に有用であることが示されている（Eldridge, J. H.ら, In Immunobiology of Proteins and Peptides V: Vaccines: Mechanisms, Design, and Application, Atassi, M. Z.編（Plenum Press, New York, 1989）, pp. 191-202）。

本発明のペプチドワクチンの適切な投与量は、過敏反応、紅斑、硬化、圧痛のような潜在的な禁忌症の監視を含めて、そのワクチンが影響を及ぼすことが提案されている多くのパラメータに基づいて、当該技術分野において用いられる一般的なワクチン方法論によって確立される（例えば、Physician's Desk Reference, 49th ed., (Medical Economics Data Production Co., Mont Vale, New Jersey, 1995）, pp. 1628, 2371（Ｂ型肝炎ワクチンについて言及）, pp. 1501, 1573, 1575（はしか、おたふく風邪、及び／又は風疹ワクチンに言及）, pp. 904, 919, 1247, 1257, 1289, 1293, 2363（ジフテリア、破傷風及び／又は百日咳ワクチンに言及）; Talwar, G. P.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8532-8536(1994)を参照）。ヒトのワクチン接種の通常かつ伝統的なアプローチは、特定のワクチンの初期用量を投与して免疫系を感作した後、そのワクチンの１回以上の「追加免疫（ブースター）」用量を投与してワクチンの初期投与（ワクチン接種）によって感作された免疫系による既往応答を誘発することである。このような「一次及び追加免疫」投与法は公知であり、例えば、はしか、ポリオ、破傷風、ジフテリア、及びＢ型肝炎ワクチンの開発及び使用におけるように、当該技術分野において通常用いられる。

個体に最初に投与されるワクチンペプチドの量は、ワクチン接種の前に個体内に存在する内因性ＣＥＴＰ活性のおおよそのレベルを中和するのに必要な量であってよく、その個体からの血清又は血漿サンプル中のＣＥＴＰ活性を測定することにより決定することができ、例えば、市販のＣＥＴＰアッセイ（例えば、ダイアグネッセント・テクノロジース社（Diagnescent Technologies, Inc.）、ヨンカース、ニューヨーク州）を用いて決定される。ワクチンペプチドの投与の後に総ＨＤＬ又はＨＤＬ－Ｃのレベルの測定可能な増加が見られるかどうかを決定するために、市販のアッセイ（例えば、ワコー・ケミカルズＵＳＡ社（Wako Chemicals USA, Inc.）、リッチモンド、バージニア州から入手可能）を用いて、ワクチン接種した個体からの血漿又は血清サンプルをモニターすることもできる。循環抗ＣＥＴＰ抗体の濃度（力価）の増加は、血漿又は血清サンプル中で、例えばELISA検定を用いて測定することが可能である（例えば、実施例3を参照）。したがって、最初に抗ＣＥＴＰ抗体の増加がＨＤＬもしくはＨＤＬ－Ｃのレベルの増加、又はＣＥＴＰ活性の低下と相関するかどうかを確立することが可能であり、かつ推奨される。その後は、抗ＣＥＴＰ抗体の力価の上昇をモニターして十分な投与量のワクチンペプチドが投与されているかどうか、又は抗ＣＥＴＰ抗体のレベルの増加を誘発するために「追加免疫」用量が指摘されているかどうかを決定することだけが必要である。これは、Ｂ型肝炎ウイルスに対するワクチン接種のような、様々な確立されたワクチン接種に関しての通常の手順である。

三次元動脈画像診断法が現在利用可能であり、これは個体における動脈の病変の同定並びにそれらの発症及び退行のモニターに用いることが可能である（例えば、McPherson, Scientific American Science ' Medicine, pages 22-31,（March/April, 1996）を参照）。したがって、そのような画像診断法を本発明のペプチドを用いるワクチン接種の有効性を

モニターするのに用いることができる。
本発明のより完全な理解及びそれらの利点は以下の非限定的な実施例から得ることができる。
実施例
実施例１．抗ＣＥＴＰワクチンペプチドの設計及び合成
内因性ＣＥＴＰに対する抗体応答の誘発の可能性を調べるため、普遍的な破傷風毒素ヘルパーＴ細胞エピトープを含むヘルパーＴ細胞エピトープ部分及びヒトＣＥＴＰのカルボキシル末端領域を含むＢ細胞エピトープ部分を有するペプチドを調製した。アミノ酸配列CQYIKANSKFIGITEFGFPEHLLVDFLQSLS（配列番号2）を有する31アミノ酸のペプチドを設計した。このうち、QYIKANSKFIGITE（配列番号2のアミノ酸2～15）は破傷風毒素タンパク質のアミノ酸830～843と同じアミノ酸配列であり、FGFPEHLLVDFLQSLS（配列番号2のアミノ酸16～31）は、ヒトＣＥＴＰの中性脂肪転移ドメインを含み、かつ抗ヒトＣＥＴＰモノクローナル抗体TP2によって認識されることが知られている（Wang, S.ら, J. Biol. Chem., 267: 17487-17490(1992); Wang, S.ら, J. Biol. Chem., 268: 1955-1958(1993)）配列番号4のアミノ酸461～476と同じアミノ酸配列であり、そしてアミノ末端システイン（C）残基は所望によりこのペプチドをそれ自体との、又は、他の分子との結合において用いるために存在する。この合成ペプチドのＣＥＴＰ関連部分は、ウサギＣＥＴＰのアミノ酸配列の対応部分とはグルタミン酸（E）残基のみが異なる（Nagashima, M.ら, J. Lipid Res., 29: 1643-6149(1988)（ウサギＣＥＴＰ遺伝子のクローン化）を参照）。しかしながら、従来の研究は、抗ヒトＣＥＴＰモノクローナル抗体がこのウサギＣＥＴＰの対応領域を認識できることを示している（Hesler, C. B.ら, J. Biol. Chem., 263: 5020-5023(1988)を参照）。このペプチドを、クォリティ・コントロールド・バイオケミカルズ社（ホプキントン、マサチューセッツ州）による標準ペプチド合成法を用いて要望通りに合成した。
実施例２．内因性ＣＥＴＰに対するウサギの免疫感作
上記実施例１の合成ワクチンペプチド（配列番号2）を、内因性ウサギＣＥＴＰに対する免疫応答を誘発するこのワクチンペプチドの能力を試験するためにニュージーランドシロウサギに注射した。第I群は3匹のウサギ（rb＃1－＃3）を含み、これらの各々にはワクチンペプチドの投与プロトコルを施した。第II群は1匹のウサギ（rb＃4）を未処理の対照として含んでいた。
ウサギにおけるワクチンペプチドの試験の一般的なプロトコルを図１に示す。1日目に、ペプチド（100μg）をRIBI™アジュバント系（RIBIイムノケム・リサーチ社、ハミルトン、モンタナ州）に製造者の指示に従って懸濁して最終容量1000μlとし、第I群のウサギの各々に、2ヶ所の筋肉内部位（部位当り250μl）に、2ヶ所の皮下部位（部位当り100μl）に、及び6ヶ所の皮内部位（部位当り50μl）に注射した。28日目に、１回の追加免疫（RIBI™アジュバント系にペプチド100μg）を1日目と同様に投与した。56日目に、もう１回の追加免疫（RIBI™アジュバント系にペプチド100μg）を1日目と同様に投与した。
対照ウサギrb＃4については予備採血しないことを除いて、各初期注射の前（「予備採血」）並びに42日、70日、及び108日目に各ウサギの耳から血液サンプル（約1～約5ml）を採取した。血漿から細胞性成分を分離するための標準遠心法により血漿サンプルを調製した。血漿サンプルを－70℃で保存した。第I群及び第II群の両者の血漿サンプルを、抗ＣＥＴＰ抗体の存在及び力価の増加について、並びに総血漿コレステロール及び血漿ＨＤＬ－Ｃレベルについて分析した。
実施例３．ワクチン接種ウサギにおける抗ＣＥＴＰ抗体の産生
抗ＣＥＴＰ抗体の力価測定のための直接ELISA
サンドイッチ酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）を用いて抗ＣＥＴＰ抗体を含有する血漿サンプルの力価を測定した。この構成では、組換えヒトＣＥＴＰ（コロンビア大学の受託機関（ニューヨーク、ニューヨーク州）からライセンスを受けた組換えCHO細胞系CHO（AT）から得られるヒトｒ ＣＥＴＰ）をマイクロタイター皿のウェルに吸着させ、第I群及び第II群のウサギに由来するウサギ血漿の様々な希釈物を各ウェルに加えた。NUNCマキシソルブ（NUNC Maxisorb）96ウェルプレートの各ウェルは、PBS中のヒトｒ ＣＥ

