

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5784009号
(P5784009)

(45) 発行日 平成27年9月24日(2015.9.24)

(24) 登録日 平成27年7月31日(2015.7.31)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/755 (2006.01)
C O 7 K 7/08 (2006.01)
A 6 1 P 7/04 (2006.01)
A 6 1 K 38/00 (2006.01)

C O 7 K 14/755 Z N A
 C O 7 K 7/08
 A 6 1 P 7/04
 A 6 1 K 37/02

請求項の数 8 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2012-511336 (P2012-511336)
 (86) (22) 出願日 平成22年5月17日 (2010.5.17)
 (65) 公表番号 特表2012-527440 (P2012-527440A)
 (43) 公表日 平成24年11月8日 (2012.11.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2010/000997
 (87) 国際公開番号 W02010/133834
 (87) 国際公開日 平成22年11月25日 (2010.11.25)
 審査請求日 平成25年2月27日 (2013.2.27)
 (31) 優先権主張番号 0908515.0
 (32) 優先日 平成21年5月18日 (2009.5.18)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 513020401
 アビトープ インターナショナル エヌブ
 イ
 ベルギー国 3590 ディーベンベーク
 , アゴララン, ヘバウ アー ビス
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 230113332
 弁理士 山本 健策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F V I I I 由来ペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列 E D N I M V T F R N Q A S R からなる、ペプチド。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のペプチドを含む、複数のペプチドを含む組成物。

【請求項 3】

被験体において第 V I I I 因子インヒビター抗体の産生を抑制または阻止するのに使用するための組成物であって、請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 4】

インビボにおいて第 V I I I 因子インヒビター抗体の産生を抑制または阻止するための医薬品の製造における、請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 に記載の組成物の使用。

【請求項 5】

被験体において血友病を処置するための組成物であって、請求項 1 に記載のペプチドまたは請求項 2 に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 6】

前記被験体が血友病 A を有し、第 V I I I 因子置換療法を受けているか、受けようとしている、請求項 3 または 5 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記被験体が後天性血友病を有しているか、後天性血友病に罹患するリスクがある、請求

項 3 または 5 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記被験体が H L A - D R 2 陽性である、請求項 3 および 5 ~ 7 のいずれかに記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ペプチドに関する。特に、本発明は、少なくともそのコア配列が第 V I I I 因子 (F V I I I) から誘導可能であるペプチドに関する。これらのペプチドを用いること
10

【背景技術】

【0002】

血友病

血友病は、血友病 A、血友病 B (クリスマス病) 及びフォン・ビレブランド病を含む一群の遺伝性血液障害に属する。

【0003】

血友病では、必須凝固因子が部分的又は完全に欠乏しているために血液の凝固能が大幅に低下しており、その結果、出血時間が延長する。血友病 A は第 V I I I 凝固因子の欠乏
20

【0004】

血友病は、生涯続く遺伝性遺伝子疾患であり、キャリアである女性及びこの状態を遺伝で受け継ぐ男性を侵す。新規診断結果の約 3 分の 1 は家族既往歴のない場合である。この疾患は世界中でみられ、全ての人種集団で生じている。英国では約 6 , 0 0 0 人が血友病に罹患している。

【0005】

血友病患者は、傷害を受けた後、長時間出血する。切り傷、擦り傷などの外傷は通常は
30

【0006】

大きな問題となるのは、関節、筋肉及び軟組織内への内出血であり、これは自発的に起こり得る。脳内出血などの内出血は、管理が極めて困難であり、致命的となり得る。関節内に繰り返し出血が起こると、急性疼痛を生じ、関節炎及び / 又は身体障害をもたらす長期関節損傷の原因となり得る。

【0007】

血友病に対する処置は、通常、不足している凝固因子の補充によって行われている。軽症又は中等症の血友病では、出血が生じたときに注射が行われればよい (オンデマンド治療) 。しかしながら、重症血友病では、血液凝固を促進し、長期関節損傷が生じる可能性
40

【0008】

血友病 A に対する凝固因子置換療法の深刻な事態となる恐れのある合併症は、第 V I I I 因子の凝固促進機能を中和する抗体の形成である。第 V I I I 因子インヒビターは、重症の血友病 A を有する患者の約 2 5 % に生じる。先天性血友病 A 患者が遺伝的に F V I I I 欠乏性であり得ることから、インヒビターの合成は、出血のエピソードを予防又は処置するために投与された外来蛋白質に対する同種免疫反応である。

【0009】

C D 4 + T 細胞は、F V I I I に対する免疫反応において中心的な役割を果たしている
50

。F V I I I は、抗原提示細胞（A P C : a n t i g e n - p r e s e n t i n g c e l l ）に取り込まれた後、蛋白質分解によりペプチド断片に分解される（非特許文献 1）。その後、これらのペプチドは、M H C クラス I I 分子と結合して A P C の表面に提示される。次いで、この複合体は F V I I I に特異的な C D 4 + 細胞の T 細胞受容体によって認識される。適切な共刺激シグナルの存在下に、この認識により、最終的に、C D 4 + 細胞が B 細胞による抗体の合成を誘導する。

【 0 0 1 0 】

インヒビター形成の発生率は、最初は第 V I I I 因子の処置回数とともに増加するが、曝露日数が 5 0 日 ~ 1 0 0 日の後には頭打ちになるように思われる。インヒビターの形成は中等症又は軽症の血友病よりも重症の血友病においてはるかによく起こり、第 V I I I 因子軽鎖内のいくつかの分子欠損、最も明瞭には大きな欠失及びナンセンス突然変異がインヒビター形成の素因となるように思われる。補充因子の濃度、種類（精製か組換えか）などのパラメータ及び処置歴も抗体産生の可能性に影響を及ぼすと考えられる。

10

【 0 0 1 1 】

インヒビターを有する血友病患者の管理は継続的課題である。脱感作技術を用いた免疫寛容の誘導（I T I : i m m u n e t o l e r a n c e i n d u c t i o n ）は第 V I I I 因子に対する同種抗体を有する一部の患者において奏功している。この治療的アプローチは、因子置換療法を継続的に受けることを要し、従って長期にわたる方法である。

【 0 0 1 2 】

I T I は奏功しうるけれども、かなりの割合（約 3 0 % ）の患者が I T I に反応しない。インヒビター力価の高い患者は処置に対して極めて反応しにくい。別の重要な要因は、I T I 開始時の年齢であり、患者が 2 0 歳を超えている場合には奏成功率が大きく減少する（非特許文献 2）。

20

【 0 0 1 3 】

I T I 療法が奏功しない場合、インヒビターは一般に死ぬまでずっと存続し、また、このような患者は通常高反応者であるため、活性型プロトロンビン複合体濃縮製剤（F E I B A（商標））、および組換え活性型 F V I I などの F V I I I バイパス製剤で出血のエピソードを処置することが必要である。しかしながら、このような薬剤の使用は、播種性血管内凝固症候群、急性心筋梗塞、肺動脈塞栓及び血栓症などの有害事象を伴う（非特許文献 3）。

30

【 0 0 1 4 】

I T I に反応しない患者に対しては免疫抑制療法を用いることがある。処置には、非特異的に免疫系を標的にするシクロホスファミド、プレドニゾン、アザチオプリン、シクロスポリンなどの免疫抑制薬の投与が含まれる。こうした処置は全般的な免疫抑制に関連する副作用を示すことがある。

【 0 0 1 5 】

B 細胞 C D 2 0 抗原に対するヒト化モノクローナル抗体である R i t u x i m a b（商標）を用いる選択的 B 細胞枯渇化に新たな関心が集まっている。しかしながら、この薬物で処置した一部の子供において注入反応、血清病及び日和見感染が発生している（非特許文献 4）。

40

【 0 0 1 6 】

後天性血友病

後天性血友病は、百万人ごとに 1 乃至 4 人を侵す希な自己免疫状態である。この状態では、血友病を持って生まれたのではない被験体が第 V I I I 因子などの凝固因子類のうちの 1 種に対して抗体を作る。妊娠及び関節リウマチなどの自己免疫疾患並びに癌は後天性血友病を発症するリスクを増大させる可能性があると考えられている。凝固因子置換療法に反応して産生される F V I I I インヒビターと後天性血友病で産生されるこのインヒビターとは、そうした産生をもたらす根底にある免疫機構に違いはあるが、これらの臨床的な発現は類似している。

【 0 0 1 7 】

50

後天性血友病患者は、獲得インヒビターが重症の出血合併症と関連付けられることが理由の一つであるが、25%に迫る死亡率を示す。獲得自己抗体インヒビターの治療は、生命及び四肢を脅かすことが多い急性出血性合併症を制御又は予防し、副次的には自己抗体を根絶して正常な凝固を回復させる必要性に主として基づいたものである。

【0018】

低力価（＜5ベセスダ単位）の自己抗体インヒビターと関連付けられる出血は、FVII濃縮製剤を高用量で投与して効果的に処置することができる場合がある。ブタFVII濃縮製剤は、かつては後天性血友病関連の出血の重要な一次治療剤と考えられていた。何故なら、これは実験室で注入後FVII凝固活性レベルを実際に測定する機会を与える唯一の置換療法であったからである。この製品は、ブタパルボウイルスによるブタ血漿プールの汚染のために2004年に市場から撤去された。現在、「バイパス」剤が最もよく用いられているが、血栓形成の潜在的なリスクが存在し、各製品の有効性は約80%に過ぎない。バイパス剤又はFVII補充が適切な止血をもたらすことができるように一時的にインヒビターの力価を十分低下させるには血漿分離交換法による血漿交換及び体外免疫吸着が必要と考えられる。

10

【0019】

自己抗体インヒビターの根絶は、以下のような免疫抑制手段に依存している：（1）3乃至6週間で30%乃至50%の有効性を示す副腎皮質ステロイドの投与、（2）細胞毒性及び骨髓抑制化学療法剤、例えばシクロホスファミド、シクロスポリン、2-クロロデオキシアデノシンの使用、（3）免疫グロブリン静注による免疫調節及び（4）リツキシマブによる選択的Bリンパ球の枯渇化。Rituximab（商標）反応者はステロイドの同時使用を必要とすることがあり、再発しても再処置に反応することがある。

20

【0020】

従って、血友病Aの処置に伴う同種抗体産生及び後天性血友病における自己抗体産生を低下させる現在利用可能な全ての方法には欠点がある。このため、血友病A及び後天性血友病における抗FVII抗体的問題に対処する方法の改良が求められている。

【0021】

本発明者らは、患者をFVII由来ペプチドで予め寛容化することによってFVIIインヒビター抗体の形成を阻止することが可能であることを見出した。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0022】

【非特許文献1】Redingほか、Haemophilia（2006年）12（補遺6）30-36

【非特許文献2】Hayほか、Seminars in Thrombosis and Hemostasis（2005年）32：15-21

【非特許文献3】Acharya及びDiMichele、Best Practice & Research Clinical Haematology（2006年）19：51-66

【非特許文献4】DiMichele、J Thromb Haemost（2007年）5：143-50

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0023】

従って、本発明の第一の局面は、FVIIに対する寛容を誘導又は回復させることができ、その配列の少なくとも一部がFVIIから誘導可能であるペプチドに関する。

【0024】

第一の実施形態において、本発明は、以下のFVII由来配列：

【0025】

【化 1】

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

10

のうちの一つを含むペプチドであって、以下の改変：

- (i) 1つまたはそれより多くの疎水性アミノ酸（複数可）の除去；
- (i i) 1つまたはそれより多くの疎水性アミノ酸（複数可）を荷電した親水性アミノ酸（複数可）と置き換えること；および
- (i i i) 1つまたは両方の末端（複数可）での荷電したアミノ酸の挿入

のうちの一つ以上を有し、その改変ペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなく MHC クラス II 分子に結合し、第 V I I I 因子特異的 T 細胞により認識され得るペプチドを提供する。

20

【 0 0 2 6 】

「親」（非改変）ペプチドは、P R C L T R Y Y S S F V N M E または D N I M V T F R N Q A S R P Y であり得る。

【 0 0 2 7 】

第二の実施形態において、本発明は、配列

$X(aa)_n$ - コア配列 - $(aa)_m$

を含むペプチドであって、

ここで、X は、荷電した親水性残基であり；

aa は、アミノ酸であり；

30

n は、0 と 5 との間の整数であり；

m は、0 と 5 との間の整数であり；そして

上記「コア配列」は以下の F V I I I 由来ペプチドの群：

【 0 0 2 8 】

【化 2】

LYISQFIIM

FIIMYSLDG

IARYIRLHP

LIIFKNQAS

LTRYYSFV

MVTFRNQAS

LRIHPQSWV

40

から選択され、

そのペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなく MHC クラス II 分子に結合し、第 V I I I 因子特異的 T 細胞により認識され得るペプチドを提供する。

【 0 0 2 9 】

例えば、上記ペプチドは、配列

X D N I M V T F R N Q A S

を含み得る。

50

【 0 0 3 0 】

第三の実施形態において、本発明は、配列
 $Y(aa)_n$ - コア配列 - $(aa)_mZ$
を含むペプチドであって、
ここで、YおよびZは、反対の極性を有する荷電したアミノ酸であり；
aaは、アミノ酸であり；
nは、0と5との間の整数であり；
mは、0と5との間の整数であり；そして
上記「コア配列」は以下のFV I I I由来ペプチドの群：

