(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0020966
(43) 공개일자 2020년02월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7004309(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년03월30일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7031010
원출원일자(국제) 2016년03월30일
심사청구일자 2017년10월26일
(85) 번역문제출일자 2020년02월13일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2016/060556
(87) 국제공개번호 WO 2016/159181
국제공개일자 2016년10월06일
(30) 우선권주장
JP-P-2015-068043 2015년03월30일 일본(JP)

(71) 출원인
고꾸리쯔 다이가꾸 호우징 오사까 다이가꾸
일본 565-0871 오사까후 스이따시 야마다오까 1방 1고
(72) 발명자
아라세 히사시
일본 5650871 오사카후 스이타시 야마다오카 1-1 고꾸리쯔 다이가꾸 호우징 오사까 다이가꾸 나이
기시다 가즈키
일본 5650871 오사카후 스이타시 야마다오카 1-1 고꾸리쯔 다이가꾸 호우징 오사까 다이가꾸 나이
(74) 대리인
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 14 항

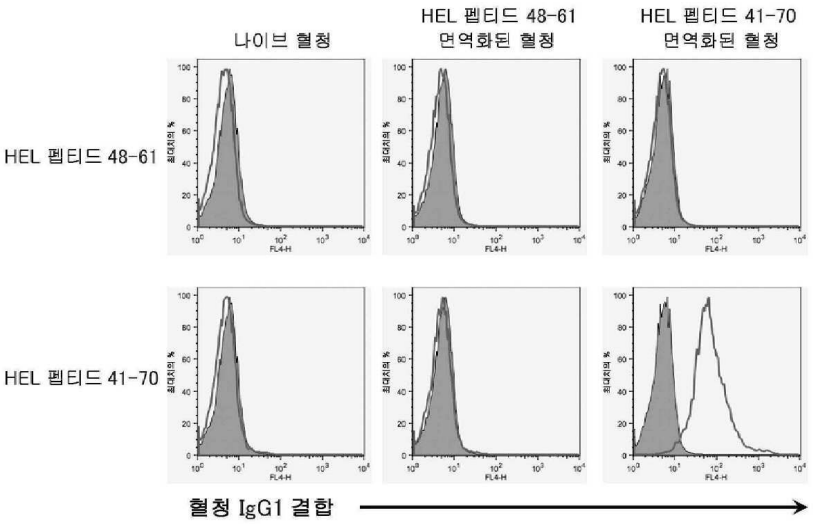
(54) 발명의 명칭 **면역용 펩티드, 면역용 펩티드의 제조 방법, 그것을 포함하는 면역 질환용 의약 조성물, 및 면역 질환의 치료 방법**

(57) 요 약

면역용 펩티드와 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도할 수 있는 새로운 면역용 펩티드를 제공한다.

본 발명의 면역용 펩티드는, 면역용 펩티드로서, 상기 면역용 펩티드는, 타깃 단백질의 T 세포 에피토프와 항체 유도부를 포함하고, 상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 N 말단 아미노산으로부터 상류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 및 상기 T 세포 에피토프의 C 말단 아미노산으로부터 하류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 중 적어도 한쪽이고, 상기 면역용 펩티드는, 생체에 투여함으로써, 상기 면역용 펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도하는 것을 특징으로 한다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C07K 2319/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

면역용 펩티드로서,

상기 면역용 펩티드는 타깃 단백질의 T 세포 에피토프와 항체 유도부를 포함하고,

상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 N 말단 아미노산으로부터 상류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 및 상기 T 세포 에피토프의 C 말단 아미노산으로부터 하류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 중 적어도 한쪽이고,

상기 면역용 펩티드는, 생체에 투여함으로써, 상기 면역용 펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도하는 것을 특징으로 하는, 면역용 펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 N 말단 아미노산으로부터 상류측으로 연속하는 3 이상의 아미노산 및 상기 T 세포 에피토프의 C 말단 아미노산으로부터 하류측으로 연속하는 3 이상의 아미노산 중 적어도 한쪽인, 면역용 펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 생산된 항체가, 상기 T 세포 에피토프와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체를 인식하는 T 세포 수용체의 결합을 저해하는, 면역용 펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 T 세포 에피토프가, 상기 T 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, T 세포 수용체가 인식하는 1 이상의 아미노산이 치환된 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 T 세포 에피토프와 상기 MHC 분자의 복합체에 대하여 특이적인 T 세포 수용체에 의해, 치환된 아미노산 서열과 상기 MHC 분자의 복합체가 인식되지 않는 치환 T 세포 에피토프인, 면역용 펩티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역용 펩티드가 상기 타깃 단백질의 B 세포 에피토프를 포함하고,

상기 B 세포 에피토프가 하기 (1) 또는 (2)의 치환 B 세포 에피토프인, 면역용 펩티드.

(1) 상기 B 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, 1 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 B 세포 에피토프에 대하여 특이적인 B 세포 수용체에 의해 인식되지 않는 치환 B 세포 에피토프

(2) 상기 B 세포 에피토프의 아미노산 서열에 대하여, 100% 미만의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 B 세포 에피토프에 대하여 특이적인 B 세포 수용체에 의해 인식되지 않는 치환 B 세포 에피토프

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MHC 분자가 MHC 클래스 I 분자 및 MHC 클래스 II 분자 중 적어도 한쪽인, 면역용 펩티드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 타깃 단백질이 면역 질환의 항원 단백질인, 면역용 펩티드.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 면역 질환이 알레르기 질환 또는 자기 면역 질환인, 면역용 펩티드.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 알레르기 질환이 음식물 알레르기, 구강 알레르기 증후군, 약제 알레르기, 화분증, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 호산구성 폐렴, 알레르기성 비염, 알레르기성 위장염, 접촉 피부염, 심마진, 광선 과민증, 금속 알레르기, 고양이 알레르기, 진드기 알레르기, 및 천식으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나인, 면역용 펩티드.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 자기 면역 질환이 관절 류머티즘, I형 당뇨병, 전신성 에리테마토데스, 바제도병, 하시모토병, 건선, 천포창, 유천포창, 강피증, 피부근염, 간질성 폐렴, 폐포 단백증, ANCA 관련 혈관염, 류머티즘성 다발 근통증, 자기 면역성 간염, 셀리악병, 다발성 근염, 쉐그렌 증후군, IgG4 관련 질환, 혈관염 증후군, 혼합성 결합 조직병, 길랑·바레 증후군, 중증 근무력증, 만성 위염, 만성 위축성 위염, 원발성 담즙성 간경변, 궤양성 대장염, 크론병, 원발성 경화성 담관염, 자기 면역성 췌염, 대동맥염 증후군, 굿파스처 증후군, 급속 진행성 사구체신염, 막성 신증, IgA 신증, 미소 변화형 네프로제 증후군, 거적아구성 빈혈, 자기 면역성 용혈성 빈혈, 자기 면역성 호중구 감소증, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 원발성 갑상선 기능 저하증, 특발성 애디슨병, 만성 원판상 에리테마토데스, 국한성 강피증, 임신성 포진, 선상 IgA 수포성 피부증, 후천성 표피 수포증, 원형 탈모증, 심상성 백반, 서턴 후천성 원심성 백반·서턴 모반, 하라다병, 자기 면역성 시신경증, 항카르디올리핀 항체, 자기 면역성 내이 장해, 특발성 무정자증, 습관성 유산, 베체트병, 강직성 척추염, 다발성 경화증, 및 나르콜렙시로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나인, 면역용 펩티드.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 면역용 펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역용 펩티드의 제조 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 면역용 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 면역 질환용 의약 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 면역 질환용 의약 조성물이 아쥬반트를 더 포함하는, 면역 질환용 의약 조성물.

청구항 14

면역 질환을 치료하는 방법으로서,

생체에 제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 기재된 면역용 펩티드 및 제12항 또는 제13항에 기재된 면역 질환용 의약 조성물 중 적어도 한쪽을 투여하는 것을 특징으로 하는, 면역 질환의 치료 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은, 면역용 펩티드, 면역용 펩티드의 제조 방법, 그것을 포함하는 면역 질환용 의약 조성물, 및 면역 질환의 치료 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 주요 조직 적합 유전자 복합체(MHC) 클래스 II 분자와, 이것에 의해 제시되어 있는 T 세포 에피토프와의 복합체를 인식하는 항체는, 상기 복합체에 특이적인 T 세포 수용체(이하, 「복합체를 인식하는 T 세포 수용체」라고도 하고, T 세포 수용체를 「TCR」이라고도 함)에 의한 상기 복합체의 인식을 저해하여, 면역 질환의 질환 발증 등

을 억제할 수 있는 것이 알려져 있다(비특허문헌 1).

[0003] 상기 항체는, 상기 T 세포 에피토프의 면역에서는 취득할 수 없고, 상기 T 세포 에피토프와 상기 MHC 클래스 II 분자의 복합체(이하, 「T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자」라고도 함)의 면역이 필요하다(비특허문헌 2-4). 그러나, 상기 MHC 클래스 II 분자는 다수의 알릴이 있고, 게다가, 환자마다 생체 내에서 발현하고 있는 상기 MHC 클래스 II 분자는 상이하다. 이 때문에, 각 면역 질환에 있어서의 각 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자에 관하여, 상기 항체를 의약으로서 취득하는 경우, 상기 항체를 생산하는 세포를 취득하기 위해, 우선, 다수의 조합의 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 준비한다. 그리고, 다수의 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자에 관하여, 각각, 생체에 투여하고, 상기 생체로부터, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 항체 생산 세포를 단클론으로서 채취할 필요가 있었다. 따라서, 방대한 수의 조합의 문제로부터, 상기 항체를 취득하고, 상기 항체를 치료에 사용하는 것은 곤란하다는 문제가 있었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0004] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Aharoni et al., “Immunomodulation of experimental allergic encephalomyelitis by antibodies to the antigen-Ia complex.”, Nature, 1991, vol.351, pp.147-150

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Viville et al., “Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain.”, Cell, 1993, vol.72, pp.635-648

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Martin et al., “H2-M mutant mice are defective in the peptide loading of class II molecules, antigen presentation, and T cell repertoire selection.”, Cell, 1996, vol.84, pp.543-550

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Cosgrove et al., “Mice lacking MHC class II molecules.”, Cell, 1991, vol.66, pp.1051-1066

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그래서, 본 발명은, 면역용 펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도할 수 있는 새로운 면역용 펩티드의 제공을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 본 발명의 과제를 해결하기 위해, 본 발명의 면역용 펩티드는, 면역용 펩티드로서,

[0007] 상기 면역용 펩티드는, 타깃 단백질의 T 세포 에피토프와 항체 유도부를 포함하고,

[0008] 상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 N 말단 아미노산으로부터 상류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 및 상기 T 세포 에피토프의 C 말단 아미노산으로부터 하류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 중 적어도 한쪽이고,

[0009] 상기 면역용 펩티드는, 생체에 투여함으로써, 상기 면역용 펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 면역용 펩티드의 제조 방법(이하, 「제조 방법」이라고도 함)은, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 면역 질환용 의약 조성물(이하, 「의약 조성물」이라고도 함)은, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0012] 본 발명의 면역 질환의 치료 방법은, 면역 질환을 치료하는 방법으로서,

[0013] 생체에 상기 본 발명의 면역용 펩티드 및 상기 본 발명의 면역 질환용 의약 조성물 중 적어도 한쪽을 투여하는

것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 면역용 펩티드에 의하면, 상기 면역용 펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은, 실시예 1A에 있어서의 IgG 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다.

도 2는, 실시예 1A에 있어서의 IgG 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다.

도 3은, 실시예 1B에 있어서의 가용형 단쇄 TCR의 결합량을 나타내는 히스토그램이다.

도 4는, 실시예 1B에 있어서의 IL-2의 생산량을 나타내는 그래프이다.

도 5는, 실시예 2A에 있어서의 IgG1 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다.

도 6은, 실시예 2B에 있어서의 가용형 단쇄 TCR의 결합량을 나타내는 히스토그램이다.

도 7은, 실시예 3에 있어서의 IgG 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다.

도 8은, 실시예 4에 있어서의 가용형 단쇄 TCR의 결합량을 나타내는 히스토그램이다.

도 9는, 실시예 5에 있어서의 IgG 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다.

도 10은, 실시예 6에 있어서의 CD45 양성 세포에 있어서의 GFP 양성 세포의 비율을 나타내는 그래프이다.

도 11은, 실시예 7에 있어서의 세포 증식의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 12는, 실시예 7에 있어서의 임상 스코어의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 13은, 실시예 8에 있어서의 임상 스코어의 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 면역용 펩티드에 있어서, 상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 N 말단 아미노산으로부터 상류측으로 연속하는 3 이상의 아미노산 및 상기 T 세포 에피토프의 C 말단 아미노산으로부터 하류측으로 연속하는 3 이상의 아미노산 중 적어도 한쪽인 것이 바람직하다.

[0017] 본 발명의 면역용 펩티드에 있어서, 상기 생산된 항체가, 상기 T 세포 에피토프와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체를 인식하는 T 세포 수용체의 결합을 저해하는 것이 바람직하다.

[0018] 본 발명의 면역용 펩티드에 있어서, 상기 T 세포 에피토프는, 상기 T 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, T 세포 수용체가 인식하는 1 이상의 아미노산이 치환된 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 T 세포 에피토프와 상기 MHC 분자의 복합체에 대하여 특이적인 T 세포 수용체에 의해, 치환된 아미노산 서열과 상기 MHC 분자의 복합체가 인식되지 않는 치환 T 세포 에피토프인 것이 바람직하다.

[0019] 본 발명의 면역용 펩티드는, 상기 타깃 단백질의 B 세포 에피토프를 포함하고,

[0020] 상기 B 세포 에피토프가, 하기 (1) 또는 (2)의 치환 B 세포 에피토프인 것이 바람직하다.

[0021] (1) 상기 B 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, 1 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 B 세포 에피토프에 대하여 특이적인 B 세포 수용체에 의해 인식되지 않는 치환 B 세포 에피토프

[0022] (2) 상기 B 세포 에피토프의 아미노산 서열에 대하여, 100% 미만의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 B 세포 에피토프에 대하여 특이적인 B 세포 수용체에 의해 인식되지 않는 치환 B 세포 에피토프

[0023] 본 발명의 면역용 펩티드에 있어서, 상기 MHC 분자가, 예컨대, MHC 클래스 I 분자 및 MHC 클래스 II 분자 중 적어도 한쪽이다.

[0024] 본 발명의 면역용 펩티드에 있어서, 상기 타깃 단백질이, 예컨대, 면역 질환의 항원 단백질이다.

[0025] 본 발명의 면역용 펩티드에 있어서, 상기 면역 질환이, 예컨대, 알레르기 질환 또는 자기 면역 질환이다. 상기 알레르기 질환이, 예컨대, 음식물 알레르기, 구강 알레르기 증후군, 약제 알레르기, 화분증, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 호산구성 폐렴, 알레르기성 비염, 알레르기성 위장염, 접촉 피부염, 심마진, 광선 과민증, 금속 알레르기, 고양이 알레르기, 진드기 알레르기, 및 천식으로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나이다. 상기 자기 면역 질환이, 예컨대, 관절 류머티즘, I형 당뇨병, 전신성 에리테마토데스, 바제도병, 하시모토병, 건선, 천포창, 유천포창, 강피증, 피부근염, 간질성 폐렴, 폐포 단백증, ANCA 관련 혈관염, 류머티즘성 다발 근통증, 자기 면역성 간염, 셀리악병, 다발성 근염, 쉐그렌 증후군, IgG4 관련 질환, 혈관염 증후군, 혼합성 결합 조직병, 길랑·바레 증후군, 중증 근무력증, 만성 위염, 만성 위축성 위염, 원발성 담즙성 간경변, 궤양성 대장염, 크론병, 원발성 경화성 담관염, 자기 면역성 췌염, 대동맥염 증후군, 굿파스처 증후군, 급속 진행성 사구체신염, 막성 신증, IgA 신증, 미소 변화형 네프로제 증후군, 거적아구성 빈혈, 자기 면역성 용혈성 빈혈, 자기 면역성 호중구 감소증, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 원발성 갑상선 기능 저하증, 특발성 애디슨병, 만성 원판상 에리테마토데스, 국한성 강피증, 임신성 포진, 선상 IgA 수포성 피부증, 후천성 표피 수포증, 원형 탈모증, 심상성 백반, 서턴 후천성 원심성 백반·서턴 모반, 하라다병, 자기 면역성 시신경증, 항카르디올리핀 항체, 자기 면역성 내이 장해, 특발성 무정자증, 습관성 유산, 베체트병, 강직성 척추염, 다발성 경화증, 및 나르콜렙시로 이루어지는 군으로부터 선택된 하나이다.

[0026] 본 발명의 면역 질환용 의약 조성물에 있어서, 상기 면역 질환용 의약 조성물은 아쥬반트를 더 포함하는 것이 바람직하다.

[0027] 본 발명에 있어서, 「상류」는, 단백질의 아미노산 서열에 있어서 N 말단 방향을 의미하고, 「하류」는, 단백질의 아미노산 서열에 있어서 C 말단 방향을 의미한다. 본 발명에 있어서, 「치료」는, 예컨대, 상기 질환의 예방, 질환의 개선, 예후의 개선의 의미를 포함하고, 어느 것이어도 좋다.

[0028] <면역용 펩티드>

[0029] 본 발명의 면역용 펩티드는, 전술한 바와 같이, 면역용 펩티드로서, 상기 면역용 펩티드는, 타깃 단백질의 T 세포 에피토프와 항체 유도부를 포함하고, 상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 N 말단 아미노산으로부터 상류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열(이하, 「상류측 항체 유도부」라고도 함) 및 상기 T 세포 에피토프의 C 말단 아미노산으로부터 하류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열(이하, 「하류측 항체 유도부」라고도 함) 중 적어도 한쪽이고, 상기 면역용 펩티드는, 생체에 투여함으로써, 상기 면역용 펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체(이하, 「면역용 펩티드/MHC 분자」라고도 함)에 대한 항체 생산을 유도하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 면역용 펩티드는, 상기 면역용 펩티드가, 상기 타깃 단백질의 T 세포 에피토프와 상기 항체 유도부를 포함하고, 상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 상류측 항체 유도부 및 상기 하류측 항체 유도부 중 적어도 한쪽이고, 상기 면역용 펩티드는, 생체에 투여함으로써, 상기 면역용 펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도하는 것을 특징으로 하고, 그 밖의 구성 및 조건은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 면역용 펩티드는, 상기 생체에 투여함으로써 항체 생산을 유도할 수 있는 점에서, 예컨대, 「항체 생산 유도제」라고 할 수도 있다.