ＴＰの1μg／ml溶液100μlに4℃で一晩さらすことによりコーティングした。非特異的結合は、PBS及び0.05％ツィーン中のBSAの1％溶液を各ウェルに添加し、150rpmの回転振盪器上で室温（20°～22℃）で2時間インキュベートすることによりブロックした。その後、ウェルをELISA洗浄バッファ（PBS＋0.05％ツィーン）で4回洗浄した。次に、血漿サンプルを希釈バッファ（PBS中の1％BSA）で1：10に希釈した後、同じバッファで2倍段階希釈を６回行った。希釈サンプル（100μl）をウェルに加え、150rpmの回転振盪器上で室温で2時間インキュベートした後、ELISA洗浄バッファ（PBS＋0.05％ツィーン）で4回洗浄した。結合した抗ＣＥＴＰ抗体を検出するため、希釈バッファ中のホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標準ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン（サザーン・バイオテクノロジー・アソシエーツ社（Southern Biotechnology Associates, Inc.）；バーミンガム、アラバマ州）の1：10,000希釈液100μlを添加し、プレートを150rpmの回転振盪器上で室温で2時間インキュベートした。その後、ウェルをELISA洗浄バッファ（上記参照）で4回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質TMB（TMBペルオキシダーゼ基質、カーグガード＆ペリー・ラボラトリーズ社（Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.）、ガイザースバーグ、メリーランド州）を添加してプレートを室温で30分間インキュベートした。光学密度の変化を、ELISAリーダー（例えば、E－max、モレキュラー・デバイス社（Molecular Device Corp.）、メンロパーク、カリフォルニア州）を用いて、450nmで分光光度的に監視した。このアッセイにおいて、このＯ．Ｄ．は血漿サンプル中に存在する抗ＣＥＴＰ抗体の量に正比例した。これらの結果は、第I群のウサギの全て（rb＃1－rb＃3）が組換えヒトＣＥＴＰに特異的な抗ＣＥＴＰ抗体を産生することを示した。実施例２における第I群の未処理対照ウサギ（rb＃4）では抗ＣＥＴＰ抗体は産生されなかった。（図２を参照のこと。）

抗ＣＥＴＰ抗体を検出するための競合ELISA

このアッセイは、ワクチン接種されたウサギが（コロンビア大学の受託機関、（ニューヨーク、ニューヨーク州）からライセンスを受けた）抗ＣＥＴＰモノクロナール抗体TP2と同じエピトープに結合する抗体を産生しているかどうかを決定するために立案した。標準的な競合ELISAをウサギの血漿中の抗ＣＥＴＰ抗体の存在の検出に適合させた。このアッセイでは、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）を、ヒトＣＥＴＰの26アミノ酸のカルボキシル末端断片に特異的に結合する抗ＣＥＴＰモノクローナル抗体TP2に結合させた（Wangら，J. Biol. Chem., 267: 17487-17490(1992); Wangら，J. Biol. Chem., 268: 1955-1959(1993)）。

抗体にHRPを結合させるために以下の方法を用いた。抗体をNa_2CO_3（50mM、pH9.5）に対して透析した。この透析抗体は2～5mg／mlの濃度であった。HRP（ベーリンガー－マンハイム（Boehringer-Mannheim））を酢酸ナトリウムバッファ（1.0mM、pH4.4）中に6mg／mlの濃度に溶解した。次に、HRP溶液1ml毎に0.2mlの過ヨウ素酸ナトリウム溶液（21.4mg／ml酢酸バッファ、使用直前に調製）を添加して活性化し、この活性化混合物を室温、ロッカー上で20分間インキュベートした。その後、この活性化HRPを、酢酸バッファで平衡化したG25カラムに通して活性化HRPを脱塩した。403nmの光学密度（Ｏ．Ｄ．）はおおよそ1mg HRP／mlに相当する。次に、この脱塩した活性化HRPを透析抗体に抗体量の1／2に等しい量で添加し（重量基準、例えば、IgG 1mg毎に活性化HRPを0.5mg添加）、この混合物を室温、ロッカー上で2時間インキュベートしてHRPを抗体分子に結合させた。この結合反応を、HRP－抗体結合混合物1ml毎に20μlの水素化ホウ素ナトリウム（10mg／ml）を添加することにより停止させた後、混合物を氷上で30分間インキュベートした。このHRP結合抗体混合物をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に対して一晩透析した後、30psiで15分間遠心した（エアフュージ（Airfuge））。その上清（HRP結合抗体）にチメロサールを0.5％まで添加し、ウシ血清アルブミンを1％まで添加した。このHRP結合抗体調製品を4℃で保存し、光から保護した。

96ウェルマイクロタイタープレートのウェルを、各ウェル内においてリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の（コロンビア大学の受託機関、（ニューヨーク、ニューヨーク州）からライセンスを受けた組換えCHO細胞系CHO（AT）から得られた）組換えヒトＣＥＴＰの300ng／ml溶液100μlをインキュベートすることによりＣＥＴＰでコーティングした。ウェルか

ら液体を排出し、PBS及び0.05％（容量／容量）ツィーン（シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリ州）中のウシ血清アルブミン（BSA）の1％（重量／重量）溶液でウェルを満たし、室温、回転振盪器（約150rpm）上で2時間インキュベートして非特異的結合をブロックした。ウェルをELISA洗浄バッファ（PBS＋0.05％ツィーン）で4回洗浄し、希釈バッファ（PBS中1％BSA）で希釈した血漿サンプル100μｌを加えた。次に、プレートを室温、回転振盪器上で上述したように1時間インキュベートした後、ELISA洗浄バッファで4回洗浄した。次いで、各ウェルに、希釈バッファ中のホースラディッシュペルオキシダーゼ結合（標準）モノクローナル抗体TP2の1：100,000希釈液100μｌを添加した。このプレートを室温、回転振盪器上で上述したように1時間インキュベートした後、ELISA洗浄バッファで4回洗浄した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ基質（例えば、TMBペルオキシダーゼ基質、カークガード＆ペリー・ラボラトリーズ社、ガイザースバーグ、メリーランド州）を各ウェルに添加し、450nmの光学密度（Ｏ．Ｄ．）の変化をELISAリーダー（例えば、E－max、モレキュラー・デバイス社、メンロパーク、カリフォルニア州）を用いて分光光度的に監視した。このアッセイでは、ワクチンペプチドのＣＥＴＰ関連部分に対して抗体が産生した場合、血漿サンプル中に存在するこのような未標識抗ＣＥＴＰ抗体分子はウェル壁に吸着しているＣＥＴＰへの結合について標識TP2モノクローナル抗体と競合し、発色の阻害が血漿サンプルの濃度が増加するにつれて観察される（すなわち、Ｏ．Ｄ．は各血漿サンプル中に存在する抗ＣＥＴＰ抗体の量に反比例する）。

図３に示されるように、ワクチンペプチドが投与された3匹のウサギのうちの2匹からそのようなＣＥＴＰへのTP2結合の阻害が観察され、それによりＣＥＴＰ特異的抗体の産生が示される（図３において、ウサギ血清rb＃2及びRb＃3のグラフを未処理対照rb＃4の血漿と比較のこと）。ＣＥＴＰへのTP2結合の最も強い阻害はウサギrb＃3の血漿によって示された（図３を参照）。

実施例４．ワクチン接種のウサギの血漿サンプル中のコレステロール及びＨＤＬレベル

実施例２における第I群及び第II群のウサギからワクチン接種プロトコルの様々な時期（日）に採取した血漿サンプルを、総コレステロール（図４）及びＨＤＬ－Ｃ（図５）の濃度についても検定した。総血漿コレステロール及びＨＤＬ－Ｃレベルは、標準的な商業アッセイ（ワコー・ケミカルUSA社、リッチモンド、バージニア州）を用いて決定した。最も高い抗ＣＥＴＰ抗体力価を有していた2匹のウサギ（rb＃2及びRb＃3）の血漿サンプルは、予備採血血漿サンプルと比較して、70日目で、ＨＤＬ－Ｃ濃度の2～5倍の増加を示した。また、ウサギ＃2及び＃3は、いずれも全期間にわたるＨＤＬ濃度の減少を示した対照ウサギ（rb＃4）及び最低抗体力価ウサギ（rb＃1）と比較して、全期間にわたる血漿ＨＤＬ濃度の増加も示した（図５）。

図６は、ワクチン接種後70日目のＨＤＬコレステロール（HDL）に対する非ＨＤＬコレステロール（非HDL）の比を示す。このデータは、ワクチン接種していない（中空）ウサギと比較して、ワクチン接種したウサギ群（線影付き）における抗アテローム形成プロフィールの傾向を示す。血漿サンプル中の総コレステロールに大きな相違は観察されなかったが、非ＨＤＬ／ＨＤＬの比は、一般に、第I群のワクチン接種ウサギにおける抗ＣＥＴＰ抗体レベルの上昇に伴って低下した。

実施例５．ヒトＣＥＴＰを発現するトランスジェニックマウスへの投与

近年、ヒトＣＥＴＰを発現するトランスジェニックマウスの系統が商業的に利用可能になってきている（バイオディグム™（Biodigm™）－ＣＥＴＰマウス；ファーマコンUSA（Pharmakon USA）、ウェーバリー、ペンシルバニア州）。このようなマウスは肝臓でヒトＣＥＴＰを発現し、正常な餌を与えた場合、一緒に生まれた遺伝子導入されていないマウスよりもＨＤＬ関連コレステロールのレベルが約50パーセント低いことが報告されている。このようなトランスジェニック動物は、本発明のワクチンペプチドをさらに試験するためのさらなる実験モデルとして役立つ。