【 0 0 3 1 】

【 化 3 】

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYSSSFV
MVTFRNQAS
LRIHPQSWV

から選択され、
そのペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなくMHCクラスII分子に結合し、第V I I I因子特異的T細胞により認識され得るペプチドを提供する。

【 0 0 3 2 】

例えば、上記ペプチドは、配列：
Y D N I M V T F R N Q A S Z
を含み得る。

【 0 0 3 3 】

第三の実施形態において、例えば、Yは、正に荷電したアミノ酸であり得、Zは、負に荷電したアミノ酸であり得る。あるいは、Yは、負に荷電したアミノ酸であり得、Zは、正に荷電したアミノ酸であり得る。

【 0 0 3 4 】

荷電した親水性アミノ酸は、例えば、D、E、K、H、またはRであり得る。正に荷電したアミノ酸は、例えば、K、H、またはRであり得る。負に荷電したアミノ酸は、例えば、DまたはEであり得る。

【 0 0 3 5 】

本発明の第一の局面のペプチドは、例えば、配列E D N I M V T F R N Q A S Rを含み得るか、または配列E D N I M V T F R N Q A S Rからなり得る。

【 0 0 3 6 】

第二の局面において、本発明は、本発明の第一の局面の1つまたはそれより多くのペプチド（複数可）を含む薬学的組成物のような組成物を提供する。上記組成物は、F V I I Iに対する寛容を誘導又は回復させることができる、F V I I Iから全体的または部分的に誘導可能な複数のペプチドを含み得る。

【 0 0 3 7 】

この組成物は、これら複数のペプチドが個別、引き続き（*subsequent*）、連続又は同時投与のために別々に提供されるキットの形態であり得る。

【 0 0 3 8 】

本発明のペプチド又は組成物は第V I I I因子インヒビター抗体の発生を抑制、低減又は阻止するのに用いることができる。

【 0 0 3 9 】

また、本発明は、第V I I I因子インヒビター抗体の発生を抑制、低減又は阻止するた

10

20

30

40

50

めの医薬品の製造におけるそのようなペプチド又は組成物の使用を提供する。

【0040】

また、本発明は、被験体において第ⅤⅠⅠⅠ因子インヒビター抗体の発生を抑制、低減又は阻止するための方法であって、この被験体にそのようなペプチド又は組成物を投与する工程を含む方法を提供する。

【0041】

この被験体はFⅤⅠⅠⅠ欠乏性であり得る。具体的には、この被験体は血友病Aを有していてもよく、第ⅤⅠⅠⅠ因子置換療法を受けているか、受けようとしていてもよい。

【0042】

あるいは、この被験体は、後天性血友病を有しているか、後天性血友病に罹患するリスクがあってもよい。

【0043】

第ⅤⅠⅠⅠ因子インヒビターは、HLA-DR2を発現している個体においてより高頻度に存在する。従って、本発明の方法により処置される被験体はHLA-DR2陽性であることができる。

本発明は、例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

以下のFⅤⅠⅠⅠ由来配列：

【化12】

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

20

30

のうちの一つを含むペプチドであって、以下の改変：

(i) 1つまたはそれより多くの疎水性アミノ酸(複数可)の除去；

(ii) 1つまたはそれより多くの疎水性アミノ酸(複数可)を荷電した親水性アミノ酸(複数可)と置き換えること；および

(iii) 1つまたは両方の末端(複数可)での荷電したアミノ酸の挿入

のうちの一つ以上を有し、改変された該ペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなくMHCクラスⅡ分子に結合し、第ⅤⅠⅠⅠ因子特異的T細胞により認識され得る、ペプチド。

40

(項目2)

配列

$X(aa)_n$ - コア配列 - $(aa)_m$

を含むペプチドであって、

ここで、Xは、荷電した親水性残基であり；

aaは、アミノ酸であり；

nは、0と5との間の整数であり；

mは、0と5との間の整数であり；そして

該「コア配列」は以下のFⅤⅠⅠⅠ由来ペプチドの群：

【化 1 3】

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYYSFV
MVTFRNQAS
LRIHPQSWV

10

から選択され、

該ペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなくMHCクラスII分子に結合し、第VII因子特異的T細胞により認識され得る、ペプチド。

(項目3)

配列：

XDNIMVTFRNQAS

を含む、項目1に記載のペプチド。

(項目4)

配列：

Y(aa)_n-コア配列-(aa)_mZ

20

を含むペプチドであって、

ここで、YおよびZは、反対の極性を有する荷電したアミノ酸であり；

aaは、アミノ酸であり；

nは、0と5との間の整数であり；

mは、0と5との間の整数であり；そして

該「コア配列」は以下のFVII由来ペプチドの群：

【化 1 4】

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYYSFV
MVTFRNQAS
LRIHPQSWV

30

から選択され、

該ペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなくMHCクラスII分子に結合し、第VII因子特異的T細胞により認識され得る、ペプチド。

(項目5)

40

配列：

YDNIMVTFRNQASZ

を含む、項目4に記載のペプチド。

(項目6)

Yが、正に荷電したアミノ酸であり、Zが、負に荷電したアミノ酸である、項目4または5に記載のペプチド。

(項目7)

Zが、KまたはRである、項目4、5、または6に記載のペプチド。

(項目8)

XまたはYが、DまたはEである、項目2～7のいずれかに記載のペプチド。

50

(項目 9)

配列 E D N I M V T F R N Q A S R を含む、前述の項目のいずれかに記載のペプチド。

(項目 1 0)

配列 E D N I M V T F R N Q A S R からなる、前述の項目のいずれかに記載のペプチド。

(項目 1 1)

前述の項目のいずれかに記載の 1 つまたはそれより多くのペプチド (複数可) を含む、複数のペプチドを含む組成物。

(項目 1 2)

インビボにおいて第 V I I I 因子インヒビター抗体の産生を抑制または阻止するのに使用するための項目 1 ~ 1 0 のいずれかに記載のペプチドまたは項目 1 1 に記載の組成物。

10

(項目 1 3)

インビボにおいて第 V I I I 因子インヒビター抗体の産生を抑制または阻止するための医薬品の製造における、項目 1 ~ 1 0 のいずれかに記載のペプチドまたは項目 1 1 に記載の組成物の使用。

(項目 1 4)

被験体において第 V I I I 因子インヒビター抗体の産生を抑制または阻止するための方法であって、該被験体に項目 1 ~ 1 0 のいずれかに記載のペプチドまたは項目 1 1 に記載の組成物を投与する工程を含む、方法。

(項目 1 5)

被験体において血友病を処置するための方法であって、該被験体に項目 1 ~ 1 0 のいずれかに記載のペプチドまたは項目 1 1 に記載の組成物を投与する工程を含む、方法。

20

(項目 1 6)

前記被験体が血友病 A を有し、第 V I I I 因子置換療法を受けているか、受けようとしている、項目 1 4 または 1 5 に記載の方法。

(項目 1 7)

前記被験体が後天性血友病を有しているか、後天性血友病に罹患するリスクがある、項目 1 4 または 1 5 に記載の方法。

(項目 1 8)

前記被験体が H L A - D R 2 である、項目 1 4 ~ 1 7 のいずれかに記載の方法。

【 図面の簡単な説明 】

30

【 0 0 4 4 】

【 図 1 - 1 】 図 1 a は、 r h F V I I I / C F A で初回刺激した F V I I I + D R 2 + マウス由来のリンパ節細胞 (L N C : l y m p h n o d e c e l l) のリコール反応 (r e c a l l r e s p o n c e) を示す。 F V I I I ペプチド 1 乃至 6 に対する L N C 増殖。 図 1 b は、 r h F V I I I / C F A で初回刺激した F V I I I + D R 2 + マウス由来のリンパ節細胞 (L N C : l y m p h n o d e c e l l) のリコール反応を示す。 F V I I I ペプチド 7 乃至 1 2 に対する L N C 増殖。

【 図 1 - 2 】 図 1 c は、 r h F V I I I / C F A で初回刺激した F V I I I + D R 2 + マウス由来のリンパ節細胞 (L N C : l y m p h n o d e c e l l) のリコール反応を示す。 F V I I I ペプチド 1、3 及び 1 1 に対する L N C 増殖。

40

【 図 2 】 図 2 a は、 F V I I I 由来ペプチドに特異的な F V I I I + D R 2 + T 細胞ハイブリドーマクローンの代表的な例を示す。 図 2 b は、 F V I I I 由来ペプチドに特異的な F V I I I + D R 2 + T 細胞ハイブリドーマクローンの代表的な例を示す。

【 図 3 - 1 】 図 3 a は、 r h F V I I I / C F A で初回刺激した F V I I I - D R 2 + マウス由来 L N C のリコール反応を示す。 図 3 b は、 r h F V I I I / C F A で初回刺激した F V I I I - D R 2 + マウス由来 L N C のリコール反応を示す。

【 図 3 - 2 】 図 3 c は、 r h F V I I I / C F A で初回刺激した F V I I I - D R 2 + マウス由来 L N C のリコール反応を示す。

【 図 4 - 1 】 図 4 は、 F V I I I 由来ペプチドに特異的な F V I I I - D R 2 + T 細胞ハイブリドーマクローンの代表的な例を示す。

50

【図4-2】図4は、F V I I I由来ペプチドに特異的なF V I I I - D R 2 + T細胞ハイブリドーマクローンの代表的な例を示す。

【図5】a) D N I M V及びb) P R C L Tに特異的なF V I I I - / - クローンを示す。

【図6】r h F V I I I / C F Aでの初回刺激の前にペプチドで3回 i . p . 処置したF V I I I + D R 2 + マウスのF V I I Iに対するL N Cのリコール反応を示す。

【図7-1】図7aは、F V I I I由来重複ペプチドに特異的なF V I I I - D R 2 + T細胞ハイブリドーマクローンをを用いた、アピトープとして機能可能なペプチドエピトープの範囲の決定を示す。元のアミノ酸を0と記す。N末端方向に1アミノ酸シフトを-1、N末端方向に2アミノ酸シフトを-2、などとする。C末端方向に1アミノ酸シフトを+1、などとする。図7bは、F V I I I由来重複ペプチドに特異的なF V I I I - D R 2 + T細胞ハイブリドーマクローンをを用いた、アピトープとして機能可能なペプチドエピトープの範囲の決定を示す。元のアミノ酸を0と記す。N末端方向に1アミノ酸シフトを-1、N末端方向に2アミノ酸シフトを-2、などとする。C末端方向に1アミノ酸シフトを+1、などとする。

10

【図7-2】図7cは、F V I I I由来重複ペプチドに特異的なF V I I I - D R 2 + T細胞ハイブリドーマクローンをを用いた、アピトープとして機能可能なペプチドエピトープの範囲の決定を示す。元のアミノ酸を0と記す。N末端方向に1アミノ酸シフトを-1、N末端方向に2アミノ酸シフトを-2、などとする。C末端方向に1アミノ酸シフトを+1、などとする。

20

【図7-3】図7cは、F V I I I由来重複ペプチドに特異的なF V I I I - D R 2 + T細胞ハイブリドーマクローンをを用いた、アピトープとして機能可能なペプチドエピトープの範囲の決定を示す。元のアミノ酸を0と記す。N末端方向に1アミノ酸シフトを-1、N末端方向に2アミノ酸シフトを-2、などとする。C末端方向に1アミノ酸シフトを+1、などとする。

【図7-4】図7cは、F V I I I由来重複ペプチドに特異的なF V I I I - D R 2 + T細胞ハイブリドーマクローンをを用いた、アピトープとして機能可能なペプチドエピトープの範囲の決定を示す。元のアミノ酸を0と記す。N末端方向に1アミノ酸シフトを-1、N末端方向に2アミノ酸シフトを-2、などとする。C末端方向に1アミノ酸シフトを+1、などとする。

30

【図8】F V I I I由来ペプチドP R C L T、D N I M V又はこれらの両者の混合物で処置したF V I I I - D R 2 + マウスにおけるF V I I Iに反応したリンパ節細胞のI F N - ガンマ産生を示す。

【図9】E D N I M V T F R N Q A S R (E D N I M V) または対照ペプチド (D N I M V) のいずれかで刺激されるナイーブマウスまたは寛容化 (t o l e r i s e d) マウスからの反応を示す。

【発明を実施するための形態】

【0045】

ペプチド

本発明はペプチドに関する。

40

【0046】

「ペプチド」という用語は、隣接するアミノ酸の - アミノ基とカルボキシル基との間で通常ペプチド結合により一方が他方に結合した一連の残基、通常、L - アミノ酸、を意味する通常の意味で用いている。この用語には改変ペプチド及び合成ペプチド類似体を含めている。

【0047】

本発明のペプチドは、化学的方法を用いて作製することができる (P e p t i d e C h e m i s t r y , A p r a c t i c a l T e x t b o o k . M i k o s B o d a n s k y , S p r i n g e r - V e r l a g 社 , B e r l i n) 。例えば、ペプチドは、固相技術 (R o b e r g e J Y ほか (1 9 9 5 年) S c i e n c e 2 6 9 : 2 0 2