[0030] 일반적으로, 상기 T 세포 에피토프와 상기 MHC 클래스 II 분자의 복합체(이하, 「T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자」라고도 함), 즉 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체(이하, 「펩티드/MHC 클래스 II 분자」라고도 함)에 대한 항체를 취득하는 경우, 상기 펩티드/MHC 클래스 II 분자를 제작하고, 면역할 필요가 있다. 그러나, 본 발명에 의하면, 이하의 이유로부터, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 항체의 유도에 있어, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자의 제작이 불필요하다. 즉, 본 발명자들은, 예의 연구한 결과, 면역 응답시에, 상기 MHC 클래스 II 분자는, 상기 T 세포 에피토프보다 긴 폴리펩티드, 즉 면역용 펩티드를 제시하고 있는 것, 및 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 항체가 존재하는 것을 발견했다. 그리고, 상기 면역용 펩티드를 생체에 투여함으로써, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 항체 생산을 유도할 수 있는 것을 확인하고, 본 발명을 확립하기에 이르렀다. 이 때문에, 본 발명에서는, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 항체 생산의 유도에 앞서, 상기 선행기술문헌과 같이, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자를 제작할 필요가 없기 때문에, 예컨대, 간편히 항체 생산을 유도할 수 있다. 또한, 본 발명자들은, 면역 응답시에, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR을 갖는 T 세포가, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 것, 및 상기 면역용 펩티드로 생산되는 항체가, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II

분자에 대한 상기 TCR의 결합을 저해할 수 있는 것을 발견했다. 또한, 면역용 펩티드와 MHC 클래스 I 분자의 복합체(이하, 「면역용 펩티드/MHC 클래스 I 분자」라고도 함)에 관해서도 마찬가지이다. 이 때문에, 본 발명의 면역용 펩티드에 의하면, 상기 생체에 상기 면역용 펩티드를 투여함으로써, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 항체 생산을 유도할 수 있고, 이에 따라, 예컨대, 상기 T 세포 에피토프/MHC 분자를 인식하는 T 세포에 의해 야기되는 질환의 발증, 증악(增惡) 등을 보다 효과적으로 억제할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 타깃 단백질은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 면역 질환의 항원 단백질 등을 들 수 있다. 상기 면역 질환은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 알레르기 질환, 자기 면역 질환, 장기 이식 후의 거절 반응 등을 들 수 있다. 상기 알레르기 질환은, 예컨대, 음식물 알레르기, 구강 알레르기 증후군, 약제 알레르기, 화분증, 아토피성 피부염, 알레르기성 결막염, 호산구성 폐렴, 알레르기성 비염, 알레르기성 위장염, 접촉 피부염, 심마진, 광선 과민증, 금속 알레르기, 고양이 알레르기, 진드기 알레르기, 천식 등을 들 수 있다. 상기 음식물 알레르기는, 예컨대, 알 알레르기, 피넛 알레르기, 소맥 알레르기, 메밀 알레르기, 대두 알레르기, 우유 알레르기, 생선 알레르기, 과일 알레르기 등을 들 수 있다. 상기 화분증은, 예컨대, 삼목 화분증, 돼지풀 화분증, 자작나무 화분증 등을 들 수 있다. 상기 자기 면역 질환은, 예컨대, 관절 류머티즘, I형 당뇨병, 전신성 에리테마토데스(SLE), 바제도병, 하시모토병, 건선, 천포창, 유천포창, 강피증, 피부근염, 간질성 폐렴, 폐포 단백증, ANCA(antineutrophil cytoplasmic antibody; 항중성구 세포질 항체) 관련 혈관염, 류머티즘성 다발근통증, 자기 면역성 간염, 셀리악병, 다발성 근염, 쉐그렌 증후군, IgG4 관련 질환, 혈관염 증후군, 혼합성 결합 조직병, 길랑·바레 증후군, 중증 근무력증, 만성 위염, 만성 위축성 위염, 원발성 담즙성 간경변, 궤양성 대장염, 크론병, 원발성 경화성 담관염, 자기 면역성 췌염, 대동맥염 증후군, 굿파스처 증후군, 급속 진행성 사구체신염, 막성 신증, IgA 신증, 미소 변화형 네프로제 증후군, 거적아구성 빈혈, 자기 면역성 용혈성 빈혈, 자기 면역성 호중구 감소증, 특발성 혈소판 감소성 자반병, 원발성 갑상선 기능 저하증, 특발성 애디슨병, 만성 원판상 에리테마토데스, 국한성 강피증, 임신성 포진, 선상 IgA 수포성 피부증, 후천성 표피 수포증, 원형 탈모증, 심상성 백반, 서턴 후천성 원심성 백반·서턴 모반, 하라다병, 자기 면역성 시신경증, 항카르디올리핀 항체, 자기 면역성 내이 장해, 특발성 무정자증, 습관성 유산, 베체트병, 강직성 척추염, 다발성 경화증, 나르콜렙시 등을 들 수 있다. 상기 타깃 단백질이 상기 알레르기 질환의 항원 단백질인 경우, 상기 타깃 단백질은, 예컨대, 「알레르겐」이라고 할 수 있다. 또한, 상기 타깃 단백질이 상기 자기 면역 질환의 항원 단백질인 경우, 상기 타깃 단백질은, 예컨대, 「자기 항원 단백질」이라고 할 수 있다. 구체적으로, 상기 타깃 단백질은, 예컨대, 하기 표 1 및 2의 타깃 단백질을 들 수 있다. 상기 타깃 단백질은, 예컨대, 1종류여도 좋고, 2종류 이상이어도 좋다.

표 1

질환명	타깃 단백질 (데이터베이스 번호)	T 세포 에피토프의 아미노산 서열	T 세포 에피토프를 제시하는 MHC 클래스 II 분자
알 알레르기	계란 라이소자임(HEL) (1LKS_A)	DGSTDYGILQINSR (서열번호 1)	I-Ak
소맥 알레르기	ω-5글리아딘 (AAG17702)	PFPQQPQQPFPQQPQQSFPQ (서열번호 2)	HLA-DQ2, DQ8
알 알레르기	오보뮤코이드 (NP_001106132)	VTYTNDCLLCAYSIEFGTN (서열번호 3)	HLA-DRB1
삼목 화분증	Cry j IA (BAA05542)	KVTVAFNQF (서열번호 4)	HLA-DP5
진드기 알레르기	Der p 1 (AAA28296)	SAYLAHRNQSLDLAEQELVDCAS (서열번호 5)	HLA-DR7, DR4
고양이 알레르기	Fel d 1 (AAC37318)	LPVVLENARILKN (서열번호 6)	HLA-DR1
다발성 경화증	PLP (미엘린 단백지질 단백질) (NP_001277491.1)	HCLGKWLGHPDKF (서열번호 7)	I-As

[0032]

[0033] 본 발명에 있어서, 「T 세포 에피토프」는, 예컨대, 후술하는 MHC 클래스 I 분자 또는 MHC 클래스 II 분자와 복합체를 형성했을 때에, 특이적인 CD4 양성 또는 CD8 양성 T 세포에 의해 인식되는 최단의 펩티드를 의미한다. 본 발명에 있어서, T 세포 에피토프는, CD4 양성 T 세포에 의해 인식되는 T 세포 에피토프여도 좋고, CD8 양성 T 세포에 의해 인식되는 T 세포 에피토프여도 좋고, 양자에 의해 인식되는 T 세포 에피토프여도 좋다. 상기 T

세포 에피토프는, 예컨대, 상기 타깃 단백질의 공지된 T 세포 에피토프여도 좋고, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열, 및 상기 MHC 클래스 I 분자 또는 상기 MHC 클래스 II 분자에 기초하여, 알고리즘 등에 의해 예측된 T 세포 에피토프여도 좋다. 전자는, 예컨대, 공지된 T 세포 에피토프의 라이브러리인 면역 에피토프 데이터베이스(Immune Epitope Database) (http://www.iedb.org)에 등록된 T 세포 에피토프 등을 들 수 있다. 또한, 후자는, 예컨대, 면역 에피토프 데이터베이스에 있어서의 알고리즘에 의해 예측된 T 세포 에피토프 등을 들 수 있다. 구체적으로, 상기 타깃 단백질의 T 세포 에피토프는, 예컨대, 상기 표 1의 T 세포 에피토프를 들 수 있다. 상기 타깃 단백질이 복수의 T 세포 에피토프를 포함하는 경우, 상기 면역용 펩티드는, 예컨대, 하나의 T 세포 에피토프를 포함해도 좋고, 복수의 T 세포 에피토프를 포함해도 좋고, 모든 T 세포 에피토프를 포함해도 좋다.

[0034] 본 발명에 있어서, 상기 T 세포 에피토프는, 상기 T 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, TCR이 인식하는 1 이상의 아미노산이 치환된 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 T 세포 에피토프/MHC 분자에 대하여 특이적인 TCR에 의해, 상기 치환된 아미노산 서열과 MHC 분자의 복합체가 인식되지 않는 치환 T 세포 에피토프인 것이 바람직하다. 상기 치환 T 세포 에피토프는, 예컨대, MHC 분자와 복합체를 형성했을 때에, 미치환의 T 세포 에피토프와 MHC 분자의 복합체를 인식하는 TCR을 갖는 T 세포에 의해 인식될 가능성이 상대적으로 낮거나, 또는 인식되지 않는다. 이 때문에, 상기 치환 T 세포 에피토프에 의하면, 예컨대, 생체에 투여했을 때에, 상기 미치환의 T 세포 에피토프와 상기 MHC 분자의 복합체를 인식하는 TCR을 갖는 T 세포의 활성화를 저감하고, 상기 면역용 펩티드/MHC 분자에 대한 항체 생산을 유도할 수 있다. 따라서, 예컨대, 면역 질환 환자에 대하여, 상기 치환 T 세포 에피토프를 포함하는 면역용 펩티드를 투여했을 때에, 상기 미치환의 T 세포 에피토프와 상기 MHC 분자의 복합체를 인식하는 TCR을 갖는 T 세포에 의해 야기되는, 상기 면역 질환의 발증, 증악 등을 억제할 수 있다. 상기 면역용 펩티드가 복수의 T 세포 에피토프를 포함하는 경우, 하나의 T 세포 에피토프가 상기 치환 T 세포 에피토프여도 좋고, 복수의 T 세포 에피토프가 상기 치환 T 세포 에피토프여도 좋고, 모든 T 세포 에피토프가 상기 치환 T 세포 에피토프여도 좋다. 상기 생체에 관해서는 후술한다.

[0035] 상기 TCR에 의해, 펩티드/MHC 분자가 인식되지 않는다란, 예컨대, 상기 TCR을 발현하는 T 세포의 상기 펩티드/MHC 분자에 대한 응답성이, 상기 TCR에 특이적인 펩티드/MHC 분자에 대한 응답성에 비교하여 유의하게 낮은 것을 의미한다. 상기 응답성은, 예컨대, 상기 펩티드/MHC 분자로 상기 TCR을 발현하는 T 세포를 자극했을 때의 증식능, IL-2 생산능, NFAT 리포터 유전자의 활성화 등에 의해 측정할 수 있다. 상기 펩티드는, 면역용 펩티드여도 좋고, T 세포 에피토프여도 좋고, 치환 T 세포 에피토프여도 좋다.

[0036] 상기 T 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, 아미노산이 치환되는 위치는, TCR이 인식하는 위치의 아미노산이면 되고, 예컨대, 상기 T 세포 에피토프에 따라 적절하게 설정할 수 있다. 상기 치환 아미노산의 위치는, 예컨대, 상기 T 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, 상기 위치의 아미노산을 치환한 치환 T 세포 에피토프가, 상기 MHC 분자와 복합체를 형성하며, 또한 상기 T 세포 에피토프/MHC 분자에 대하여 특이적인 TCR에 의한 인식이, 상기 치환에 의해 유의하게 저하되는 아미노산의 위치를 들 수 있다. 상기 치환 아미노산의 위치는, 구체적으로는, 예컨대, 상기 MHC 분자의 펩티드 결합 홈 상에 배치되며, 또한 앵커 잔기 이외의 아미노산의 위치를 들 수 있다. 구체예로서, 상기 치환 아미노산의 위치는, 상기 표 1의 T 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, 밑줄로 표시한 아미노산을 들 수 있다. 상기 치환 후의 아미노산은, 예컨대, 상기 치환 전의 아미노산과 상이한 아미노산이고, 바람직하게는, 상기 치환 전의 아미노산의 측쇄와 상이한 특성의 측쇄를 갖는 아미노산이다. 구체적으로, 상기 타깃 단백질이 HEL이고, 상기 T 세포 에피토프가 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드인 경우, 상기 치환 아미노산의 위치는, 예컨대, 6번째의 티로신(Y)(HEL의 53번째의 티로신), 및 9번째의 류신(L)(HEL의 56번째의 류신)을 들 수 있다. 또한, 상기 6번째의 티로신(Y)에 있어서의 치환 후의 아미노산은, 예컨대, 알라닌(A)을 들 수 있고, 상기 9번째의 류신(L)에 있어서의 치환 후의 아미노산은, 예컨대, 알라닌(A)을 들 수 있다. 상기 타깃 단백질이 PLP이고, 상기 T 세포 에피토프가 상기 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드인 경우, 상기 치환 아미노산의 위치는, 예컨대, 3번째의 류신(L)(PLP의 141번째의 류신), 6번째의 트립토판(W)(PLP의 144번째의 트립토판), 및 9번째의 히스티딘(H)(PLP의 147번째의 히스티딘)을 들 수 있다. 또한, 상기 면역용 펩티드의 아미노산 서열에 있어서, 시스테인(C)이 세린(S)으로 치환되어도 좋다. 구체적으로, 상기 타깃 단백질이 PLP이고, 상기 T 세포 에피토프가 상기 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드인 경우, 상기 치환 아미노산의 위치는, 예컨대, 2번째의 시스테인(C)(PLP의 140번째의 시스테인)을 들 수 있다.

[0037] 상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 상류측 항체 유도부 및 상기 하류측 항체 유도부 중 적어도 한쪽이다. 구체적으로, 상기 면역용 펩티드는, 예컨대, 상기 상류측 항체 유도부를 포함해도 좋고, 상기 하류측 항체 유도부를 포함해도 좋고, 양자를 포함해도 좋다. 상기 면역용 펩티드가 어느 상기

항체 유도부를 포함할지는, 예컨대, 상기 타깃 단백질의 T 세포 에피토프에 따라 적절하게 설정할 수 있다. 상기 타깃 단백질이 HEL이고, 상기 T 세포 에피토프가 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드인 경우, 상기 면역용 펩티드는, 상기 하류측 항체 유도부를 포함하는 것이 바람직하다. 상기 타깃 단백질이 PLP이고, 상기 T 세포 에피토프가 상기 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드인 경우, 상기 면역용 펩티드는, 상기 상류측 항체 유도부를 포함하는 것이 바람직하다.

[0038] 상기 면역용 펩티드가 상기 상류측 항체 유도부를 포함하는 경우, 상기 상류측 항체 유도부에 있어서, 연속하는 아미노산의 개수는, 1 이상이면 되고, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 이상이다. 상기 연속하는 아미노산의 개수의 상한은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 N 말단 아미노산보다 상류의 모든 아미노산의 개수(이하, 「N 말단측 아미노산 총수」라고도 함), N 말단측 아미노산 총수 - 1, N 말단측 아미노산 총수 - 2, N 말단측 아미노산 총수 - 3, N 말단측 아미노산 총수 - 4, N 말단측 아미노산 총수 - 5, N 말단측 아미노산 총수 - 10, N 말단측 아미노산 총수 - 15, N 말단측 아미노산 총수 - 20, N 말단측 아미노산 총수 - 25, N 말단측 아미노산 총수 - 30, N 말단측 아미노산 총수 - 35, N 말단측 아미노산 총수 - 40, N 말단측 아미노산 총수 - 45이다. 구체예로서, 상기 타깃 단백질이 HEL이고, 상기 T 세포 에피토프가 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드인 경우, 상기 상류측 항체 유도부에 있어서, 연속하는 아미노산의 개수는, 예컨대, 1~47개, 3~23개, 5~12개이다. 상기 타깃 단백질이 PLP이고, 상기 T 세포 에피토프가 상기 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드인 경우, 상기 상류측 항체 유도부에 있어서, 연속하는 아미노산의 개수는, 예컨대, 1~131개, 3~66개, 5~33개이다. 본 발명에 있어서, 개수의 수치 범위는, 예컨대, 그 범위에 속하는 양의 정수를 전부 개시하는 것이다.

[0039] 상기 면역용 펩티드가 상기 하류측 항체 유도부를 포함하는 경우, 상기 하류측 항체 유도부에 있어서, 연속하는 아미노산의 개수는, 1 이상이면 되고, 예컨대, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 이상이다. 상기 연속하는 아미노산의 개수의 상한은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 C 말단 아미노산보다 하류의 모든 아미노산의 개수(이하, 「C 말단측 아미노산 총수」라고도 함)이고, 바람직하게는, C 말단측 아미노산 총수 - 1, C 말단측 아미노산 총수 - 2, C 말단측 아미노산 총수 - 3, C 말단측 아미노산 총수 - 4, C 말단측 아미노산 총수 - 5, C 말단측 아미노산 총수 - 10, C 말단측 아미노산 총수 - 15, C 말단측 아미노산 총수 - 20, C 말단측 아미노산 총수 - 25, C 말단측 아미노산 총수 - 30, C 말단측 아미노산 총수 - 35, C 말단측 아미노산 총수 - 40, C 말단측 아미노산 총수 - 45이다. 구체예로서, 상기 타깃 단백질이 HEL이고, 상기 T 세포 에피토프가 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드인 경우, 상기 하류측 항체 유도부에 있어서, 연속하는 아미노산의 개수는, 예컨대, 1~68개, 3~34개, 5~17개이다. 상기 타깃 단백질이 PLP이고, 상기 T 세포 에피토프가 상기 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드인 경우, 상기 하류측 항체 유도부에 있어서, 연속하는 아미노산의 개수는, 예컨대, 1~131개, 3~66개, 5~33개이다.

[0040] 본 발명의 상기 면역용 펩티드가, 상기 타깃 단백질의 B 세포 에피토프를 포함하고, 상기 B 세포 에피토프가, 하기 (1) 또는 (2)의 치환 B 세포 에피토프인 것이 바람직하다.

[0041] (1) 상기 B 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, 1 이상의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 B 세포 에피토프에 대하여 특이적인 B 세포 수용체(이하, 「BCR」이라고도 함)에 의해 인식되지 않는 치환 B 세포 에피토프

[0042] (2) 상기 B 세포 에피토프의 아미노산 서열에 대하여, 100% 미만의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 B 세포 에피토프에 대하여 특이적인 B 세포 수용체에 의해 인식되지 않는 치환 B 세포 에피토프

[0043] 상기 치환 B 세포 에피토프는, 예컨대, 미치환의 B 세포 에피토프를 인식하는 BCR을 갖는 B 세포에 의해 인식될 가능성이 상대적으로 낮거나, 또는 인식되지 않는다. 이 때문에, 상기 치환 B 세포 에피토프에 의하면, 예컨대, 생체에 투여했을 때에, 상기 미치환의 B 세포 에피토프를 인식하는 BCR을 갖는 B 세포의 활성화를 저감하고, 상기 면역용 펩티드/MHC 분자에 대한 항체 생산을 유도할 수 있다. 따라서, 예컨대, 면역 질환 환자에 대하여, 상기 치환 B 세포 에피토프를 포함하는 면역용 펩티드를 투여했을 때에, 상기 미치환의 B 세포 에피토프를 인식하는 BCR을 갖는 B 세포에 의해 야기되는, 아나필락시 쇼크 등의 부작용을 억제할 수 있다. 상기 치환 B 세포 에피토프는, 예컨대, 상기 치환 T 세포 에피토프와 조합해도 좋다.

[0044] 본 발명에 있어서, 「B 세포 에피토프」는, 예컨대, 특이적인 B 세포에 의해 인식되는 최단의 펩티드를 의미한

다. 상기 B 세포 에피토프는, 예컨대, 상기 타깃 단백질의 공지된 B 세포 에피토프여도 좋고, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 기초하여, 알고리즘 등에 의해 예측된 B 세포 에피토프여도 좋다. 전자는, 예컨대, 공지된 B 세포 에피토프의 라이브러리인 면역 에피토프 데이터베이스(http://www.iedb.org)에 등록된 B 세포 에피토프 등을 들 수 있다. 또한, 후자는, 예컨대, 면역 에피토프 데이터베이스에 있어서의 알고리즘에 의해 예측된 B 세포 에피토프 등을 들 수 있다. 구체적으로, 상기 타깃 단백질의 B 세포 에피토프는, 예컨대, 하기 표 2의 B 세포 에피토프를 들 수 있다.

표 2

[0045]

질환명	타깃 단백질 (데이터베이스 번호)	B 세포 에피토프의 아미노산 서열
소맥 알레르기	ω-5글리아딘 (AAG17702)	QQIPQQQ (서열번호８)
알 알레르기	오보뮤코이드 (NP_001106132)	AEVDCSRFPNATDKEGKDVLSIE FGTNISKVEQGASVDKR (서열번호９)
삼목 화분증	Cry j IA (BAA05542)	GVEPVHPQDGDALTLRTATN (서열번호１０)

[0046] 상기 타깃 단백질이 복수의 B 세포 에피토프를 포함하는 경우, 상기 면역용 펩티드는, 예컨대, 하나의 B 세포 에피토프를 포함해도 좋고, 복수의 B 세포 에피토프를 포함해도 좋고, 모든 B 세포 에피토프를 포함해도 좋다. 상기 면역용 펩티드가 복수의 상기 B 세포 에피토프를 포함하는 경우, 하나의 B 세포 에피토프가 상기 치환 B 세포 에피토프여도 좋고, 복수의 B 세포 에피토프가 상기 치환 B 세포 에피토프여도 좋고, 모든 B 세포 에피토프가 상기 치환 B 세포 에피토프여도 좋다. 또한, 상기 면역용 펩티드는, 예컨대, 각 B 세포 에피토프에 있어서, 상기 B 세포 에피토프의 아미노산 서열의 전부를 포함해도 좋고, 그 일부를 포함해도 좋다.