6匹のトランスジェニックＣＥＴＰ発現マウスからなる2群を用いて、上記実施例１～４において用いられたものと同じワクチンペプチドを試験した。第I群のマウスの各々には、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に溶解し、完全フロイントアジュバントで乳化して（1：1

）最終濃度を100μg／100μlとしたワクチンペプチドを初回注射した。各マウスには、2ヶ所の皮下部位の各々に、50μl用量（50μg）でワクチンペプチド混合液を投与した。28日目及び56日目にも、これらの動物に、PBS中のペプチドワクチン（100μg）の追加免疫を施したが、ワクチンペプチドは不完全フロイントアジュバントで乳化した。血液サンプルを42日目及び63日目に採取した。第II群の対照マウスには、アジュバントで乳化はしたもののワクチンペプチドを含まないPBSを、第I群のマウスと同じ方法で初回免疫及び追加免疫注射した。血漿サンプルは、ウサギの血漿サンプルについて上に記載した通りに調製した。

第I群の全てのマウスは、上述の直接ELISAにより広範囲の血漿希釈液（1：10～1：1,000,000）で測定したときかなりの力価の抗ＣＥＴＰ抗体を有していた（図７参照）。さらに、第I群の6匹のマウスのうちの3匹は、（上記実施例３においてウサギrb＃2及びRb＃3について見出されたものと同様の）組換えヒトＣＥＴＰへの結合についてモノクローナル抗体TP2と競合する抗ＣＥＴＰ抗体を有することが明らかにされた。

実施例６．アテローム性動脈硬化症のコレステロール給餌モデルにおける内因性ＣＥＴＰに対するウサギの免疫感作

上記実施例１の合成ワクチンペプチド（配列番号2）を、内因性ウサギＣＥＴＰに対する免疫応答を誘発するこのワクチンペプチドの能力及びアテローム性動脈硬化の発症を防ぎ、もしくは低減させる能力を調べるため、ニュージーランドシロウサギに注射した。第I群は6匹のウサギ（rb＃1～rb＃6）を含み、これらの各々にはワクチンペプチドの投与プロトコルを施した。第II対照群は、ワクチン接種はしたものの高コレステロール餌は与えない6匹のウサギ（rb＃7～12）を含んでいた。第III対照群は、ワクチン接種せず、かつ高コレステロール餌を与えない6匹のウサギ（rb＃13～18）を含んでいた。第IV対照群は、ワクチン接種はしないが高コレステロール餌を与える6匹のウサギ（rb＃19～24）を含んでいた。高コレステロール餌は、ワクチンによる最終追加免疫の4週間後から開始して合計17週間与えた。

これらのウサギにおいてワクチンペプチドを試験するための一般的なプロトコルを下記表1に示す。0日目に、製造者の指示に従ってペプチド（100μg）をRIBI™アジュバント系（RIBIイムノケム・リサーチ社、ハミルトン、モンタナ州）に懸濁して最終容量を1000μlとし、第I群及び第II群のウサギの各々に2ヶ所の筋肉内部位（部位当り250μl）に、2ヶ所の皮下部位（部位当り100μl）に、及び6ヶ所の皮内部位（部位当り50μl）に注射した。28日目に、追加免疫（RIBI™アジュバント系中ペプチド100μg）を0日目と同様に投与した。49日目に、もう一回の追加免疫（RIBI™アジュバント系中ペプチド100μg）を0日目と同様に投与した。77日目に、第I群及び第IV群に0.25%（w／w）コレステロール強化餌（コレステロールを補給したウサギ餌（ファーマーズ・エクスチェンジ（Farmer's Exchange）、フラミンガム、MA））を与えた。第II群及び第III群には、同じではあるがコレステロールを補給していないウサギ餌（ファーマーズ・エスクチェンジ、フラミンガム、MA）を与えた。

血液サンプル（約1～5ml）を、各ウサギの耳から、各初回注射の前（「予備採血」）及び型通りにその後約2週間毎に採取した。血漿サンプルを、血漿から細胞性成分を分離する標準的な遠心法によって調製した。血漿サンプルを－70℃で保存した。全ての群の血漿サンプルを抗ＣＥＴＰ抗体の存在及びその力価の増加について、並びに総血漿コレステロール及び血漿ＨＤＬ－Ｃレベルについて分析した。

表1

ウサギのスケジュール

週	群ごとの手順 1	2	3	4	飼料 第2群及び第3群	飼料 第1群及び第4群	飼料変更後の週数	実際の日数
-2	B	B	B	B	正常	正常		-14
-1	B	B	B	B	正常	正常		-6
0	B.V	B.V	B	B	正常	正常		0
1					正常	正常		7
2	B	B	B	B	正常	正常		14
3					正常	正常		21
4	B.V	B.V	B	B	正常	正常		28
5					正常	正常		35
6					正常	正常		42
7	B.V	B.V	B	B	正常	正常		49
8					正常	正常		56
9					正常	正常		63
10	B	B	B	B	正常	正常		70
11					変更	変更		77
12					対照	0.25% コレステロール	0	84
13	B	B	B	B	対照	0.25% コレステロール	1	91
14					対照	0.25% コレステロール	2	98
15	B	B	B	B	対照	0.25% コレステロール	3	105
16					対照	0.25% コレステロール	4	112
17	B	B	B	B	対照	0.25% コレステロール	5	119
18					対照	0.25% コレステロール	6	126
19	B	B	B	B	対照	0.25% コレステロール	7	133
20					対照	0.25% コレステロール	8	140
21	B	B	B	B	対照	0.25% コレステロール	9	147
22					対照	0.25% コレステロール	10	154
23	B	B	B	B	対照	0.25% コレステロール	11	161
24					対照	0.25% コレステロール	12	168
25	B	B	B	B	対照	0.25% コレステロール	13	175
26					対照	0.25% コレステロール	14	182
27					対照	0.25% コレステロール	15	189
28	B.E			B.E	対照	0.25% コレステロール	16	196
							17	

注: 1= ワクチン接種、高コレステロール飼料　B= 血液サンプル
2= ワクチン接種、正常／対照飼料　V= ワクチン接種
3= 対照、正常／対照飼料　E= 安楽死
4= 対照、高コレステロール飼料

実施例７．アテローム性動脈硬化型（高コレステロール血症）モデルにおけるワクチン接種ウサギでの抗ＣＥＴＰ抗体の産生

抗組換えヒトＣＥＴＰ抗体の力価を測定するための直接ELISA

サンドイッチ酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）を抗ＣＥＴＰ抗体を含有する血漿サンプルの力価の測定に用いた。この構成では、組換えヒトＣＥＴＰ（コロンビア大学の受託機関、（ニューヨーク、ニューヨーク州）のライセンスを受けた組換えCHO細胞系CHO（AT）から得られるヒトｒ ＣＥＴＰ）をマイクロタイター皿のウェルに吸着させ、第I群～第IV群のウサギに由来するウサギ血漿の様々な希釈物を各ウェルに加えた。NUNCマキシソルブ96ウェルプレートの各ウェルは、PBS中のヒトｒ ＣＥＴＰの1μg／ml溶液100

μlに4℃で一晩さらすことによりコーティングした。非特異的結合は、PBS及び0.05%ツィーン中のBSAの1%溶液を各ウェルに添加し、150rpmの回転振盪器上で室温（20°～22℃）で2時間インキュベートすることによりブロックした。その後、ウェルをELISA洗浄バッファ（PBS＋0.05%ツィーン）で4回洗浄した。次に、血漿サンプルを希釈バッファ（PBS中の1%BSA）で1：10に希釈した後、同じバッファで2倍段階希釈を６回実施した。希釈サンプル（100μl）をウェルに加え、150rpmの回転振盪器上で室温で2時間インキュベートした後、ELISA洗浄バッファ（PBS＋0.05%ツィーン）で4回洗浄した。結合した抗ＣＥＴＰ抗体を検出するため、希釈バッファ中のホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン（サザーン・バイオテクノロジー・アソシエーツ社；バーミンガム、アラバマ州）の1：10,000希釈液100μlを添加し、プレートを150rpmの回転振盪器上で室温で2時間インキュベートした。その後、ウェルをELISA洗浄バッファ（上記参照）で4回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質TMB（TMBペルオキシダーゼ基質、カーグガード＆ペリー・ラボラトリーズ社、ガイザースバーグ、メリーランド州）を添加してプレートを室温で30分間インキュベートした。光学密度の変化を、ELISAリーダー（例えば、E－max、モレキュラー・デバイス社、メンロパーク、カリフォルニア州）を用いて、450nmで分光光度的に監視した。このアッセイにおいて、このＯ．Ｄ．は血漿サンプル中に存在する抗ＣＥＴＰ抗体の量に正比例した。これらの結果は、12匹のワクチン接種ウサギ（第I群及び第II群）のうちの5匹が組換えヒトＣＥＴＰに特異的な抗ＣＥＴＰ抗体を産生することを示した。未処理第III及び第IV対照群では抗組換えヒトＣＥＴＰ抗体は産生されなかった。