50

- 204) で合成し、樹脂から切断し、調製的高速液体クロマトグラフィー (例えば、Creighton (1983年) Proteins Structures And Molecular Principles、WH Freeman and Co、New York、NY) によって精製することができる。自動合成は、例えば、ABI 431 A Peptide Synthesizer (Perkin Elmer社) を用い、メーカーから提供された使用説明書に従って達成することができる。

【0048】

あるいは、このペプチドは、組換え法によって、又は第VII因子からのペプチドの切断後の1つまたは両方の末端の改変によって作製することができる。ペプチドの組成はアミノ酸分析又は配列決定 (例えば、エドマン分解法) によって確認することができる。

10

【0049】

実際的には、このペプチドが示し得る種々の他の特性がある。例えば、このペプチドが治療上有用であるためにインビボで十分安定であることも重要である。このペプチドのインビボでの半減期は少なくとも10分、30分、4時間又は24時間とすることができる。

【0050】

また、このペプチドはインビボで良好な生物学的利用能を示すこともできる。このペプチドは、インビボにおいて、これが然るべき障害なしに細胞表面のMHC分子に結合することを可能にするコンフォメーションを維持することができる。

【0051】

20

コア残基

適応免疫反応では、Tリンパ球は蛋白質抗原の内部エピトープを認識することができる。抗原提示細胞 (APC) は蛋白質抗原を取り込み、これを短いペプチド断片に分解する。ペプチドは細胞内の主要組織適合性複合体 (MHC: major histocompatibility complex) クラスI又はII分子に結合して細胞表面に運ばれ得る。MHC分子との組合せで細胞表面に提示されると、このペプチドはT細胞によって (T細胞受容体 (TCR: T cell receptor) を介して) 認識され得、この場合、このペプチドはT細胞エピトープである。

【0052】

このように、エピトープとは、MHCクラスI又はII分子のペプチド結合溝に結合し、T細胞によって認識されることが可能である、抗原から誘導可能なペプチドである。

30

【0053】

最小エピトープとは、MHCクラスI又はII分子のペプチド結合溝に結合し、T細胞によって認識されることが可能である、エピトープから誘導可能な最短のペプチドである。所与の免疫原性領域において、全てが最小エピトープを含むが、それらの隣接領域が異なるエピトープとして機能する重複ペプチドの「入れ子セット」を生じることが通常可能である。

【0054】

同様に、切断ペプチドに対する反応を測定することによって特定のMHC分子: T細胞組合せの最小エピトープを同定することが可能である。例えば、重複ライブラリ内の1乃至15番目の残基を含むペプチドに対して反応が得られる場合、両端において切断されたセット (即ち、1乃至14、1乃至13、1乃至12など及び2乃至15、3乃至15、4乃至15など) を用いて最小エピトープを同定することができる。

40

【0055】

本発明は、以下のリスト:

【0056】

【化 4】

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYSSSFV
MVTFRNQAS
LRIHPQSWV

から選択される F V I I I の「コア残基」配列を含むペプチドを提供する。

10

【0057】

こうしたコア残基配列は、実施例に示されるように、各領域の最小エピトープを代表するかこれを含むように、HLA-DR2 結合アルゴリズムを用いて予測された。

【0058】

アピトープ

本発明者らはこれまでに、更なる抗原プロセッシングを受けることなく MHC クラス I 又は II 分子に結合して T 細胞に提示されるペプチドの能力とインビボで寛容を誘導するペプチドの能力との間に関連があることを決定した (WO 02 / 16410)。ペプチドは、更にプロセッシング (例えば、トリミング) されなければ長すぎて MHC 分子のペプチド結合溝に結合できないか、又は不適切なコンフォメーションで結合するのであれば、インビボで寛容原性とはならないであろう。他方、このペプチドが適切な大きさ及び立体構造であることによりそのまま MHC ペプチド結合溝に結合して T 細胞に提示されるのであれば、このペプチドは寛容誘導に有用であると予測することができる。

20

【0059】

従って、ペプチドがインビトロで更なる抗原プロセッシングを受けることなく MHC クラス I 又は II 分子に結合し、T 細胞に提示されうるかどうかを調べることによって、ペプチドの寛容原能力を調査することが可能である。

【0060】

本発明のペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなく MHC クラス I II 分子に結合し、第 V I I I 因子特異的 T 細胞からの反応を刺激することができる点において、アピトープ (抗原プロセッシング非依存性エピトープ) である。このようなアピトープは、WO 02 / 16410 に記載されているルールに基づいた方法に従って F V I I I に対する寛容をもたらすと予測することができる。

30

【0061】

本発明のペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなく MHC クラス I 又は II 分子に結合することができる任意の長さとしてすることができる。通常、本発明のペプチドは MHC クラス I II に結合することができる。

【0062】

MHC クラス I 分子に結合するペプチドは、普通 7 乃至 13、より普通には 8 乃至 10 アミノ酸長である。このペプチドの結合は、ペプチドの主鎖内の原子と全ての MHC クラス I 分子のペプチド結合溝内のインバリアント部位との接触によって両端で安定化されている。ペプチドのアミノ及びカルボキシ末端と結合する溝の両端にインバリアント部位がある。ペプチドの長さの変動については、ペプチド主鎖内の、多くの場合、必要な柔軟性を与えるプロリン又はグリシン残基におけるよじれによって説明される。

40

【0063】

MHC クラス I II 分子に結合するペプチドは、普通 8 乃至 20 アミノ酸長、より普通には 10 乃至 17 アミノ酸長であり、さらに長くする (例えば、最大 40 アミノ酸長) ことも可能である。こうしたペプチドは、(MHC クラス I ペプチド結合溝と異なって) 両端が開いている MHC クラス I II のペプチド結合溝に沿って伸長されたコンフォメーションで横たわる。このペプチドは、主に主鎖の原子をペプチド結合溝に沿って並ぶ保存残基と

50

接触させることによって所定の位置に保持される。

【 0 0 6 4 】

ペプチド配列

本発明の第一の実施形態は、以下の F V I I I 由来配列：

【 0 0 6 5 】

【 化 5 】

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHXY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

10

のうちの一つを含むペプチドであって、以下の改変：

(i) 1つまたはそれより多くの疎水性アミノ酸（複数可）の除去；

20

(i i) 1つまたはそれより多くの疎水性アミノ酸（複数可）を荷電した親水性アミノ酸（複数可）と置き換えること；および

(i i i) 1つまたは両方の末端（複数可）での荷電したアミノ酸の挿入

のうちの一つ以上を有し、その改変ペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなく M H C クラス I I 分子に結合し、第 V I I I 因子特異的 T 細胞により認識され得るものとするペプチドに関する。

【 0 0 6 6 】

標準のアミノ酸の列挙を、その側鎖の極性、電荷、および疎水性親水性指数（ h y d r o p h a t h y i n d e x ）とともに表 1 に示す。

【 0 0 6 7 】

30

表 1

【 0 0 6 8 】

【表 1】

アミノ酸	3-文字	1-文字	側鎖の極性	側鎖の電荷(pH 7)	疎水性親水性指数	
アラニン	Ala	A	非極性	中性	1.8	
アルギニン	Arg	R	極性	正	-4.5	
アスパラギン	Asn	N	極性	中性	-3.5	
アスパラギン酸	Asp	D	極性	負	-3.5	10
システイン	Cys	C	非極性	中性	2.5	
グルタミン酸	Glu	E	極性	負	-3.5	
グルタミン	Gln	Q	極性	中性	-3.5	
グリシン	Gly	G	非極性	中性	-0.4	
ヒスチジン	His	H	極性	正	-3.2	20
イソロイシン	Ile	I	非極性	中性	4.5	
ロイシン	Leu	L	非極性	中性	3.8	
リジン	Lys	K	極性	正	-3.9	
メチオニン	Met	M	非極性	中性	1.9	
フェニルアラニン	Phe	F	非極性	中性	2.8	30
プロリン	Pro	P	非極性	中性	-1.6	
セリン	Ser	S	極性	中性	-0.8	
トレオニン	Thr	T	極性	中性	-0.7	
トリプトファン	Trp	W	非極性	中性	-0.9	
チロシン	Tyr	Y	極性	中性	-1.3	40
バリン	Val	V	非極性	中性	4.2	

疎水性アミノ酸としては、G、C、M、A、P、I、L、V、ならびに芳香族アミノ酸 F および W が挙げられる。疎水性アミノ酸は、配列の末端または配列内から除去され得る。

【0069】

荷電した親水性アミノ酸としては、K、R、D、H、および E が挙げられる。疎水性アミノ酸は、配列の末端または配列内で荷電した親水性アミノ酸と交換され得る。

【0070】

1 つまたはそれより多くのアミノ酸（複数可）は、配列の N 末端で挿入され得る。有利 50

に、電荷双極子 (c h a r g e d i p o l e) を作り出すために、正に荷電したアミノ酸は、1つの末端において挿入または置換され得、負に荷電したアミノ酸は、もう1つの末端において挿入／置換され得る。

【 0 0 7 1 】

親配列の改変は、M H C 分子のペプチド結合溝に対するペプチドの結合、T細胞によって認識されるその能力、またはアピトープ (M H C 分子に結合し、更なる抗原プロセッシングを受けることなくT細胞に提示される) として働くその能力を、顕著には損なうべきではない。このことは、公知の抗原提示アッセイおよびT細胞ハイブリドーマを用いて容易に試験され得る。

【 0 0 7 2 】

10

本発明の第二の実施形態は、配列
 $X(aa)_n$ - コア配列 - $(aa)_m$
 を含むペプチドであって、
 ここで、Xは、荷電した親水性残基であり；
 aaは、アミノ酸であり；
 nは、0と5との間の整数であり；
 mは、0と5との間の整数であり；そして
 上記「コア配列」は以下のF V I I I 由来ペプチドの群：

【 0 0 7 3 】

【 化 6 】

20

LYISQFIIM
 FIIMYSLDG
 IARYIRLHP
 LIIFKNQAS
 LTRYYSFV
 MVTFRNQAS
 LRIHPQSWV

から選択され、
 そのペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなくM H C クラス I I 分子に結合し、第V I I I 因子特異的T細胞により認識され得るペプチドに関する。

30

【 0 0 7 4 】

配列 $(aa)_n$ または $(aa)_m$ は、4アミノ酸と5アミノ酸との間の任意の配列であり得る。例えば、上記ペプチドは、配列：

X D N I M V T F R N Q A S

を有し得、

その場合、 $n = 3$ および $m = 0$ である。

【 0 0 7 5 】

本発明の第三の実施形態は、配列
 $Y(aa)_n$ - コア配列 - $(aa)_m Z$
 を含むペプチドであって、
 ここで、YおよびZは、反対の極性を有する荷電したアミノ酸であり；
 aaは、アミノ酸であり；
 nは、0と5との間の整数であり；
 mは、0と5との間の整数であり；そして
 上記「コア配列」は以下のF V I I I 由来ペプチドの群：

40

【 0 0 7 6 】

【化 7】

LYISQFIIM
FIIMYSLDG
IARYIRLHP
LIIFKNQAS
LTRYYSFV
MVTFRNQAS
LRIHPQSWV

から選択され、

10

そのペプチドは、更なる抗原プロセッシングを受けることなく MHC クラス II 分子に結合し、第 VII 因子特異的 T 細胞により認識され得るペプチドに関する。

【0077】

例えば、ペプチド EDNIMVTFRNQASR について

$Y = E$;

$(aa)_n = DNI$

$m = 0$; および

$Z = R$

である。

【0078】

20

このペプチドは、得られるペプチドが更なる抗原プロセッシングを受けることなく MHC クラス II 分子に結合することができるという条件で、これらのコア残基配列を、N 及び / 又は C 末端での別の隣接配列 (それぞれ $(aa)_n$ および $(aa)_m$) と共に含むことができる。

【0079】

こうした N 及び / 又は C 末端の隣接配列はヒト FVII 中のコア残基配列の両端に隣接する配列から誘導可能なものとして行うことができる。

【0080】

APIPS

a) (CD28 に対する抗体の存在又は非存在下の) 固定 APC、

30

b) (CD28 に対する抗体の存在又は非存在下の) クラス I 又は II MHC 分子含有脂質膜及び

c) (CD28 に対する抗体の存在又は非存在下の) プレートに結合させた状態の精製天然又は組換え MHC

を含む種々の抗原プロセッシング非依存性提示系 (APIPS: antigen processing independent presentation system) が知られている。

【0081】

これらの系は全て抗原を MHC 分子との組合せで提示することができるが、抗原をプロセッシングすることはできない。これらの全ての系において、このプロセッシング機能は存在しないか、無効化されている。これによって、ペプチドが更なる抗原プロセッシングを受けることなく MHC クラス I 又は II 分子に結合して T 細胞に提示され得るかどうかを調べることが可能となる。

40

【0082】

T 細胞の反応を検討するための固定 APC の使用については、当該分野では、例えば、ポリペプチド内の最小エピトープを切断ペプチドに対する反応を測定することによって調べる研究 (Fairchild ほか (1996 年) Int. Immunol. 8: 1035 - 1043) において公知である。APC は、例えば、ホルムアルデヒド (通常、パラホルムアルデヒド) 又はグルタルアルデヒドを用いて固定することができる。