[0047] 상기 (1)에 있어서, 「1 이상」은, 예컨대, 상기 (1)이, 상기 B 세포 에피토프에 대하여 특이적인 BCR이 인식하지 않는 범위이면 된다. 상기 (1)의 「1 이상」은, 상기 B 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, 예컨대, 1개, 2개, 1~3개, 1~5개, 1~9개, 1~10개, 1~20개, 1~30개, 1~40개, 1~45개, 1~50개이다. 상기 「1 이상」의 상한은, 예컨대, 100개, 90개, 80개이다.

[0048] 상기 (2)에 있어서, 「동일성」은, 예컨대, 상기 (2)가, 상기 B 세포 에피토프에 대하여 특이적인 BCR이 인식하지 않는 범위이면 된다. 상기 (2)의 동일성은, 상기 B 세포 에피토프의 아미노산 서열에 대하여, 100% 미만이면 되고, 예컨대, 99% 이하, 98% 이하, 97% 이하, 96% 이하, 95% 이하, 90% 이하, 85% 이하, 80% 이하, 70% 이하, 60% 이하, 50% 이하, 40% 이하이다. 상기 동일성의 하한은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 0%, 5%, 10%, 20%, 30%이다. 상기 동일성의 범위는, 예컨대, 0% 이상 100% 미만, 5% 이상 95% 이하, 10% 이상 90% 이하이다.

[0049] 상기 BCR에 의해, 상기 B 세포 에피토프가 인식되지 않는다란, 예컨대, 상기 BCR을 발현하는 B 세포의 상기 B 세포 에피토프에 대한 결합능이, 예컨대, 상기 BCR에 특이적인 B 세포 에피토프에 대한 결합 능력에 비교하여 유의하게 낮은 것을 의미한다. 상기 결합능은, 예컨대, ELISA 법, 플로우 사이토메트리, 분자간 상호작용 해석 등에 의해 측정할 수 있다.

[0050] 상기 면역용 펩티드는, 생체에 투여함으로써, 상기 면역용 펩티드/MHC 분자에 대한 항체 생산을 유도한다. 상기 항체는, 예컨대, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 I 분자에 대한 항체여도 좋고, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 항체여도 좋고, 양자에 대한 항체여도 좋다. 상기 면역용 펩티드는, 예컨대, 1종류의 상기 면역용 펩티드여도 좋고, 2종류 이상의 상기 면역용 펩티드의 혼합물이어도 좋다. 상기 생체(이하, 「투여 대상」이라고도 함)는, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 인간 및 인간을 제외하는 비인간 동물을 들 수 있다. 상기 비인간 동물은, 예컨대, 마우스, 래트, 개, 원숭이, 토끼, 양, 말, 모르모트, 고양이 등을 들 수 있다.

[0051] 상기 면역용 펩티드의 투여량은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 상기 투여 대상의 종류, 증상, 연령, 투여 방법 등에 의해 적절하게 설정할 수 있다. 구체예로서, 인간에 투여하는 경우, 1회당의 상기 면역용 펩티드의 투여량은, 예컨대, 0.8~30 mg, 10~30 mg이다. 상기 면역용 펩티드의 투여 횟수는, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 1~3회이다.

[0052] 상기 면역용 펩티드의 투여 방법은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 정맥 주사, 근육 주사, 피하 투여, 피내 투

여, 경피 투여, 직장 투여, 복강내 투여, 국소 투여, 경비 투여, 설하 투여 등을 들 수 있다.

[0053] 상기 면역용 펩티드는, 그 밖의 성분을 포함해도 좋다. 상기 그 밖의 성분은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 아쥬반트, 보존제, 항산화제, 킬레이트제 등을 들 수 있다. 상기 아쥬반트는, 예컨대, 수산화알루미늄, 인산알루미늄, 염화알루미늄, 완전 프로인트 아쥬반트, 불완전 프로인트 아쥬반트, CpG 올리고뉴클레오티드 등을 포함하는 Toll양 수용체 자극제 등의 공지된 아쥬반트를 들 수 있다. 상기 보존제는, 예컨대, 티메로살, 2-페녹시에탄올 등을 들 수 있다. 상기 킬레이트제는, 예컨대, 에틸렌디아민사아세트산, 글리콜에테르디아민사아세트산 등을 들 수 있다.

[0054] 상기 MHC 분자는, 예컨대, MHC 클래스 I 분자 및 MHC 클래스 II 분자 중 적어도 한쪽이다. 상기 면역용 펩티드가 CD8 양성 T 세포에 의해 인식되는 T 세포 에피토프를 포함하는 경우, 상기 MHC 분자는, MHC 클래스 I 분자인 것이 바람직하다. 또한, 상기 면역용 펩티드가 CD4 양성 T 세포에 의해 인식되는 T 세포 에피토프를 포함하는 경우, 상기 MHC 분자는, MHC 클래스 II 분자인 것이 바람직하다.

[0055] 상기 MHC 클래스 II 분자는, 예컨대, α쇄 및 β쇄의 복합체이고, 각각의 종류는 특별히 제한되지 않고, 이들을 코드하는 유전자의 하플로타입은 특별히 제한되지 않는다.

[0056] 상기 MHC 클래스 II 분자가 인간 유래인 경우, 상기 MHC 클래스 II 분자의 α쇄는, 예컨대, HLA-DPA 유전자좌, HLA-DQA 유전자좌 또는 HLA-DRA 유전자좌에 코드되어 있는 MHC 클래스 II 분자의 α쇄를 들 수 있고, 상기 MHC 클래스 II 분자의 β쇄는, 예컨대, HLA-DPB 유전자좌, HLA-DQB 유전자좌 또는 HLA-DRB 유전자좌에 코드되어 있는 MHC 클래스 II 분자의 β쇄를 들 수 있다. 상기 각 유전자좌에 있어서의 MHC 클래스 II 분자의 α쇄 및 β쇄의 하플로타입은, 특별히 제한되지 않는다. 상기 MHC 클래스 II 분자는, 예컨대, α쇄 및 β쇄 중 어느 한쪽을 포함하는 분자이고, α쇄 및 β쇄의 양쪽을 포함하는 분자인 것이 바람직하다.

[0057] 상기 MHC 클래스 II 분자는, 예컨대, HLA-DR, HLA-DP 및 HLA-DQ 등이 바람직하고, 특히, 상기 표 1에 기재한 상기 T 세포 에피토프를 제시하는 MHC 클래스 II 분자를 예시할 수 있다.

[0058] 상기 HLA-DR은, 예컨대, HLA-DR1, HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR5, HLA-DR6, HLA-DR7, HLA-DR8, HLA-DR9, HLA-DR10, HLA-DR11, HLA-DR12, HLA-DR13, HLA-DR14, HLA-DR15, HLA-DR52, HLA-DR53 등을 들 수 있다. 상기 HLA-DR은, 예컨대, α쇄로서 HLA-DRA1 등의 HLA-DRA와, β쇄로서 HLA-DRB1, HLA-DRB3, HLA-DRB4 또는 HLA-DRB5 등의 HLA-DRB를 포함하는 분자를 들 수 있고, 구체적으로는, α쇄로서, 예컨대, HLA-DRA1*01 등의 알릴, β쇄로서, 예컨대, HLA-DRB1*01, HLA-DRB1*03, HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*07, HLA-DRB1*08, HLA-DRB1*09, HLA-DRB1*10, HLA-DRB1*11, HLA-DRB1*12, HLA-DRB1*13, HLA-DRB1*14, HLA-DRB1*15, HLA-DRB1*16, HLA-DRB3*01, HLA-DRB4*01, HLA-DRB5*01 등의 알릴을 들 수 있다.

[0059] 상기 HLA-DQ는, 예컨대, HLA-DQ1, HLA-DQ2, HLA-DQ3, HLA-DQ4, HLA-DQ5, HLA-DQ6, HLA-DQ7, HLA-DQ8 등을 들 수 있다. 상기 HLA-DQ는, 예컨대, α쇄로서 HLA-DQA1 등의 HLA-DQA와, β쇄로서 HLA-DQB1 등의 HLA-DQB를 포함하는 분자를 들 수 있고, 구체적으로는, α쇄로서, 예컨대, HLA-DQA1*01, HLA-DQA1*02, HLA-DQA1*03, HLA-DQA1*04, HLA-DQA1*05, HLA-DQA1*06, β쇄로서, 예컨대, HLA-DQB1*02, HLA-DQB1*03, HLA-DQB1*04, HLA-DQB1*05, HLA-DQB1*06 등의 알릴을 들 수 있다.

[0060] 상기 HLA-DP는, 예컨대, HLA-DP1, HLA-DP2, HLA-DP3, HLA-DP4, HLA-DP5 등을 들 수 있다. 상기 HLA-DP는, 예컨대, α쇄로서 HLA-DPA1 등의 HLA-DPA와, β쇄로서 HLA-DPB1 등의 HLA-DPB를 포함하는 분자를 들 수 있고, 구체적으로는, α쇄로서, 예컨대, HLA-DPA1*01, HLA-DPA1*02, HLA-DPA1*03, HLA-DPA1*04 등, β쇄로서, 예컨대, HLA-DPB1*02, HLA-DPB1*04, HLA-DPB1*05, HLA-DPB1*09 등의 알릴을 들 수 있다.

[0061] 상기 MHC 클래스 I 분자는, 예컨대, α쇄 및 β 미크로글로불린의 복합체이고, α쇄의 종류는 특별히 제한되지 않고, 코드하는 유전자의 하플로타입은 특별히 제한되지 않는다.

[0062] 상기 MHC 클래스 I 분자가 인간 유래인 경우, 상기 MHC 클래스 I 분자의 α쇄는, 예컨대, HLA-A 유전자좌, HLA-B 유전자좌 또는 HLA-C 유전자좌에 코드되어 있는 MHC 클래스 I 분자의 α쇄를 들 수 있다. 상기 각 유전자좌에 있어서의 MHC 클래스 I 분자의 α쇄의 하플로타입은, 특별히 제한되지 않는다. 상기 MHC 클래스 I 분자는, 예컨대, α쇄 및 β 미크로글로불린 중 어느 한쪽을 포함하는 분자이고, α쇄 및 β 미크로글로불린의 양쪽을 포함하는 분자인 것이 바람직하다.

[0063] 상기 MHC 클래스 I 분자는, 예컨대, HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 등이 바람직하다.

[0064] 상기 HLA-A는, 예컨대, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*02:07, HLA-A*02:10, HLA-A*02:18, HLA-A*11:01,

HLA-A*11:02, HLA-A*24:02, HLA-A*24:04, HLA-A*24:08, HLA-A*24:20, HLA-A*26:01, HLA-A*26:02, HLA-A*26:03, HLA-A*26:04, HLA-A*26:05, HLA-A*26:06 등의 알릴을 들 수 있다.

[0065] 상기 HLA-B는, 예컨대, HLA-B*13:01, HLA-B*13:02, HLA-B*15:01, HLA-B*15:02, HLA-B*15:07, HLA-B*15:11, HLA-B*15:18, HLA-B*15:27, HLA-B*39:01, HLA-B*39:02, HLA-B*39:04, HLA-B*40:02, HLA-B*40:03, HLA-B*40:06 등의 알릴을 들 수 있다.

[0066] 상기 HLA-C는, 예컨대, HLA-Cw*01:02, HLA-Cw*02:02, HLA-Cw*03:02, HLA-Cw*03:03, HLA-Cw*03:07, HLA-Cw*04:01, HLA-Cw*05:01, HLA-Cw*08:01 등의 알릴을 들 수 있다.

[0067] 상기 생산된 항체는, 상기 면역용 펩티드/MHC 분자에 결합할 수 있으면 되고, 그 밖의 단백질 등에 결합해도 좋다. 상기 생산된 항체는, 예컨대, 투여한 상기 면역용 펩티드가 단축화된 단축화 펩티드와 상기 MHC 분자의 복합체에 결합해도 좋다. 상기 단축화 면역용 펩티드는, 예컨대, 상기 T 세포 에피토프보다 길며, 또한 상기 투여한 면역용 펩티드에 있어서의 상기 항체 유도부의 노출 말단의 아미노산으로부터 1 이상의 연속하는 아미노산이 결실한 펩티드를 들 수 있다.

[0068] 상기 면역용 펩티드/MHC 분자에 있어서의, 상기 면역용 펩티드와 상기 MHC 분자의 조합은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 투여한 상기 면역용 펩티드와, 투여한 상기 생체에서 발현하고 있는 MHC 분자의 조합을 들 수 있다. 구체적으로는, 상기 조합은, 예컨대, 상기 표 1에 있어서의 상기 T 세포 에피토프를 포함하는 상기 면역용 펩티드와 상기 MHC 분자의 조합 등을 들 수 있다. 상기 조합은, 예컨대, 상기 표 1에 있어서의 1종류의 조합이어도 좋고, 2종류 이상의 조합이어도 좋다.

[0069] 상기 생산된 항체가, 상기 T 세포 에피토프/MHC 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 것이 바람직하고, 상기 T 세포 에피토프/MHC 분자를 인식하는 TCR의 상기 면역용 펩티드/MHC 분자에 대한 결합을 저해하는 것이 보다 바람직하다. 상기 저해는, 예컨대, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 I 분자를 인식하는 TCR의 결합의 저해여도 좋고, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합의 저해여도 좋다. 전자의 경우, 상기 생산된 항체가, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 I 분자에 대한 결합을 저해하는 것이 바람직하다. 후자의 경우, 상기 생산된 항체가, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 결합을 저해하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 저해는, 전자 및 후자의 양자의 저해여도 좋다. 전술한 바와 같이, 상기 T 세포 에피토프/MHC 분자를 인식하는 TCR은, 예컨대, 상기 면역용 펩티드/MHC 분자도 인식한다. 이 때문에, 상기 생산된 항체는, 예컨대, 상기 면역용 펩티드/MHC 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해한다고 할 수도 있다. 또한, 상기 생산된 항체가, 상기 T 세포 에피토프/MHC 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해함으로써, 예컨대, 상기 투여 대상에 있어서, 상기 TCR을 갖는 T 세포의 활성화를 보다 저감할 수 있다. 이 때문에, 예컨대, 상기 생체에 상기 면역용 펩티드를 투여함으로써, 상기 T 세포 에피토프/MHC 분자를 인식하는 T 세포에 의해 야기되는, 상기 면역 질환의 발증, 증악 등을 보다 효과적으로 억제할 수 있다.

[0070] 상기 면역용 펩티드의 제조 방법은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 화학적 합성, 상기 타깃 단백질의 분해, 재조합 DNA 기술을 사용한 합성 등을 들 수 있다. 상기 화학적 합성 방법의 경우, 상기 면역용 펩티드는, 예컨대, 벤질옥시카르보닐기(Cbz), tert-부톡시카르보닐기(Boc), 플루오레닐메톡시카르보닐기(Fmoc) 등의 보호기를 이용한 공지된 유기 합성 방법에 의해 제조할 수 있다. 상기 타깃 단백질의 분해에 의한 경우, 상기 면역용 펩티드는, 예컨대, 상기 타깃 단백질을, 프로테아제, 펩티다아제 등의 공지된 단백질 분해 효소로 분해함으로써 제조할 수 있다. 상기 타깃 단백질의 분해 조건은, 예컨대, 상기 타깃 단백질의 종류, 상기 단백질 분해 효소의 기질 특이성 등에 따라 적절하게 설정할 수 있다. 상기 재조합 DNA 기술을 사용하는 경우, 상기 면역용 펩티드는, 예컨대, 상기 면역용 펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터를 제작한다. 그리고, 상기 면역용 펩티드의 발현계를 제작하고, 발현된 상기 면역용 펩티드를 제작함으로써 제조할 수 있다. 상기 발현계는, 예컨대, 상기 발현 벡터를 숙주에 도입함으로써 제작할 수 있다. 상기 숙주는, 예컨대, 동물 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 세균 등의 공지된 숙주를 들 수 있다. 또한, 상기 재조합 DNA 기술을 사용하는 경우, 상기 면역용 펩티드는, 예컨대, 상기 면역용 펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드와, 공지된 무세포 번역계를 사용하여 제작해도 좋다. 그리고, 상기 무세포 번역계에 의해, 상기 폴리뉴클레오티드로부터 번역된 상기 면역용 펩티드를 단리함으로써 제조할 수 있다.

[0071] <폴리뉴클레오티드>

[0072] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드인 것이 특징

이고, 그 밖의 구성 및 조건은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드의 유전자 공학적 수법에 의한 합성에 유용하다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드의 설명을 원용할 수 있다.

[0073] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예컨대, 상기 면역용 펩티드의 아미노산 서열에 기초하여, 대응하는 코돈으로 치환함으로써 설계 가능하다.

[0074] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예컨대, 상기 면역용 펩티드의 아미노산 서열에 있어서, 1 혹은 수개의 아미노산이 결실, 치환, 삽입 및/또는 부가된 아미노산 서열로 이루어지고, 생체에 투여함으로써, 투여된 폴리펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드여도 좋고, 상기 면역용 펩티드의 아미노산 서열에 대하여, 80% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열로 이루어지고, 생체에 투여함으로써, 투여된 폴리펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도하는 폴리펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드여도 좋다. 상기 아미노산 서열에 관한 「1 혹은 수개」는, 예컨대, 상기 면역용 펩티드의 아미노산 서열에 있어서, 예컨대, 1~20개, 1~10개, 1~9개, 1~5개, 1~3개, 1 또는 2개이다. 상기 아미노산 서열에 관한 「동일성」은, 예컨대, 상기 면역용 펩티드의 아미노산 서열에 대하여, 예컨대, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상이다.

[0075] 본 발명에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는, 예컨대, 유전자 공학적 수법 또는 유기 합성적 수법에 의해 합성할 수 있고, cDNA 등의 합성 DNA, 합성 RNA라고 할 수도 있다.

[0076] <면역용 펩티드의 발현 벡터>

[0077] 본 발명의 면역용 펩티드의 발현 벡터(이하, 「발현 벡터」라고도 함)는, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 발현 벡터는, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것이 특징이고, 그 밖의 구성 및 조건은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 발현 벡터는, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드, 폴리뉴클레오티드 등의 설명을 원용할 수 있다.

[0078] 본 발명의 발현 벡터는, 예컨대, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 코드하는 면역용 펩티드를 발현 가능하도록, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 포함하고 있으면 되고, 그 구성은 전혀 제한되지 않는다.

[0079] 본 발명의 발현 벡터는, 예컨대, 골격이 되는 벡터(이하, 「기본 벡터」라고도 함)에, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 삽입함으로써 제작할 수 있다. 상기 벡터의 종류는, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 상기 숙주의 종류에 따라 적절하게 결정할 수 있다. 상기 벡터는, 바이러스 벡터 및 비바이러스 벡터를 들 수 있다. 상기 도입 방법으로서 히트 쇼크법에 의해 숙주의 형질 전환을 행하는 경우, 상기 벡터는, 예컨대, 바이너리 벡터 등을 들 수 있다. 상기 벡터는, 예컨대, pETDuet-1 벡터, pQE-80L 벡터 및 pUCP26Km 벡터 등을 들 수 있다. 대장균 등의 세균에 형질 전환을 행하는 경우, 상기 벡터는, pETDuet-1 벡터(노바젠사), 예컨대, pQE-80L 벡터(QIAGEN사) 등을 들 수 있다.

[0080] 상기 본 발명의 발현 벡터는, 예컨대, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현 및 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 코드하는 상기 본 발명의 면역용 펩티드의 발현을 조절하는, 조절 서열을 갖는 것이 바람직하다. 상기 조절 서열은, 예컨대, 프로모터, 터미네이터, 인핸서, 폴리아데닐화 시그널 서열, 복제 기점 서열(ori) 등을 들 수 있다. 상기 본 발명의 발현 벡터에 있어서, 상기 조절 서열의 배치는 특별히 제한되지 않는다. 상기 본 발명의 발현 벡터에 있어서, 상기 조절 서열은, 예컨대, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현 및 이것이 코드하는 상기 본 발명의 면역용 펩티드의 발현을, 기능적으로 조절할 수 있도록 배치되어 있으면 되고, 공지된 방법에 기초하여 배치할 수 있다. 상기 조절 서열은, 예컨대, 상기 기본 벡터가 미리 구비하는 서열을 이용해도 좋고, 상기 기본 벡터에, 상기 조절 서열을 추가로 삽입해도 좋고, 상기 기본 벡터가 구비하는 조절 서열을, 다른 조절 서열로 치환해도 좋다.

[0081] 상기 본 발명의 발현 벡터는, 예컨대, 선택 마커, 단백질 태그 등의 코드 서열을 추가로 가져도 좋다. 상기 선택 마커는, 예컨대, 약제 내성 마커, 형광 단백질 마커, 효소 마커, 세포 표면 리셉터 마커 등을 들 수 있다. 상기 태그는, 예컨대, 히스티딘 태그 등의 공지된 단백질 태그를 들 수 있다.