自己反応性抗ウサギ（内因性）ＣＥＴＰ抗体の力価を測定するための直接ELISA

配列番号4に示すヒトＣＥＴＰ配列のカルボキシル末端領域のアミノ酸457～476に相当する配列番号7の配列：LQMDFGFPKHLLVDFLQSLSを有する、内因性ウサギＣＥＴＰのアミノ酸配列を有するペプチド（ウサギペプチド）を、クオリティ・コントロールド・バイオケミカルズ社（ホプキントン、マサチューセッツ州）による標準ペプチド合成法を用いて要望通り合成した。このウサギＣＥＴＰアミノ酸配列のこの部分は、ヒトの配列（配列番号4）の465位のグルタミン酸残基がリシン残基で置換されていることで、ヒトＣＥＴＰ配列とは異なる（配列番号7のアミノ酸9を参照）。このアッセイの目的のため、このウサギペプチドをビオチンル化誘導体（ビチオンがアミノ末端ロイシン残基に共有結合されている）として購入した。

予めブロックされたストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレートを以下の通りに調製した。ＰＢＳ中の5μg／mlストレプトアビジン（カタログ＃43－4302、ジムド・ラボラトリーズ社（Zymed Laboratories, Inc.）、Ｓ．サンフランシスコ、CA）100μlを、着脱可能なストリップを有する96ウェルマイクロプレート（カタログ＃950－2950－00P、ラブシステムズ（LabSystems）、ニードハム、MA）の各ウェルに分注し、密封して室温で一晩インキュベートした。各ウェルの内容物を吸引した後、プレートを洗浄し、1%BSA、5%ショ糖、0.05%ツィーン20及び0.1%硫酸ゲンタマイシンを含有するPBS 300μlを用いて室温で一晩ブロックした。翌日、ウェルを空にして一晩乾燥させた後、使用に供するまで乾燥剤と共に密封して4℃で保存した。その後、ウサギペプチドを各ウェルに添加し（10%(w／v)ウシ血清アルブミン（BSA）を補足した、PBS（ギブコ（GIBCO）BRL）中の1μg／ml溶液100μl）、150rpmで振盪しながら、室温（22℃）で1時間インキュベートした。プレートを洗浄バッファ（0.05%ツィーン20を補足したPBS）で3回洗浄して未結合のペプチドを除去した。ウサギ血漿サンプルを5%BSA及び1%ゼラチンを補足したPBSで希釈し（最初に1：40、その後段階的に1／2に）、各希釈液100μlを150rpmで振盪しながら室温で90分間インキュベートした。その後、プレートを洗浄バッファで3回洗浄した。ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識したヤギ抗ウサギIgG（サザーン・バイオテクノロジー・アソシエーツ社、バーミンガム、AL）を洗浄バッファで1：5000に希釈し、その100μlを各ウェルに添加した後、150rpmで振盪しながら室温で90分間インキュベートした。プレートを洗浄バッファで3回洗浄した後、ペルオキシダーゼ基質TMB（TMBペルオキシダーゼ基質、カークガード＆ペリー・ラボラトリーズ社、ガイザースバーグ、メリーランド）を

添加してインキュベートし、そのプレートを室温で30分間インキュベートした。光学密度の変化を、ELISAリーダー（例えば、E－max、モレキュラー・デバイス社、メンロパーク、カリフォルニア州）を用いて、450nmで分光光度的に監視した。このアッセイにおいて、Ｏ．Ｄ．は血漿サンプル中に存在する抗ウサギＣＥＴＰ抗体の量に正比例した。

これらの結果は、最終追加免疫の3週間後（及び第I群及び第IV群にコレステロール補給餌を投与する前）に、12匹のワクチン接種動物のうちの6匹（第I群及び第II群の各々から3匹）が内因性ウサギＣＥＴＰ配列から誘導されるペプチドと反応する抗体を産生したことを示す（図１０Ａ及び１０Ｂを参照）。

これらのデータは、ワクチンペプチドがウサギ内因性ＣＥＴＰに対する自己反応性抗体を誘発することが可能であることを示した。これは、破傷風毒素T細胞エピトープとＣＥＴＰのカルボキシル末端領域のB細胞エピトープの組み合わせが、特定の自己タンパク質、すなわち、この場合は内因性ウサギＣＥＴＰ、に対する寛容を破壊することが可能であることを示す。

実施例９．アテローム性動脈硬化症モデルにおけるワクチン接種ウサギの血漿サンプル中のコレステロール及びＨＤＬレベル

実施例６の各群のウサギからワクチン接種プロトコルの様々な時期（日）に採取した血漿サンプルを、総コレステロール（図１１）及びＨＤＬ－Ｃ（図１２）の濃度についてもアッセイした。総血漿コレステロール及びＨＤＬ－Ｃレベルは、標準的な商業アッセイ（ワコー・ケミカルUSA社、リッチモンド、バージニア州）を用いて決定した。

第I群（ワクチン接種）及び第IV群（非ワクチン接種）の血漿サンプルは、コレステロール補給餌の投与により、総コレステロールの増加（高コレステロール血症）を示した（図１１）。第II群（ワクチン接種）及び第III群（非ワクチン接種）は餌誘発高コレステロール血症を示さなかった（図１１）。

同様に、コレステロール補給餌を与えた第I群及び第IV群はＨＤＬ－Ｃの増加を示した（図１２）。第II群のデータの予備分析により、最高の抗ＣＥＴＰ抗体力価を有する3匹の動物も、ワクチン接種前のレベルと比較してＨＤＬ－Ｃのレベルの増加を示すことが示された。また、この予備分析により、第III群の5匹の動物のうちの3匹において、ワクチン接種前のレベルと比較してＨＤＬ－Ｃのレベルに有意な変化が観察されないことも示された。

実施例１０．アテローム性動脈硬化症のコレステロール給餌モデルにおけるウサギの大動脈アテローム硬化性病変の測定

第I群及び第IV群にコレステロール補給餌を、及び第II群及び第III群に対照餌（コレステロールの補給なし）を17週間与えた後、全ての生存するウサギ（第I群及び第IV群において4匹、第II群において5匹、第III群において6匹）から大動脈を摘出した。非生存ウサギの死は、剖検によって、毛球（hair ball）によるものであり、したがって、実験の設計によるものではないことが示された。アテローム性動脈硬化症病変を調べる正面からの検分のため、各々の大動脈を切開した。大動脈の全長、すなわち心臓内の大動脈弓から下腹部の分岐まで、をオイルレッド0で染色して病変を検出した。病変を測定し、コンピュータプログラム（ザ・モルホメーター（The Morphometer）、ウッズ・ホール・エデュケーショナル・アソシエーテッド（Woods Hole Educational Associated）、ウッズ・ホール、MA）を用いてデータを定量化した。

この分析の図１３の結果は、第IV群の動物（非ワクチン接種、コレステロール補給餌）における病変の大きさと比較した場合の第I群（ワクチン接種、コレステロール補給餌）の動物における病変の大きさの統計的に有意な減少を示した。これらの結果は、ペプチドワクチンが、コレステロール補給（高コレステロール血症）餌が与えられた動物におけるアテローム性動脈硬化症病変の面積を50%を超えて減少させることが可能であることを示した。非ワクチン接種動物（第IV群）は平均で大動脈の全面積の45%を覆う病変を有していた。これに対して、ワクチン接種動物（第I群）は平均で大動脈の全面積の19%を覆う病変を有していた。

幾つかの態様を上に説明したが、当業者であれば、記載された組成物及び方法の修正及び

変更を本発明の精神又は添付の請求の範囲から逸脱することなくなし得ることを理解するであろう。ここに引用される論文及び刊行物は参考としてここに組み入れるものとする。

配列表

（１）一般的な情報

（ｉ）出願人：リッターシャウス，チャールズ，ダブリュー．
トーマス，ローレンス　ジェイ．

（ii）発明の名称：コレステロールエステル転移タンパク質（CETP）活性のモジュレーション

（iii）配列の数：９

（iv）住所：

（Ａ）名宛人：バーナー　＆　アレグレッティ，Ltd．

（Ｂ）通り名：７５ステートストリート

（Ｃ）都市名：ボストン

（Ｄ）州名：マサチューセッツ

（Ｅ）国名：米国

（Ｆ）郵便番号：０２１０９

（ｖ）コンピューター読み取り可能形式：：

（Ａ）媒体の形式：フロッピーディスク

（Ｂ）コンピューター：ＩＢＭ　ＰＣ互換機

（Ｃ）オペレーティングシステム：ＰＣ－ＤＯＳ／ＭＳ－ＤＯＳ

（Ｄ）ソフトウェア：ＷｏｒｄＰｅｒｆｅｃｔ　６．１

（vi）本出願のデータ：

（Ａ）出願番号：（未だ付与されていない）

（Ｂ）出願日：１９９６年５月１日

（Ｃ）分類：

（vii）先の出願のデータ：

（Ａ）出願番号：０８／４３２，４８３

（Ｂ）出願日：１９９５年５月１日

（viii）：代理人に関する情報

（Ａ）名称：ヤンクビック，レオン　アール．

（Ｂ）登録番号：３０，２３７

（Ｃ）参照／事件番号：９５，１７９－Ｂ（ＴＣＳ－２０４－ＰＣＴ）

（２）配列番号：１：

（ｉ）配列の特色

（Ａ）配列の長さ：２６アミノ酸

（Ｂ）配列の型：　アミノ酸

（Ｄ）トポロジー：直鎖状

（ii）配列の種類：ペプチド

（iii）仮想配列：

（iv）アンチセンス：

（ix）配列の特徴：

（Ａ）名称：ヒトＣＥＴＰのカルボキシ末端２６アミノ酸

（Ｂ）存在位置：

（ｘ）公表に関する情報：

（Ａ）著者：ドライナ，デニス，ら

（Ｂ）題名：ヒトコレステロールエステル転移ｃＤＮＡのクローニングおよび配列決定

（Ｃ）雑誌名：Ｎａｔｕｒｅ

（Ｄ）巻：３２７

（Ｅ）発行：

（Ｆ）頁：６３２～６３４

（Ｇ）日付：１９８７年６月１８日
（Ｋ）配列番号１における適切な残基：１～２６
（xi）配列：

Arg Asp Gly Phe Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe
1 5 10

Gly Phe Pro Glu His Leu Leu Val Asp Phe Leu
15 20

Gln Ser Leu Ser
25

（２）配列番号：２：
（ｉ）配列の特色
（Ａ）配列の長さ：３１アミノ酸
（Ｂ）配列の型：　アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ペプチド
（iii）仮想配列：
（iv）アンチセンス：
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称：
（Ｂ）存在位置：
（xi）配列：