【0083】

50

脂質膜（平面膜でもリボソームでもよい）は、人工脂質を用いて調製することができ、又はA P Cからの細胞膜 / ミクロソーム画分であり得る。

【 0 0 8 4 】

使用に当たっては、A P I P Sを組織培養プレートのウェルに加える。次いで、ペプチド抗原を加え、A P I P SのM H C部分へのこのペプチドの結合を選択したT細胞株又はクローンの添加によって検出する。T細胞株又はクローンの活性化については、当該分野で公知の方法のいずれかによって、例えば、³H - チミジン取り込み又はサイトカイン分泌によって測定することができる。

【 0 0 8 5 】

第V I I I因子

本発明のペプチドのコア配列は、第V I I I因子から誘導可能である。1つまたは両方の隣接配列（（a a）_nおよび（a a）_m）もまた、第V I I I因子から誘導可能であり得る。

【 0 0 8 6 】

第V I I I因子は血液凝固の内因性経路に関与するが、第V I I I因子は、C a + 2及びリン脂質の存在下に第X因子を活性型X aに変換する第I X a因子の補因子である。

【 0 0 8 7 】

第V I I I因子遺伝子は、選択的スプライシングによる2種の転写産物を生じる。転写産物変異体1は、血漿中を循環し、フォンウィルブランド因子と結合して非共有結合複合体を形成する大きな糖蛋白質、イソ型a、をコードしている。この蛋白質は複数の切断事象を起こす。転写産物変異体2は、主として第V I I I c因子のリン脂質結合ドメインからなる推定小蛋白質（イソ型b）をコードしている。この結合ドメインは凝集活性に必須である。

【 0 0 8 8 】

ヒト第V I I I因子遺伝子の186,000塩基対の完全な配列は1980年代半ばに解明された（G i t s c h i e rほか（1984年）N a t u r e 312、326-330）。同時に、アミノ酸2,351個の完全な配列をコードしているDNAクローンを用いて培養哺乳動物細胞で生物学的に活性な第V I I I因子が作製された（W o o dほか（1984年）N a t u r e 312:330-337）。ヒト第V I I I因子のアミノ酸2,351個の完全な配列を配列番号1として示した。

【 0 0 8 9 】

本発明のペプチドのコア残基は、第V I I I因子から誘導可能である。必要に応じて、上記隣接配列（複数可）もまた、それらが天然のF V I I Iポリペプチドにおいて、コア配列に隣接する配列と同じ場合、第V I I I因子から誘導可能であり得る。この配列は、第V I I I因子の配列の切断から取得可能とすることができ、又は取得することができる。

【 0 0 9 0 】

溶解度

本発明の第一の実施形態のペプチドは、以下のペプチド：

【 0 0 9 1 】

【化 8】

GTLMVFFGNVDSSGI
TQTLHKFILLFAVFD
SLYISQFIIMYSLDG
PPIIARYIRLHPHY
PPLLTRYLRIHPQSW
MHTVNGYVNRSLPGL
LGQFLLFCHISSHQH
DTLLIIFKNQASRPY
PRCLTRYYSFVNME
TENIQRFLPNPAGVQ
DNIMVTFRNQASRPY
RYLRIHPQSWVHQIA

10

のうちの一つの改変された形態である。

【0092】

これらのペプチドは、アピトープとして働くことがすでに示されており、インビボで寛容原性である（実施例および国際特許出願第 P C T / G B 2 0 0 8 / 0 0 3 9 9 6 号を参照のこと）。

【0093】

ペプチドが媒介する寛容誘導において、溶解度が重要な考慮点であることは、それ以来 20 明らかになっている。溶解度は、以下：

- (i) 1 つまたはそれより多くの疎水性残基の除去；
- (i i) 1 つまたはそれより多くの親水性残基を添加するための添加 / 置換
- (i i i) 電荷双極子を作り出すために、いずれか任意の末端に正に荷電したアミノ酸および負に荷電したアミノ酸を置くこと

のうちの一つ以上によって改善され得る。

【0094】

改変ペプチドは、親（非改変）ペプチドよりも可溶性であり得る。上記改変ペプチドは、親ペプチドよりも 2 倍、3 倍、4 倍、または 5 倍大きい溶解度を有し得る。上記ペプチドは、0 . 5 m g / m l 、 1 m g / m l 、または 5 m g / m l までの濃度で可溶性であり 30 得る。

【0095】

寛容

T 細胞エピトープは、自己のものであれ外来性であれ任意の抗原に対する適応免疫反応において中心的な役割を果たしている。過敏性疾患（例えば、アレルギー、自己免疫疾患及び移植片拒絶反応）において T 細胞エピトープが果たしている中心的な役割については実験モデルを使用することによって明らかにされている。炎症性又はアレルギー性疾患は、（T 細胞エピトープの構造に基づいた）合成ペプチドをアジュバントとの併用で注射することにより誘導することが可能である。

【0096】

40

これに対して、特定の抗原に対する免疫寛容は、可溶性のペプチドエピトープを投与することによって誘導可能であることが分かっている。可溶性ペプチド抗原の投与は、実験的自己免疫性脳脊髄炎（E A E : e x p e r i m e n t a l a u t o i m m u n e e n c e p h a l o m y e l i t i s - 多発性硬化症（M S : m u l t i p l e s c l e r o s i s ）のモデル）（M e t z l e r 及び W r a i t h （ 1 9 9 3 年 ） I n t . I m m u n o l . 5 : 1 1 5 9 - 1 1 6 5 、 L i u 及び W r a i t h （ 1 9 9 5 年 ） I n t . I m m u n o l . 7 : 1 2 5 5 - 1 2 6 3 並びに A n d e r t o n 及び W r a i t h （ 1 9 9 8 年 ） E u r . J . I m m u n o l . 2 8 : 1 2 5 1 - 1 2 6 1 ）並びに関節炎、糖尿病及びブドウ膜網膜炎の実験モデル（上記の A n d e r t o n 及び W r a i t h （ 1 9 9 8 年 ）で概説されている）において疾患を抑制する効果的な手段であることが明らかに 50

されている。また、これはE A Eにおいて進行中の疾患を処置する手段となることが明らかにされている(上記のA n d e r t o n及びW r a i t h (1 9 9 8 年))。

【 0 0 9 7 】

寛容とは、抗原に対して反応しないことである。自己抗原に対する寛容は免疫系の本質的な特徴であり、これが失われると、自己免疫疾患が生じ得る。適応免疫系は、それ自身の組織内に含まれる自己抗原の自己免疫性攻撃を回避しつつ膨大な種類の感染性因子に対して反応する能力を維持しなければならない。これは、未熟なTリンパ球の胸腺におけるアポトーシス細胞死に対する感受性によってかなりの程度まで制御されている(中枢性寛容)。しかしながら、全ての自己抗原が胸腺において検出される訳ではないので、自己反応性胸腺細胞の死は不完全なままである。従って、末梢組織の成熟自己反応性Tリンパ球によって寛容が獲得されるメカニズムも存在する(末梢性寛容)。中枢性及び末梢性寛容のメカニズムについては、A n d e r t o nほか(1 9 9 9 年)(I m m u n o l o g i c a l R e v i e w s 1 6 9 : 1 2 3 - 1 3 7) に総説されている。

10

【 0 0 9 8 】

血友病Aでは、患者は第V I I I 因子の遺伝子に欠陥を有する。このことは、第V I I I 因子は免疫系によって「自己」抗原として認識されないことを意味している。従って、凝固因子置換療法時に第V I I I 因子を投与すると、この外来タンパク質に対する同種免疫反応が生じ、F V I I I インヒビター抗体の産生を招く。

【 0 0 9 9 】

本発明のペプチドは、F V I I I を治療的に投与する場合にこれが免疫反応を誘導せず、F V I I I インヒビターが生じないように、第V I I I 因子に対する寛容を誘導することができる。

20

【 0 1 0 0 】

後天性血友病は、第V I I I 因子に対する寛容が機能しなくなっている自己免疫疾患である。この場合、本発明のペプチドを投与することによりこの自己蛋白質に対する寛容を回復させ、病因となる免疫反応を抑えることができる。

【 0 1 0 1 】

寛容は、C D 4 + T細胞の少なくとも一部においてアネルギーが誘導されることから生じ、又はこれを特徴とすることができる。T細胞を活性化するためには、ペプチドはT細胞に2つのシグナルを送達することができる「プロフェッショナル」A P Cと結合する必要がある。第一のシグナル(シグナル1)は、A P Cの細胞表面のM H C - ペプチド複合体によって送達され、T C Rを介してT細胞に受け取られる。第二のシグナル(シグナル2)は、C D 8 0、C D 8 6などの、A P Cの表面の共刺激分子によって送達され、T細胞の表面のC D 2 8によって受け取られる。T細胞は、シグナル2の無い状態でシグナル1を受け取ると、活性化されないばかりか、アネルギーの状態になると考えられている。アネルギーのT細胞は、その後の抗原投与に対して不応性であり、他の免疫反応を抑制できる場合がある。アネルギーのT細胞はT細胞寛容の媒介に関与していると考えられている。

30

【 0 1 0 2 】

理論にとらわれることを望まないが、M H C分子と共に提示される前にプロセッシングを必要としているペプチドは、成熟した抗原提示細胞により処理される必要があるので寛容を誘導しないと、本発明者らは予測する。(マクロファージ、B細胞及び樹状細胞などの)成熟抗原提示細胞は抗原をプロセッシングすることができるが、シグナル1及び2の両方をT細胞に送達することもでき、その結果、T細胞の活性化がもたらされる。他方、アピトープは未熟A P CのクラスI I M H Cに結合することができると考えられる。従って、これは共刺激なしにT細胞に提示され、その結果、T細胞のアネルギー及び寛容がもたらされると考えられる。

40

【 0 1 0 3 】

勿論、アピトープは成熟A P Cの細胞表面においてM H C分子に結合することもできる。しかしながら、免疫系は成熟A P Cよりも未熟A P Cをより豊富に含んでいる(樹状細胞

50

胞の10%未満が活性化されると示唆されている、Summersほか(2001年)Am. J. Pathol. 159:285-295)。従って、アピトープに対する初期状態(default position)は、活性化ではなくアネルギー/寛容である。

【0104】

F V I I I に対する寛容の誘導は、当該分野で周知の技術によって

(i) F V I I I 阻害性抗体、

(ii) F V I I I に特異的なC D 4 + T細胞

(iii) F V I I I 阻害性抗体を分泌することができるB細胞

のレベルの低下を探索することによってインビボでモニターすることができる。

【0105】

ペプチド投与によって寛容が誘導されると、抗原特異的C D 4 + T細胞の増殖能が低下することが分かっている。また、この細胞によるI L - 2、I F N - 及びI L - 4の産生は下方制御されるが、I L - 10の産生は増加する。ペプチドにより寛容が誘導された状態のマウスにおいてI L - 10を中和すると、疾患への罹患性が完全に元に戻ることが分かっている。寛容状態では、I L - 10を産生し、免疫調節を媒介する制御性細胞集団が存続することが提唱されている(Burkhardtほか(1999年)Int. Immunol. 11:1625-1634)。

【0106】

従って、寛容の誘導は、

(a) C D 4 + T細胞におけるアネルギーの誘導(これはその後のインビトロでのF V I I I 投与によって検出することができる)

(b) (i) 増殖の低下、

(ii) I L - 2、I F N - 及びI L - 4産生の下方制御、及び

(iii) I L - 10の産生増加

を含むC D 4 + T細胞集団の変化

を含む種々の方法によってモニターすることもできる。

【0107】

本明細書に用いている「寛容原性の」という用語は寛容を誘導することができることを意味している。

【0108】

組成物

また、本発明は、本発明による1つまたはそれより多くのペプチド(複数可)を含む薬学的組成物などの組成物に関する。

【0109】

このペプチドは、複数のペプチド、例えば、2種、3種、4種、5種又は6種のペプチドを含むことができる。

【0110】

本発明の組成物は予防用又は治療用とすることができる。

【0111】

この組成物は、予防用に投与する場合、F V I I I に対する免疫反応の発生を低減又は阻止することができる。免疫反応のレベルは、この組成物で処置しなかった場合に患者で得られたであろうレベルより低い。「低減する」という用語は、この組成物で処置しなかった場合に患者で観察されたであろう反応に対して(又は同じ時間枠にわたって未処置の患者で観察された反応に対して)50%、70%、80%又は90%低減などの免疫反応の部分的な低減が観察されることを意味している。「阻止する」という用語は、F V I I I に対する測定可能な免疫反応が認められないことを意味している。

【0112】

治療用に投与する場合、この組成物は、F V I I I に対して既に進行中の免疫反応を抑制することができる。「抑制する」という用語は、ペプチド処置の前のレベル又は処置がなされなかった場合に同時点で観察されたであろうレベルと比較した場合の進行中の免疫