[0082] <면역용 펩티드의 제조 방법>

[0083] 본 발명의 면역용 펩티드의 제조 방법은, 전술한 바와 같이, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 발현 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 제조 방법은, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 코드하는 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 공정을 포함하는 것이 특징이고, 그 밖의 공정 및 조

건은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 제조 방법은, 상기 본 발명의 면역용 펩티드, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터 등의 설명을 원용할 수 있다.

[0084] 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현은, 예컨대, 상기 본 발명의 발현 벡터를 사용하여 행해도 좋다.

[0085] 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 방법은, 특별히 제한되지 않고, 공지된 방법을 채용할 수 있고, 예컨대, 숙주를 사용해도 좋고, 무세포 단백질 합성계를 사용해도 좋다.

[0086] 전자의 경우, 예컨대, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드가 도입된 상기 숙주를 사용하고, 상기 숙주의 배양에 의해, 상기 숙주에 있어서 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 것이 바람직하다. 이와 같이, 예컨대, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 숙주에 도입함으로써, 본 발명의 면역용 펩티드를 합성하는 형질 전환체를 제조할 수 있고, 또한, 상기 형질 전환체의 배양에 의해, 상기 면역용 펩티드를 합성할 수 있다.

[0087] 상기 숙주는, 예컨대, 미생물, 동물 세포, 곤충 세포, 또는, 이들의 배양 세포 등의 비인간 숙주, 단리한 인간 세포 또는 그 배양 세포 등을 들 수 있다. 상기 미생물은, 예컨대, 원핵 생물, 진핵 생물 등을 들 수 있다. 상기 원핵 생물은, 예컨대, 대장균(*Escherichia coli*) 등의 에세리키아속, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 등의 슈도모나스속 등의 세균을 들 수 있다. 상기 진핵 생물은, 예컨대, 사카로미세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*) 등의 효모 등을 들 수 있다. 상기 동물 세포는, 예컨대, COS 세포, CHO 세포 등을 들 수 있고, 상기 곤충 세포는, 예컨대, Sf9, Sf21 등을 들 수 있다.

[0088] 상기 숙주의 배양 방법은, 특별히 제한되지 않고, 상기 숙주의 종류에 따라 적절하게 설정할 수 있다. 배양에 사용하는 배지는, 특별히 제한되지 않고, 상기 숙주의 종류에 따라 적절하게 결정할 수 있다.

[0089] 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 상기 숙주에 도입하는 방법은, 특별히 제한되지 않고, 공지된 방법에 의해 행할 수 있다. 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드는, 예컨대, 상기 본 발명의 발현 벡터에 의해 도입되어도 좋다. 상기 도입 방법은, 예컨대, 상기 숙주의 종류에 따라 적절하게 설정할 수 있다. 상기 도입 방법은, 예컨대, 파티클 건 등의 유전자총에 의한 도입법, 인산칼슘법, 폴리에틸렌글리콜법, 리포좀을 이용하는 리포펙션법, 일렉트로포레이션법, 초음파 핵산 도입법, DEAE-덱스트란법, 미소 유리관 등을 이용한 직접 주입법, 하이드로다이나믹법, 카티오닉 리포좀법, 도입 보조제를 이용하는 방법, 아그로박테리움을 통하는 방법 등을 들 수 있다. 상기 리포좀은, 예컨대, 리포펙타민 및 카티오닉 리포좀 등을 들 수 있고, 상기 도입 보조제는, 예컨대, 아텔로콜라겐, 나노 입자 및 폴리머 등을 들 수 있다. 상기 숙주가 미생물인 경우, 예컨대, 그 중에서도, 대장균(*E. coli*) 또는 슈도모나스 푸티다(*Ps. putida*) 등을 통하는 방법이 바람직하다.

[0090] 후자의 경우, 무세포 단백질 합성계에 있어서 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드를 발현시키는 것이 바람직하다. 이 경우, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드의 발현에는, 상기 본 발명의 발현 벡터를 사용해도 좋다. 상기 무세포 단백질 합성계는, 예컨대, 세포 추출액과, 각종 성분을 포함하는 버퍼와, 원하는 면역용 펩티드의 폴리뉴클레오티드가 도입된 발현 벡터를 이용하여, 공지된 방법에 의해 행할 수 있고, 예컨대, 시판되는 시약 키트를 사용할 수 있다.

[0091] 본 발명의 제조 방법은, 예컨대, 상기 발현 공정 대신에, 상기 본 발명의 면역용 펩티드의 아미노산 서열을 합성하는 공정, 또는 타깃 단백질을 분해함으로써, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 생성하는 공정을 포함해도 좋다. 상기 합성 공정 및 상기 생성 공정은, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드의 설명을 원용할 수 있다.

[0092] 본 발명의 제조 방법은, 예컨대, 상기 면역용 펩티드를 정제하는 공정을 포함해도 좋다. 상기 면역용 펩티드의 정제 방법은, 특별히 제한되지 않고, 예컨대, 겔 여과, HPLC 등의 공지된 정제 방법을 들 수 있다.

[0093] <면역 질환용 의약 조성물>

[0094] 본 발명의 면역 질환용 의약 조성물은, 전술한 바와 같이, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 의약 조성물은, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 포함하는 것이 특징이고, 그 밖의 구성 및 조건은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 의약 조성물에 의하면, 예컨대, 상기 면역 질환을 치료할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물은, 생체에 투여함으로써, 상기 면역용 펩티드/MHC 분자에 대한 항체 생산을 유도할 수 있다. 이 때문에, 본 발명의 의약 조성물은, 예컨대, 「백신」이라고 할 수도 있다. 본 발명의 의약 조성물은, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드의 설명을 원용할 수 있다.

[0095] 본 발명의 의약 조성물은, 상기 면역용 펩티드 대신에, 또는 더하여, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 상기 발현 벡터 중 적어도 한쪽을 포함해도 좋다. 이 경우, 상기 본 발명의 의약 조성물은, 예컨대, 「핵산 백신」이

라고 할 수도 있다.

[0096] 본 발명의 의약 조성물은, 예컨대, 상기 면역용 펩티드의 상기 타깃 단백질이 관여하고 있는 면역 질환에 사용하는 것이 바람직하다. 상기 타깃 단백질과 상기 면역 질환의 조합은, 예컨대, 상기 표 1 및 2의 조합을 들 수 있다. 구체예로서, 상기 타깃 단백질이 HEL인 경우, 상기 면역 질환은 알 알레르기를 들 수 있다.

[0097] <면역용 펩티드의 설계 방법>

[0098] 본 발명의 면역용 펩티드의 설계 방법은, 타깃 단백질의 T 세포 에피토프와 항체 유도부를 포함하고, 상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 N 말단 아미노산으로부터 상류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 및 상기 T 세포 에피토프의 C 말단 아미노산으로부터 하류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 중 적어도 한쪽인 펩티드를 면역용 펩티드로 하는 설계 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 면역용 펩티드의 설계 방법에 의하면, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드를 설계할 수 있다.

[0099] 본 발명의 설계 방법은, 타깃 단백질의 T 세포 에피토프와 항체 유도부를 포함하고, 상기 항체 유도부는, 상기 타깃 단백질의 아미노산 서열에 있어서, 상기 T 세포 에피토프의 N 말단 아미노산으로부터 상류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 및 상기 T 세포 에피토프의 C 말단 아미노산으로부터 하류측으로 연속하는 1 이상의 아미노산 서열 중 적어도 한쪽인 펩티드를 면역용 펩티드로 하는 것이 특징이고, 그 밖의 공정 및 조건은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 설계 방법은, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드의 설명을 원용할 수 있다.

[0100] <면역 질환의 치료 방법>

[0101] 본 발명의 면역 질환의 치료 방법은, 전술한 바와 같이, 면역 질환을 치료하는 방법으로서, 생체에 상기 본 발명의 면역용 펩티드 및 상기 본 발명의 면역 질환용 의약 조성물 중 적어도 한쪽을 투여하는 투여 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 치료 방법은, 상기 생체에, 상기 본 발명의 면역용 펩티드 및 상기 본 발명의 면역 질환용 의약 조성물 중 적어도 한쪽을 투여하는 것을 특징으로 하고, 그 밖의 공정 및 조건은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 치료 방법에 의하면, 예컨대, 상기 면역 질환을 치료할 수 있다. 본 발명의 면역 질환의 치료 방법은, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드 등의 설명을 원용할 수 있다.

[0102] 본 발명의 치료 방법은, 상기 면역용 펩티드 및 상기 의약 조성물 대신에, 또는 더하여, 상기 본 발명의 폴리뉴클레오티드 및 상기 발현 벡터 중 적어도 한쪽을 투여해도 좋다.

[0103] <항체의 유도 방법>

[0104] 본 발명의 항체의 유도 방법은, 생체에 상기 본 발명의 면역용 펩티드 및 상기 본 발명의 면역 질환용 의약 조성물 중 적어도 한쪽을 투여함으로써, 면역용 펩티드와 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도하는 항체 유도 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 항체의 유도 방법은, 상기 생체에, 상기 본 발명의 면역용 펩티드 및 상기 본 발명의 면역 질환용 의약 조성물 중 적어도 한쪽을 투여하는 것을 특징으로 하고, 그 밖의 공정 및 조건은 특별히 제한되지 않는다. 본 발명의 항체의 유도 방법에 의하면, 예컨대, 상기 생체 내에서 면역용 펩티드/MHC 분자에 대한 항체를 간편히 유도할 수 있다. 본 발명의 항체의 유도 방법은, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드, 치료 방법 등의 설명을 원용할 수 있다.

[0105] <면역용 펩티드 및 면역 질환용 의약 조성물의 용도>

[0106] 본 발명은, 면역 질환을 치료하기 위한 면역용 펩티드의 용도이다. 또한, 본 발명은, 면역 질환용 의약의 제조를 위한 면역용 펩티드의 용도이다. 본 발명은, 면역 질환을 치료하기 위한 면역 질환용 의약 조성물의 용도이다. 또한, 본 발명은, 면역 질환용 의약의 제조를 위한 면역 질환용 의약 조성물의 용도이다. 본 발명의 면역용 펩티드 및 면역 질환용 의약 조성물의 용도는, 예컨대, 상기 본 발명의 면역용 펩티드 등의 설명을 원용할 수 있다.

[0107] 이하에 실시예 등에 의해 본 발명을 상세히 설명하지만, 본 발명은 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0109] **실시예**

[0110] [실시예 1]

[0111] HEL 단백질을 면역하고, 상기 HEL 단백질에 있어서의 T 세포 에피토프보다 긴 펩티드와 생체의 MHC 클래스 II

분자의 복합체에 대한 항체 생산이 유도되는 것, 및 상기 항체가, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 것을 확인했다.

[0112] (실시예 1A)

[0113] HEL 단백질을 면역하고, 상기 HEL 단백질에 있어서의 T 세포 에피토프보다 긴 펩티드와 생체의 MHC 클래스 II 분자의 복합체에 대한 항체 생산이 유도되는 것을 확인했다.

[0114] (1) HEL 펩티드 제시 세포의 조제

[0115] 마우스 비장 cDNA로부터, 하기의 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^k$)의 α쇄 및 β쇄를 코드하는 폴리뉴클레오티드를, 각각, pME18S 벡터에 클로닝하여, 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^k$) α쇄 발현 벡터($I\text{-}A^k$α 발현 벡터) 및 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^k$) β쇄 발현 벡터($I\text{-}A^k$β 발현 벡터)를 제작했다. 또한, GFP 발현 벡터는, pMX-GFP(도쿄 대학 의과학 연구소 첨단 의료 연구 센터 세포 요법 분야로부터 입수)를 사용했다.

[0116] 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^k$) α쇄(서열번호 11)

ATGCCGCGCAGCAGAGCTCTGATTCTGGGGGTCCTCGCCCTGACCACCATGCTCAGCCTCTGCGGAGGT
GAAGACGACATTGAGGCCGACCACGTAGGCTCCTATGGTATAACTGTATATCAGTCTCCTGGAGACATT
GGCCAGTACACATTTGAATTTGATGGTGATGAGTTGTTCTATGTGGACTTGGATAAGAAGGAGACTGTC
TGGATGCTTCCTGAGTTTGCTCAACTGAGAAGATTTGAGCCCCAAGGTGGACTGCAAAACATAGCTACA
GGAAAACACAACTTGGAAATCTTGACTAAGAGGTCAAATTCCACCCCAGCTACCAATGAGGCTCCTCAA
GCGACTGTGTTCCCCAAGTCTCCTGTGCTGCTGGGTCAGCCCAACACCCTTATCTGCTTTGTGGACAAC
ATCTTCCCTCCTGTGATCAACATCACATGGCTCAGAAATAGCAAGTCAGTCACAGACGGCGTTTATGAA
ACCAGCTTCTTCGTCAACCGTGACTATTCCTTCCACAAGCTGTCTTATCTCACCTTCATCCCTTCTGAC
GATGACATTTATGACTGCAAGGTGGAGCACTGGGGCCTGGAGGAGCCGGTTCTGAAACACTGGGAACCT
GAGATTCCAGCCCCCATGTCAGAGCTGACAGAGACTGTGGTGTGTGCCCTGGGGTTGTCTGTGGGCCTT
GTGGGCATCGTGGTGGGCACCATCTTCATCATTCAAGGCCTGCGATCAGGTGGCACCTCCAGACACCCA

[0117] GGGCCTTTATGA

[0118] 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^k$) β쇄(서열번호 12)

ATGGCTCTGCAGATCCCCAGCCTCCTCCTCTTGGCTGCTGTTGTGGTGCTGACGGTGCTGAGCAGCCCA
GGGACTGAGGGCGGAAACTCCGAAAGGCATTTCGTGCACCAGTTCCAGCCCTTCTGCTACTTCACCAAC
GGGACGCAGCGCATACGGCTTGTGATCAGATACATCTACAACCGGGAGGAGTACGTGCGCTTCGACAGC
GACGTGGGCGAGTACCGCGCGGTGACCGAGCTGGGGCGGCCAGACGCCGAGTACTGGAATAAGCAGTAC
CTGGAGCGAACGCGGGCCGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAACTACGAGAAGACGGAGACCCCCACC
TCCCTGCGGCGGCTTGAACAGCCCAGTGTCGTCATCTCCCTGTCCAGGACAGAGGCCCTCAACCACCAC
AACACGCTGGTCTGCTCAGTGACAGATTTCTACCCAGCCAAGATCAAAGTGCGCTGGTTCCGGAATGGC
CAGGAGGAGACGGTGGGGGTCTCGTCCACACAGCTTATTAGGAATGGGGACTGGACCTTCCAGGTCCTG
GTCATGCTGGAGATGACCCCTCGGCGGGGAGAGGTCTACACCTGCCATGTGGAGCATCCCAGCCTGAAG
AGTCCCATCACCGTGGAGTGGCGGGCACAGTCCGAGTCTGCCCGGAGCAAGATGTTGAGCGGCATCGGT
GGCTGCGTGCTTGGGGTGATCTTCCTCGGGCTTGGCCTTTTCATCCGTCACAGGAGTCAGAAAGGACCT

[0119] CGAGGCCCTCCTCCAGCAGGGCTCCTGCAGTGA

[0120] GFP(서열번호 13)

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTA
AACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAG
TTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTG
CAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGC
TACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTC
GAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTG
GGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGC
ATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAG
CAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCC
CTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATC
[0121] ACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

[0122] 상기 발현 벡터를 도입하는 숙주 세포로서, 293T 세포(이화학 연구소 바이오 리소스 센터로부터 입수)를 사용했다. 우선, 24 웰 플레이트에, 상기 293T 세포를, 2×10^5 세포/500 μL/웰이 되도록 파종했다. 다음으로, 상기 293T 세포에 대한 상기 발현 벡터의 도입은, 트랜스펙션 시약(PEI max, 코스모 바이오사)을 2 mg/ml가 되도록 정제수로 녹인 PEI max 용액을 사용했다. 구체적으로는, 2 μL PEI max 용액과 50 μL 무혈청 배지(OPTI-MEM(등록상표), GIBCO사 제조)의 혼합액을, 0.26 ㎍ I-A^kα 발현 벡터, 0.26 ㎍ I-A^kβ 발현 벡터 및 0.26 ㎍ GFP 발현 벡터를 포함하는 50 μL 무혈청 배지에 첨가 후, 혼화하여, 트랜스펙션 시약을 조제했다. 그리고, 상기 트랜스펙션 시약을 각 웰에 첨가하여, 상기 발현 벡터를 상기 293T 세포에 도입했다. 상기 도입 후, 상기 293T 세포는, DMEM 배지를 사용하고, 37℃, 12시간의 배양 조건하에서 배양했다. 다음으로, 20 μmol/L가 되도록, 하기 표 3의 HEL 펩티드를, 각각, 상기 웰에 첨가했다. 또한, 상기 배양 조건하에서 24시간 배양하고, 상기 HEL 펩티드를 상기 293T 세포에 펄스했다. 배양 후의 상기 293T 세포에 관하여, 상기 웰로부터 회수 후, 후술하는 항체의 검출에 사용했다. 또, 본 실시예 및 후술하는 실시예의 HEL 펩티드는, 스크럼사, 유로핀 제노믹스 주식회사, 또는 GenScript사로부터 취득했다. 또한, 상기 HEL 단백질에 있어서, 상기 MHC 클래스 II 분자인 I-A^k에 제시되는 T 세포 에피토프는, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드(DGSTDYGILQINSR)이다. 이 때문에, 하기 표 3의 HEL 펩티드에 있어서, 상기 면역용 펩티드는, HEL 펩티드 41-70이다.

표 3

[0123]

	아미노산 서열
HEL 펩티드 1－30 (서열번호 14)	KVFGRCELAAAMKRHGLDNYRGYSLGNWVC
HEL 펩티드 41－70 (서열번호 15)	QATNRNTDGSTDYGILQINSRWWCNDGRTP
HEL 펩티드 48－61 (서열번호 16)	DGSTDYGILQINSR

[0124] (2) 항체의 취득

[0125] 100 ㎍의 HEL 단백질(Sigma사 제조)과 완전 프로인트 아쥬반트(CFA, Sigma사 제조)를 혼합하고, 마우스(B10.A 계통)의 피하에 투여했다. 상기 투여 후 2주간에 있어서, 상기 마우스로부터 전혈을 채취하고, 또한, 혈청을 회수했다.

[0126] (3) 항체의 검출

[0127] 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청을, 항크스 평형 염류 완충액(HANKS' BALANCED SALT SOLUTION (HBSS), Sigma사 제조)에 의해 100배로 희석하여, 희석 혈청을 얻었다. 다음으로, 상기 (1)에서 얻어진 293T 세포에, 10 μL 희석 혈청을 첨가하고, 반응시켰다. 또한, 반응 후의 293T 세포를 세정 후, APC 표지 항마우스 IgG(H+L) 항체(code-number: 715-136-150, Jackson ImmunoResearch사 제조)로 염색했다. 그리고, 염색 후의 293T 세포에 관하여, 플로우 사이토메트리(FACSCalibur(상표), Becton Dickinson사)에 의해 해석을 행했다(펩티드 미첨가군). 또한, 펩티드 첨가군은, 상기 희석 혈청에, 40 μmol/L가 되도록, 상기 표 3의 HEL 펩티드를 각각 첨가했다. 그리고, 상기 HEL 펩티드를 첨가한 희석 혈청을, 첨가한 상기 HEL 펩티드와 대응하는 HEL 펩티드를 펄스한

293T 세포에 첨가하고, 반응시켰다. 상기 펩티드 첨가군은, 이러한 점 이외에는 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다.

