

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-57208

(P2004-57208A)

(43) 公開日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 4
<b>A 6 1 K 38/00</b>	A 6 1 K 39/00	H 4 C 0 8 4
<b>A 6 1 K 39/00</b>	A 6 1 P 31/12	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 31/12</b>	A 6 1 P 37/02	4 H 0 4 5
<b>A 6 1 P 37/02</b>	C O 7 K 7/08 Z N A	
	審査請求 有 請求項の数 20 O L (全 32 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-196606 (P2003-196606)	(71) 出願人	503253002
(22) 出願日	平成15年7月14日 (2003.7.14)		オルソ ダイアグノスティック システムズ, インコーポレーテッド
(62) 分割の表示	特願平6-508271の分割		アメリカ合衆国 08869-0606
原出願日	平成5年9月15日 (1993.9.15)		ニュージャージー州 ラリタン, ユー. エス. ルート #202, 1001番地
(31) 優先権主張番号	07/945, 280	(71) 出願人	594140915
(32) 優先日	平成4年9月15日 (1992.9.15)		ジョージタウン・ユニバーシティ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		GEORGETOWN UNIVERSITY
			アメリカ合衆国ディー・シー20057、ワシントン、エヌ・ダブリュー、サーティセブンス・アンド・オー・ストリート (番地の表示なし)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エプスタイン-バーウイルスからの免疫反応性ペプチド

## (57) 【要約】

【課題】エプスタイン-バーウイルス (EBV) 関連疾患の免疫診断及び免疫療法に有用なエプスタイン-バーウイルス (EBV) に特異的ポリペプチドの提供。

【解決課題】エプスタイン-バーウイルス (EBV) 関連疾患を有する個体からの検体中で抗体に結合できるポリペプチド、該ポリペプチドの保存的変異体及び混合物、これらのポリペプチドに対する抗体を検出する方法、ならびにこれらのポリペプチドを含む医薬組成物。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

下記式 (I) で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、エプスタイン - バーウイルス (EBV) 関連疾患を有する個体からの検体中で抗体に結合できるポリペプチド。

$$\left( \text{K Q K H P K K V K Q A F N P L} \right)_n \quad (\text{I})$$

(式中、 と は独立に 0 から 5 の天然に存在するアミノ酸であり、n は 1 から 1000 である。)

## 【請求項 2】

n が 1 である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

## 【請求項 3】

前記式 (I) で表されるアミノ酸配列が K Q K H P K K V K Q A F N P L である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 4】

前記式 (I) で表されるアミノ酸配列が (A R Q K Q K H P K K V K Q A F N P L I) n である、請求項 1 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 5】

n が 1 である、請求項 4 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 6】

下記式 (II) で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、エプスタイン - バーウイルス (EBV) 関連疾患を有する個体からの検体中で抗体に結合できるポリペプチド。

20

$$\left( \text{G M L E A S E G L D G W I H Q} \right)_n \quad (\text{II})$$

(式中、 と は独立に 0 から 5 の天然に存在するアミノ酸であり、n は 1 から 1000 である。)

## 【請求項 7】

n が 1 である、請求項 6 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 8】

前記式 (II) で表されるアミノ酸配列が G M L E A S E G L D G W I H Q である、請求項 6 に記載のポリペプチド。

30

## 【請求項 9】

下記式 (III) で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、エプスタイン - バーウイルス (EBV) 関連疾患を有する個体からの検体中で抗体に結合できるポリペプチド。

$$\left( \text{H Q Q G G W S T L I E D N I P} \right)_n \quad (\text{III})$$

(式中、 と は独立に 0 から 5 の天然に存在するアミノ酸であり、n は 1 から 1000 である。)

## 【請求項 10】

n が 1 である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

## 【請求項 11】

前記式 (III) で表されるアミノ酸配列が H Q Q G G W S T L I E D N I P である、請求項 9 に記載のポリペプチド。

40

## 【請求項 12】

請求項 1 から 11 の何れかに記載のポリペプチドに対する抗体を検出する方法であって、検体を該ポリペプチドと接触させ、そして抗体が該ペプチドに結合するかどうかを確認することを含む方法。

## 【請求項 13】

検体が血液である、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 14】

ペプチドが検出可能なように標識されている、請求項 12 に記載の方法。

50

## 【請求項 15】

検出可能標識が、放射性同位元素、蛍光化合物、コロイド状金属、化学発光化合物、生物発光化合物、リン光化合物、及び酵素からなる群から選ばれる、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

ペプチドが固相に結合している、請求項 12 に記載の方法。

## 【請求項 17】

請求項 1 ~ 11 のいずれに記載のポリペプチドに対する抗体を、かかる抗体を含有すると推測される検体中で検出するのに有用なキットであって、請求項 1 ~ 11 のいずれに記載のポリペプチドを含有する容器を含む 1 又は 2 以上の容器をその中に厳重に収納するように仕切られた運搬容器手段を含むキット。

10

## 【請求項 18】

少なくとも 1 回投与分の免疫原的有効量の請求項 1 から 11 の何れかに記載のポリペプチドを製剤上の担体中に含む医薬組成物。

## 【請求項 19】

請求項 1 に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及びそれに相補的なポリヌクレオチド配列。

## 【請求項 20】

請求項 1 から 11 の何れかに記載のポリペプチドの保存的変異体。

## 【発明の詳細な説明】

20

発明の背景

## 1. 発明の分野

本発明は、エプスタイン - バーウイルス関連疾患の診断及び治療に関する。より具体的には、これら様相は、EBV 特異的ペプチドの発見に基づく。

## 【0001】

## 2. 関連技術の説明

エプスタイン - バーウイルス (EBV) は、全てのヒト集団に固有のヒトヘルペスウイルスである。殆どの人々は、幼児期にこのウイルスに感染して生涯このウイルスを保有している。初感染が青年期まで遅れると、感染性単核球症 (IM) が頻繁に発生する。このウイルスは一定の種類の高悪性度の癌とも関係している。アフリカのマラリア地帯では EBV はパーキ