10

20

30

40

50

反応のレベルの低下を意味する。

【0113】

本発明の組成物で処置することにより

(i) F V I I I 阻害性抗体、

(ii) F V I I I に特異的な C D 4 + T 細胞

(iii) F V I I I 阻害性抗体を分泌する B 細胞

のうちのいずれか又は全てのレベルの低下をもたらすことができる。

【0114】

これらの因子全ての検出は、E L I S A、F A C S などの、当該分野で公知の技術によって実施することができる。

【0115】

本発明の組成物で処置することにより、F V I I I に特異的な C D 4 + T 細胞においてアネルギーを追加的に又は代わりに、もたらすことができる。アネルギーは、例えばその後インビトロで F V I I I を投与することにより検出することができる。

【0116】

F V I I I に対する全ての免疫反応が病因となる訳ではないことを念頭に置いておくことは重要である。インヒビターを有しない血友病患者 (M o r e a u ほか (2000年) B l o o d 95 : p . 3435 - 41) 及び健康な献血者の約 15 % (A l g i m a n ほか (1992年) 89 : p . 3795 - 9) において非阻害性抗 F V I I I 抗体を見出すこともある。

【0117】

F V I I I インヒビターは、正常血漿中の F V I I I に対する患者の血漿の不活化能を試験するベセズダ凝固アッセイの N i j m e g e n の変法によって検出することができる。ベセズダ単位は、血漿 F V I I I 活性の 50 % を中和する抗体の量と定義され、0 . 6 B U 以上の力価は抗体の存在を示唆する。

【0118】

インヒビターは、一般に、そのレベルが < 5 B U であれば低力価に、5 B U であれば高力価に分類される。

【0119】

循環 F V I I I 阻害性抗体のレベルは、患者が処置を受けなかった場合に観察されたとあろう抗体レベルの 90 %、75 %、50 %、20 %、10 %、5 % にまで低下させることができる。

【0120】

循環 F V I I I 阻害性抗体のレベルは、5 B U、4 B U、3 B U、2 B U、1 B U 又は 0 . 5 B U にまで低下させることができる。

【0121】

本発明のペプチド及び組成物は、患者における凝固を助けるのに使用することができる治療的に投与される F V I I I の量及び割合を増大させることができる。これは、ある割合の F V I I I をその治療的作用を発揮することから効果的に排除することができる F V I I I インヒビターが低減するためである。本発明のペプチド又は組成物は、利用可能な F V I I I の量を、例えば、10 %、25 %、50 %、75 % 又は 100 % 増加させることができる。

【0122】

従って、本発明のペプチド及び組成物は、患者における凝固を助けるために投与する必要のある F V I I I の量を低減させることができる。

【0123】

製剤化

この組成物は溶液又は懸濁液のいずれかの注射剤として調製することができ、注射に先立って液体中の溶液または懸濁液に適した固体形態を調製することもできる。この調製物は乳化してもよく、ペプチドはリポソームに封入することができる。有効成分は、医薬用

10

20

30

40

50

として許容可能であり、この有効成分と適合性の賦形剤と混合することができる。好適な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水（例えば、リン酸緩衝生理食塩水）、デキストロース、グリセロール、エタノールなど及びこれらの組合せである。

【0124】

さらに、必要に応じて、この組成物は、湿潤剤又は乳化剤及び/又はpH緩衝剤などの補助物質を少量含有することができる。緩衝塩としては、リン酸塩、クエン酸塩、酢酸塩が挙げられる。塩酸及び/又は水酸化ナトリウムをpH調整に用いることができる。安定化にはスクロース、トレハロースなどの二糖類を用いることができる。

【0125】

この組成物が複数のペプチドを含む場合、これらのペプチドの相対比率はほぼ等しいものとすることができる。或いは、例えば、特定のサブセットの自己反応性T細胞に寛容原性反応を集中させるために、又はあるペプチドがその他のペプチドよりも特定のHLA型において効果的に作用することが分かっている場合に、各ペプチドの相対比率を変更することができる。

10

【0126】

製剤化後に、この組成物を滅菌容器に入れ、これを密封して低温、例えば4℃で保存することができ、又はこの組成物を凍結乾燥することができる。

【0127】

この組成物は凍結乾燥（フリーズドライの）粉末として調製するのが好都合である。凍結乾燥によって安定化状態での長期保存が可能となる。凍結乾燥の手順については当該分野で週知であり、例えば、<http://www.device-link.com/ivdt/archive/97/01/006.html>を参照されたい。凍結乾燥に先だって、一般に、マンニトール、デキストラン、グリシンなどの増量剤が用いられる。

20

【0128】

この組成物は、経口、静脈内（水溶性の場合）、筋肉内、皮下、舌下、鼻腔内、皮内もしくは坐剤による経路又は埋め込み（例えば、持続放出分子を使用）などの都合のよい様式で投与することができる。

【0129】

この組成物は、鼻腔内、皮下又は皮内経路によって有利に投与すればよい。

【0130】

本発明のペプチド及び組成物はヒト被験体を処置するのに用いることができる。この被験体は、血友病A、特に重症の血友病Aを有し得る。この被験体は遺伝的にFVIIを欠損し得る。この被験体は後天性血友病を有し得る。この被験体は阻害性抗FVII抗体を有し得る。

30

【0131】

この被験体はFVIIによる凝固剤置換療法を受けているか、受けようとしていてもよい。

【0132】

この被験体はFVII遺伝子による遺伝子療法を受けているか、受けようとしていてもよい。

40

【0133】

この被験体は、阻害性抗FVII同種抗体又は自己抗体を生じやすい素因と関連付けられるHLAハプロタイプとすることができる。この被験体は、HLA-DQ2を発現することができる。個体のHLAハプロタイプを決定するための方法は当該分野では公知である。

【0134】

通常、医師は個々の被験体に最も適している実際の投与量を決定することになり、これは特定の患者の年齢、体重及び反応によって様々に異なる。

【0135】

好ましい実施形態では、複数の用量を濃度を段階的に上げて患者に投与する「用量漸増

50

」プロトコルに従うことができる。このような手法は、例えば、ハチ毒アレルギーに対する免疫療法用途におけるホスホリパーゼA2ペプチドに関して用いられている(Muellerほか(1998年)J. Allergy Clin Immunol. 101: p. 747-754及びAkdisほか(1998年)J. Clin. Invest. 102: p. 98-106)。

【0136】

キット

好都合なことに、組成物が複数のペプチドを含む場合、これらを混合組成物又はカクテルの形態と一緒に投与することができる。しかしながら、同時投与、個別投与、連続投与又は併用投与のために、これらのペプチドをキットの形態で別々に提供することが好ましい状況がある場合がある。

10

【0137】

また、このキットは混合及び/又は投与手段(例えば、鼻腔内投与用気化器又は皮下/皮内投与用注射器及び注射針)を含むこともできる。また、このキットは使用説明書を含むこともできる。

【0138】

本発明の薬学的組成物又はキットは疾患を処置及び/又は予防するために用いることができる。

【0139】

特に、この組成物/キットは血友病A又は後天性血友病を処置及び/又は予防するために用いることができる。

20

【0140】

血友病A

血友病A(古典的血友病)は第VIII因子の欠損に起因する。

【0141】

血友病Aの推定発症率は男性では10,000人当たり1人であり、一方、血友病Bは男性では40,000人当たり1人の率で発症すると推定される。女性では5,000人当たり約1人が血友病Aの保因者であり、20,000人当たり1人が血友病Bの保因者である。

【0142】

血友病は、通常、血中の凝固因子のレベルに基づいて3種類、即ち、重症、中等症及び軽症に分類される。重症血友病では、凝固因子は正常値の1%未満である。重症度は何世代にもわたって一貫している傾向がある。

30

【0143】

一般に信じられているのとは反対に、小さな傷口及び創傷は血友病患者には通常は脅威ではない。むしろ、最大の危険は関節及び筋肉内に生じることがある突発性出血によってもたらされる。これは、成長の急な年齢期、通常5乃至15歳に最も生じやすい。

【0144】

関節において特発性出血を繰り返すと、関節炎を生じる恐れがあり、周囲の筋肉が弱くなる。血液の蓄積によって神経への圧迫が生じると、痛み、しびれ及び患部の一時的動作不能が起こる。

40

【0145】

血友病Aは、通常、凝固の有効性を測定し、凝固因子のレベルが異常かどうかを調べる血液テストを用いて診断される。

【0146】

献血された血液から単離された精製凝固因子が1970年代に開発されたことにより血友病患者の長期予後が著しく改善された。軽症乃至中等症の血友病患者はFVIIIによる処置を臨時的に利用するのに対して、重症の血友病患者は定期的で無期限の処置を必要とすると考えられる。

【0147】

50

従来、患者は何千もの血漿献血からプールされた第ⅤⅠⅠⅠ因子濃縮物を投与されていた。このため、ウイルス性の病原体、特にヒト免疫不全ウイルス及び肝炎ウイルスによる汚染という深刻な問題がもたらされた。モノクローナル抗体による精製技術、熱不活化及び殺ウイルス性界面活性剤処置によって血漿由来濃縮物は比較的安全になっている。

【0148】

今や、組換えDNA技術によってRecombinate(商標)、Kogenate(商標)などの一連の合成製品が供給されている。Kogenateは、ヒト第ⅤⅠⅠⅠ因子を発現する新生仔ハムスター腎細胞を用いて作製されている。得られた因子は高度に精製され、血漿からのウイルス感染のあらゆる可能性が排除されている。

【0149】

本発明のペプチド又は組成物は第ⅤⅠⅠⅠ因子置換療法の施行前及び/又は施行中に投与することができる。

【0150】

血友病Aは遺伝子治療の理想的な疾患標的である。何故なら、i)これが特定の単一遺伝子の突然変異に起因しており、ii)インビボで凝固因子レベルを僅かに上昇させることにより重症の血友病をより軽症のものに変えることができ、iii)現行の置換療法が最適以下と考えられているからである。また、凝固活性の所望レベルを超過しても安全性の範囲は広い。

【0151】

残念なことに、現在に至るまで血友病の治療法としての遺伝子療法の将来性は実現されていない。その主な理由は、凝固因子の長期発現を可能にするのに十分非免疫原性である遺伝子送達系を見出すのが困難であることにある。

【0152】

本発明のペプチドは、第ⅤⅠⅠⅠ因子による遺伝子療法に先立って被験体を寛容化し、及び/又は遺伝子療法後の患者におけるFⅤⅠⅠⅠインヒビターの形成を管理するのにも適していると考えられる。

【0153】

後天性血友病

後天性血友病は、以前に凝固が正常であった個体におけるFⅤⅠⅠⅠに対する自己抗体インヒビターの存在を特徴とする。これは、年間の推定発症率が百万人当たり1乃至3人の希な状態である。獲得自己抗体インヒビターと関連付けられる死亡率は、同種抗体を有する個体における死亡リスクが実質的により低いのに対して25%に達する。

【0154】

同種抗体インヒビターを有する患者と比較して、後天性血友病は、(1)より重篤な出血パターン、(2)高齢集団における発症率の上昇、(3)約50%の症例における、根底にある特定可能な自己免疫疾患、リンパ球増殖性又は固形腫瘍悪性疾患、妊娠及びペニシリン、スルホンアミドなどの特定の抗生物質の使用に関連した発生、並びに(4)通常、患者血漿において2%乃至18%の範囲の残存第ⅤⅠⅠⅠ因子レベルをもたらす、その自己抗体による標的化凝固因子活性の不完全な中和を示すⅠⅠ型薬物動態パターンをたどるインビトロインヒビター活性、を特徴とする。

【0155】

本発明のペプチド又は組成物は、後天性血友病を有する患者に対して、又は、例えば、i)例えば、ペニシリンもしくはスルホンアミドによる処置が迫っていること、ii)腫瘍もしくは他の悪性疾患が進行していること、iii)妊娠が間近もしくはその早期であることのために後天性血友病を発症するリスクがあると考えられる患者に対して、投与することができる。

【0156】

次に、実施例により本発明をさらに説明するが、これらの実施例は、本発明の実施に当たり当業者の便をはかるのに役立つものであり、本発明の範囲を何ら限定するものではな

10

20

30

40

50

い。

【実施例】

【0157】

実施例 1

H L A - D R 2 第 V I I I 因子ペプチドの選択

一連の F D V I I I 15 マーペプチドを以下の 3 種の H L A - D R 結合アルゴリズムを用いて比較した：

S Y F P E I T H I (<http://www.syfpeithi.de/home.htm>)

P r o P r e d (<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>) 及び

及び I E D B (<http://www.immuneepitope.org/home.do>) 。

【0158】

これらのプログラムのうちの 2 種以上によって H L A - D R 2 結合であると予測されるペプチドを選択し、その予測されたコア残基群の隣接配列を設計した (表 2) 。

【0159】

表 2

【0160】

【表 2】

ペプチド 番号	FVIII 第一 AA	単一アミノ酸コードによる配列	本明細書における別称:
1	2140	GTLMVFFGNVDSSGI	GTLMV
2	0208	TQTLHKFILLFAVFD	TQTLH
3	2114	SLYISQFIIMYSLDG	SLYIS
4	2161	PPIIARYIRLHPHXY	PPIIA
5	2318	PPLLTRYLRHPQSW	PPLLT
6	250	MHTVNGYVNRSLPGL	MHTVN
7	322	LGQFLLFCHISSHQH	LGQFL
8	478	DTLLIIFKNQASRPY	DTLLI
9	545	PRCLTRYSSFVNME	PRCLT
10	607	TENIQRFLPNPAGVQ	TENIQ
11	1788	DNIMVTFRNQASRPY	DNIMV
12	2322	RYLRIHPQSWVHQIA	RYLRI