[0128] 이 결과를 도 1에 나타낸다. 도 1은, IgG 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다. 도 1에 있어서, 횡축은 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합량을 나타내고, 종축은 세포의 카운트수를 나타낸다. 또한, 도 1에 있어서, 각 히스토그램의 위는 상기 HEL 펩티드의 종류를 나타낸다. 도 1에 나타내는 바와 같이, 상기 펩티드 미첨가군에 있어서, I-A^k에 제시되는 T 세포 에피토프보다 긴 상기 HEL 펩티드 41-70을 펄스한 293T 세포에 대하여, 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합이 확인되었다. 이에 대하여, I-A^k에 제시되는 T 세포 에피토프만의 상기 HEL 펩티드 48-61 및 상기 T 세포 에피토프를 포함하지 않는 상기 HEL 펩티드 1-30을 펄스한 293T 세포에 대해서는, 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합은 확인되지 않았다. 또한, 상기 펩티드 첨가군에 있어서도, 마찬가지로, I-A^k에 제시되는 T 세포 에피토프보다 긴 상기 HEL 펩티드 41-70을 펄스한 293T 세포에 대해서는, 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합이 확인되었다. 그리고, I-A^k에 제시되는 T 세포 에피토프만의 상기 HEL 펩티드 48-61 및 상기 T 세포 에피토프를 포함하지 않는 상기 HEL 펩티드 1-30을 펄스한 293T 세포에 대해서는, 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합은 확인되지 않았다. 이들 결과로부터, 상기 HEL 단백질을 면역함으로써, 상기 T 세포 에피토프보다 긴 펩티드, 즉 상기 면역용 펩티드/상기 MHC 클래스 II 분자에 대한 항체를 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0129] (4) 항체의 결합 개소

[0130] 상기 표 3의 HEL 펩티드 대신에, 상기 HEL 펩티드 41-70, 상기 HEL 펩티드 48-61, 및 하기 표 4의 HEL 펩티드를 이용한 것 이외에는, 상기 (3)과 동일하게 하여, 펩티드 미첨가군에 관하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다. 컨트롤은, 상기 293T 세포에, I-A^kα 발현 벡터 및 I-A^kβ 발현 벡터를 도입하지 않은 것 이외에는 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다. 또, 상기 면역용 펩티드는, HEL 펩티드 32-61, HEL 펩티드 41-70, 및 HEL 펩티드 48-77이다. 또한, 상기 HEL 펩티드 32-61은, 상기 T 세포 에피토프와 상기 상류측 항체 유도부를 포함하는 펩티드이고, 상기 HEL 펩티드 41-70은, 상기 T 세포 에피토프와 상기 상류측 항체 유도부와 상기 하류측 항체 유도부를 포함하는 펩티드이고, 상기 HEL 펩티드 48-77은, 상기 T 세포 에피토프와 상기 하류측 항체 유도부를 포함하는 펩티드이다.

표 4

[0131]

	아미노산 서열
HEL 펩티드 32-61 (서열번호 17)	AKFESNFNTQATNRNTDGSTDYGILQINSR
HEL 펩티드 48-77 (서열번호 18)	DGSTDYGILQINSRWWCNDGRTPGSRNLCN

[0132] 이 결과를 도 2에 나타낸다. 도 2는, IgG 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다. 도 2에 있어서, 횡축은 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합량을 나타내고, 종축은 세포의 카운트수를 나타낸다. 또한, 도 2에 있어서, 각 히스토그램의 위는 상기 HEL 펩티드의 종류를 나타내고, 실선의 히스토그램은 상기 펩티드 미첨가군을 나타내고, 망 형상의 히스토그램은 컨트롤을 나타낸다. 도 2에 나타내는 바와 같이, MHC 클래스 II 분자를 발현하고 있지 않은 293T 세포에 대해서는, 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합은 확인되지 않았다. 또한, 도 2에 나타내는 바와 같이, 상기 펩티드 미첨가군에 있어서, I-A^k에 제시되는 T 세포 에피토프보다 긴 상기 HEL 펩티드 32-61, 상기 HEL 펩티드 41-70, 및 상기 HEL 펩티드 48-77을 펄스한 293T 세포 에 대해서는, 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합이 확인되었다. 이에 대하여, I-A^k에 제시되는 T 세포 에피토프만의 상기 HEL 펩티드 48-61을 펄스한 293T 세포에 대해서는, 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합은 확인되지 않았다. 또한, 하류측 항체 유도부를 포함하는 상기 HEL 펩티드 48-77은, 상류측 항체 유도부를 포함하는 상기 HEL 펩티드 32-61에 대하여, 평균 형광 강도가 높았다. 이들 결과로부터, 상기 HEL 단백질을 면역함으로써, 상기 T 세포 에피토프 및 상기 상류측 항체 유도부를 포함하는 펩티드와 상기 MHC 클래스 II 분자의 복합체, 상기 T 세포 에피토프 및 상기 하류측 항체 유도부를 포함하는 펩티드와 상기 MHC 클래스 II 분자의 복합체, 및 상기 T 세포 에피토프, 상기 상류측 항체 유도부 및 상기 하류측 항체 유도부를 포함하는 펩티드와 상기 MHC 클래스 II 분자의 복합체의 어느 것에 대한 항체도 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다. 또한, 상기 HEL 단백질의 경우, 상기 T 세포 에피토프와 상기 하류측 항체 유도부를 포함하는 면역용 펩티드가, 상기 T 세포 에피토프와 상기 상류측 항체 유도부를 포함하는 면역용 펩티드와 비교하여, 높은 항체 생산을 유도할 수 있는 것이 시사되었다.

[0133] (실시예 1B)

[0134] 상기 실시예 1A에서 생산된 항체가, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 것을 확인했다.

[0135] (1) 가용형 단쇄 TCR의 조제

[0136] 상기 T 세포 에피토프인 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드와 상기 MHC 클래스 II 분자인 $I\text{-}A^k$의 복합체를 인식하는 TCR을 발현하는 3A9T 세포 하이브리도마(독립행정법인 의약 기반 연구소 백신 마테리알 프로젝트로부터 입수)로부터, 상기 TCR을 클로닝했다. 구체적으로는, 상기 3A9T 세포 하이브리도마 유래의 cDNA로부터, 하기의 3A9 TCR α쇄 및 β쇄를 GGGGS 링커로 연결한 폴리뉴클레오티드를, pME18S 벡터에 클로닝하여, 3A9 TCR 발현 벡터를 제작했다. 또, 상기 벡터는, 발현 단백질의 C 말단에 인간 IgG의 Fc 도메인을 부가하도록 설계되어 있다. 이 때문에, 상기 발현 벡터를 숙주에 도입함으로써, 3A9 TCR과 Fc가 결합한 가용형 단쇄 TCR(3A9 scTCR-Fc)이 발현된다.

[0137] 단쇄 3A9 TCR α, β쇄(서열번호 19)

ATGCTCCTGGCACTCCTCCCAGTGCTGGGGATACACTTTGTCCTGAGAGATGCCCAAGCTCAGTCAGTG
ACACAGCCCGATGCTCGCGTCACTGTCTCTGAAGGAGCCTCTCTGCAGCTGAGATGCAAGTATTCCTAC
TCTGGGACGCCTTATCTGTTCTGGTATGTCCAGTACCCGCGGCAGGGGCTGCAGCTGCTCCTCAAGTAC
TATTCCGGAGACCCAGTGGTTCAAGGAGTGAATGGCTTTGAGGCTGAGTTCAGCAAGAGTAACTCTTCC
TTCCACCTGCGGAAAGCCTCCGTGCACTGGAGCGACTCGGCTGTGTACTTCTGTGCTTTAAATTCTGGA
GGAAGCAATGCAAAGCTAGCCTTCGGGAAAGGCTCTAAACTCTCTGTTAAATCAAACGGCGGAGGCGGA
TCAGGAGGAGGAGGATCAGGCGGAGGAGGATCAGCAGTCACCCAAAGCCCAAGAAACAAGGTGGCAGTA
ACAGGAGGAAAGGTGACATTGAGCTGTAATCAGACTAATAACCACAACAACATGTACTGGTATCGGCAG
GACACGGGGCATGGGCTGAGGCTGATCCATTATTCATATGGTGCTGGCAGCACTGAGAAAGGAGATATC
CCTGATGGATACAAGGCCTCCAGACCAAGCCAAGAGAACTTCTCCCTCATTCTGGAGTTGGCTACCCCC
TCTCAGACATCAGTGTACTTCTGTGCCAGCGGTGATGAATCGGCCCTACCGGAGCTCTACTTTGGTGAA
GGCTCAAAGCTGACAGTGCTGGAGGATCTGAGAAATGTGACTCCACCCAAGGTCTCCTTGTTTGAGCCA
TCAAAAGCAGAGATTGCAAACAAACAAAAGGCTACCCTCGTGTGCTTGGCCAGGGGCTTCTTCCCTGAC
CACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGCAAGGAGGTCCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCTCAGGCC
TACAAGGAGAGCAATTATAGCTACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCTGCTACCTTCTGGCACAAT
CCTCGCAACCACTTCCGCTGCCAAGTGCAGTTCCATGGGCTTTCAGAGGAGGACAAGTGGCCAGAGGGC

[0138] TCACCCAAACCTGTCACACAGAACATCAGTGCAGAGGCCTGGGGCCGAGCAGAC

[0139] 다음으로, $I\text{-}A^k\alpha$ 발현 벡터 및 $I\text{-}A^k\beta$ 발현 벡터 대신에, 상기 3A9 TCR 발현 벡터를 도입한 것 이외에는, 상기 실시예 1A(1)과 동일한 배양 조건하에서, 상기 293T 세포를 96시간 배양했다. 그리고, 상기 배양 후의 상청을 회수하고, 가용형 단쇄 TCR로서 사용했다.

[0140] (2) HEL 펩티드 제시 세포의 조제

[0141] 24 웰 플레이트에, 상기 MHC 클래스 II 분자인 $I\text{-}A^k$를 발현하는 LK35.2 세포를, 1×10^5 세포/1 mL/웰이 되도록 파종했다. 다음으로, 200 ㎍/mL가 되도록, 상기 HEL 단백질을, 20 μmol/L가 되도록, 상기 HEL 펩티드 41-70, 및 상기 HEL 펩티드 48-61을, 각각, 상기 웰에 첨가했다. 또한, 상기 배양 조건하에서, 상기 HEL 단백질 첨가군은 48시간 배양하고, 상기 HEL 펩티드 첨가군은 24시간 배양하고, 상기 HEL 단백질 또는 상기 HEL 펩티드를 상기 LK35.2 세포에 펄스했다. 배양 후의 상기 LK35.2 세포에 관하여, 상기 웰로부터 회수 후, 후술하는 항체에 의한 TCR 인식의 저해에 사용했다.

[0142] (3) 항체에 의한 TCR 인식의 저해

[0143] 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청을, HBSS에 의해 10배로 희석하여, 희석 혈청을 얻었다. 다음으로, 상기 (2)에서 얻어진 LK35.2 세포에, 10 μL 희석 혈청을 첨가하고, 반응시켰다. 또한, 상기 (1)에서 얻어진 20 μL 상청과, 10 μL의 100배 희석한 APC 표지 항인간 IgGFc 항체(code number: 109-136-098, Jackson

ImmunoResearch사 제조)의 2량체를 미리 형성시키고, 상기 반응 후의 LK35.2 세포를 상기 2량체와 반응시켰다. 그리고, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다. 컨트롤 1은, 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청 대신에, 비면역 마우스로부터 채취한 혈청을 이용한 것 이외에는 동일하게 하고, 컨트롤 2는, 상기 HEL 단백질 및 상기 HEL 펩티드를 미첨가로 한 것 이외에는 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다.

[0144] 이 결과를 도 3에 나타낸다. 도 3은, 가용형 단쇄 TCR의 결합량을 나타내는 히스토그램이다. 도 3에 있어서, 횡축은 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합량을 나타내고, 종축은 세포의 카운트수를 나타낸다. 또한, 도 3에 있어서, 각 히스토그램의 위는, 상기 HEL 단백질 및 상기 HEL 펩티드 미첨가(무 항원), 상기 HEL 단백질 또는 상기 HEL 펩티드의 종류를 나타내고, 검은 실선은 컨트롤 1을 나타내고, 그레이의 실선은 각 면역 마우스의 혈청을 첨가한 경우를 나타낸다. 도 3에 나타내는 바와 같이, 컨트롤 2에서는, 가용형 단쇄 TCR의 결합은 관찰되지 않았다. 또한, 상기 HEL 단백질 또는 상기 HEL 펩티드를 펄스한 LK35.2 세포를, 상기 비면역 마우스의 혈청과 반응시킨 경우, 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합을 확인할 수 있었다. 또한, 상기 HEL 펩티드 48-61을 펄스한 LK35.2 세포를, 상기 HEL 면역 마우스의 혈청과 반응시킨 경우, 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합을 확인할 수 있었다. 이에 대하여, 상기 HEL 단백질 또는 상기 HEL 펩티드 41-70을 펄스한 LK35.2 세포를, 상기 HEL 면역 마우스의 혈청과 반응시킨 경우, 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합은 확인할 수 없었다. 이들 결과로부터, 상기 HEL 단백질을 면역함으로써, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 항체를 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0145] (4) 혈청 중의 항체의 정제

[0146] 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청으로부터, IgG 항체를 정제했다. 구체적으로는, 100 μL 혈청을 인산 완충 생리 식염수(PBS)로 10배 희석한 샘플을, Profinia(Bio Rad사 제조)를 이용하여, 어피니티 크로마토그래프에 의해 정제했다. 상기 어피니티 크로마토그래프에서는, 프로테인 A를 포함하는 컬럼(Bil-Scale mini UNO Sphere SUPrA Cartridege, Bio Rad사 제조)을 사용했다. 그리고, 상기 샘플을 상기 컬럼에 제공하고, 상기 혈청 중의 IgG 항체와 상기 컬럼 중의 프로테인 A를 반응시켰다. 반응 후의 상기 컬럼을, PBS로, 1회 세정했다. 그리고, 0.1 mol/L 글리신-HCl(pH 2.8)을 첨가하고, 상기 컬럼으로부터 IgG 항체를 회수했다.

[0147] (5) 정제 IgG 항체에 의한 TCR 인식의 저해

[0148] 상기 마우스로부터, 통상법에 의해, 비장 세포를 조제했다. 그리고, 96 웰 플레이트에, 1×10^5 비장 세포, 1×10^5 3A9T 세포 하이브리도마, 10 μmol/L HEL 펩티드 41-70, 및 소정 농도(2.6, 7.8 또는 23.4 μg/mL) IgG 항체/200 μL/웰이 되도록, 상기 세포, 상기 T 세포 하이브리도마, 상기 HEL 펩티드, 및 상기 IgG 항체를 파종했다. 상기 파종 후, 상기 각 웰은, RPMI 배지를 사용하고, 37℃, 24시간의 배양 조건하에서 배양했다. 그리고, 상기 배양 후의 상청을 회수하고, ELISA 법에 의해, 상기 상청 중의 IL-2의 농도를 측정했다. 컨트롤은, 상기 IgG 항체를 미첨가로 한 것 이외에는 동일하게 하여, 상청 중의 IL-2의 농도를 측정했다. 상기 ELISA 법에 있어서, IL-2의 포착 항체는, 어피니티 정제된 항-마우스 IL-2(클론명: JES6.1A12, eBioscience사 제조)를, IL-2의 검출 항체는, 비오틴-항-마우스 IL-2(클론명: JES6.5H4, eBioscience사 제조)를 사용하고, 상기 검출 항체의 결합은, 아비딘-HRP(SIGMA사 제조)를 이용하여 검출했다.

[0149] 이 결과를 도 4에 나타낸다. 도 4는, IL-2의 생산량을 나타내는 그래프이다. 도 4에 있어서, 횡축은 상기 IgG 항체의 농도를 나타내고, 종축은 IL-2의 농도를 나타낸다. 도 4에 나타내는 바와 같이, 상기 IgG 항체의 농도 의존적으로, IL-2의 농도가 저하되었다. 또한, 상기 IL-2의 농도는, 상기 3A9T 세포 하이브리도마의 활성화의 정도, 즉 상기 3A9T 세포 하이브리도마의 3A9 TCR이, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자와 결합할 수 있는 정도와 상관한다. 이 때문에, 이들 결과로부터, 상기 HEL 단백질을 면역함으로써, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 IgG 항체를 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0150] [실시예 2]

[0151] 면역용 펩티드를 면역하고, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 항체 생산이 유도되는 것, 및 상기 항체가, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 것을 확인했다.

[0152] (실시예 2A)

[0153] 면역용 펩티드를 면역하고, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 항체 생산이 유도되는 것을 확인했다.

[0154] (1) 항체의 취득

[0155] 30 nmol의 상기 HEL 펩티드 41-70 또는 상기 HEL 펩티드 48-61과 완전 프로인트 아쥬반트를 혼합하고, 각각, 상기 마우스(B10.A 계통)의 피하에 투여했다. 상기 투여 후 2주간에 있어서, 상기 마우스로부터 전혈을 채취하고, 또한, 혈청을 회수했다.

[0156] (2) HEL 펩티드 제시 세포의 조제

[0157] 상기 HEL 단백질, 상기 HEL 펩티드 41-70, 및 상기 HEL 펩티드 48-61 대신에, 상기 HEL 펩티드 41-70 또는 상기 HEL 펩티드 48-61을 첨가한 것 이외에는, 상기 실시예 1B(2)와 동일하게 하여, 상기 HEL 펩티드를 상기 LK35.2 세포에 펄스했다. 배양 후의 상기 LK35.2 세포에 관하여, 상기 웰로부터 회수 후, 후술하는 항체의 검출에 사용했다.

[0158] (3) 항체의 검출

[0159] 상기 293T 세포 대신에, 상기 실시예 2A(2)의 LK35.2 세포를, APC 표지 항마우스 IgG(H+L) 항체 대신에, Alexa(등록상표) 647 표지 항마우스 IgG1 항체(카탈로그 번호: A21240, Invitrogen사 제조)를 이용한 것 이외에는, 상기 실시예 1A(3)과 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다(펩티드 첨가군). 컨트롤 1은, 상기 HEL 펩티드 면역 마우스의 혈청 대신에, 비면역 마우스로부터 채취한 혈청을 이용한 것 이외에는 동일하게 하고, 컨트롤 2는, 상기 HEL 펩티드를 미첨가로 한 것 이외에는 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다(펩티드 미첨가군).

[0160] 이 결과를 도 5에 나타낸다. 도 5는, IgG1 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다. 도 5에 있어서, 횡축은 상기 혈청 중의 IgG1 항체의 결합량을 나타내고, 종축은 세포의 카운트수를 나타낸다. 또한, 도 5에 있어서, 각 히스토그램의 위는 상기 혈청의 종류를 나타내고, 히스토그램의 좌측은 상기 LK35.2 세포에 펄스한 상기 HEL 펩티드의 종류를 나타낸다. 또한, 도 5에 있어서, 실선의 히스토그램은 상기 펩티드 첨가군을 나타내고, 망 형상의 히스토그램은 컨트롤 2(펩티드 미첨가군)를 나타낸다. 도 5에 나타내는 바와 같이, 컨트롤 1(나이브 혈청) 및 상기 HEL 펩티드 48-61 면역 마우스의 혈청에서는, 상기 HEL 펩티드 41-70 또는 상기 HEL 펩티드 48-61을 펄스한 LK35.2 세포에 대하여, 상기 IgG1 항체의 결합은 관찰되지 않았다. 이에 대하여, 상기 HEL 펩티드 41-70 면역 마우스의 혈청에서는, 상기 HEL 펩티드 48-61을 펄스한 LK35.2 세포에 대해서는, 상기 IgG1 항체의 결합은 확인되지 않았지만, 상기 HEL 펩티드 41-70을 펄스한 LK35.2 세포에 대해서는, 상기 IgG1 항체의 결합이 확인되었다. 이들 결과로부터, 상기 HEL 펩티드 41-70, 즉 상기 면역용 펩티드를 면역함으로써, 상기 면역용 펩티드와 상기 MHC 클래스 II 분자의 복합체에 대한 항체를 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0161] (실시예 2B)

[0162] 상기 실시예 2A에서 생산된 항체가, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 것을 확인했다.

[0163] (1) HEL 펩티드 제시 세포의 조제

[0164] 상기 HEL 단백질, 상기 HEL 펩티드 41-70, 및 상기 HEL 펩티드 48-61 대신에, 상기 HEL 단백질을 첨가한 것 이외에는, 상기 실시예 1B(2)와 동일하게 하여, 상기 HEL 단백질을 상기 LK35.2 세포에 펄스했다. 배양 후의 상기 LK35.2 세포에 관하여, 상기 웰로부터 회수 후, 후술하는 항체에 의한 TCR 인식의 저해에 사용했다.

[0165] (2) 항체에 의한 TCR 인식의 저해

[0166] 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청에 더하여, 상기 HEL 펩티드 41-70 면역 마우스의 혈청 또는 상기 HEL 펩티드 48-61 면역 마우스의 혈청을 이용하고, 상기 실시예 1B(2)에서 얻어진 LK35.2 세포 대신에, 상기 실시예 2B(1)에서 얻어진 LK35.2 세포를 이용한 것 이외에는, 상기 실시예 1B(3)과 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다. 컨트롤 1은, 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청, 상기 HEL 펩티드 41-70 면역 마우스의 혈청 및 상기 HEL 펩티드 48-61 면역 마우스의 혈청 대신에, 비면역 마우스로부터 채취한 혈청을 이용한 것 이외에는 동일하게 하고, 컨트롤 2는, 상기 HEL 단백질을 미첨가로 한 것 이외에는 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다.