30

## 【0002】

急性ウイルス感染は、特異性核抗原 (EBNA - I 及び EBNA - II と呼ばれる)、“早期抗原 (EA)”複合体、ウイルスクャプシッド抗原 (VCA)、及び他の関連分子の産生をもたらす。この“早期抗原複合体”は、細胞質 + 核 (即ち、拡散性分布) 内又は細胞質内だけ (即ち、制限性) での免疫蛍光測定法でのそれらの分布に基づき、及びメタノール固定細胞内でのそれらの染色現象に基づき“早期抗原 - 拡散性 (EA - D)”及び“早期抗原 - 制限性 (EA - R)”抗原からなる。それぞれ分子量 50 ~ 55 Kd、17 Kd、及び 85 Kd を有するこれら EA 抗原は、EBV 感染の“溶解”期の際に合成され、

40

形質転換リンパ芽球様細胞内にはない。これら早期抗原に対する抗体は急性 EBV 感染の際に存在し、次いでウイルスが潜伏期に入るときに消えてしまう。抗 EA 抗体の再出現はウイルス再活性化の信号を送って、鼻咽頭癌及びパーキリンパ腫の如き疾患においてこのウイルスの可能な役割に糸口を提供する。

## 【0003】

間接的な証拠が、シェーグレン症候群の患者における EBV 再活性化のための可能な役割を示唆している。この症候群は、唾液腺 (EBV 潜伏の普通の部位) のリンパ様浸潤物を特徴とする自己免疫疾患である。EA 抗原に対する抗体は免疫蛍光測定法によって検出されるので、かかる抗体を自己免疫疾患の一部として抗核及び抗細胞質抗体を有する患者内で検出することはできない。従って、自己免疫疾患患者内の抗 EA 抗体の測定ができるよ

50

うにするため及び急性又は再活性化EBVの他の患者内の抗EA抗体をより正確に定量するため、精製EA分子を有することが望ましいといえる。

【0004】

最近、EBVのDNA配列が決定され (Baerら, Nature 310:207, 1984) EA-D抗原はゲノム内に局在していた。EA-Dタンパク質に向けられたモノクローナル抗体を用いて、部分アミノ酸配列決定及びかくしてそのコーディング配列の位置確認ができるように十分なタンパク質が精製された。その情報を用いて、そのDNA配列に基づく一連の合成ペプチドを調製することが可能となった。EBVのEBNA-I抗原 (Rhodesら, J. Immunol., 134:211, 1985) 及びEBNA-II抗原 (Dillner, J. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:4652, 1984) 上の免疫学的に重要なエピトープを同定するのに同戦略が有用であることが判明した。IM及び他の疾患状態の患者からの免疫性ヒト血清と反応性のエピトープを含有するEA-D分子から誘導した合成ペプチドも記載されている (Foxら, J. Clin. Lab. Anal., 1:140, 1987)。

【0005】

最近の研究は、タンパク質の一次アミノ酸残基配列の短い線状セグメントに対応する化学的に合成されたポリペプチドを用いて天然タンパク質と免疫反応する抗体を誘発できることを示した (Lernerら, Nature, 299:592, 1982; Sutcliffeら, Science, 219:260, 1983)。加えて、幾つかの研究は、合成ポリペプチドが天然タンパク質によって誘発された抗体と免疫反応できることを示した (Rhodesら, J. Immunol., 134:211, 1985)。かくして、幾つかの合成ポリペプチドは、天然タンパク質の免疫原及び抗原決定基を免疫学的に擬態できる。

【0006】

しかしながら、当該技術分野で周知のように、合成ペプチド技術の適用は、依然として幾つかの欠点を持っている。例えば、天然タンパク質上の抗原決定基を擬態できるペプチドを同定するには、そのタンパク質のアミノ酸残基配列を知ることが必要である。そのタンパク質をコードする遺伝子の核酸配列からアミノ酸残基配列を予測することができるが、そのような予測は、その遺伝子の正確なリーディングフレームが既知である場合に行えるに過ぎない。

【0007】

EBVゲノムの核酸配列は分かっている。しかしながら、たとえタンパク質のアミノ酸残基配列が分かっているとしても、免疫原及び抗原決定基を構成するタンパク質内の座を同定する方法は本来実験的なものであって予測可能な結果をもたらさない。これには少なくとも2つの理由がある。第1に、タンパク質の三次元構造が分からなければ、そのタンパク質の線状セグメントが宿主免疫系を利用できることを確認するための信頼できる方法はない。第2に、三次元構造が分かっているかどうかに関わらず、短い線状ポリペプチドは、適切な免疫原及び抗原決定基を構成するために要求される二次及び三次コンフォメーション構造を擬態する能力を有さないと思われる場合が多い (Tainerら, Nature, 312:127, 1984)。しかしながら、T又はB細胞と優先的に相互作用する分子の優勢エピトープの同定を可能にする Berzofsky のアルゴリズム (AMPHI program, 1987) の如き方法が開発されている。