実施例 2

第 V I I I 因子免疫化マウスからの H L A - D R 2 拘束性細胞のペプチドに対する反応の調査

H L A - D R 2 トランスジェニックマウスをアジュバント中のヒト第 V I I I 因子で免疫化した。流入領域リンパ節細胞を採集し、表 2 からの 12 種のペプチドを種々の濃度で用いてインビトロで再刺激した。その結果を図 1 に示した。

【0161】

第 V I I I 因子免疫化マウスからの H L A - D R 2 拘束性細胞は明らかにペプチド D N I M V (第 1 アミノ酸 1788) に対して強く反応する。ペプチド P R C L T (545) 及び P P I I A (2161) に対する反応も見られる。

【0162】

実施例 3

H L A - D R 2 マウスからの T 細胞のペプチドに対する反応の調査

先ず、H L A - D R 2 マウスをアジュバント中の第 V I I I 因子で免疫化した。免疫マウスからの脾細胞を第 V I I I 因子によりインビトロで再刺激し、得られたリンパ芽球をポリエチレングリコールを用いて B W 5 1 4 7 胸腺腫と融合させた。

【 0 1 6 3 】

T 細胞ハイブリドーマを H A T 培地で選択し、こうしたハイブリドーマをクローニングして第 V I I I 因子に対する反応について調べた。次いで、これらのハイブリドーマを上記 1 2 種の予測ペプチドに対する反応についてスクリーニングした。スクリーニングした 2 7 種のハイブリドーマのうち、1 1 種が D N I M V に、3 種が P R C L T に、3 種が P P I I A に反応したが、P P I I A に対する反応はより弱く、特異性が低かった。D N I M V 及び P R C L T に特異的な 2 種のハイブリドーマの反応を図 2 に示した。

10

【 0 1 6 4 】

実施例 4

F V I I I - D R 2 + マウスからのリンパ節細胞のペプチドに対する反応の調査

H L A - D R 2 トランスジェニックマウスを第 V I I I 因子欠損マウスと交配させてヒト H L A クラス I I M H C 分子を発現する血友病のモデルを作製した。

【 0 1 6 5 】

これらの F V I I I - D R 2 + 動物をアジュバント中の第 V I I I 因子で免疫化した。流入領域リンパ節を単離し、上記ペプチドパネルに対する反応を調べた。図 3 に示したように、こうした細胞は P R C L T 及び D N I M V によく反応した。G T L M V に対する反応は弱かったが、R Y L R I に対する反応は顕著だった。

20

【 0 1 6 6 】

実施例 5

H L A - D R 2 マウスからの T 細胞のペプチドに対する反応の調査

H L A - D R 2 を発現する第 V I I I 因子欠損マウスをアジュバント中の第 V I I I 因子で免疫化した。この免疫化マウスからの脾細胞を第 V I I I 因子によりインビトロで再刺激し、得られたリンパ芽球を上述のようにして B W 5 1 4 7 と融合させた。T 細胞ハイブリドーマを上記 1 2 種の予測ペプチドに対する反応についてスクリーニングした。さらにこの場合も、ハイブリドーマの大部分はペプチド D N I M V 及び P R C L T に反応した。第 V I I I 因子に特異的な 1 9 種のハイブリドーマのうち、1 0 種が D N I M V に、6 種が P R C L T に、1 種が P P I I A に、1 種が S L Y I S に、1 種が D T L L I に反応した。これらのハイブリドーマによる反応の例を図 4 に示した。

30

【 0 1 6 7 】

これらの実験から、2 種のペプチド D N I M V (第 1 アミノ酸 1 7 8 8 番目) 及び P R C L T (第 1 アミノ酸 5 4 5) がヒト第 V I I I 因子に対する H L A - D R 2 拘束性 T 細胞の反応において免疫優性 T 細胞エピトープを構成することは明らかである。

【 0 1 6 8 】

実施例 6

D N I M V 及び P R C L T はアピトープとして挙動する

アピトープであるためには、ペプチドは更なる抗原プロセッシング (即ち、トリミング) を受けることなく M H C クラス I 又は I I 分子に結合することができ、T 細胞に提示されなければならない。この例では、固定 A P C により提示されるペプチドの能力を調査した。

40

【 0 1 6 9 】

M g a r 細胞は新鮮なもの又は 1 % パラホルムアルデヒドで固定したものとした。2 0 μ g / m l の r h F V I I I 又はペプチドエピトープの存在又は非存在下に 1 0 0 μ l のハイブリドーマ細胞を 5 \times 1 0 ⁴ 個の M g a r 細胞と共に一夜培養することによってクローンの抗原特異性を調べた。次いで、上清を採集し、E L I S A により I L - 2 産生について評価した。r h F V I I I が生きた M g a r 細胞によって提示されなければならないという事実は、完全な状態の蛋白質が提示されるには抗原プロセッシングを受ける必要があ

50

ることを示している。他方、ペプチド D N I M V 及び P R C L T は生及び固定 M g a r 細胞のいずれによっても提示され、このことはこれらのペプチドがアピトープとして機能することを示している（図 5）。

【 0 1 7 0 】

実施例 7

アピトープとして機能することができるペプチドエピトープの範囲の決定

重複ペプチドのパネル（本明細書の原文の 3 6 乃至 3 7 ページに示した）を調製し、実施例 5 と同様の方法により T 細胞ハイブリドーマを用いてこれらをスクリーニングすることによって、D N I M V、P R C L T 及びその他のペプチドを取り囲む配列内のアピトープとして機能することができるペプチドエピトープの範囲を特定した（図 7）。

10

【 0 1 7 1 】

実施例 8

D N I M V 及び P R C L T は第 V I I I 因子蛋白質全体に対する寛容を誘導する

H L A - D R 2 トランスジェニックマウスをアジュバント中の第 V I I I 因子による免疫化に先だってこれら 2 種の可溶性ペプチドのいずれか又は対照としての P B S で処置した。流入領域リンパ節を単離し、マウスの免疫状態を評価するために細胞を第 V I I I 因子蛋白質によりインビトロで再刺激した。図 6 に示したように、D N I M V 又は P R C L T のいずれかでマウスを処置すると、第 V I I I 因子に対する免疫反応の実質的な抑制がもたらされた。

20

【 0 1 7 2 】

実施例 9

D N I M V 及び P R C L T が第 V I I I 因子ノックアウトマウスにおいて寛容を誘導することができるかどうかについての調査

実施例 8 から、これらの 2 種のペプチドが内因性第 V I I I 因子を発現するマウスにおいて第 V I I I 因子に対する免疫反応を阻止することができることが分かった。F V I I I - D R 2 + 動物でこの実験を繰り返すことによりこれらのペプチドが第 V I I I 因子欠損マウスにおける第 V I I I 因子に対する免疫反応をも阻止するかどうかを明らかにした。

【 0 1 7 3 】

実施例 1 0

D N I M V 及び P R C L T の併用が第 V I I I 因子ノックアウトマウスにおいて寛容を誘導することができるかどうかについての調査

実施例 9 において第 V I I I 因子欠損マウスにおける第 V I I I 因子に対する免疫反応を単独で低下させることが示された 2 種のペプチドを併用した。図 8 に示したように、D N I M V 及び P R C L T の両方でマウスを処置すると、I F N - ガンマ産生の減少によって示されるように、第 V I I I 因子に対する免疫反応の実質的な抑制がもたらされた。I F N - ガンマは、マウスにおいて抗体を中和するのに必要とされる主要なクラススイッチリンホカインである。示された効果はいずれかのペプチドを単独で用いて観察される効果よりも大きかった。

30

【 0 1 7 4 】

実施例 1 1

改変ペプチドを用いた寛容の誘導

ペプチド D N I M V は、部分的に可溶性であるが、完全に可溶性ではない。上記ペプチドの溶解度を改善するために、改変バージョンを以下の配列：E D N I M V T F R N Q A S R で設計した。

40

【 0 1 7 5 】

これは、荷電した親水性残基を添加するために N 末端において伸長されている。また、C 末端において、プロリン残基およびチロシン残基を除去するために切断されている。さらに、正に荷電したアミノ酸および負に荷電したアミノ酸を上記ペプチドのいずれかの末端に置くことによって、溶解度を増大させると報告される荷電双極子を作り出す。

50

【 0 1 7 6 】

その改変ペプチドは、D N I M Vよりも可溶性であり、鼻腔内ペプチド送達を可能にするのに十分に可溶性である。このペプチドエピトープを用いて寛容の誘導を評価するために、F V I I I 欠損マウスを取得し、改変E D N I M Vペプチド（図9における「寛容化」と呼ぶ）でマウスの半数を処置した。上記マウスを次に、C F A中のD N I M Vで免疫化し、10日後、流入領域リンパ節を回収し、D N I M VまたはE D N I M Vのいずれかでインビトロで刺激した。図9は、インビトロでD N I M VまたはE D N I M Vのいずれかで刺激したナイーブマウスまたは寛容化マウスからの反応についての結果を示す。

【 0 1 7 7 】

結果は、E D N I M Vが、D N I M Vで免疫化したマウスからの免疫反応をリコールすることが可能であることを実証する。さらに、これらは、E D N I M Vで寛容化したマウスが、C F A中のD N I M Vで初回刺激の後、インビトロでD N I M VまたはE D N I M Vのいずれに対する反応の不足によって明らかにされるように、インビボでD N I M Vに対する免疫反応を樹立（mount）できないことを非常に明らかに実証する。

【 0 1 7 8 】

実施例 1 2

E D N I M Vは第V I I I 因子蛋白質全体に対する寛容を誘導する

図8に記載される実験を改変ペプチドE D N I M Vについて繰り返し、E D N I M Vが、第V I I I 因子蛋白質全体に対する免疫反応を抑制することが可能であることを実証する。

【 0 1 7 9 】

方法

(i) r h F V I I I で初回刺激したD R 2 + マウスのリコール反応

H L A - D R 2 + マウスM H C クラスI I ヌルマウスを、尾の基部へ皮下的に、400 μ gの加熱死菌M . t u b e r c u l o s i s H 3 7 R aを補充した完全フロイントアジュバントに乳化した40 μ gのr h F V I I I で免疫化した。10日後、マウスを屠殺し、流入領域リンパ節を取り出した。単一細胞浮遊液を調製し、96ウェル平底プレートにおいてウェル当たり4乃至5 $\times 10^5$ 個のリンパ球を、示した濃度のペプチド又は対照抗原と共に72時間インキュベートした後、さらに16時間0 . 5 μ C i / ウェルのトリチウム標識チミジンでパルスした。次いで、プレートを凍結した後、細胞をガラスフィルターマット上に採取し、放射能取込を液体シンチレーション - カウンターを用いて測定した。

【 0 1 8 0 】

(i i) D R 2 + マウスから得られたT細胞ハイブリドーマのF V I I I ペプチド特異性

H L A - D R 2 + マウスM H C クラスI I ヌルマウスを上記のようにして免疫化した。10日目に流入領域リンパ節を取り出し、20 μ g / m l のr h F V I I I の存在下の24ウェルプレートにおいて2 . 5 $\times 10^6$ 個 / m l のリンパ球を1 m l / ウェル3日間培養した。この刺激の後に、リンパ球を回収し、洗浄して、N e l s o n ほか（1980年）P N A S 7 7 (5) : p . 2 8 6 6 に記載されるようにポリエチレングリコールを用い、T C R - B W 融合パートナー細胞と1個のリンパ球に対して4個のB W 細胞の割合で融合させた。融合細胞を注意深く洗浄した後、平底96ウェルプレートで2日間平板培養し、次いで、H A T 培地を加えてT細胞ハイブリドーマを選択した。細胞の増殖をモニターし、融合を実施してから約10日後に、個々のクローンを選択してH A T 培地中24ウェルプレートに移した。クローンは、少なくとも2週間H A T 培地に維持した後、H T 培地、次いで完全培地に移した。クローンの抗原特異性について、20 μ g / m l のr h F V I I I の存在又は非存在下に100 μ l のハイブリドーマ細胞を5 $\times 10^4$ M g a r 細胞と共に一夜培養することによって調べた。次いで、上清を採集してE L I S A によりI L - 2 産生について評価し、r h F V I I I に反応してI L - 2 を産生するクローンをF V I I I 特異性に関して陽性であるとみなした。予測されるF V I I I ペプチドの

10

20

30

40

50

レパートリーを調査するために、F V I I I 特異的クローンについて上記 1 2 種のペプチドのそれぞれ 20 μ g / ml と一夜インキュベーションした後、I L - 2 産生を再度調べた。

【0181】

(i i i) r h F V I I I で初回刺激した F V I I I - / - マウスのリコール反応
マウスが F V I I I 欠損、H L A - D R 2 + 及びマウス M H C クラス I I ヌルである以外は (i) の場合と同じ方法に従った。