[0167] 이 결과를 도 6에 나타낸다. 도 6은, 가용형 단쇄 TCR의 결합량을 나타내는 히스토그램이다. 도 6에 있어서, 횡축은 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합량을 나타내고, 종축은 세포의 카운트수를 나타낸다. 또한, 도 6에 있어서, 각 히스토그램의 위는 상기 혈청의 종류를 나타내고, 실선의 히스토그램은 상기 HEL 단백질을 펄스한 LK35.2 세

포를 사용한 경우를 나타내고, 망 형상의 히스토그램은 컨트롤 2를 나타낸다. 도 6에 나타내는 바와 같이, 컨트롤 2에서는, 어느 혈청에 있어서도, 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합을 확인할 수 없었다. 또한, 컨트롤 1(정상 혈청) 및 상기 HEL 펩티드 48-61 면역 마우스의 혈청과 반응시킨 경우, 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합을 확인할 수 있었다. 이에 대하여, 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청 및 상기 HEL 펩티드 41-70 면역 마우스의 혈청과 반응시킨 경우, 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합은 확인할 수 없었다. 이들 결과로부터, 상기 HEL 단백질 및 상기 HEL 펩티드 41-70, 즉 상기 면역용 펩티드를 면역함으로써, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 항체를 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0168] [실시예 3]

[0169] T 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, TCR이 인식하는 아미노산이 치환된 T 세포 에피토프를 포함하는 면역용 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체에 대하여, 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청 중의 IgG 항체가 결합하는 것을 확인했다.

[0170] (1) HEL 펩티드 제시 세포의 조제

[0171] 상기 표 3의 HEL 펩티드 대신에, 상기 HEL 펩티드 48-77 및 하기의 HEL 펩티드 48-77(Y53A L56A)을 이용한 것 이외에는, 상기 실시예 1A(1)과 동일하게 하여, 상기 HEL 펩티드를 상기 293T 세포에 펄스했다. 배양 후의 상기 293T 세포에 관하여, 상기 웰로부터 회수 후, 후술하는 항체의 검출에 사용했다. 또, 상기 HEL 펩티드 48-77(Y53A L56A)은, 상기 T 세포 에피토프인 상기 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어지는 펩티드에 있어서, 공지된 TCR이 인식하는 아미노산인 6번째의 티로신을 알라닌으로, 9번째의 류신을 알라닌으로 치환한 치환 T 세포 에피토프를 포함하는 면역용 펩티드이다.

[0172] (2) 항체의 검출

[0173] 상기 실시예 1A(1)에서 얻어진 293T 세포 대신에, 상기 실시예 3(1)에서 얻어진 293T 세포를 이용한 것 이외에는, 상기 실시예 1A(3)과 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다(펩티드 첨가군). 컨트롤은, 상기 293T 세포 대신에, 상기 HEL 펩티드를 펄스하지 않은 LK35.2 세포를 이용한 것 이외에는 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다(펩티드 미첨가군).

[0174] 도 7은, IgG 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다. 도 7에 있어서, 횡축은 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합량을 나타내고, 종축은 세포의 카운트수를 나타낸다. 또한, 도 7에 있어서, 각 히스토그램의 위는 상기 293T 세포에 펄스한 상기 HEL 펩티드의 종류를 나타내고, 망 형상의 히스토그램은 컨트롤(펩티드 미첨가군)을 나타내고, 실선의 히스토그램은 펩티드 첨가군을 나타낸다. 도 7에 나타내는 바와 같이, 컨트롤에서는, 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합이 확인되지 않았다. 이에 대하여, 상기 HEL 펩티드 48-77 및 상기 HEL 펩티드 48-77(Y53A L56A)을 펄스한 293T 세포에 대해서는, 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합이 확인되었다. 이들 결과로부터, 상기 HEL 단백질을 면역함으로써, 상기 TCR이 인식하는 아미노산이 치환된 T 세포 에피토프를 포함하는 면역용 펩티드와 MHC 클래스 II 분자의 복합체에 대한 항체를 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0175] [실시예 4]

[0176] T 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, TCR이 인식하는 아미노산이 치환된 T 세포 에피토프를 포함하는 면역용 펩티드를 면역하고, 생산된 항체가, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 것을 확인했다.

[0177] (1) 항체의 취득

[0178] 30 nmol의 상기 HEL 펩티드 48-77(Y53A L56A)과 완전 프로인트 아쥬반트를 혼합하고, 상기 마우스(B10.A 계통)의 피하에 투여했다. 상기 투여 후 2주간에 있어서, 상기 마우스로부터 전혈을 채취하고, 또한, 혈청을 회수했다.

[0179] (2) HEL 펩티드 제시 세포의 조제

[0180] 상기 HEL 단백질, 상기 HEL 펩티드 41-70, 및 상기 HEL 펩티드 48-61 대신에, 상기 HEL 단백질을 첨가한 것 이외에는, 상기 실시예 1B(2)와 동일하게 하여, 상기 HEL 단백질을 상기 LK35.2 세포에 펄스했다. 배양 후의 상기 LK35.2 세포에 관하여, 상기 웰로부터 회수 후, 후술하는 항체에 의한 TCR 인식의 저해에 사용했다.

[0181] (3) 항체에 의한 TCR 인식의 저해

[0182] 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청에 더하여, 상기 HEL 펩티드 48-77(Y53A L56A) 면역 마우스의 혈청을 이용하고, 상기 실시예 1B(2)에서 얻어진 LK35.2 세포 대신에, 상기 실시예 4(2)에서 얻어진 LK35.2 세포를 이용한 것 이외에는, 상기 실시예 1B(3)과 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다. 컨트롤은, 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청 및 상기 HEL 펩티드 48-77(Y53A L56A) 면역 마우스의 혈청 대신에, 비면역 마우스로부터 채취한 혈청을 이용한 것 이외에는 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다.

[0183] 이 결과를 도 8에 나타낸다. 도 8은, 가용형 단쇄 TCR의 결합량을 나타내는 히스토그램이다. 도 8에 있어서, 횡축은 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합량을 나타내고, 종축은 세포의 카운트수를 나타낸다. 또한, 도 8에 있어서, 각 히스토그램의 상부는 상기 혈청의 종류를 나타낸다. 도 8에 나타내는 바와 같이, 상기 컨트롤(비면역 마우스의 혈청)과 반응시킨 경우, 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합을 확인할 수 있었다. 이에 대하여, 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청 및 상기 HEL 펩티드 48-77(Y53A L56A) 면역 마우스의 혈청과 반응시킨 경우, 상기 가용형 단쇄 TCR의 결합은 확인할 수 없었다. 이들 결과로부터, 상기 T 세포 에피토프의 아미노산 서열에 있어서, TCR이 인식하는 아미노산이 치환된 T 세포 에피토프를 포함하는 면역용 펩티드를 면역함으로써, 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 항체를 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0184] [실시예 5]

[0186] 면역용 펩티드를 면역하고, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 항체 생산이 유도되는 것을 확인했다.

[0187] (1) PLP 펩티드 제시 세포의 조제

[0188] 마우스 비장 cDNA로부터, 하기의 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^s$)의 α쇄 및 β쇄를 코드하는 폴리뉴클레오티드를, 각각, pME18S 벡터에 클로닝하여, 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^s$) α쇄 발현 벡터($I\text{-}A^s$α 발현 벡터) 및 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^s$) β쇄 발현 벡터($I\text{-}A^s$β 발현 벡터)를 제작했다.

[0189] 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^s$) α쇄(서열번호 22)

ATGCCGCGCAGCAGAGCTCTGATTCTGGGGGTCCTCGCCCTGACCACCATGCTCAGCCTCTGTGGAGGT
GAAGACGACATTGAGGCCGACCACGTAGGCGTCTATGGTACAACTGTATATCAGTCTCCTGGAGACATT
GGCCAGTACACACATGAATTTGATGGTGATGAGTGGTTCTATGTGGACTTGGATAAGAAGGAGACTATC
TGGATGCTTCCTGAGTTTGGCCAATTGACAAGCTTTGACCCCCAAGGTGGACTGCAAAACATAGCTACA
GGAAAATACACCTTGGGAATCTTGACTAAGAGGTCAAATTCCACCCCAGCTACCAATGAGGCTCCTCAA
GCGACTGTGTTCCCCAAGTCCCCTGTGCTGCTGGGTCAGCCCAACACCCTTATCTGCTTTGTGGACAAC
ATCTTCCCTCCTGTGATCAACATCACATGGCTCAGAAATAGCAAGTCAGTCACAGACGGCGTTTATGAG
ACCAGCTTCCTTGTCAACCGTGACCATTCCTTCCACAAGCTGTCTTATCTCACCTTCATCCCTTCTGAC
GATGATATTTATGACTGCAAGGTGGAGCACTGGGGCCTGGAGGAGCCGGTTCTGAAACACTGGGAACCT
GAGATTCCAGCCCCCATGTCAGAGCTGACAGAGACTGTGGTGTGTGCCCTGGGGTTGTCTGTGGGCCTT
GTGGGCATCGTGGTGGGCACCATCTTCATCATTCAAGGCCTGCGATCAGGTGGCACCTCCAGACACCCA

[0190] GGGCCTTTATGA

[0191] 마우스 MHC 클래스 II 분자 ($I\text{-}A^s$) β쇄(서열번호 23)

ATGGCTCTGCAGATCCCCAGCCTCCTCCTCTCGGCTGCTGTGGTGGTGCTGATGGTGCTGAGCAGCCCA
GGGACTGAGGGCGGAGACTCCGAAAGGCATTTCGTGTTCCAGTTCAAGGGCGAGTGCTACTTCACCAAC
GGGACGCAGCGCATACGATCTGTGGACAGATACATCTACAACCGGGAGGAGTACCTGCGCTTCGACAGC
GACGTGGGCGAGTACCGCGCGGTGACCGAGCTGGGGCGGCCAGACCCCGAGTACTACAATAAGCAGTAC
CTGGAGCAAACGCGGGCCGAGCTGGACACGGTGTGCAGACACAACTACGAGGGGGTGGAGACCCACACC
TCCCTGCGGCGGCTTGAACAGCCCAATGTCGTCATCTCCCTGTCCAGGACAGAGGCCCTCAACCACCAC
AACACTCTGGTCTGCTCAGTGACAGATTTCTACCCAGCCAAGATCAAAGTGCGCTGGTTCCGGAATGGC
CAGGAGGAGACGGTGGGGGTCTCATCCACACAGCTTATTAGGAATGGGGACTGGACCTTCCAGGTCCTG
GTCATGCTGGAGATGACCCCTCGGCGGGGAGAGGTCTACACCTGCCACGTGGAGCATCCGAGCCTGAAG
AGCCCCATCACTGTGGAGTGGAGGGCACAGTCTGAGTCTGCCCGGAGCAAGATGTTGAGCGGCATCGGG
GGCTGCGTGCTTGGGGTGATCTTTCTCGGGCTTGGCCTTTTCATCCGTCACAGGAGTCAGAAAGGACCT

[0192] CGAGGCCCTCCTCCTGCAGGGCTCCTGCAGTGA

[0193] 다음으로, 상기 $I\text{-}A^k$α 발현 벡터 및 상기 $I\text{-}A^k$β 발현 벡터 대신에, 상기 $I\text{-}A^s$α 발현 벡터 및 상기 $I\text{-}A^s$β 발현 벡터를 이용한 것 이외에는, 상기 실시예 1A(1)과 동일하게 하여, 상기 발현 벡터를 상기 293T 세포에 도입했다. 또한, 상기 HEL 펩티드 대신에, 하기 표 5의 PLP(미엘린 단백지질 단백질) 펩티드 136-151 또는 PLP 펩티드 139-151을 첨가한 것 이외에는, 상기 실시예 1A(1)과 동일하게 하여, 상기 PLP 펩티드를 상기 293T 세포에 펄스했다. 또, 이하에서 사용하는 PLP 펩티드에서는, 상기 서열번호 7의 아미노산 서열로 이루어지는 T 세포 에피토프의 2번째의 아미노산인 시스테인을 세린으로 치환한 하기 표 5의 PLP 펩티드 139-151(서열번호 20)을 T 세포 에피토프로서 사용하고 있다. 또한, PLP 펩티드 136-151(서열번호 21)에서는, 표 5에 있어서 밑줄로 표시하는 바와 같이, 상류측 항체 유도부에 있어서, N 말단으로부터 3번째의 아미노산을 시스테인으로부터 세린으로 치환하고 있다. 상기 배양 후의 상기 293T 세포에 관하여, 상기 웰로부터 회수 후, 후술하는 항체의 검출에 사용했다. 또, 본 실시예의 PLP 펩티드는, 유로핀 제노믹스 주식회사 또는 GenScript사로부터 취득했다. 또한, 상기 PLP 단백질에 있어서, 상기 MHC 클래스 II 분자인 $I\text{-}A^s$에 제시되는 T 세포 에피토프는, 하기 표 5의 PLP 펩티드 139-151이다. 이 때문에, 상기 표 5의 PLP 펩티드에 있어서, 상기 면역용 펩티드는, PLP 펩티드 136-151이다.

표 5

[0194]

	아미노산 서열
PLP 펩티드 139-151 (서열번호 20)	HSLGKWLGHPDKF
PLP 펩티드 136-151 (서열번호 21)	RVSHSLGKWLGHPDKF

[0195] (2) 항체의 취득

[0196] 상기 HEL 단백질 대신에, 30 nmol의 PLP 펩티드 139-151 또는 PLP 펩티드 136-151을 사용하고, 상기 마우스(B10.A 계통) 대신에, 마우스(B10.S 계통 또는 SJL)에 투여한 것 이외에는, 상기 실시예 1A(2)와 동일하게 하여 혈청을 회수했다.

[0197] (3) 항체의 검출

[0198] 상기 HEL 단백질 면역 마우스의 혈청 대신에, PLP 펩티드 139-151 면역 마우스의 혈청 또는 PLP 펩티드 136-151 면역 마우스의 혈청을 사용하고, 상기 실시예 1A(1)에서 얻어진 293T 세포 대신에, 상기 실시예 5(1)에서 얻어진 293T 세포를 이용한 것 이외에는, 상기 실시예 1A(3)과 동일하게 하여, 상기 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다(펩티드 첨가군). 또한, 컨트롤은, 상기 293T 세포에 상기 PLP 펩티드를 펄스하지 않은 것 이외에는 동일하게 하여, 플로우 사이토메트리에 의해 해석을 행했다(펩티드 미첨가군).

[0199] 이 결과를 도 9에 나타낸다. 도 9는, IgG 항체의 결합량을 나타내는 히스토그램이다. 도 9에 있어서, 횡축은 상기 혈청 중의 IgG 항체의 결합량을 나타내고, 종축은 세포의 카운트수를 나타낸다. 또한, 도 9에 있어서, 각 히

스토그램의 위는 상기 혈청의 종류를 나타낸다. 또한, 도 9에 있어서, 실선의 히스토그램은 상기 펩티드 첨가군을 나타내고, 망 형상의 히스토그램은 컨트롤(펩티드 미첨가군)을 나타낸다. 도 9에 나타내는 바와 같이, 펩티드 미첨가군(컨트롤)에서는, 어느 혈청에 있어서도, IgG 항체의 결합은 관찰되지 않았다. 또한, 상기 PLP 펩티드 139-151 면역 마우스의 혈청에서는, 상기 PLP 펩티드 136-151 또는 상기 PLP 펩티드 139-151을 펄스한 293T 세포에 대하여, 상기 IgG 항체의 결합은 확인되지 않았다. 이에 대하여, 상기 PLP 펩티드 136-151 면역 마우스의 혈청에서는, 상기 PLP 펩티드 136-151을 펄스한 293T 세포 및 상기 PLP 펩티드 139-151을 펄스한 293T 세포에 대하여, 상기 IgG 항체의 결합이 확인되었다. 이들 결과로부터, 상기 PLP 펩티드 136-151, 즉 상기 면역용 펩티드를 면역함으로써, 상기 면역용 펩티드와 상기 MHC 클래스 II 분자의 복합체에 대한 항체를 유도할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0200] [실시예 6]

[0201] 면역용 펩티드를 면역함으로써 얻어진 항체가, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 것을 확인했다.

[0202] (1) PLP 펩티드 제시 세포의 조제

[0203] 상기 PLP 펩티드 136-151을 10 μmol/L가 되도록 첨가한 것 이외에는, 상기 실시예 5(1)과 동일하게 하여, 상기 PLP 펩티드를 펄스한 상기 293T 세포를 조제했다.

[0204] (2) IgG 항체의 취득

[0205] 상기 HEL 단백질 대신에, 30 nmol의 PLP 펩티드 136-151을 사용하고, 상기 마우스(B10.A 계통) 대신에, 마우스(SJL/J 계통)를 이용하고, 상기 투여 후 14-30일째에 있어서, 상기 마우스로부터 전혈을 채취한 것 이외에는, 상기 실시예 1A(2)와 동일하게 하여, 혈청을 회수했다. 얻어진 혈청에 관하여, 프로테인 A 및 프로테인 G(Bio-rad사 제조)를 이용하고, 첨부의 프로토콜에 기초하여, IgG 항체를 정제했다.

[0206] (3) 리포터 T 세포의 제작

[0207] T 세포 에피토프인 PLP 펩티드 139-151과, MHC 클래스 II 분자인 I-A^s의 복합체를 인식하는 TCR(2E5 TCR)을 발현하고, TCR 자극에 의해 GFP를 발현하는 리포터 T 세포는, 이하의 순서로 제작했다.

[0208] 우선, CRISPR-Cas9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins) 시스템을 이용하여, 하기 참고 문헌의 43-1 세포주의 TCR α쇄 유전자 및 TCR β쇄 유전자를 결실시킨 세포를, 플로우 사이토메트리로 채취했다. 상기 채취 후의 세포를 한계 희석하고, TCR의 세포 표면 발현이 음성의 클론을 선발했다(제1 선발 세포). 상기 제1 선발 세포에 대하여, TCR α쇄 유전자 또는 TCR β쇄 유전자를 단독으로 도입해도 TCR이 세포 표면에 발현하지 않고, TCR α쇄 및 β쇄 유전자의 양쪽을 도입하면 TCR이 세포 표면에 발현하는 클론을 선발했다(제2 선발 세포). 그리고, TCR α쇄 및 β쇄 유전자를 도입하고, TCR을 세포 표면에 발현시킨 상태에서, 고상화 항CD3 항체(클론명: 2C11, 고상화 농도: 10 ug/ml)에 의해 자극하면, 리포터 단백질인 GFP가 잘 발현하는 클론을 선발하고, 이것을 TCR 결실 43-1 세포로서 사용했다.

[0209] 참고 문헌: Makoto Ohtsuka et. al., “NFAM1, an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-bearing molecule that regulates B cell development and signaling”, PNAS, 2004, vol.101, No.21, pages 8126-8131

[0210] 다음으로, NCBI 액세션 번호 NM_013488.2로 등록되어 있는 마우스 CD4 분자 mRNA의 170～1543번째의 염기 서열(종지 코돈을 포함함)을, pMXs 벡터(도쿄 대학 의과학 연구소 기타무라 토시오 박사로부터 분여)에 클로닝하여 CD4 발현 벡터를 제작했다. 상기 CD4 발현 벡터를 PlatE 세포에 트랜스펙션하고, 레트로바이러스를 제작했다. 상기 TCR 결실 43-1 세포에 상기 레트로바이러스를 감염시키고, 마우스 CD4를 안정적으로 발현하는 CD4 발현 43-1 세포를 제작했다. 또한, 2E5 TCR α쇄 유전자(서열번호 24, 종지 코돈을 포함함) 및 2E5 TCR β쇄 유전자(서열번호 25, 종지 코돈을 포함함)를 pMXs 벡터에 클로닝하여, 2E5 TCR 발현 벡터를 제작했다. 그리고, 상기 CD4 발현 벡터 대신에, 상기 2E5 TCR 발현 벡터를 이용하고, 상기 TCR 결실 43-1 세포 대신에, CD4 발현 43-1 세포를 이용한 것 이외에는 동일하게 하여, 레트로바이러스를 제작하고, 2E5 TCR을 안정적으로 발현하는 2E5 리포터 T 세포를 제작했다.