【0008】

以前の研究で、ウィルス複製サイクルの間に合成されるEBV誘発抗原に対する細胞性免疫応答が調べられた (Pothénら, Int. J. Cancer, 49:656, 1991)。その結果は、早期抗原(EA)複合体の幾つかの成分が、主要膜糖タンパク質、つまりgp350/250で以前に認められたものと類似の強いT細胞増殖応答の誘発に非常に有効であることを証明した (Ulaetoら, Europ. J. Immunol., 18:1689, 1988)。EBV感染ドナーからのCD4

+ 及びCD8+ 両方のリンパ球集団が、EA複合体からイムノアフィニティクロマトグラフィーによって精製したポリペプチドの存在下で増殖した。EA-Dの主要ポリペプチド及びEA-Rの主要ポリペプチドの1つが、このT細胞認識測定法で特に有効であった。そのデータは、EA複合体のこれら成分が、EBV感染又は不死化細胞の免疫監視において重要な標的抗原として機能することを示唆した。EA-R複合体ポリペプチド上で発現される優勢T及びB細胞エピトープを同定すれば、EBV関連リンパ増殖性疾患の個体の診断及び管理におけるこれら成分に対する抗体応答の重要性に関する情報が得られるであろう。

#### 【0009】

疾患と関連するEBVの診断ができるような、検体中のEA-R又はEA-D及び抗EA-R又は抗EA-D抗体の存在を検査する改善された方法、並びに感染性単核球症の如き疾患の病期の診断法を開発することが望まれよう。EA-R/EA-Dポリペプチド上のB及びT細胞エピトープを同定することは、EBV関連リンパ増殖性疾患の個体において診断及び疾患管理の目的で用いる分子の合成への重要なステップとなる。

#### 【0010】

##### 発明の要旨

本発明は、エプスタイン-バーウイルス(EBV)に特異的な免疫原部位を規定するポリペプチドを提供する。これらポリペプチドは、EBV関連疾患の免疫診断及び免疫療法に、並びにこれらポリペプチドに特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するのに用いることができる。これらモノクローナル抗体を用いて本発明のポリペプチドを含む抗原を検出することができ、また治療に用いてEBV関連疾患を改善することもできる。

#### 【0011】

本発明の好ましい態様の詳細を添付図面及び以下の説明で述べる。一旦本発明の詳細を理解すれば、更なる多数の改良及び変更が当業者に自明となる。

#### 【0012】

##### 発明の詳細な説明

本発明の好ましい態様は、エピトープポリペプチド E T F T E T W N R F I T H T E (配列番号：1)、G M L E A S E G L D G W I H Q (配列番号：2)、H Q Q G G W S T L I E D N I P (配列番号：3)、K Q K H P K K V K Q A F N P L (配列番号：4)、及びこれらペプチドの保存的変異体及び混合物を含む。ここで用いる“保存的変異体”という用語は、他の生物学的に類似の残基によるアミノ酸残基の置換体を意味する。保存的変異体の例には、イソロイシン、バリン、ロイシン又はメチオニンの如き1疎水性残基の他の1残基との置換、又はアルギニンのリシンとの置換、グルタミン酸のアスパラギン酸との置換、若しくはグルタミンのアスパラギンとの置換の如き1極性残基の他の1残基との置換、及びそれに類したものが含まれる。この“保存的変異体”という用語には、未置換親アミノ酸の代わりに置換アミノ酸を用いることも含まれる。但し、その置換ポリペプチドに対して生じた抗体もその未置換ポリペプチドと免疫反応するものとする。かくして、EBV関連疾患の患者からの血清で保存的変異体ポリペプチドを試験するなどの日常的スクリーニング方法を用いることによって、当業者は不当に実験を積むことなく変異体ポリペプチドが本発明のポリペプチドの必要な生物活性を有するかどうかを容易に確認できる。

#### 【0013】

本発明のエピトープポリペプチドは、それらの血清学的反応性を増すためにアミノ末端又はカルボキシ末端において追加のアミノ酸を含有してもよい。好ましくは、これら追加のアミノ酸残基は、これらアミノ酸の保存的変異体に関して、天然に存在するタンパク質のアミノ酸であって、独立に約0~約5の数である。例えば、配列番号：1の変異体はエピトープポリペプチド Q N S E T F T E T W N R F I T H T E H V D を含み、配列番号：4の変異体はエピトープポリペプチド A R Q K Q K H P K K V K Q A F N P L I を含む。下線を引いたアミノ酸はもとのポリペプチドの延長部分を表す。本発明のポリペプチドは、1から約100単位長に及ぶ繰り返し単位として用いることもできる。これら単

位は、例えば、全ての単位が同じポリペプチドの繰り返しである同型のものであっても、本発明のポリペプチドの混合物であってもよい。

【0014】

本発明のペプチドは、単独で用いても、混合物で用いても、凝集体、ポリマー及びそれに類したものの如き多量体として用いてもよい。従って、本発明は、そこに含まれる本発明の個々のポリペプチドに関して同種又は異種のポリマーを生成する1又は2以上の本発明の同じか又は異なるポリペプチドを含むポリペプチドを包含する。種々の混合物、凝集体、多量体及びそれに類したものを作る適切な技術は、当業者にとって既知であろう。例えば、本発明は、配列番号：1と配列番号：2、3若しくは4又はこれらのあらゆる組み合わせを含むポリペプチドであって、例えば、スパーサー又はリンカー部分を用いることによってそれら配列を直接又は間接に連結しているポリペプチドを包含する。