【0182】

(i v) F V I I I - / - マウスから得られた T 細胞ハイブリドーマの F V I I I ペプチド特異性

マウスが F V I I I 欠損及び H L A - D R 2 + である以外は (i i) の場合と同じ方法に従った。

【0183】

(v) 免疫優性 F V I I I ペプチドでの前処置による D R 2 + マウスにおける F V I I I 特異的反応の寛容化

H L A - D R 2 + マウス M H C クラス I I ヌルマウスを P B S に溶かした 100 μ g の D N I M V 、 P R C L T もしくは P P I I A 又は同等の体積の P B S 単独で 3 回処置した。ペプチドは、各用量の間に 3 乃至 4 日をおいて腹腔内投与した。最後の投与の後、(i) の場合のように、マウスを完全フロインドアジュバントに乳化した r h F V I I I で初回刺激した。10 日後、流入領域リンパ節を回収し、次いで、リンパ球を r h F V I I I 又は各寛容化ペプチド及び対照抗原と共にインビトロで 72 時間培養した後、(i) の場合のようにトリチウム標識チミジンを加えた。

【0184】

(v i) 免疫優性 F V I I I ペプチドの組み合わせでの前処置による D R 2 + マウスにおける F V I I I 特異的反応の寛容化

H L A - D R 2 + マウス M H C クラス I I ヌルマウスを P B S に溶かした D N I M V 、 P R C L T もしくは D N I M V 及び P R C L T の両者の組合せ又は同等の体積の P B S 単独で 3 回処置した。ペプチドは 8 日間にわたって腹腔内投与した。最後の投与の後、(i) の場合のように、マウスを完全フロインドアジュバントに乳化した r h F V I I I で初回刺激した。10 日後、流入領域リンパ節を回収し、次いで、リンパ球を r h F V I I I を用いてインビトロで再刺激した。次いで、上清を採集して I F N - ガンマを測定した。

【0185】

上記明細書に記載した刊行物は全て、引用により本明細書に組み込まれている。本発明の範囲および精神を逸脱することなく、開示した本発明の方法および系の種々の変更および改変を行うことができることは、当業者には明瞭に理解されよう。本発明については特定の好ましい実施態様に関して説明したが、本発明の特許請求の範囲がこのような実施態様に不当に限定されるべきではないことは理解されよう。それどころか、分子免疫学もしくはその関連分野の当業者には自明である、発明実施のために開示した実施態様の種々の変更は、以下の特許請求の範囲に含まれるものである。

【0186】

配列番号 1

【0187】

10

20

30

40

【 化 9 】

1 mqieltstcfff lcllrfcfsa trryylgave lswdymqsdl gelpvdarfp prvpksfpfn
 61 tsvvykktlf veftdhlfni akprppwmgl lgptiqaevy dtvvtlknm ashpvslhav
 121 gvsywksseg aeyddqtsqr ekeddkvfpg gshtyvwqvl kengpmasdp lcitysylvh
 181 vdlvkdlnsg ligallvcre gslakektqt lkhfillfav fdegkswhse tknslmqdrd
 241 aasarawpkm htvngyvnrs lpgligchrk svywhvigmg tpevhhsifl eghtflvrnh
 301 rqaaleispi tftaqtllm dlqqlfch issqhhdgme ayvkvdscpe epqlrmknne
 361 eaedydddlit dsemdvvrfd ddnspsfqi rsvakkhpkt wwhyiaaeeee dwdyaplvia
 421 pddrsyksqy lnnqpqrigr kykkvrfmay tdetfktrea iqhesgilgp llygevgdtl
 481 liifknqasr pyniypghit dvrplysrrl pkgvkhkdf pilpgeifky kwvtvvedgp
 541 tksdprcltr yyssfvnmer dlasgligpl licykesvdq rgnqimsdkr nvilfsvfde
 601 nrsywylteni qrlpnpagv qledpefqas nimhsingyv fdlqlsvcl hevaywyils
 661 igaqtdflsv ffsygtfkhk mvyedtltf pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrng
 721 mtallkvssc dkntgdyyed syedisayll sknnaieprs fsqnsrhpst rqqqfnatti
 781 pendiektdp wfahrtpmpk iqnvssdli mlrrqsptph glslsdlqea kyetfsddps
 841 pgaidssnsl semthfrpql hhsqdmvftp esglqlrlne klgtaatel kkldfkvsst
 901 snnlitips dnlaagtndt sslgppsmpv hydsqldtli fgkksplte sggplslsee
 961 nndskilesq lmsqesswg knvsstesgr lfkgrahgp alltkdnalf kvsislktn
 1021 ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefkk vtplihdrml mdknatalri
 1081 nhmsnktts knmemvqqkk egpipdaqn pdmsffkmf lpesarwiqr thgknslnsg
 1141 qgpspkqlvs lgpeksvegq nlfseknkvv vgkgeftkdv glkemvfpss rmlftnldn
 1201 lhenntnqe kkieeiekk etliqenvvl pqihtvtgk nfmknlfils trqnvegsyd
 1261 gayapvlqdf rslndstnr kkhtahfskk geeenleglg nqtkqiveky acttrispnt
 1321 sqqnfvtqrs kralkqfrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
 1381 kgaitqspls dcltrshsip qanrspia kvssfpsirp iyltrvlfqd nsshipaasy
 1441 rkkdsgvqes shflqgakkn nlsailte mtgdqrevgs lgtsatnsvt ykkventvlp
 1501 kpdlpktsqk vellpkvhiy qkdlftets ngspghldlv egslqgteg aikwneanrp
 1561 gkvplrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl
 1621 nacesnhaia aineggnkpe levtwakqr terlcsqnpp vlkrhqreit rttlqsdqee
 1681 idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkktrhyfia averlwdygm sssphvlmr
 1741 aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlgilgp yiraevedni mvtrfnqasr
 1801 pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
 1861 dlekdvhsqgl igpllvchn tlnpahgrqv tvqefalfft ifdetkswyf tenmerncra
 1921 pcniqmedpt fkenyrfhai ngymdtlpg lvmaqdqrir wyllsmgsne nihsihfsg
 1981 vftvrkkeey kmalynlpg vftvemlps kagiwrvecl igehlhagms tflvysnkc
 2041 qtplgmasgh irdfqitasg qyqwapkla rlhygsina wstkepfswi kvdlapmii
 2101 hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgkk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnfn
 2161 ppiaryirl hpthysirst lrmewmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
 2221 twspskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqtkmkt gvtqgvksl ltsmyvkefl
 2281 issqdghqaw tlfqngkvk vfqgnqdsft pvnslppl ltrylrihpq swvhqialrm
 2341 evlgceaql y

10

20

30

【 0 1 8 8 】

【化 1 0】

実施例7で調製した重複ペプチドパネル

DTLLIIFKNQASRPY のための重複セット

1.	473-488	YGEVGD TLLIIFKNQ
2.	474-489	GEVGD TLLIIFKNQA
3.	475-490	EVGD TLLIIFKNQAS
4.	476-491	VGD TLLIIFKNQASR
5.	477-492	GD TLLIIFKNQASRP
6.	478-493	DTLLIIFKNQASRPY
7.	479-494	TLLIIFKNQASRPYN
8.	480-495	LLIIFKNQASRPYNI
9.	481-496	LIIIFKNQASRPYNIY
10.	482-497	IIFKNQASRPYNIYP
11.	483-498	IFKNQASRPYNIYPH

10

PRCLTRYSSSFVNME のための重複セット

1.	540-554	PTKSDPRCLTRYSS
2.	541-555	TKSDPRCLTRYSSF
3.	542-556	KSDPRCLTRYSSFV
4.	543-557	SDPRCLTRYSSFVN
5.	544-558	DPRCLTRYSSFVNM
6.	545-559	PRCLTRYSSSFVNME
7.	546-560	RCLTRYSSSFVNMER
8.	547-561	CLTRYSSSFVNMERD
9.	548-562	LTRYSSSFVNMERDL
10.	549-563	TRYSSSFVNMERDLA
11.	550-564	RYSSSFVNMERDLAS

20

DNIMVTFRNQASRPY のための重複セット

1.	1783-1797	RAEVEDNIMVTFRNQ
2.	1784-1798	AEVEDNIMVTFRNQA
3.	1785-1799	EVEDNIMVTFRNQAS
4.	1786-1800	VEDNIMVTFRNQASR
5.	1787-1801	EDNIMVTFRNQASRP
6.	1788-1802	DNIMVTFRNQASRPY
7.	1789-1803	NIMVTFRNQASRPYS
8.	1790-1804	IMVTFRNQASRPYSF
9.	1791-1805	MVTFRNQASRPYSFY
10.	1792-1806	VTFRNQASRPYSFY
11.	1793-1807	TFRNQASRPYSFYSS

30

40

SLYISQFIIMYSLDG のための重複セット

1.	2109-2123	RQKFSSLYISQFIIM
2.	2110-2124	QKFSSLYISQFIIMY

【 0 1 8 9】

【化 1 1】

3. 2111-2125	KFSSLYISQFIIMYS
4. 2112-2126	FSSLYISQFIIMYSL
5. 2113-2127	SSLYISQFIIMYSLD
6. 2114-2128	SLYISQFIIMYSLDG
7. 2115-2129	LYISQFIIMYSLDGK
8. 2116-2130	YISQFIIMYSLDGKK
9. 2117-2131	ISQFIIMYSLDGKKW
10. 2118-2132	SQFIIMYSLDGKKWQ
11. 2119-2133	QFIIMYSLDGKKWQT

10

PPIIARYIRLHPHXY のための重複セット

1. 2156-2170	HNIFNPPIIARYIRL
2. 2157-2171	NIFNPPIIARYIRLH
3. 2158-2172	IFNPPIIARYIRLHP
4. 2159-2173	FNPPPIIARYIRLHPT
5. 2160-2174	NPPIIARYIRLHPH
6. 2161-2175	PPIIARYIRLHPHXY
7. 2162-2176	PIIARYIRLHPHXY
8. 2163-2177	IIARYIRLHPHXY
9. 2164-2178	IARYIRLHPHXY
10. 2165-2179	ARYIRLHPHXY
11. 2166-2180	RYIRLHPHXY

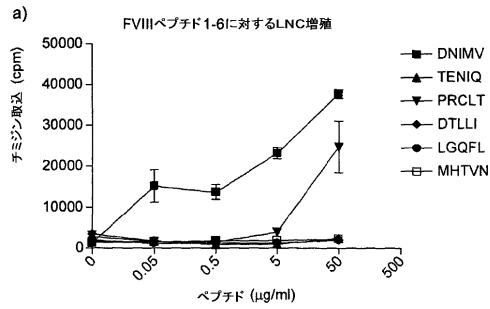
20

RYLRIHPQSWVHQIA のための重複セット

1. 2317-2331	PPLLTRYLRIHPQSW
2. 2318-2332	PLLTRYLRIHPQSWV
3. 2319-2333	LLTRYLRIHPQSWVH
4. 2320-2334	LTRYLRIHPQSWVHQ
5. 2321-2335	TRYLRIHPQSWVHQI
6. 2322-2336	RYLRIHPQSWVHQIA
7. 2323-2337	YLRIHPQSWVHQIAL
8. 2324-2338	LRIHPQSWVHQIALR
9. 2325-2339	RIHPQSWVHQIALRM
10. 2326-2340	IHPQSWVHQIALRME
11. 2327-2341	HPQSWVHQIALRMEV

30

【図 1 - 1】



b)

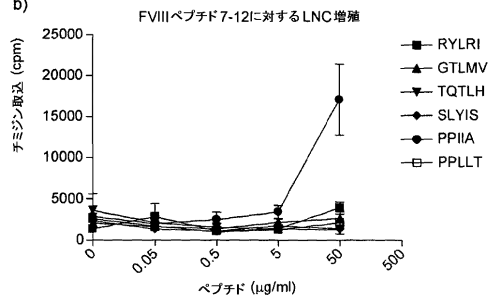


FIG. 1

【図 1 - 2】

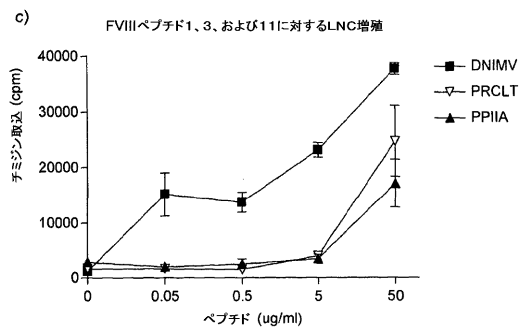
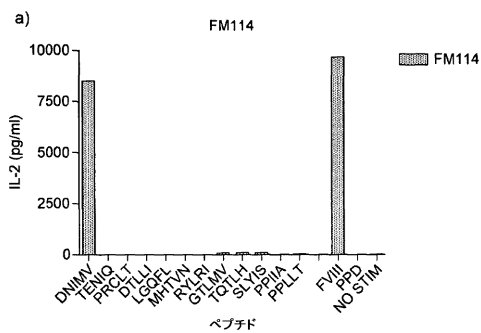


FIG. 1(続き)

【図 2】



b)