Cys Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile
1 5 10

Gly Ile Thr Glu Phe Gly Phe Pro Glu His Leu
15 20

Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
25 30

（２）配列番号：３：
（ｉ）配列の特色
（Ａ）配列の長さ：２１アミノ酸
（Ｂ）配列の型：　アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ペプチド
（iii）仮想配列：
（iv）アンチセンス：
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称：２１アミノ酸の破傷風毒素ユニバーサルヘルパーＴ細胞エピトープ
（Ｂ）存在位置：
（ｘ）公表に関する情報：
（Ａ）著者：パニアーボーディントン，ピー，ら

（Ｂ）題名：普遍的抗原性のＴ細胞エピトープ：ヒトＭＨＣクラスIIへの不規則な結合およびＴ細胞による不規則な認識
（Ｃ）雑誌名：European Jouranal of Immunology
（Ｄ）巻：１９
（Ｅ）発行：
（Ｆ）頁：2237～2242
（Ｇ）日付：１９８９年
（Ｋ）配列番号３における適切な残基：１～２１
（xi）配列：

Phe Asn Asn Phe Thr Val Ser Phe Trp Leu Arg
1 5 10

Val Pro Lys Val Ser Ala Ser His Leu Glu
15 20

（２）配列番号：４：
（ｉ）配列の特色
（Ａ）配列の長さ：４７６アミノ酸
（Ｂ）配列の型： アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ペプチド
（iii）仮想配列：
（iv）アンチセンス：
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称：成熟ヒトＣＥＴＰのアミノ酸配列
（Ｂ）存在位置：
（ｘ）公表に関する情報：
（Ａ）著者：ドライナ，デニス，ら
（Ｂ）題名：ヒトコレステロールエステル転移ｃＤＮＡのクローニングおよび配列決定
（Ｃ）雑誌名：Ｎａｔｕｒｅ
（Ｄ）巻：３２７
（Ｅ）発行：
（Ｆ）頁：６３２～６３４
（Ｇ）日付：１９８７年６月１８日
（Ｋ）配列番号４における適切な残基：１～４７６
（xi）配列：

Cys Ser Lys Gly Thr Ser His Glu Ala Gly Ile Val Cys
1 5 10

Arg Ile Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn His Glu
15 20 25

Thr Ala Lys Val Ile Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Ser
30 35

Tyr Pro Asp Ile Thr Gly Glu Lys Ala Met Met Leu Leu
40 45 50

Gly Gln Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Ile Gln Ile Ser
55 60 65

His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Glu
70 75

Ala Lys Ser Ile Asp Val Ser Ile Gln Asn Val Ser Val
80 85 90

Val Phe Lys Gly Thr Leu Lys Tyr Gly Tyr Thr Thr Ala
95 100

Trp Trp Leu Gly Ile Asp Gln Ser Ile Asp Phe Glu Ile
105 110 115

Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Gln Leu Thr
120 125 130

Cys Asp Ser Gly Arg Val Arg Thr Asp Ala Pro Asp Cys
135 140

Tyr Leu Ser Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly
145 150 155

Glu Arg Glu Pro Gly Trp Ile Lys Gln Leu Phe Thr Asn
160 165

Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys Leu Val Leu Lys Gly Gln
170 175 180

Ile Cys Lys Glu Ile Asn Val Ile Ser Asn Ile Met Ala
185 190 195

Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp
200 205

Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Leu Thr Gly Asp Pro
210 215 220

Val Ile Thr Ala Ser Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly
225 230

His Phe Ile Tyr Lys Asn Val Ser Glu Asp Leu Pro Leu
235 240 245

Pro Thr Phe Ser Pro Thr Leu Leu Gly Asp Ser Arg Met
250 255 260

Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Glu Arg Val Phe His Ser Leu
265 270

Ala Lys Val Ala Phe Gln Asp Gly Arg Leu Met Leu Ser
275 280 285

Leu Met Gly Asp Glu Phe Lys Ala Val Leu Glu Thr Trp
290 295

Gly Phe Asn Thr Asn Gln Glu Ile Phe Gln Glu Val Val
300 305 310

Gly Gly Phe Pro Ser Gln Ala Gln Val Thr Val His Cys
315 320 325

Leu Lys Met Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Lys Gly Val
330 335

Val Val Asn Ser Ser Val Met Val Lys Phe Leu Phe Pro
340 345 350

Arg Pro Asp Gln Gln His Ser Val Ala Tyr Thr Phe Glu
355 360

Glu Asp Ile Val Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser Lys
365 370 375

Lys Lys Leu Phe Leu Ser Leu Leu Asp Phe Gln Ile Thr
380 385 390

Pro Lys Thr Val Ser Asn Leu Thr Glu Ser Ser Ser Glu
395 400

Ser Ile Gln Ser Phe Leu Gln Ser Met Ile Thr Ala Val
405 410 415

Gly Ile Pro Glu Val Met Ser Arg Leu Glu Val Val Phe
420 425

Thr Ala Leu Met Asn Ser Lys Gly Val Ser Leu Phe Asp
430 435 440

Ile Ile Asn Pro Glu Ile Ile Thr Arg Asp Gly Phe Leu
445 450 455

Leu Leu Gln Met Asp Phe Gly Phe Pro Glu His Leu Leu
460 465

Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
470 475

（２）配列番号：５：
（ｉ）配列の特色
（Ａ）配列の長さ：１４２８塩基
（Ｂ）配列の型：　核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ｃＤＮＡ
（iii）仮想配列：
（iv）アンチセンス：
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称：成熟ヒトＣＥＴＰのコード配列
（Ｂ）存在位置：
（ｘ）公表に関する情報：
（Ａ）著者：ドライナ，デニス，ら
（Ｂ）題名：ヒトコレステロールエステル転移ｃＤＮＡのクローニングおよび配列決定
（Ｃ）雑誌名：Ｎａｔｕｒｅ
（Ｄ）巻：３２７
（Ｅ）発行：
（Ｆ）頁：６３２～６３４
（Ｇ）日付：１９８７年６月１８日
（Ｋ）配列番号５における適切な残基：１～１４２８
（xi）配列：