10

【0015】

本発明のペプチドは、Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149, 1962 及び Stewart と Young, Solid Phase Peptides Synthesis, (Freeman, San Francisco, 1969, pp.27-62) に記載されている周知の固相ペプチド合成法により、0.1~1.0ミリモルアミン/gポリマーを含有するスチレン-ジビニルベンゼンコポリマーを用いて合成することができる。化学合成の終了時に液体HF-10%アニソールで約1/4~1時間0で処理することによって、ペプチドを脱保護してこのポリマーから切り離すことができる。それら試薬を留去した後、ペプチドをポリマーから1%酢酸溶液で抽出し、次いで凍結乾燥して粗製物を得る。これは普通5%酢酸を溶媒として用いるセファデックスG-15でのゲル濾過の如き技術によって精製できる。このカラムの適切な画分を凍結乾燥すると、均質なペプチド又はペプチド誘導体が生成するであろう。これは、アミノ酸分析、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、紫外線吸収スペクトル、モル旋光度、溶解性の如き標準的技術によってその特徴を明らかにすることができ、そして固相エドマン分解により定量することができる。

20

【0016】

合成中又は合成後に、反応性のアミノ酸を種々の保護基で保護してもよい。例えば、システインを3,4-ジメチルベンジル(DMB)基により、アルギニン及びヒスチジンをトシル(TOS)基により、アスパラギン酸及びグルタミン酸をベンジル(Bzl)基により、そしてリシンを2-クロロベンジルオキシカルボキシル(2-CBZ)基により保護することができる。他の保護基が周知であり、本発明に用いることができる。当業者は、ペプチド合成の他の技術を知っているか、又は不当に実験を積むことなくかかる技術を容易に探知できるであろう。

30

【0017】

また、本発明のポリペプチドは、当業者に広く知られている組換え技術を用いてつくることができる(例えば、Corrent Protocols in Molecular Biology, Ausbelら編, Wiley Interscience Press, 1989を参照のこと。なお、これは参照によりここに組み入れられるものとする。)

40

【0018】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。ここで用いる場合“ポリヌクレオチド”は、別々の断片の形にあるか又は大きな構築体の成分としてのデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドのポリマーのことをいう。本発明のペプチドをコードするDNAは、組換え転写装置内で発現されることができる合成遺伝子を提供するcDNA断片からでもオリゴヌクレオチドからでも組み立てることができる。本発明のポリヌクレオチド配列には、DNA、RNA及びcDNA配列が含まれる。ポリヌクレオチド配列は遺伝子コードから推定することができるが、コードの縮重を考慮しなければならない。本発明のポリヌクレオチド配列には、遺伝子コードの結果としての縮重物

50

である配列が含まれる。本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに相補的であってハイブリダイズできる配列も包含する。

【0019】

“EBV関連疾患”という用語は、EBVにより直接又は間接に起こるあらゆる疾患並びに患者にEBVによる感染を受けやすくする疾患を意味する。前者のカテゴリーに入る疾患の例には、感染性単核球症、鼻咽頭癌、及びバーキットリンパ腫が含まれる。後者のカテゴリーに入る疾患（即ち、患者をEBV感染の危険に曝す疾患）には、シェーグレン症候群が含まれ、広くは、臓器移植及び一定の癌治療を受けた患者の如き免疫抑制の又は免疫系の機能が低下した状態を起こすあらゆる状況が含まれる。

【0020】

本発明は、更に、本発明のポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体並びにこれらモノクローナル抗体を診断及び治療に使用することに関する。この特異性により、このポリペプチド又はこのポリペプチドを含むアミノ酸鎖が検体又はヒトの如き宿主内に存在するときに、このモノクローナル抗体、及び類似の特異性を有する類似のモノクローナル抗体を本発明のポリペプチドに結合させるのに用いるのが可能になる。

10

【0021】

不当な実験を積むことなく本発明のモノクローナル抗体を産生させるのに多くの技術を用いることができる。本発明のポリペプチドは性質が高度に規定されているので、かかるモノクローナル抗体の産生をかなりの程度まで定型的なものにすることができる。かくして、本発明のポリペプチドを免疫感作及び/又はスクリーニングに用いるかどうかに関わらず、そのポリペプチド上の免疫原決定基の数が非常に限定されているので、例えば、クローン発現のレポトリーをできるだけ限定することにより、本発明のモノクローナル抗体を産生する細胞系の同定は非常に簡略化される。

20

【0022】

本発明のモノクローナル抗体の産生に非常に有用な細胞系のタイプの1つはハイブリドーマである。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作るために用いる一般的な方法は周知である（KohlerとMilstein, Nature, 256: 495, 1975）。次いで、得られたハイブリドーマを本発明のポリペプチドに結合できるモノクローナル抗体の産生についてスクリーニングした。

【0023】

感作及び/又は免疫感作、細胞融合、腹水産生、混合ハイブリドーマの選択、又はモノクローナルハイブリドーマのサブクローニングの技術は当該技術分野で広く周知である。Koprowskiら、米国特許第4,172,124号、Koprowskiら、米国特許第4,196,265号、又はDouillard, J. Y.とHoffman, T., Basic Facts about Hybridomas, in Compendium of Immunology, Vol. II, L. Schwartz編（1981）に留意のこと。なお、これらは参照によりここに組み入れられるものとする。

30

【0024】

一般に、この精製エピトープペプチドは、この合成ペプチドが免疫原タンパク質に連結橋、例えば、マレイミドベンゾイル化（MB）キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）で非定方向的に結合できるように、C末端で結合したシスチンを有する。他の免疫原結合体、例えば、アルブミン及びそれに類したものも用いることができる。得られる構造体は1分子のタンパク質に連結した幾つかのペプチド構造体を有することができる。