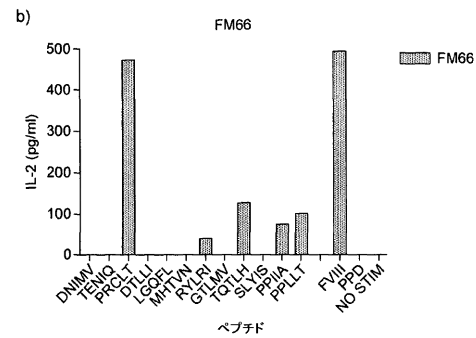
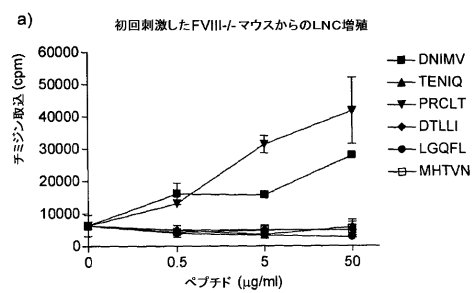


FIG. 2

【図 3 - 1】



b)

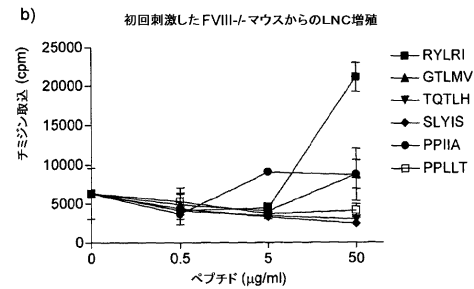


FIG. 3

【図 3 - 2】

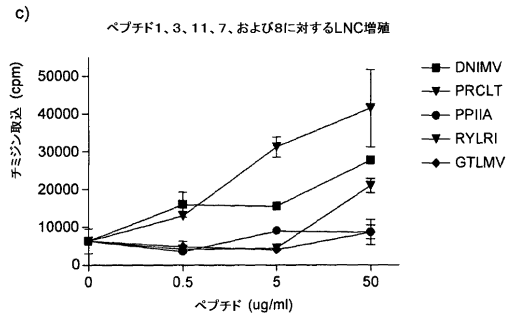


FIG. 3(続き)

【図 4 - 1】

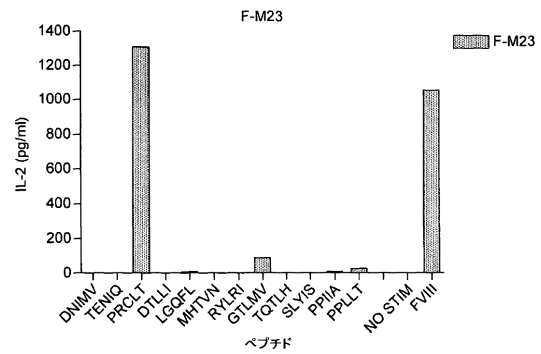
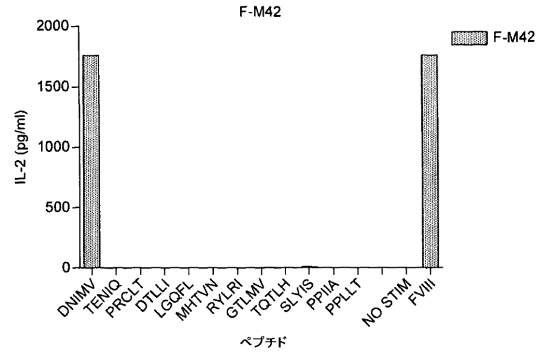


FIG. 4

【図 4 - 2】

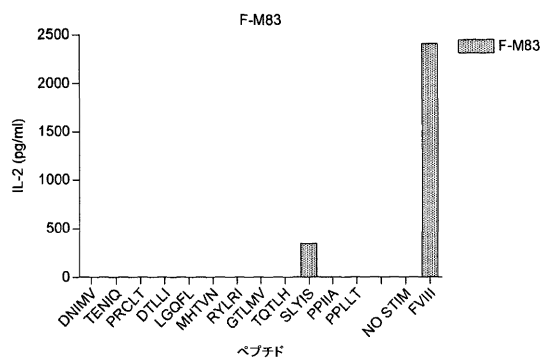
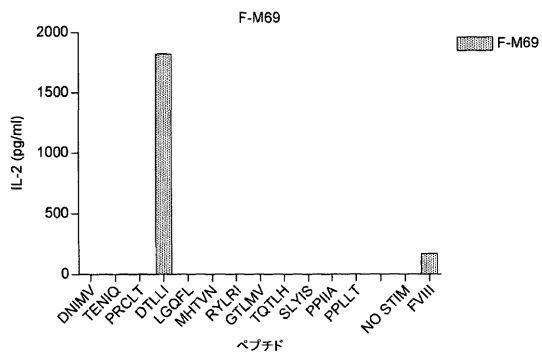


FIG. 4(続き)

【図 5】

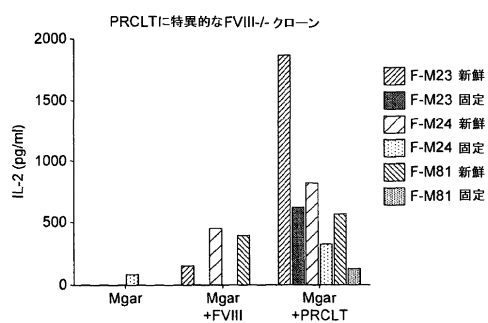
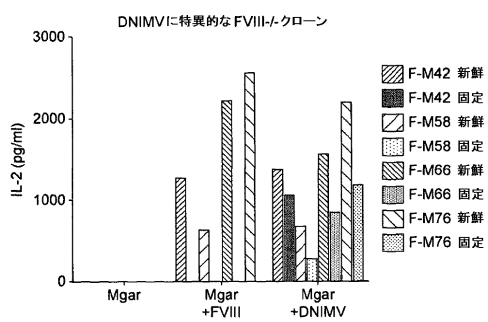


FIG. 5

【図 6】

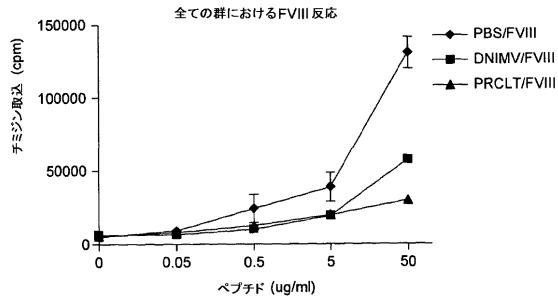


FIG. 6

【図 7 - 1】

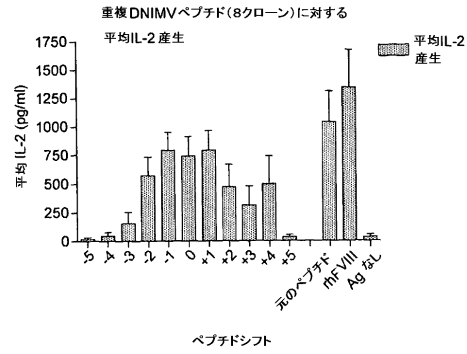


FIG. 7a

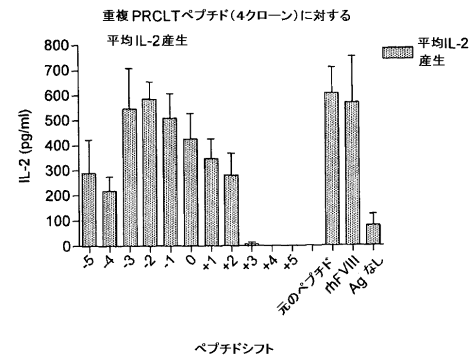


FIG. 7b

【図 7 - 2】

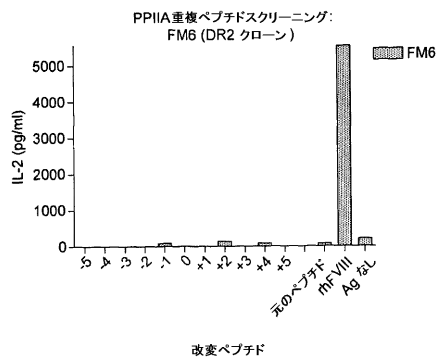
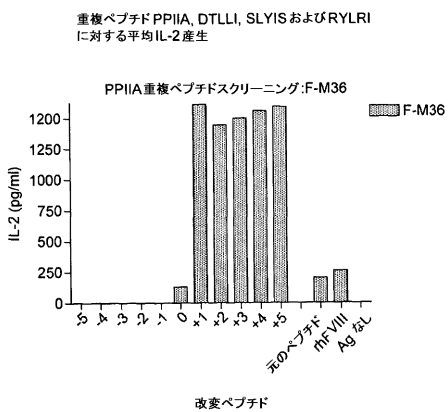


FIG. 7c

【図 7 - 3】

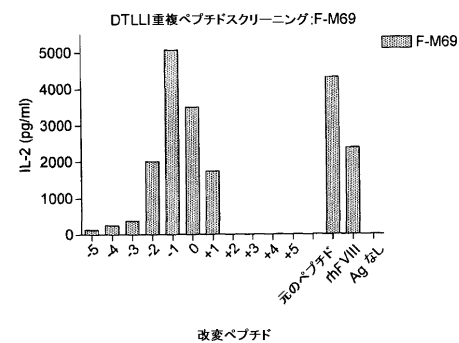
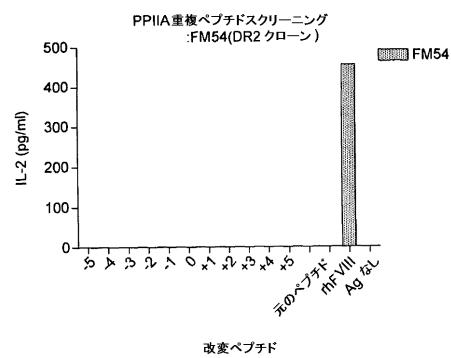


FIG. 7(続き)

【図 7 - 4】

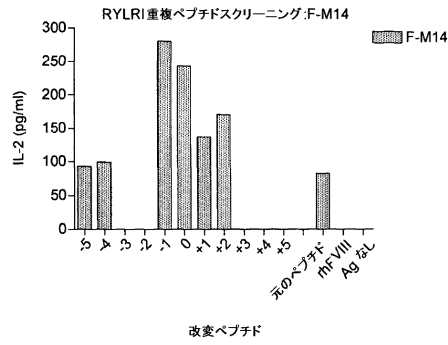
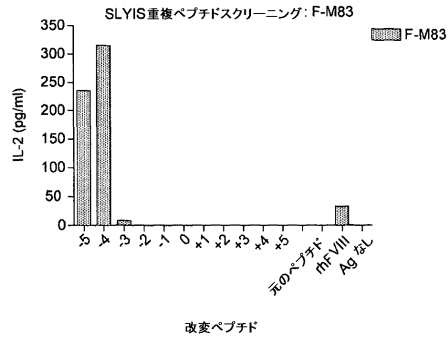


FIG. 7 (続き)

【図 8】

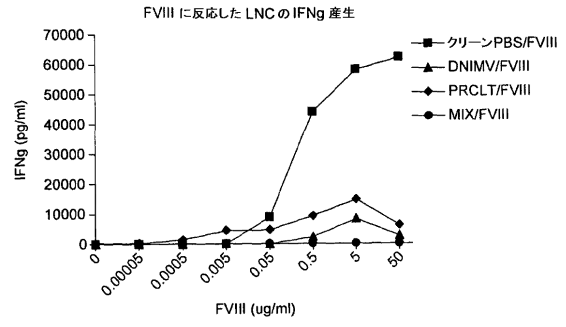


FIG. 8

【図 9】

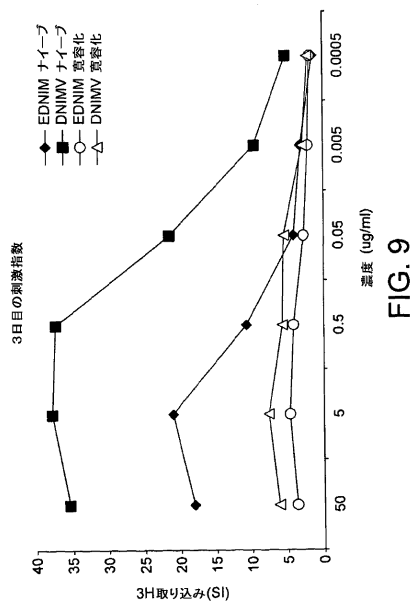


FIG. 9

【配列表】

0005784009000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 ライス, デイビッド

イギリス国 ビーエス1 5ユービー ブリストル, パーク ロウ, ユニバーシティー ゲー
ト イースト, アピトープ テクノロジー (ブリストル) リミテッド

審査官 木原 啓一郎

(56)参考文献 特表2005-538694(JP, A)

国際公開第02/098454(WO, A1)

JONES, T. D. et al., IDENTIFICATION AND REMOVAL OF A PROMISCUOUS CD4+ T CELL EPITOPE F
ROM THE C1 DOMAIN OF FACTOR VIII, JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, 2005年
5月, Vol.3, No.5, p.991-1000

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K

C12N 15/00

GenBank/EMBL/DDBJ/UniProt/GeneSeq

CAplus/REGISTRY(STN)