[0211] 2E5 TCR α쇄 유전자(서열번호 24)

ATGAAGACATCCCTTCACACTGTATTCCTATTCTTGTGGCTGTGGATGGACTGGGAAAGCCATGGAGAG
AAGGTCGAGCAACACCAGTCTACACTGAGTGTTCGAGAGGGAGACAGCGCTGTCATCAACTGCACTTAC
ACAGATACTGCCTCATCATACTTCCCTTGGTACAAGCAAGAAGCTGGAAAGAGTCTCCACTTTGTGATA
GACATTCGTTCAAATGTGGACAGAAAACAGAGCCAAAGACTTACAGTTTTATTGGATAAGAAAGCCAAA
CGATTCTCCCTGCACATCACAGCCACACAGCCTGAAGATTCAGCCATCTACTTCTGTGCAGCAAGCCCG
GGAGCTAACACTGGAAAGCTCACGTTTGGACACGGCACCATCCTTAGGGTCCATCCAAACATCCAGAAC
CCAGAACCTGCTGTGTACCAGTTAAAAGATCCTCGGTCTCAGGACAGCACCCTCTGCCTGTTCACCGAC
TTTGACTCCCAAATCAATGTGCCGAAAACCATGGAATCTGGAACGTTCATCACTGACAAAACTGTGCTG
GACATGAAAGCTATGGATTCCAAGAGCAATGGGGCCATTGCCTGGAGCAACCAGACAAGCTTCACCTGC
CAAGATATCTTCAAAGAGACCAACGCCACCTACCCCAGTTCAGACGTTCCCTGTGATGCCACGTTGACC
GAGAAAAGCTTTGAAACAGATATGAACCTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTTATGGGACTCCGAATCCTC
CTGCTGAAAGTAGCGGGATTTAACCTGCTCATGACGCTGAGGCTGTGGTCCAGTTGA

[0212]

[0213] 2E5 TCR β쇄 유전자(서열번호 25)

ATGGGTGCAAGACTGCTCTGCTGTGTAGCAGTTTGTCTGCTTGGGGCAGGCTCTTTTGTTGCTGGAGTA
ACCCAGACTCCACGATACCTGGTCAAAGAGGAAGGACAGAAAGCACACATGAGTTGTAGTCCTGAAAAA
GGGCACACTGCCTTTTACTGGTATCAACAGAACCAGAAACAAGAACTTACATTTTTGATTAACTTTCGG
AATGAAGAAATTATGGAACAAACAGACTTGGTCAAGAAGAGATTCTCAGCTAAGTGTTCCTCGAACTCA
CAGTGCATCCTGGAAATCCTATCCTCTGAAGAAGACGACTCAGCACTGTACCTCTGTGCCAGCAGCCTT
GTACGAGGGAACTCCGACTACACCTTCGGCTCAGGGACCAGGCTTTTGGTAATAGAGGATCTGAGAAAT
GTGACTCCACCCAAGGTCTCCTTGTTTGAGCCATCAAAAGCAGAGATTGCAAACAAACAAAAGGCTACC
CTCGTGTGCTTGGCCAGGGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGCAAGGAG
GTCCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCTCAGGCCTACAAGGAGAGCAATTATAGCTACTGCCTGAGCAGC
CGCCTGAGGGTCTCTGCTACCTTCTGGCACAATCCTCGAAACCACTTCCGCTGCCAAGTGCAGTTCCAT
GGGCTTTCAGAGGAGGACAAGTGGCCAGAGGGCTCACCCAAACCTGTCACACAGAACATCAGTGCAGAG
GCCTGGGGCCGAGCAGACTGTGGAATCACTTCAGCATCCTATCATCAGGGGGTTCTGTCTGCAACCATC
CTCTATGAGATCCTACTGGGGAAGGCCACCCTATATGCTGTGCTGGTCAGTGGCCTAGTGCTGATGGCC
ATGGTCAAGAAAAAAAATTCCTGA

[0214]

[0215] (4) 항체에 의한 TCR 인식의 저해

[0216] 상기 실시예 6(1)에서 얻어진 PLP 펩티드를 펄스한 293T 세포에, 2×10^4 세포의 상기 2E5 리포터 T 세포와, 1 mg/mL가 되도록, 상기 (2)에서 취득한 IgG 항체를 첨가하고, 37℃, 1일의 배양 조건하에서 배양했다. 상기 배양 후, 세포를 회수하고, 상기 2E5 리포터 T 세포를, APC 표지 항CD45 항체(클론명: 30-F11, eBioscience사 제조)로 염색했다. 그리고, 상기 플로우 사이토메트리를 이용하여, 상기 염색 후의 2E5 리포터 세포에 관하여, CD45 양성 세포에 있어서의 GFP 양성 세포의 비율에 관하여 해석을 행했다. 컨트롤 1은, 상기 IgG 항체 대신에, 상기 배지를 첨가한 것 이외에는 동일하게 하고, 컨트롤 2는, 상기 PLP 펩티드 136-151을 첨가하지 않고 면역한 마우스(CFA 면역 마우스) 유래의 혈청으로부터 정제한 IgG 항체를 이용한 것 이외에는 동일하게 하여, CD45 양성 세포에 있어서의 GFP 양성 세포의 비율에 관하여 해석을 행했다.

[0217] 이들 결과를 도 10에 나타낸다. 도 10은, CD45 양성 세포에 있어서의 GFP 양성 세포의 비율을 나타내는 그래프이다. 도 10에 있어서, 횡축은 샘플의 종류를 나타내고, 종축은 GFP 양성 세포의 비율을 나타낸다. 도 10에 나타내는 바와 같이, 상기 컨트롤 2(상기 CFA 면역 마우스 유래의 혈청으로부터 정제한 IgG 항체)는, 상기 컨트롤 1과 동일한 정도의 GFP 양성 세포가 존재하고, 상기 2E5 리포터 세포의 2E5 TCR이, T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자와 결합하고, 상기 2E5 리포터 세포가 활성화되어 있었다. 이에 대하여, 상기 PLP 펩티드 136-151 면역 마우스의 혈청으로부터 정제한 IgG 항체를 첨가한 경우, 상기 컨트롤 1 및 2에 대하여, GFP 양성 세포의 비율이 현저히 저하되었다. 즉, 상기 PLP 펩티드 136-151 면역 마우스의 혈청으로부터 정제한 IgG 항체에 의해, 상기

2E5 리포터 세포의 2E5 TCR과, T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자의 결합이 저해되고, 상기 2E5 리포터 세포의 활성화가 저해되어 있었다. 이들 결과로부터, 면역용 펩티드를 면역함으로써 얻어진 항체가, 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자에 대한 상기 T 세포 에피토프/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 TCR의 결합을 저해하는 것을 알 수 있었다.

[0218] [실시예 7]

[0219] 면역용 펩티드를 면역함으로써 얻어진 항체가, 생체에 있어서 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 T 세포(특이적 T 세포)의 활성화를 저해하는 것을 확인했다.

[0220] (1) IgG 항체의 취득

[0221] 상기 실시예 6(2)와 동일하게 하여, IgG 항체를 정제했다.

[0222] (2) 생체에 있어서의 특이적 T 세포의 활성화

[0223] 30 nmol의 상기 PLP 펩티드 139-151과 CFA를 혼합하고, 마우스(SJL/J 계통)의 피하에 면역했다. 또한, 상기 면역 후 0 및 2일째에, 2 mg의 상기 실시예 7(1)에서 취득한 IgG 항체를, 상기 마우스의 복강 내에 투여했다. 상기 면역 후 11일째에, 상기 마우스의 림프절로부터, 항CD4 항체(클론명: GK1.5, eBioscience사 제조) 및 셀 소터(Sony cell sorter SH800Z, Sony사 제조)를 이용하여, CD4 양성 세포를 정제했다.

[0224] 또한, 비면역 마우스(SJL/J 계통)의 비장을 호모게나이즈하여 단일 세포 부유액을 조제 후, ACK 용혈 완충액으로 적혈구를 용혈함으로써, 비장 세포를 조제했다. 그리고, 1×10^5 세포의 상기 CD4 양성 세포, 및 4×10^5 세포의 상기 비장 세포를 혼합 후, 소정 농도(0, 2, 20 또는 200 μmol/L)가 되도록, PLP 펩티드 136-151을 첨가하고, 37℃, 4일의 배양 조건하에서 배양함으로써, CD4 양성 세포를 자극하여, 증식을 유도했다. 상기 배양은, RPMI 배지를 이용하여 실시했다. 그리고, 상기 배양 후의 세포에 관하여, 세포 증식 측정 키트(Cell proliferation ELISA kit, Roche사 제조)를 이용하여 측정했다(IgG 항체 투여군). 컨트롤은, 상기 IgG 항체를 투여하지 않은 상기 마우스로부터 정제한 CD4 양성 세포를 이용한 것 이외에는, 동일하게 하여 측정했다(IgG 항체 비투여군).

[0225] 이들 결과를 도 11에 나타낸다. 도 11은, 세포 증식의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 11에 있어서, 횡축은 상기 PLP 펩티드 136-151의 농도를 나타내고, 종축은 세포 증식능(rlu/s)을 나타내고, 도면 중의 사각(□)은 상기 IgG 항체를 투여한 마우스 유래의 CD4 양성 세포를 이용한 결과를 나타내고, 능형(◆)은 컨트롤의 결과를 나타낸다. 도 11에 나타내는 바와 같이, 상기 PLP 펩티드 136-151을 첨가하지 않은 경우, 즉, 상기 CD4 양성 세포를 자극하지 않은 경우, 상기 IgG 항체 투여군과, 상기 IgG 항체 비투여군의 사이에서, 상기 CD4 양성 세포의 세포 증식능에 차는 없었다. 이에 대하여, 상기 PLP 펩티드 136-151이 2, 20, 또는 200 μmol/L의 경우, 상기 IgG 항체 투여군은, 상기 IgG 항체 비투여군에 대하여, 상기 CD4 양성 세포의 세포 증식능이 현저히 저하되어 있었다. 이러한 점으로부터, 면역용 펩티드를 면역함으로써 얻어진 항체가, 생체에 있어서 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 T 세포의 활성화를 저해하는 것을 알 수 있었다.

[0226] (3) 양자 이입을 이용한 특이적 T 세포의 활성화의 평가

[0227] 상기 실시예 7(2)와 동일하게 하여, 상기 PLP 펩티드 139-151의 면역 및 상기 IgG 항체의 투여를 행했다. 그리고, 상기 면역 후 12일째에, 상기 마우스의 림프절을 호모게나이즈하여 단일 세포 부유액을 조제함으로써, 림프절 세포를 조제했다. 그리고, 상기 림프절 세포에, 50 μg/mL가 되도록 상기 PLP 펩티드 139-151을 첨가하고, 37℃, 4일의 배양 조건하에서 배양했다. 상기 배양 후, 상기 림프절 세포를 회수하고, 9×10^6 세포/마우스가 되도록, 비면역 마우스(SJL/J 계통)에 정맥내 투여했다. 그리고, 상기 투여 후의 소정일(0, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 17, 19, 22, 25, 28, 32 및 36일)에, 이하의 자기 면역성 뇌척수염의 평가 기준에 의해, 임상 스코어(EAE Score)를 산출했다(IgG 항체 투여군). 컨트롤은, 상기 IgG 항체를 투여하지 않은 마우스로부터 조제한 림프절 세포를 이용한 것 이외에는, 동일하게 하여 임상 스코어를 산출했다(IgG 항체 비투여군).

[0228] (자기 면역성 뇌척수염의 평가 기준)

[0229] 스코어: 증상

[0230] 1: 꼬리의 이완(꼬리를 잡으면 늘어진 채로의 상태)

[0231] 2: 부분적인 뒷다리의 마비(보행의 이상)

[0232] 3: 완전한 뒷다리의 마비

[0233] 4: 뒷다리 및 하반신의 마비

[0234] 5: 뒷다리, 하반신 및 앞다리의 마비

[0235] 6: 사망

[0236] 이들 결과를 도 12에 나타낸다. 도 12는, 임상 스코어의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 12에 있어서, 횡축은 상기 림프절 세포 투여 후의 일수를 나타내고, 종축은 임상 스코어를 나타내고, 도면 중의 파선은 상기 IgG 항체 투여군의 결과를 나타내고, 실선은 상기 IgG 항체 비투여군의 결과를 나타낸다. 도 12에 나타내는 바와 같이, 상기 IgG 항체 투여군은, 상기 IgG 항체 비투여군보다, 자기 면역성 뇌척수염의 발증이 늦고, 또한 발증한 경우에 있어서도, 증상이 유의하게 저감되어 있었다. 이들 결과로부터, 상기 면역용 펩티드를 면역함으로써 얻어진 항체가, 생체에 있어서 상기 면역용 펩티드/MHC 클래스 II 분자를 인식하는 T 세포의 활성화를 저해하는 것을 알 수 있었다.

[0237] [실시예 8]

[0238] 면역용 펩티드를 면역함으로써, 자기 면역 질환인 실험적 자기 면역성 뇌척수염(EAE)의 발증 및 증상을 억제할 수 있는 것을 확인했다.

[0239] 30 nmol의 상기 PLP 펩티드 136-151과 CFA를 혼합하고, 마우스(SJL/J 계통)의 피하에 면역했다. 상기 면역 후 8주째에, 50 nmol의 상기 PLP 펩티드 139-151과 CFA를 혼합하고, 상기 마우스에 면역했다. 또한, 상기 PLP 펩티드 139-151의 면역 후 0 및 2일째에, 100 ng의 백일해 독소를 상기 마우스에 정맥내 투여함으로써, EAE를 유도했다. 그리고, 상기 PLP 펩티드 139-151 면역 후의 소정일(0, 3, 7, 9, 11, 12, 14, 17, 19, 20, 22, 24, 27, 30, 32, 34, 및 36일)에, 이하의 자기 면역성 뇌척수염의 평가 기준에 의해, 임상 스코어(EAE Score)를 산출했다(면역 펩티드 투여군). 컨트롤은, 1회째의 면역시에, 상기 PLP 펩티드 136-151 대신에, 상기 PLP 펩티드 139-151을 이용한 것 이외에는, 동일하게 하여 임상 스코어를 산출했다(T 세포 에피토프 투여군).

[0240] 이들 결과를 도 13에 나타낸다. 도 13은, 임상 스코어를 나타내는 그래프이다. 도 13에 있어서, 횡축은 2회째의 면역 후의 일수를 나타내고, 종축은 임상 스코어를 나타내고, 도면 중의 파선은 상기 면역 펩티드 투여군의 결과를 나타내고, 실선은 상기 T 세포 에피토프 투여군의 결과를 나타낸다. 도 13에 나타내는 바와 같이, 상기 면역용 펩티드 투여군은, 상기 T 세포 에피토프 투여군과 비교하여, 자기 면역성 뇌척수염의 발증이 늦고, 또한 발증한 경우에 있어서도, 증상이 매우 저감되어 있었다. 이들 결과로부터, 상기 면역용 펩티드를 면역함으로써, 자기 면역 질환의 발증 및 증상을 억제할 수 있는 것을 알 수 있었다.

[0241] 이상, 실시형태 및 실시예를 참조하여 본 발명을 설명했지만, 본 발명은 상기 실시형태 및 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 구성이나 상세에는, 본 발명의 범위 내에서 당업자가 이해할 수 있는 여러가지 변경을 할 수 있다.

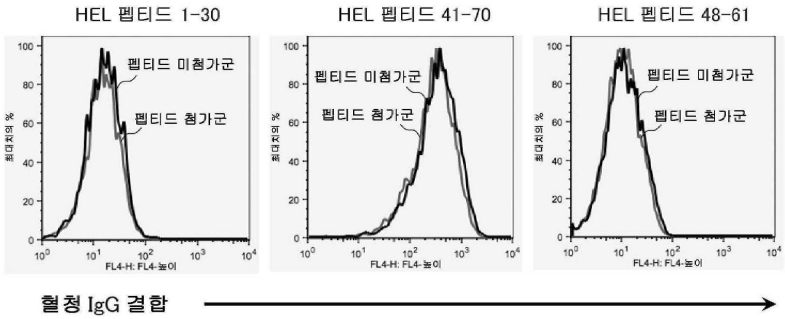
[0242] 이 출원은, 2015년 3월 30일에 출원된 일본 특허출원 2015-068043을 기초로 하는 우선권을 주장하고, 그 개시의 전부를 여기에 도입한다.

[0243] **산업상 이용가능성**

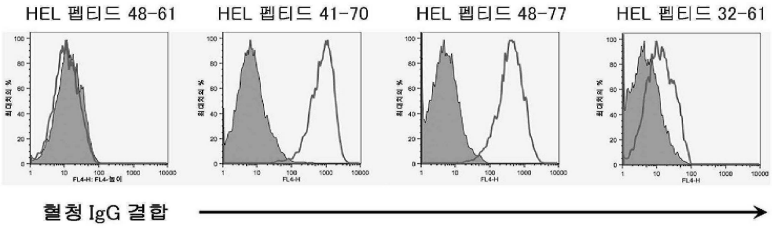
[0244] 본 발명의 면역용 펩티드에 의하면, 상기 면역용 펩티드와 상기 생체의 MHC 분자의 복합체에 대한 항체 생산을 유도할 수 있다. 이 때문에, 본 발명은, 예컨대, 임상 분야 등에 있어서 매우 유용하다.