TGCTCCAAAG GCACCTCGCA CGAGGCAGGC ATCGTGTGCC 40

GCATCACCAA GCCTGCCCTC CTGGTGTTGA ACCACGAGAC 80

TGCCAAGGTG ATCCAGACCG CCTTCCAGCG AGCCAGCTAC 120

CCAGATATCA CGGGCGAGAA GGCCATGATG CTCCTTGGCC 160

AAGTCAAGTA TGGGTTGCAC AACATCCAGA TCAGCCACTT 200

GTCCATCGCC AGCAGCCAGG TGGAGCTGGT GGAAGCCAAG 240

TCCATTGATG TCTCCATTCA GAACGTGTCT GTGGTCTTCA 280

AGGGGACCCT GAAGTATGGC TACACCACTG CCTGGTGGCT 320

GGGTATTGAT CAGTCCATTG ACTTCGAGAT CGACTCTGCC 360

ATTGACCTCC AGATCAACAC ACAGCTGACC TGTGACTCTG 400

GTAGAGTGCG GACCGATGCC CCTGACTGCT ACCTGTCTTT 440

CCATAAGCTG CTCCTGCATC TCCAAGGGGA GCGAGAGCCT 480

GGGTGGATCA AGCAGCTGTT CACAAATTTC ATCTCCTTCA 520

CCCTGAAGCT GGTCCTGAAG GGACAGATCT GCAAAGAGAT 560

CAACGTCATC TCTAACATCA TGGCCGATTT TGTCCAGACA 600

AGGGCTGCCA GCATCCTTTC AGATGGAGAC ATTGGGGTGG 640

ACATTTCCCT GACAGGTGAT CCCGTCATCA CAGCCTCCTA 680

CCTGGAGTCC CATCACAAGG GTCATTTCAT CTACAAGAAT 720

GTCTCAGAGG ACCTCCCCCT CCCCACCTTC TCGCCCACAC 760

TGCTGGGGGA CTCCCGCATG CTGTACTTCT GGTTCTCTGA 800

GCGAGTCTTC CACTCGCTGG CCAAGGTAGC TTTCCAGGAT 840

GGCCGCCTCA TGCTCAGCCT GATGGGAGAC GAGTTCAAGG 880

CAGTGCTGGA GACCTGGGGC TTCAACACCA ACCAGGAAAT 920

CTTCCAAGAG GTTGTCGGCG GCTTCCCCAG CCAGGCCCAA 960

GTCACCGTCC ACTGCCTCAA GATGCCCAAG ATCTCCTGCC 1000

AAAACAAGGG AGTCGTGGTC AATTCTTCAG TGATGGTGAA 1040

ATTCCTCTTT CCACGCCCAG ACCAGCAACA TTCTGTAGCT 1080

TACACATTTG AAGAGGATAT CGTGACTACC GTCCAGGCCT 1120

CCTATTCTAA GAAAAAGCTC TTCTTAAGCC TCTTGGATTT 1160

CCAGATTACA CCAAAGACTG TTTCCAACTT GACTGAGAGC 1200

AGCTCCGAGT CCATCCAGAG CTTCCTGCAG TCAATGATCA 1240

CCGCTGTGGG CATCCCTGAG GTCATGTCTC GGCTCGAGGT 1280

AGTGTTTACA GCCCTCATGA ACAGCAAAGG CGTGAGCCTC 1320

TTCGACATCA TCAACCCTGA GATTATCACT CGAGATGGCT 1360

TCCTGCTGCT GCAGATGGAC TTTGGCTTCC CTGAGCACCT 1400

GCTGGTGGAT TTCCTCCAGA GCTTGAGC 1428

（２）配列番号：６：
（ｉ）配列の特色
（Ａ）配列の長さ：４９６アミノ酸
（Ｂ）配列の型：　アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：タンパク質
（iii）仮想配列：
（iv）アンチセンス：
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称：成熟ウサギＣＥＴＰタンパク質のアミノ酸配列
（Ｂ）存在位置：
（ｘ）公表に関する情報：
（Ａ）著者：ナガシマ，マリコ，ら
（Ｂ）題名：ウサギコレステロールエステル転移タンパク質のクローニングおよびｍＲＮＡの組織分布
（Ｃ）雑誌名：J. Lipid Res.
（Ｄ）巻：２９
（Ｅ）発行：
（Ｆ）頁：1643～1649
（Ｇ）日付：１９８８年
（Ｋ）配列番号６における適切な残基：１～４９６
（xi）配列：

Cys Pro Lys Gly Ala Ser Tyr Glu Ala Gly Ile Val Cys
1 5 10

Arg Ile Thr Lys Pro Ala Leu Leu Val Leu Asn Gln Glu
15 20 25

Thr Ala Lys Val Val Gln Thr Ala Phe Gln Arg Ala Gly
30 35

Tyr Pro Asp Val Ser Gly Glu Arg Ala Val Met Leu Leu
40 45 50

Gly Arg Val Lys Tyr Gly Leu His Asn Leu Gln Ile Ser
55 60 65

His Leu Ser Ile Ala Ser Ser Gln Val Glu Leu Val Asp
70 75

Ala Lys Thr Ile Asp Val Ala Ile Gln Asn Val Ser Val
80 85 90

Val Phe Lys Gly Thr Leu Asn Tyr Ser Tyr Thr Ser Ala
95 100

Trp Gly Leu Gly Ile Asn Gln Ser Val Asp Phe Glu Ile
105 110 115

Asp Ser Ala Ile Asp Leu Gln Ile Asn Thr Glu Leu Thr
120 125 130

Cys Asp Ala Gly Ser Val Arg Thr Asn Ala Pro Asp Cys
135 140

Tyr Leu Ala Phe His Lys Leu Leu Leu His Leu Gln Gly
145 150 155

Glu Arg Glu Pro Gly Trp Leu Lys Gln Leu Phe Thr Asn
160 165

Phe Ile Ser Phe Thr Leu Lys Leu Ile Leu Lys Arg Gln
170 175 180

Val Cys Asn Glu Ile Asn Thr Ile Ser Asn Ile Met Ala
185 190 195

Asp Phe Val Gln Thr Arg Ala Ala Ser Ile Leu Ser Asp
200 205

Gly Asp Ile Gly Val Asp Ile Ser Val Thr Gly Ala Pro
210 215 220

Val Ile Thr Ala Thr Tyr Leu Glu Ser His His Lys Gly
225 230

His Phe Thr His Lys Asn Val Ser Glu Ala Phe Pro Leu
235 240 245

Arg Ala Phe Pro Pro Gly Leu Leu Gly Asp Ser Arg Met
250 255 260

Leu Tyr Phe Trp Phe Ser Asp Gln Val Leu Asn Ser Leu
265 270

Ala Arg Ala Ala Phe Gln Glu Gly Arg Leu Val Leu Ser
275 280 285

Leu Thr Gly Asp Glu Phe Lys Lys Val Leu Glu Thr Gln
290 295

Gly Phe Asp Thr Asn Gln Glu Ile Phe Gln Glu Leu Ser
300 305 310

Arg Gly Leu Pro Thr Gly Gln Ala Gln Val Ala Val His
315 320 325

Cys Leu Lys Val Pro Lys Ile Ser Cys Gln Asn Arg Gly
330 335

Val Val Val Ser Ser Ser Val Ala Val Thr Phe Arg Phe
340 345 350

Pro Arg Pro Asp Gly Arg Glu Ala Val Ala Tyr Arg Phe
355 360

Glu Glu Asp Ile Ile Thr Thr Val Gln Ala Ser Tyr Ser
365 370 375

Gln Lys Lys Leu Phe Leu His Leu Leu Asp Phe Gln Cys
380 385 390

Val Pro Ala Ser Gly Arg Ala Gly Ser Ser Ala Asn Leu
395 400

Ser Val Ala Leu Arg Thr Glu Ala Lys Ala Val Ser Asn
405 410 415

Leu Thr Glu Ser Arg Ser Glu Ser Leu Gln Ser Ser Leu
420 425

Arg Ser Leu Ile Ala Thr Val Gly Ile Pro Glu Val Met
430 435 440

Ser Arg Leu Glu Val Ala Phe Thr Ala Leu Met Asn Ser
445 450 455

Lys Gly Leu Asp Leu Phe Glu Ile Ile Asn Pro Glu Ile
460 465

Ile Thr Leu Asp Gly Cys Leu Leu Leu Gln Met Asp Phe
470 475 480

Gly Phe Pro Lys His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser
485 490

Leu Ser
495

（２）配列番号：７：
（ｉ）配列の特色
（Ａ）配列の長さ：１４８８塩基対
（Ｂ）配列の型：　核酸
（Ｃ）鎖の数：一本鎖
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ｃＤＮＡ
（iii）仮想配列：
（iv）アンチセンス：
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称：成熟ウサギＣＥＴＰのコード配列
（Ｂ）存在位置：
（ｘ）公表に関する情報：
（Ａ）著者：ナガシマ，マリコ，ら
（Ｂ）題名：ウサギコレステロールエステル転移タンパク質のクローニングおよびｍＲＮＡの組織分布
（Ｃ）雑誌名：J. Lipid Res.
（Ｄ）巻：２９
（Ｅ）発行：
（Ｆ）頁：1643～1649
（Ｇ）日付：１９８８年
（Ｋ）配列番号７における適切な残基：１～１４８８
（xi）配列：