40

【0025】

この合成ペプチドに対して免疫感作された宿主から誘導される体細胞をいずれかの適する免疫感作技術により得ることができる。この抗原を、通常は上記のようなタンパク質結合体の形で、いずれかの適当な方法により、好ましくは腹腔内、静脈内、皮下、又は足蹠内のいずれかでの注射により投与することによって、宿主被験体を免疫感作する。この免疫感作手順にアジュバントを含めてもよい。

50

## 【0026】

このタンパク質結合抗原で初回免疫感作した後、数回の追加抗原注射を数週間の間隔で周期的に投与してもよい。次いで、各宿主の血漿中に含有される抗体を本発明の免疫感作ポリペプチドとのその反応性について試験することができる。通常は最高の応答を有する宿主が、ハイブリドーマの産生に用いる体細胞を分泌する抗体のドナーとして最も好ましい。また、静脈内及び/又は腹腔内経路により追加量のペプチド-タンパク質結合体を繰り返し注射することによって過免疫感作を行うことができる。

## 【0027】

本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの単離は、興味の対象であるモノクローナル抗体の基本反応パターンの確認ができる日常的スクリーニング技術を用いて行うことができる。かくして、試験されるモノクローナル抗体が本発明のポリペプチドと結合するならば、試験されるその抗体と本発明のハイブリドーマによって産生される抗体は同等である。

10

## 【0028】

また、本発明は、本発明の好ましいモノクローナル抗体の結合に具体的に要求されるポリペプチド又はアミノ酸配列を教示するので、今度はこれらポリペプチドを免疫感作の目的のために用いて、このポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体をつくるハイブリドーマを産生させることが可能になる。このアプローチは、このポリペプチドによる免疫感作で提示される抗原決定基の数を限定することによって生じるモノクローナル抗体のレパートリーを減少させるという追加の効果をも有する。この方法によって産生されるモノクローナル抗体は、標準的技術を用いて、例えば、マイクロタイタープレートにポリペプチドを結合させてモノクローナル抗体の結合をELISA測定法により測定することによって、特異性をスクリーニングすることができる。

20

## 【0029】

あるモノクローナル抗体が本発明のモノクローナル抗体と同じ特異性を有するかどうかを、前者が本発明のポリペプチドへの後者の結合を阻止するか否かを確認することによって、不当な実験を積むことなしに確認することも可能である。試験されるモノクローナル抗体が本発明のモノクローナル抗体と競合して本発明のモノクローナル抗体による結合の減少が示されるならば、これら2つのモノクローナル抗体は同じか又は密接に関連するエピトープに結合すると言えよう。

30

## 【0030】

あるモノクローナル抗体が本発明のモノクローナル抗体の特異性を有するかどうかを確認するなともう1つの方法は、本発明のモノクローナル抗体をそれが正常では反応性である本発明のポリペプチドと予備インキュベートさせてから、試験されるモノクローナル抗体を添加して、その試験されるモノクローナル抗体がその抗原に結合する能力を阻害されるかどうかを確認する方法である。試験されるモノクローナル抗体が阻害されれば、多分、それは本発明のモノクローナル抗体と同じか又は密接に関連するエピトープ特異性を有するであろう。

## 【0031】

異なる宿主受容種内で外来ドナー種からのモノクローナル抗体を *in vivo* で用いるのは通常は複雑ではないが、生じ得る潜在的な問題は、そのドナー抗体上に存在する抗原決定基に対する宿主による免疫学的副作用の出現である。幾つの場合には、この副作用は、宿主内でのドナー抗体の *in vivo* 使用を短縮させるほど重いものであり得る。更に、この宿主副作用は、ドナー抗体のEBV関連疾患抑制効力を遮るように働き得る。宿主内で起こる免疫副作用の可能性を回避することが可能な1つの方法は、キメラ抗体を用いることによる方法である (Sunら, Hybridoma, 5 (Supplement 1): S17, 1986; Oiら, Bio Techniques, 4(3): 214, 1986)。キメラ抗体は、抗体の重鎖及び軽鎖の種々のドメインが1を越える種からのDNAによってコードされる抗体である。典型的には、キメラ抗体は、所期の抗原特異性の抗体を産生するドナー種から誘導される重鎖(V

40

50

$C_H$ )及び軽鎖( $V_L$ )の可変ドメイン、及び宿主受容種から誘導される重鎖( $C_H$ )及び軽鎖( $C_L$ )の可変ドメインを含むであろう。これらドナー抗体ドメインの抗原決定基、特に $C_H$ 領域内のものに宿主免疫系を曝すのを減らすことによって、受容種内で起こる免疫学的副反応の可能性が軽減されると考えられる。従って、例えば、本発明のハイブリドーマから単離されるDNAによりコードされるマウス $V_H$ 及び $V_L$ ドメイン及びヒト白血球から単離されるDNAでコードされる $C_H$ 及び $C_L$ ドメインを含む、ヒトにおける *in vivo* 臨床用途のためのキメラ抗体を産生することが可能である。

#### 【0032】

一定の状況下では、1アイソタイプのモノクローナル抗体が他のものよりもそれらの診断的又は治療的効力の点でより好ましいかも知れない。例えば、抗体媒介細胞溶解の研究から、アイソタイプ - 2a及び - 3の未修飾マウスモノクローナル抗体は、 - 1アイソタイプの抗体よりも標的細胞の溶解に概してより効果的であることが知られている。この効力の差は、標的細胞の細胞溶解的破壊に、より積極的に参加する - 2a及び - 3アイソタイプの能力のによるものと考えられる。モノクローナル抗体の特定のアイソタイプを、初回融合体からの選択によって直接に調製しても、異なるアイソタイプのモノクローナル抗体を分泌する親ハイブリドーマからクラススイッチ変異体を単離するための同胞選択技術を用いることによって二次的に調製してもよい (Steplewskiら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:8653, 1985; Spiraら, J. Immunol. Methods, 74:307, 1984)。かくして、本発明のモノクローナル抗体は、本発明のポリペプチドに対する特異性を有するクラススイッチ変異体を含むことになるう。