도면

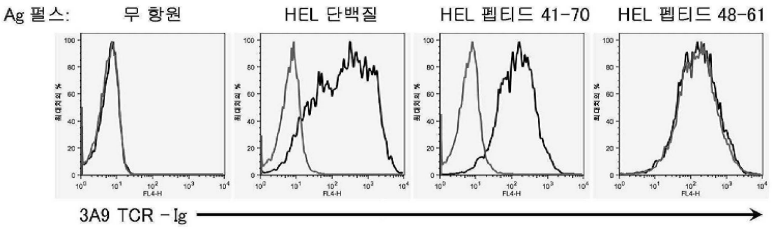
도면1



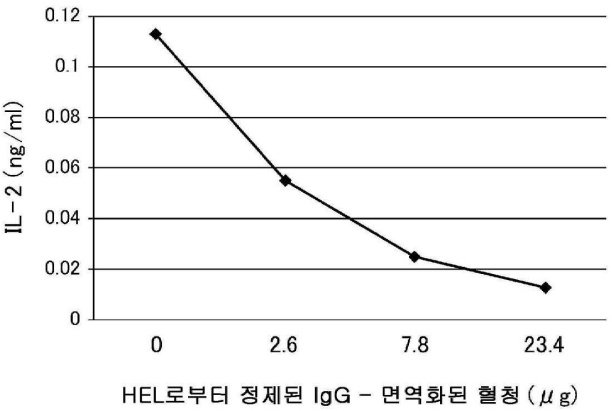
도면2



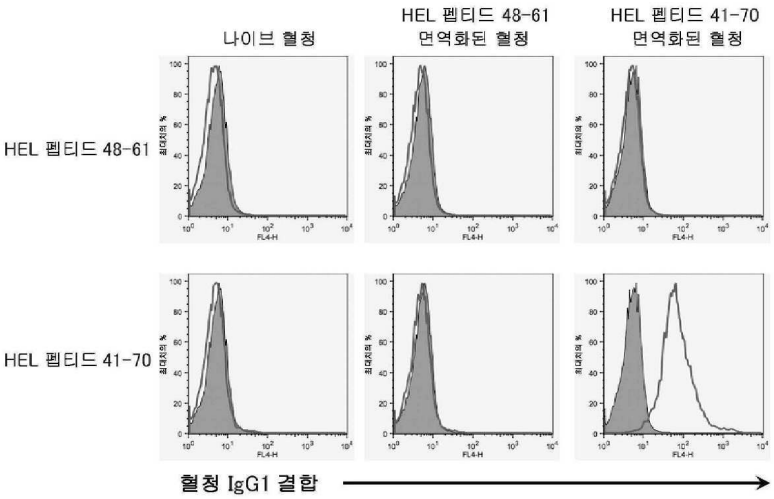
도면3



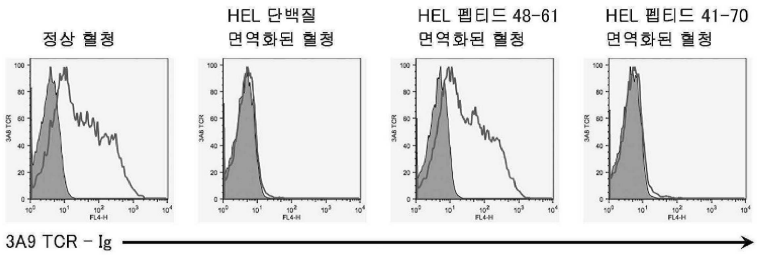
도면4



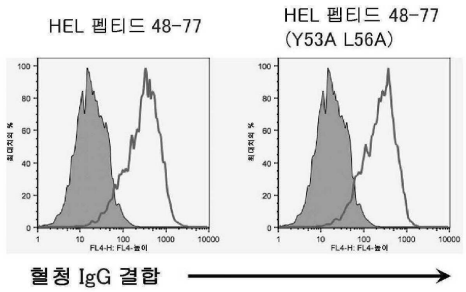
도면5



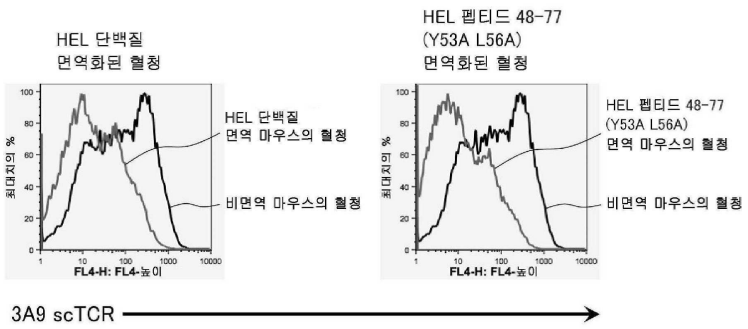
도면6



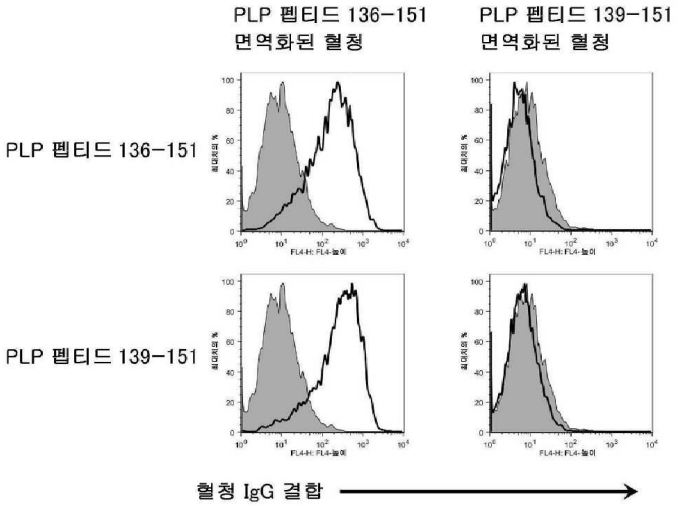
도면7



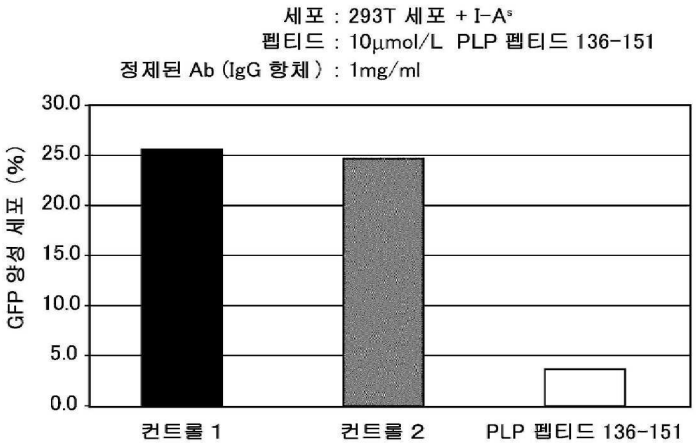
도면8



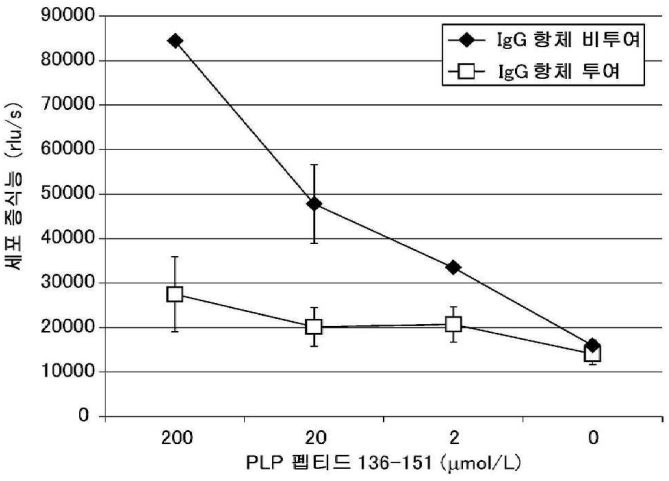
도면9



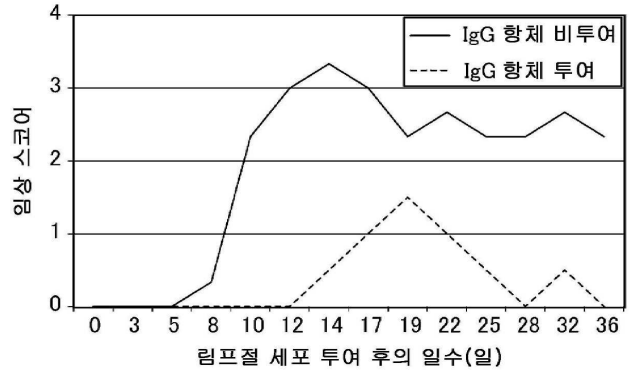
도면10



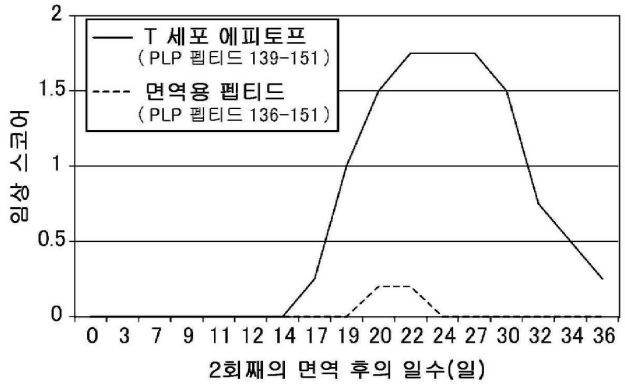
도면11



도면12



도면13



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka University

<120> Peptide for immunization, method of producing peptide for immunization, pharmaceutical composition for immune diseases containing the same, and method of treating immune disease

<130> TF14085WO

<150> JP2015-068043

<151> 2015-03-30

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Gallus gallus domesticus

<400> 1

Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg

1 5 10

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 2

Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln Pro Phe Pro Gln Gln Pro Gln Gln

1 5 10 15

Ser Phe Pro Gln

20

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Gallus gallus domesticus

<400> 3

Val Thr Tyr Thr Asn Asp Cys Leu Leu Cys Ala Tyr Ser Ile Glu Phe

1 5 10 15

Gly Thr Asn

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> Cryptomeria japonica

<400> 4

Lys Val Thr Val Ala Phe Asn Gln Phe

1 5

<210> 5

<211> 23

<212> PRT

<213> Acarina

<400> 5

Ser Ala Tyr Leu Ala His Arg Asn Gln Ser Leu Asp Leu Ala Glu Gln

1 5 10 15

Glu Leu Val Asp Cys Ala Ser

20

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Felis silvestris catus

<400>

6

Leu Pro Val Val Leu Glu Asn Ala Arg Ile Leu Lys Asn

1 5 10

<210> 7

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

His Cys Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe

1 5 10

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Triticum aestivum

<400> 8

Gln Gln Ile Pro Gln Gln Gln

1 5

<210> 9

<211> 40

<212> PRT

<213> Gallus gallus domesticus

<400> 9

Ala Glu Val Asp Cys Ser Arg Phe Pro Asn Ala Thr Asp Lys Glu Gly

1 5 10 15

Lys Asp Val Leu Ser Ile Glu Phe Gly Thr Asn Ile Ser Lys Val Glu

20 25 30

Gln Gly Ala Ser Val Asp Lys Arg

35 40

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Cryptomeria japonica

<400> 10

Gly Val Glu Pro Val His Pro Gln Asp Gly Asp Ala Leu Thr Leu Arg

1 5 10 15

Thr Ala Thr Asn

20

<210> 11

<211> 771

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

atgccgcgca gcagagctct gattctgggg gtcctcgccc tgaccaccat gctcagcctc 60

tgcggaggtg aagacgacat tgaggccgac cacgtaggct cctatggtat aactgtatat 120

cagtctcctg gagacattgg ccagtacaca tttgaatttg atggtgatga gttgttctat 180

gtggacttgg ataagaagga gactgtctgg atgcttcctg agtttgctca actgagaaga 240

tttgagcccc aaggtggact gcaaaacata gctacaggaa aacacaactt ggaaatcttg 300

actaagaggt caaattccac cccagctacc aatgaggctc ctcaagcgac tgtgttcccc 360

aagtctcctg tgctgctggg tcagcccaac acccttatct gctttgtgga caacatcttc 420

cctcctgtga tcaacatcac atggctcaga aatagcaagt cagtcacaga cggcgtttat 480

gaaaccagct tcttcgtcaa ccgtgactat tccttccaca agctgtctta tctcaccttc 540

atcccttctg acgatgacat ttatgactgc aaggtggagc actggggcct ggaggagccg 600

gttctgaaac actgggaacc tgagattcca gcccccatgt cagagctgac agagactgtg 660

gtgtgtgccc tggggttgtc tgtgggcctt gtgggcatcg tggtgggcac catcttcatc 720

attcaaggcc tgcgatcagg tggcacctcc agacacccag ggcctttatg a 771

<210> 12

<211> 792

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 12

atggctctgc agatccccag cctcctcctc ttggctgctg ttgtggtgct gacggtgctg 60

agcagcccag ggactgaggg cggaaactcc gaaaggcatt tcgtgcacca gttccagccc 120

ttctgctact tcaccaacgg gacgcagcgc atacggcttg tgatcagata catctacaac 180

cgggaggagt acgtgcgctt cgacagcgac gtgggcgagt accgcgcggt gaccgagctg 240

gggcggccag acgccgagta ctggaataag cagtacctgg agcgaacgcg ggccgagctg 300

gacacggtgt gcagacacaa ctacgagaag acggagaccc ccacctccct gcggcggctt 360

gaacagccca gtgtcgtcat ctccctgtcc aggacagagg ccctcaacca ccacaacacg 420

ctggtctgct cagtgacaga tttctaccca gccaagatca aagtgcgctg gttccggaat 480

ggccaggagg agacggtggg ggtctcgtcc acacagctta ttaggaatgg ggactggacc 540

ttccaggtcc tggtcatgct ggagatgacc cctcggcggg gagaggtcta cacctgccat 600

gtggagcatc ccagcctgaa gagtcccatc accgtggagt ggcgggcaca gtccgagtct 660

gcccggagca agatgttgag cggcatcggt ggctgcgtgc ttggggtgat cttcctcggg 720

cttggccttt tcatccgtca caggagtcag aaaggacctc gaggccctcc tccagcaggg 780

ctcctgcagt ga 792

<210> 13

<211> 720

<212> DNA

<213> Aequorea coerulescens

<400> 13

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180

ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240

cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300

ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420

aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540

gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga tcacatggtc 660

ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720

<210> 14

<211> 30

<212> PRT

<213> Gallus gallus domesticus

<400> 14

Lys Val Phe Gly Arg Cys Glu Leu Ala Ala Ala Met Lys Arg His Gly

1 5 10 15

Leu Asp Asn Tyr Arg Gly Tyr Ser Leu Gly Asn Trp Val Cys

20 25 30

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Gallus gallus domesticus

<400> 15

Gln Ala Thr Asn Arg Asn Thr Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu

1 5 10 15

Gln Ile Asn Ser Arg Trp Trp Cys Asn Asp Gly Arg Thr Pro

20 25 30

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> Gallus gallus domesticus

<400> 16

Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg

1 5 10

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Gallus gallus domesticus

<400> 17

Ala Lys Phe Glu Ser Asn Phe Asn Thr Gln Ala Thr Asn Arg Asn Thr

1 5 10 15

Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg

20 25 30

<210> 18

<211> 30

<212> PRT

<213> Gallus gallus domesticus

<400> 18

Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Gly Ile Leu Gln Ile Asn Ser Arg Trp Trp

1 5 10 15

Cys Asn Asp Gly Arg Thr Pro Gly Ser Arg Asn Leu Cys Asn

20 25 30

<210> 19

<211> 1158

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> fusion protein

<400> 19

atgctcctgg cactcctccc agtgctgggg atacactttg tcctgagaga tgcccaagct 60

cagtcagtga cacagcccga tgctcgcgtc actgtctctg aaggagcctc tctgcagctg 120

agatgcaagt attcctactc tgggacgcct tatctgttct ggtatgtcca gtacccgcgg 180

caggggctgc agctgctcct caagtactat tccggagacc cagtggttca aggagtgaat 240

ggctttgagg ctgagttcag caagagtaac tcttccttcc acctgcggaa agcctccgtg 300

cactggagcg actcggctgt gtacttctgt gctttaaatt ctggaggaag caatgcaaag 360

ctagccttcg ggaaaggctc taaactctct gttaaatcaa acggcggagg cggatcagga 420

ggaggaggat caggcggagg aggatcagca gtcacccaaa gcccaagaaa caaggtggca 480

gtaacaggag gaaaggtgac attgagctgt aatcagacta ataaccacaa caacatgtac 540

tggtatcggc aggacacggg gcatgggctg aggctgatcc attattcata tggtgctggc 600

agcactgaga aaggagatat ccctgatgga tacaaggcct ccagaccaag ccaagagaac 660

ttctccctca ttctggagtt ggctaccccc tctcagacat cagtgtactt ctgtgccagc 720

ggtgatgaat cggccctacc ggagctctac tttggtgaag gctcaaagct gacagtgctg 780

gaggatctga gaaatgtgac tccacccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag 840

attgcaaaca aacaaaaggc taccctcgtg tgcttggcca ggggcttctt ccctgaccac 900

gtggagctga gctggtgggt gaatggcaag gaggtccaca gtggggtcag cacggaccct 960

caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgcctgagca gccgcctgag ggtctctgct 1020

accttctggc acaatcctcg caaccacttc cgctgccaag tgcagttcca tgggctttca 1080

gaggaggaca agtggccaga gggctcaccc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag 1140

gcctggggcc gagcagac 1158

<210> 20

<211> 13

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 20

His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe

1 5 10

<210> 21

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 21

Arg Val Ser His Ser Leu Gly Lys Trp Leu Gly His Pro Asp Lys Phe

1 5 10 15

<210> 22

<211> 771

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 22

atgccgcgca gcagagctct gattctgggg gtcctcgccc tgaccaccat gctcagcctc 60

tgtggaggtg aagacgacat tgaggccgac cacgtaggcg tctatggtac aactgtatat 120

cagtctcctg gagacattgg ccagtacaca catgaatttg atggtgatga gtggttctat 180

gtggacttgg ataagaagga gactatctgg atgcttcctg agtttggcca attgacaagc 240

tttgaccccc aaggtggact gcaaaacata gctacaggaa aatacacctt gggaatcttg 300

actaagaggt caaattccac cccagctacc aatgaggctc ctcaagcgac tgtgttcccc 360

aagtcccctg tgctgctggg tcagcccaac acccttatct gctttgtgga caacatcttc 420

cctcctgtga tcaacatcac atggctcaga aatagcaagt cagtcacaga cggcgtttat 480

gagaccagct tccttgtcaa ccgtgaccat tccttccaca agctgtctta tctcaccttc 540

atcccttctg acgatgatat ttatgactgc aaggtggagc actggggcct ggaggagccg 600

gttctgaaac actgggaacc tgagattcca gcccccatgt cagagctgac agagactgtg 660

gtgtgtgccc tggggttgtc tgtgggcctt gtgggcatcg tggtgggcac catcttcatc 720

attcaaggcc tgcgatcagg tggcacctcc agacacccag ggcctttatg a 771

<210> 23

<211> 792

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 23

atggctctgc agatccccag cctcctcctc tcggctgctg tggtggtgct gatggtgctg 60

agcagcccag ggactgaggg cggagactcc gaaaggcatt tcgtgttcca gttcaagggc 120

gagtgctact tcaccaacgg gacgcagcgc atacgatctg tggacagata catctacaac 180

cgggaggagt acctgcgctt cgacagcgac gtgggcgagt accgcgcggt gaccgagctg 240

gggcggccag accccgagta ctacaataag cagtacctgg agcaaacgcg ggccgagctg 300

gacacggtgt gcagacacaa ctacgagggg gtggagaccc acacctccct gcggcggctt 360

gaacagccca atgtcgtcat ctccctgtcc aggacagagg ccctcaacca ccacaacact 420

ctggtctgct cagtgacaga tttctaccca gccaagatca aagtgcgctg gttccggaat 480

ggccaggagg agacggtggg ggtctcatcc acacagctta ttaggaatgg ggactggacc 540

ttccaggtcc tggtcatgct ggagatgacc cctcggcggg gagaggtcta cacctgccac 600

gtggagcatc cgagcctgaa gagccccatc actgtggagt ggagggcaca gtctgagtct 660

gcccggagca agatgttgag cggcatcggg ggctgcgtgc ttggggtgat ctttctcggg 720

cttggccttt tcatccgtca caggagtcag aaaggacctc gaggccctcc tcctgcaggg 780

ctcctgcagt ga 792

<210> 24

<211> 816

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 24

atgaagacat cccttcacac tgtattccta ttcttgtggc tgtggatgga ctgggaaagc 60

catggagaga aggtcgagca acaccagtct acactgagtg ttcgagaggg agacagcgct 120

gtcatcaact gcacttacac agatactgcc tcatcatact tcccttggta caagcaagaa 180

gctggaaaga gtctccactt tgtgatagac attcgttcaa atgtggacag aaaacagagc 240

caaagactta cagttttatt ggataagaaa gccaaacgat tctccctgca catcacagcc 300

acacagcctg aagattcagc catctacttc tgtgcagcaa gcccgggagc taacactgga 360

aagctcacgt ttggacacgg caccatcctt agggtccatc caaacatcca gaacccagaa 420

cctgctgtgt accagttaaa agatcctcgg tctcaggaca gcaccctctg cctgttcacc 480

gactttgact cccaaatcaa tgtgccgaaa accatggaat ctggaacgtt catcactgac 540

aaaactgtgc tggacatgaa agctatggat tccaagagca atggggccat tgcctggagc 600

aaccagacaa gcttcacctg ccaagatatc ttcaaagaga ccaacgccac ctaccccagt 660

tcagacgttc cctgtgatgc cacgttgacc gagaaaagct ttgaaacaga tatgaaccta 720

aactttcaaa acctgtcagt tatgggactc cgaatcctcc tgctgaaagt agcgggattt 780

aacctgctca tgacgctgag gctgtggtcc agttga 816

<210> 25

<211> 921

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 25

atgggtgcaa gactgctctg ctgtgtagca gtttgtctgc ttggggcagg ctcttttgtt 60

gctggagtaa cccagactcc acgatacctg gtcaaagagg aaggacagaa agcacacatg 120

agttgtagtc ctgaaaaagg gcacactgcc ttttactggt atcaacagaa ccagaaacaa 180

gaacttacat ttttgattaa ctttcggaat gaagaaatta tggaacaaac agacttggtc 240

aagaagagat tctcagctaa gtgttcctcg aactcacagt gcatcctgga aatcctatcc 300

tctgaagaag acgactcagc actgtacctc tgtgccagca gccttgtacg agggaactcc 360

gactacacct tcggctcagg gaccaggctt ttggtaatag aggatctgag aaatgtgact 420

ccacccaagg tctccttgtt tgagccatca aaagcagaga ttgcaaacaa acaaaaggct 480

accctcgtgt gcttggccag gggcttcttc cctgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 540

aatggcaagg aggtccacag tggggtcagc acggaccctc aggcctacaa ggagagcaat 600

tatagctact gcctgagcag ccgcctgagg gtctctgcta ccttctggca caatcctcga 660

aaccacttcc gctgccaagt gcagttccat gggctttcag aggaggacaa gtggccagag 720

ggctcaccca aacctgtcac acagaacatc agtgcagagg cctggggccg agcagactgt 780

ggaatcactt cagcatccta tcatcagggg gttctgtctg caaccatcct ctatgagatc 840

ctactgggga aggccaccct atatgctgtg ctggtcagtg gcctagtgct gatggccatg 900

gtcaagaaaa aaaattcctg a 921