TGTCCCAAAG GCGCCTCCTA CGAGGCTGGC ATCGTGTGTC 40

GCATCACCAA GCCCGCCCTC TTGGTGTTGA ACCAAGAGAC 80

GGCCAAGGTG GTCCAGACGG CCTTCCAGCG CGCCGGCTAT 120

CCGGACGTCA GCGGCGAGAG GGCCGTGATG CTCCTCGGCC 160

GGGTCAAGTA CGGGCTGCAC AACCTCCAGA TCAGCCACCT 200

GTCCATCGCC AGCAGCCAGG TGGAGCTGGT GGACGCCAAG 240

ACCATCGACG TCGCCATCCA GAACGTGTCC GTGGTCTTCA 280

AGGGGACCCT GAACTACAGC TACACGAGTG CCTGGGGGTT 320

GGGCATCAAT CAGTCTGTCG ACTTCGAGAT CGACTCTGCC 360

ATTGACCTCC AGATCAACAC AGAGCTGACC TGCGACGCTG 400

GCAGTGTGCG CACCAATGCC CCCGACTGCT ACCTGGCTTT 440

CCATAAACTG CTCCTGCACC TCCAGGGGGA GCGCGAGCCG 480

GGGTGGCTCA AGCAGCTCTT CACAAACTTC ATCTCCTTCA 520

CCCTGAAGCT GATTCTGAAG CGACAGGTCT GCAATGAGAT 560

CAACACCATC TCCAACATCA TGGCTGACTT TGTCCAGACG 600

AGGGCCGCCA GCATCCTCTC AGATGGAGAC ATCGGGGTGG 640

ACATTTCCGT GACGGGGGCC CCTGTCATCA CAGCCACCTA 680

CCTGGAGTCC CATCACAAGG GTCACTTCAC GCACAAGAAC 720

GTCTCCGAGG CCTTCCCCCT CCGCGCCTTC CCGCCCGGTC 760

TTCTGGGGGA CTCCCGCATG CTCTACTTCT GGTTCTCCGA 800

TCAAGTGCTC AACTCCCTGG CCAGGGCCGC CTTCCAGGAG 840

GGCCGTCTCG TGCTCAGCCT GACAGGGGAT GAGTTCAAGA 880

AAGTGCTGGA GACCCAGGGT TTCGACACCA ACCAGGAAAT 920

CTTCCAGGAG CTTTCCAGAG GCCTTCCCAC CGGCCAGGCC 960

CAGGTAGCCG TCCACTGCCT TAAGGTGCCC AAGATCTCCT 1000

GCCAGAACCG GGGTGTCGTG GTGTCTTCTT CCGTCGCCGT 1040

GACGTTCCGC TTCCCCCGCC CAGATGGCCG AGAAGCTGTG 1080

GCCTACAGGT TTGAGGAGGA TATCATCACC ACCGTCCAGG 1120

CCTCCTACTC CCAGAAAAAG CTCTTCCTAC ACCTCTTGGA 1160

TTTCCAGTGC GTGCCGGCCA GCGGAAGGGC AGGCAGCTCA 1200

GCAAATCTCT CCGTGGCCCT CAGGACTGAG GCTAAGGCTG 1240

TTTCCAACCT GACTGAGAGC CGCTCCGAGT CCCTGCAGAG 1280

CTCTCTCCGC TCCCTGATCG CCACGGTGGG CATCCCGGAG 1320

GTCATGTCTC GGCTCGAGGT GGCGTTCACA GCCCTCATGA 1360

ACAGCAAAGG CCTGGACCTC TTCGAAATCA TCAACCCCGA 1400

GATTATCACT CTCGATGGCT GCCTGCTGCT GCAGATGGAC 1440

TTCGGTTTTC CCAAGCACCT GCTGGTGGAT TTCCTGCAGA 1480

GCCTGAGC 1488

（２）配列番号：８
（ｉ）配列の特色
（Ａ）配列の長さ：５０アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ペプチド
（iii）仮想配列：
（iv）アンチセンス：
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称：
（Ｂ）存在位置：
（xi）配列：

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

Thr Glu Leu Phe Pro Arg Pro Asp Gln Gln His Ser Val
15 20 25

Ala Tyr Thr Phe Glu Glu Asp Ile Phe Gly Phe Pro Glu
30 35

His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
40 45 50

（２）配列番号：９：
（ｉ）配列の特色
（Ａ）配列の長さ：５０アミノ酸
（Ｂ）配列の型：アミノ酸
（Ｄ）トポロジー：直鎖状
（ii）配列の種類：ペプチド
（ix）配列の特徴：
（Ａ）名称：
（Ｂ）存在位置：
（xi）配列：