10

20

#### 【0033】

当業者は、本発明のモノクローナル抗体の特異性を有するモノクローナル抗体を分泌する他のハイブリドーマの単離を抗イディオタイプ抗体を産生させることによって行うこともできる (Herlynら, Science, 232:100, 1986)。抗イディオタイプ抗体とは、興味の対象であるハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体上に存在する特有の決定基を認識する抗体のことである。これら決定基は、その抗体の超可変領域内に位置している。所与のエピトープに結合するのはこの領域であり、従ってその抗体の特異性を司っている。抗イディオタイプ抗体は、興味の対象であるモノクローナル抗体で動物を免疫感作することによって調製することができる。この免疫感作動物は、免疫感作抗体のイディオタイプ決定基を認識してそれに応答し、そしてこれらイディオタイプ決定基に対する抗体を産生するであろう。この第2動物を免疫感作するのに用いた単独ハイブリドーマにより産生されるモノクローナル抗体に特異的であるこの免疫感作動物の抗イディオタイプ抗体を用いることによって、今度は免疫感作に用いたハイブリドーマの抗体と同じイディオタイプを有する他のクローンを同定することが可能になる。

30

#### 【0034】

2つのハイブリドーマのモノクローナル抗体間のイディオタイプの同一性が、それら2つのモノクローナル抗体が同じエピトープ決定基の認識に関して同じものであることを証明する。従って、抗イディオタイプ抗体を用いることによって、同じエピトープ特異性を有するモノクローナル抗体を発現する他のハイブリドーマを同定することが可能である。エピトープを擬態するモノクローナル抗体を産生するのに抗イディオタイプ技術を用いることも可能である。例えば、第1モノクローナル抗体に対して作った抗イディオタイプモノクローナル抗体は、その第1モノクローナル抗体により結合されるエピトープの“イメージ”である超可変領域内の結合ドメインを有するであろう。かくして、この抗イディオタイプモノクローナル抗体を免疫感作に用いることができるだろう。というのは、この抗イディオタイプモノクローナル抗体結合ドメインは抗原として働くからである。

40

#### 【0035】

EBV関連疾患の *in vivo* 診断及び治療に特に好ましいのはヒトモノクローナ

50

ル抗体である。モノクローナル抗体分野における最近の発展により、今日では、組換えクローニング技術を用いることによってヒトモノクローナル抗体を簡単に産生させることができる。典型的には、これら技術は、興味の対象である抗原に対して表出された抗体を有する患者からのリンパ球を用い、これらリンパ球から単離される核酸から組換えライブラリーをつくる。このライブラリーは、宿主生物内の免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のクローニングができるように適合させた発現ベクターを含有する。特定の抗原に対する所期の特異性を有する抗体を産生する個々のコロニーを、例えば、固体面にその抗原を付着させてその抗原について“パニング” (“panning”) することによって同定することができる。(例えば、Burtonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10134, 1991 を参照のこと。なお、これは参照によりここに組み入れられるものとする。)

10

**【0036】**

かくして、当業者は、同じようにして、本発明のペプチドに特異的なヒトモノクローナル抗体を、EBVへの体液性免疫を有する個体のリンパ球からの核酸、好ましくはmRNAを用いて組換えライブラリーをつくり、そうしてつくったライブラリーを本発明のポリペプチドを用いてスクリーニングすることによって日常的な事柄として産生させることができる。本発明のポリペプチドの高度に規定された性質から見て、各ポリペプチドはほんの僅かのエピトープ(おそらく1又は2)しか持たないであろうから、このライブラリーのスクリーニングは、不当な実験を要せずに簡単かつ非常に限定的に行うことができる。

**【0037】**

この発明で用いる“抗体”という用語は、完全な分子だけでなくFab及びF(ab')<sub>2</sub>の如きエピトープ決定基に結合することができるそれらの断片も含めようとするものである。

20

**【0038】**

本発明のモノクローナル抗体は、in vitro 又は in vivo 免疫診断又は免疫療法を施すことが望ましいあらゆる動物に用いることができる。ここに用いる“動物”という用語は、ヒト及び非ヒトの両者を含むことを意味するものである。

**【0039】**

本発明のモノクローナル抗体は、例えば、それらを液相で用いることができるか又は固相キャリアーに結合させることができる免疫測定法に用いるのに適している。加えて、これら免疫測定法におけるモノクローナル抗体を種々の方法で検出可能であるように標識することができる。本発明のモノクローナル抗体を用いることができる免疫測定法のタイプの例は、直接又は間接型のいずれかの競合及び非競合免疫測定法である。かかる免疫測定法の例は、放射性免疫測定法(RIA)及びサンドイッチ(免疫測定)法である。本発明のモノクローナル抗体を用いる抗原の検出は、生理学的サンプルでの免疫組織化学的測定法を含む、順向、逆向、又は同時モードのいずれかで作動する免疫測定法を用いて行うことができる。当業者は、不当な実験を要せずに他の免疫測定法を知り、容易に認識できるであろう。