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

Thr Glu Arg Phe Pro Arg Pro Asp Gly Arg Glu Ala Val
15 20 25

Ala Tyr Arg Phe Glu Glu Asp Ile Phe Gly Phe Pro Lys
30 35

His Leu Leu Val Asp Phe Leu Gln Ser Leu Ser
40 45 50

【図１】

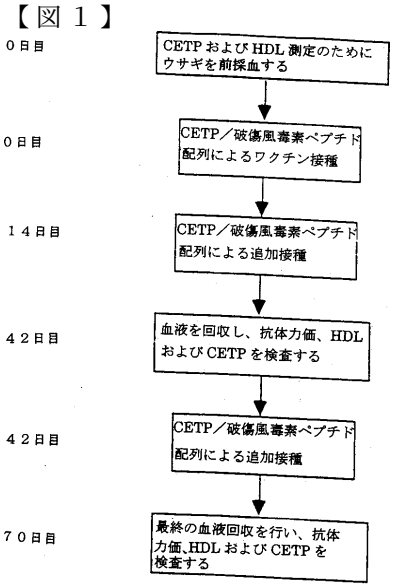

Fig. 1

【図２】

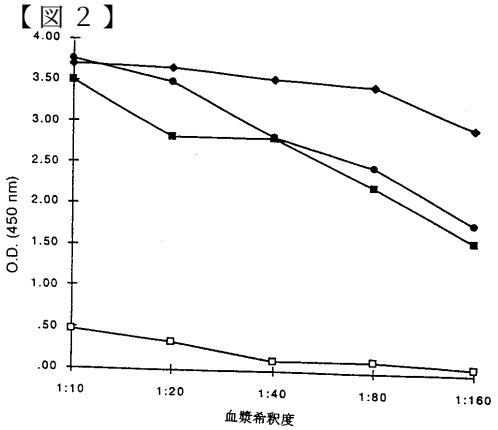

Fig. 2

【図３】

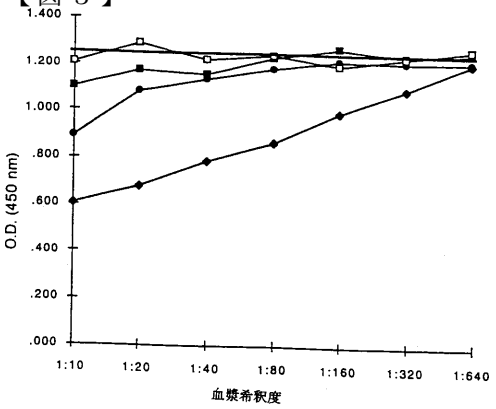

Fig. 3

【図５】

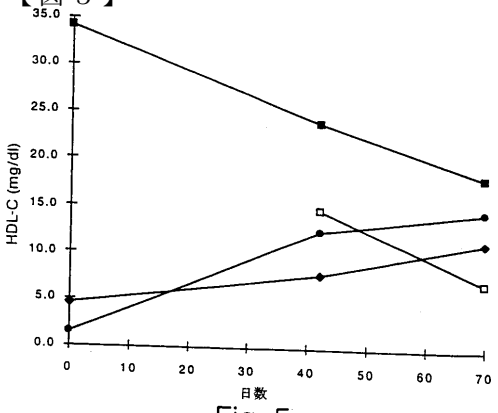

Fig. 5

【図４】

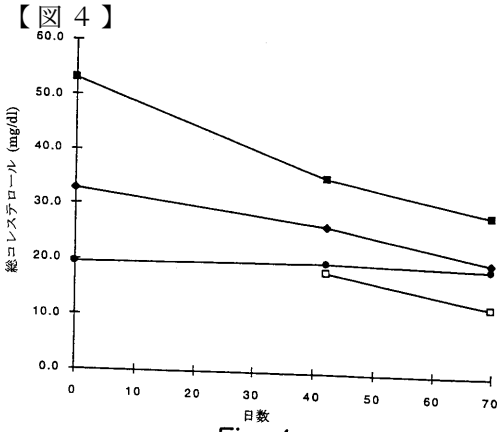

Fig. 4

【図６】

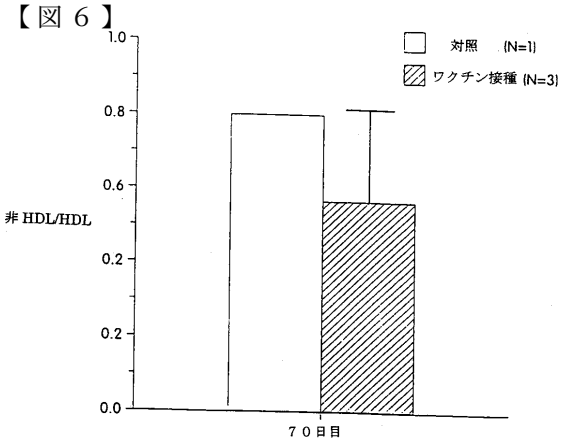

Fig. 6

【図７】

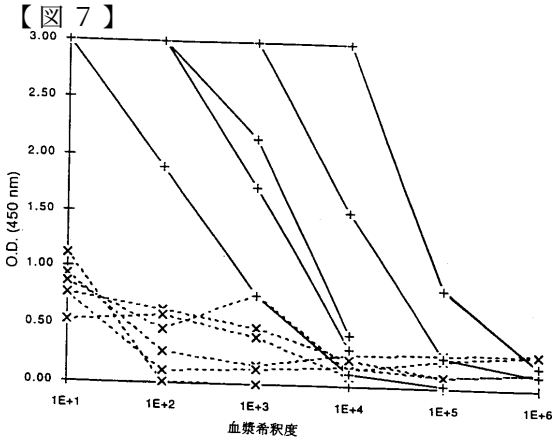

Fig. 7

【図８Ａ】

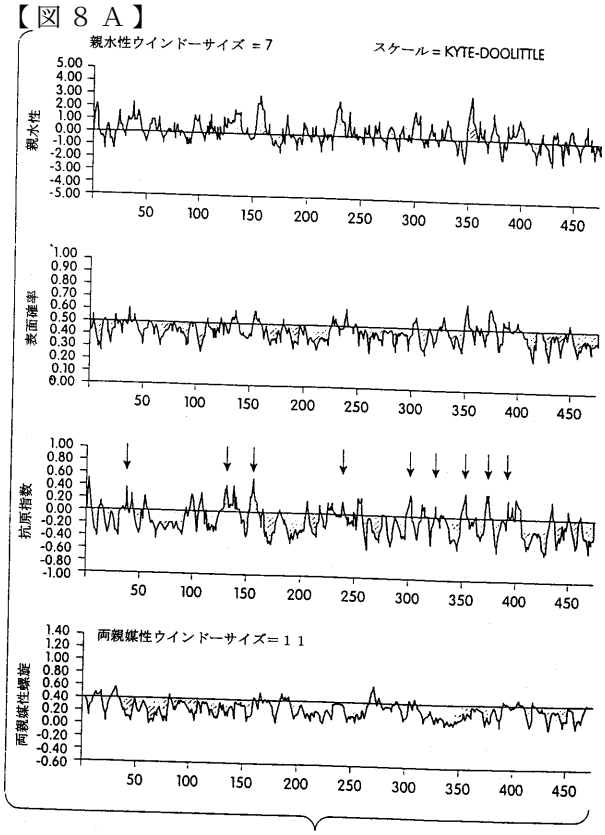

Fig. 8A

【図８Ｂ】

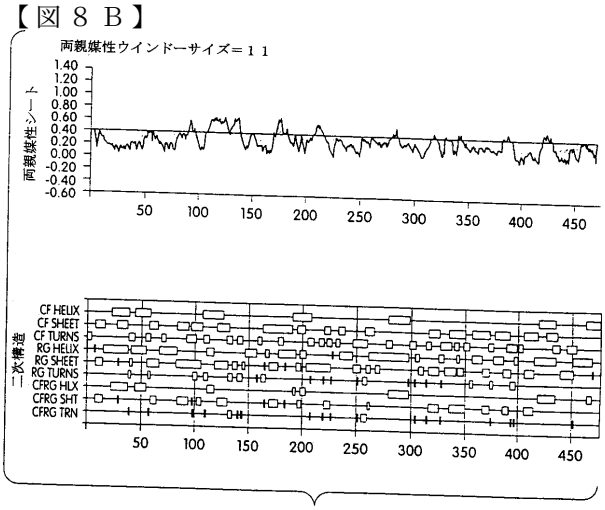

Fig. 8B

【図９】

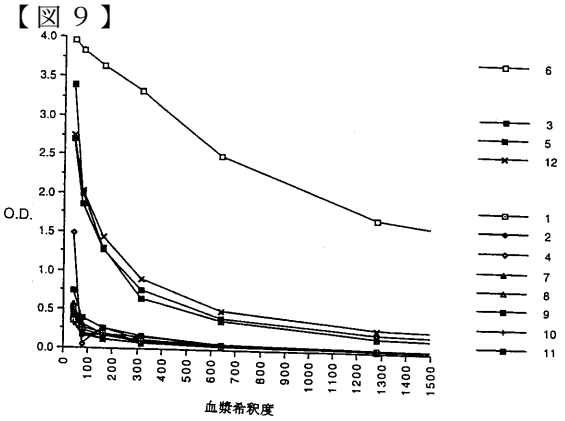

Fig. 9

【図１０Ｂ】

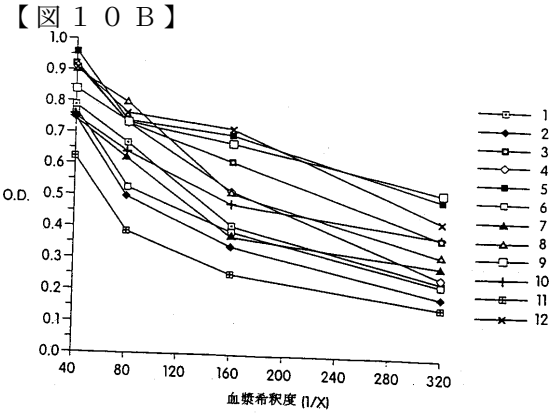

Fig. 10B

【図１０Ａ】

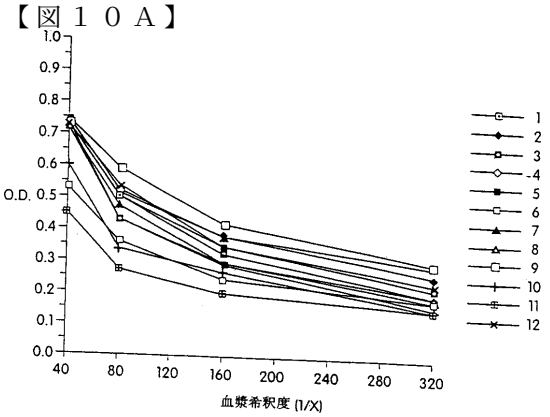

Fig. 10A

【図１１】

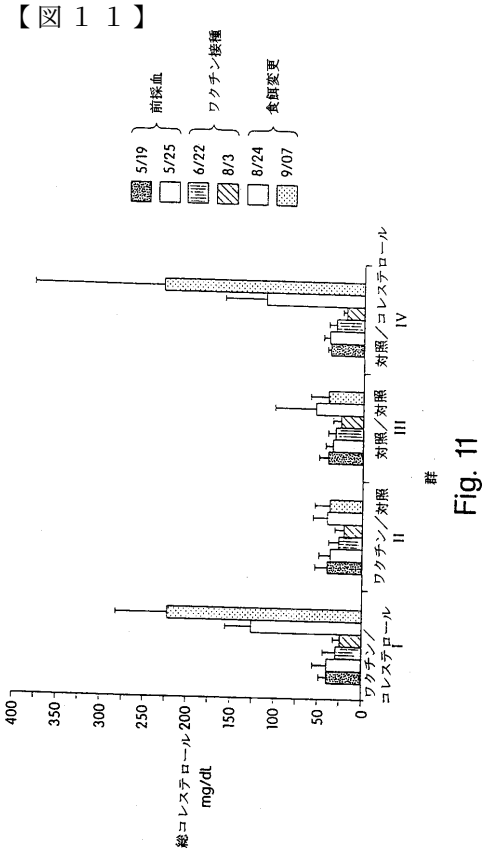

Fig. 11

【図１２】

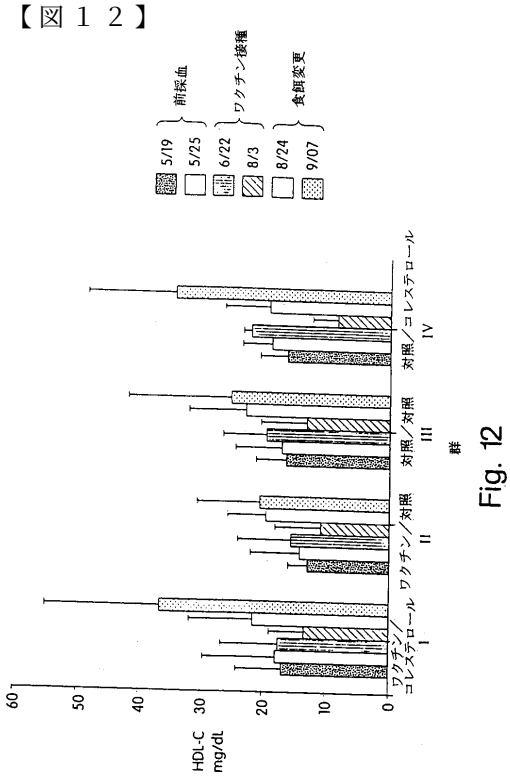

Fig. 12

【図１３】

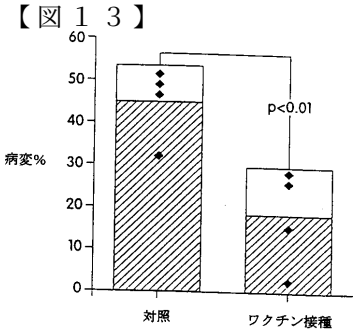

Fig. 13

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		
A61K 39/10	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/10	
A61K 39/13	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/13	
A61K 39/165	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/165	
A61K 39/20	***(2006.01)***	Ａ６１Ｋ	39/20	
A61P 9/10	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	9/10	
A61P 37/04	***(2006.01)***	Ａ６１Ｐ	37/04	
C12N 15/09	***(2006.01)***	Ｃ１２Ｎ	15/00	ＺＮＡＡ

(72)発明者 リッターズハウス，チャールズ，ダブル．
アメリカ合衆国 ０２１４８ マサチューセッツ州，マルデン，ガーデン ストリート ６５
(72)発明者 トーマス，ローレンス，ジェイ．
アメリカ合衆国 ０１６１３ マサチューセッツ州，ウォーセスター，ピー．オー．ボックス ２４１９

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 特開平０３－１７３８３０（ＪＰ，Ａ）
欧州特許出願公開第００４２７３４７（ＥＰ，Ａ１）
国際公開第９４／０２５０６０（WO，Ａ１）
J. Biol. Chem.，１９９２年，Vol.274，No.25，17487-17490
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.，２０００年 9月，Vol.20，No.9，2106-2112
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.，Vol.20，No.9，２０００年 9月，2029-2031
J. General Virol.，１９９１年，Vol.72，1293-1299
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.，Vol.20，No.9，２０００年 9月，2029-2131

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K 14/47
A61K 39/00
A61P 9/10
A61P 37/04
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)