30

**【0040】**

本発明のモノクローナル抗体は多くの異なるキャリアーに結合することができるので、本発明のポリペプチドを含む抗原の存在を検出するのに用いることができる。周知のキャリアーの例には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び変性セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース及び磁鉄鉱が含まれる。キャリアーの性質は、本発明の目的により可溶性であっても不溶性であってもよい。当業者は、モノクローナル抗体を結合するのに適する他のキャリアーを知っているか、又は日常的な実験を用いてそうしたものを探知できるであろう。

40

**【0041】**

当業者に知られている多くの異なる標識及び標識方法がある。本発明に用いることができる標識のタイプの例には、酵素、放射性同位元素、蛍光化合物、コロイド状金属、化学発光化合物、リン光化合物、及び生物発光化合物が含まれる。当業者は、このモノクローナ

50

ル抗体に結合させるのに適する他の標識を知っているか、又は日常的な実験を用いてそうしたものを探知できるであろう。更には、本発明のモノクローナル抗体へのこれら標識の結合は、当業者にとって常識である標準的技術を用いて行うことができる。

【0042】

本発明の目的のために、本発明のポリペプチドに特異的な抗体又は本発明のポリペプチドを含む抗原は、生物学的流体及び組織中に存在している場合に本発明のモノクローナル抗体によって検出することができる。検出可能な量のかかる抗原を含有するあらゆる検体を用いることができる。サンプルは、尿、唾液、脳脊髄液、血液、血清及びそれに類したものの如き液体であっても、又は組織、糞便、及びそれに類したものの如き固体若しくは半固体であっても、別に、組織診に普通に用いられるものの如き固体組織であってもよい。特に好ましいサンプルは血液である。

10

【0043】

より高感度をもたらすことができるもう1つの技術は、低分子量ハプテンへの抗体のカップリングからなる。次いで、これらハプテンを第2反応によって特異的に検出することができる。例えば、アビジンと反応するビオチン、又は特異的抗ハプテン抗体と反応できるジニトロフェニル、ピリドキサル、及びフルオレセインの如きハプテンを用いるのが普通である。

【0044】

この発明で用いる場合“エピトープ”という用語は、本発明のモノクローナル抗体と特異的相互作用ができるあらゆる決定基を含めようとするものである。エピトープ決定基は、通常、アミノ酸又は糖側鎖の如き化学的に活性な分子の表面集合体からなり、通常は特有の三次元構造的特徴、並びに特有の電荷的特徴を有する。

20

【0045】

抗原の *in vivo* 検出に本発明のモノクローナル抗体を用いるに際して、検出可能標識モノクローナル抗体を診断的に有効である量で与える。この“診断的に有効”という用語は、検出可能標識モノクローナル抗体の量が、そのモノクローナル抗体が特異的である本発明のポリペプチドを含む抗原を有する部位の検出を可能にできる十分な量で投与されることを意味する。

【0046】

投与される検出可能標識モノクローナル抗体の濃度は、そのポリペプチドを有する細胞への結合がバックグラウンドに比較して検出できるように十分であるべきである。更に、最良の標的対バックグラウンドシグナル比が得られるように、検出可能標識モノクローナル抗体が循環系から速やかに除かれるのが望ましい。

30

【0047】

一般に、*in vivo* 診断のための検出可能標識モノクローナル抗体の投与量は、個体の年齢、性別、及び疾患の程度の如き要因に依存して変動するであろう。モノクローナル抗体の投与量は、約  $0.01 \sim 500 \text{ mg/m}^2$ 、好ましくは  $0.1 \sim 200 \text{ mg/m}^2$ 、最も好ましくは約  $0.1 \sim 10 \text{ mg/m}^2$  で変動してもよい。かかる投与量は、例えば、多数回注射をするかどうか、抗原荷重、及び当業者によって知られている他の要因に依存して変動してもよい。

40

【0048】

*in vivo* 診断的画像化 (*diagnostic imaging*) については、利用できる検出装置のタイプが所与の放射性同位元素を選択するに際しての主要因である。選んだ放射性同位元素は、所与のタイプの装置について検出可能であるタイプの放射崩壊を有さなければならない。*in vivo* 診断用放射性同位元素を選択するに際してのいま1つの重要な要因は、その放射性同位元素の半減期が、標的による最大取り込み時間でも依然として検出可能であるよう十分に長い、宿主に関して有害な照射が最小限になるよう十分に短いことである。理想的には、*in vivo* 画像化に用いる放射性同位元素は粒子放射を欠くであろうが、従来のカメラにより容易に検出できる  $140 \sim 250 \text{ keV}$  の範囲で多数の光子を発生するであろう。

50

## 【0049】

*in vivo* 診断については、放射性同位元素を中間官能基を用いることによって直接にでも間接にでも免疫グロブリンに結合させることができる。金属イオンとして存在する放射性同位元素をイムノグロブリンに結合させるのに用いられることが多い中間官能基は、ジエチレントリアミン・五酢酸 (DTPA) 及びエチレンジアミン・四酢酸 (EDTA) 及び類似の分子の如き2官能性キレート剤である。本発明のモノクローナル抗体に結合することのできる金属イオンの典型的な例は、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{72}\text{As}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 、及び  $^{201}\text{Tl}$  である。

## 【0050】

本発明のモノクローナル抗体は、磁気共鳴画像化 (MRI) 又は電子スピン共鳴 (ESR) におけるように、*in vivo* 診断の目的に常磁性同位元素で標識することもできる。一般に、診断的画像を可視化するあらゆる従来の方法を用いることができる。通常、及び陽電子放出性放射性同位元素が、カメラ画像化及びMRI用常磁性同位元素に用いられる。かかる技術に特に有用な元素には、 $^{157}\text{Gd}$ 、 $^{55}\text{Mn}$ 、 $^{162}\text{Dy}$ 、 $^{52}\text{Cr}$ 、及び  $^{56}\text{Fe}$  が含まれる。

## 【0051】

本発明のモノクローナル抗体は、動物におけるEBV関連疾患の改善の経過を追跡するために *in vitro* 及び *in vivo* で用いることができる。従って、例えば、本発明のポリペプチドを含む抗原を発現する細胞の数の増加若しくは減少又は種々の体液中に存在するかかる抗原の濃度の変化を測定することによって、EBV関連疾患の改善を目指した特定の療法が有効であるか否かを確認することが可能になるであろう。

## 【0052】

この“改善”という用語は、治療を受けている動物におけるEBV関連疾患の好ましくない影響を軽減することを意味する。“治療的に有効”という用語は、用いるモノクローナル抗体又はポリペプチドの量がEBV関連疾患を改善するのに十分な量であることを意味する。

## 【0053】

本発明で用いる場合“免疫原的有効量”という用語は、例えば、本発明のポリペプチドを含む抗原に結合するであろう抗体の産生を刺激することによって、EBV関連疾患に対する改善的免疫応答を誘発するのに必要なポリペプチドの量のことである。

## 【0054】

本発明のポリペプチドに対する免疫応答の誘発に際しては、そのポリペプチドを、注射、急速注入、鼻咽頭吸収、皮膚吸収により非経口で、及び経口で投与することができる。非経口投与用製剤には、滅菌した水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、及び乳剤が含まれる。非水性溶剤の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油の如き植物油、及びオレイン酸エチルの如き注射可能な有機エステルである。閉鎖包帯のための製剤上の担体を用いて、皮膚透過性を高めて抗原吸収を増進させることができる。経口投与のための液体製剤は、一般に、その液体投与製剤を含有するリポソーム溶液を含む。このリポソームを懸濁するのに適する製剤には、精製水の如き当該技術分野で普通に用いられる不活性希釈剤を含有する乳剤、懸濁剤、溶液剤、シロップ剤、及びエリキシル剤が含まれる。不活性希釈剤の他に、かかる組成物は、アジュバント、湿潤剤、乳化剤及び懸濁剤、及び甘味剤、矯味剤、及び香料も含むことができる。

## 【0055】

本発明のポリペプチドを含有する抗原性製剤がアジュバントを含むのも可能である。アジュバントは、特異的免疫応答を非特異的に増大させるために用いられる物質である。普通、免疫系に供給する前にアジュバントと抗原を混合するか、又は免疫感作される動物の同一部位に別々に供給する。アジュバントはそれらの組成に基づいて幾つかのグループに大まかに分けることができる。これらグループには、油性アジュバント (例えば、フロイント完全及び不完全)、無機塩 (例えば、 $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$ 、 $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$ 、シリカ、ミョウバン、 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

、カオリン、及び炭素)、ポリヌクレオチド(例えば、ポリIC及びポリAU酸)、並びに一定の天然物(例えば、結核菌からのワックスD、及びコリネバクテリウム・パーブム(parvum)、百日咳菌、及びブルセラ属のメンバーに見出される物質)が含まれる。

【0056】

動物を免疫感作するのに用いるポリペプチド抗原の物理的形態は、凝集体であっても非凝集体であってもよい。凝集ポリペプチドは、例えば、グルタルアルデヒド又は他の架橋剤での処理の如き普通の技術により、非凝集ポリペプチドから作ることができる。次いで、こうして誘導された凝集ポリペプチドは、活性免疫反応を誘発するのに有効なEBV関連疾患改善組成物の製造用に用いることができるであろう。しかしながら、凝集体又は非凝集体のいずれで動物を免疫感作するかに関わらず、これら両方の形態のポリペプチドは、このポリペプチドに対する抗体を産生させる筈である。従って、これら抗ポリペプチド抗体を、例えば、検体中のポリペプチドの存在を検出するためのキット中におけるように、診断に用いることが可能である。

10

【0057】

上記のように、本発明のポリペプチド抗原製剤は、このポリペプチドのエピトープ決定基に結合するであろう抗体の産生を誘発するのに用いることができる。ポリペプチドに対する抗体の産生を増進する特に有用な方法は、本発明のポリペプチド抗原製剤で初回免疫感作してから後の免疫感作を行う方法である。多数回免疫感作法を用いる場合は、免疫感作の時期を定める多くの異なる技術が存在する。本発明の抗原性製剤を1回より多く用いて、免疫感作動物により発現される免疫グロブリンレパートリーの発現のレベル及び多様性を向上させることが可能である。典型的には、多数回免疫感作を行う場合には、それらには1~2ヶ月の間隔をあけるだろう。一般に、動物に投与されるポリペプチドの量は、年齢、状態、性別及び疾患の程度の如き要因に依存して変動するであろう。そして、もし他の変動要因があっても、当業者により調節され得る。本発明の抗原性ポリペプチド製剤は1回投与としてでも多数回投与としてでも投与でき、投与当たり約50~約500mg、より好ましくは投与当たり約50~約300mg、最も好ましくは投与当たり約100~約200mgのポリペプチド抗原で変動させることができる。本発明のモノクローナル抗体は、本発明のモノクローナル抗体と反応性のエピトープを有するEBV関連疾患を有する動物における免疫療法に、単独で用いてもエフェクター細胞(Douillardら, Hybridoma, 5 (Supp. 1: S139, 1986)と組み合わせて用いてもよい。

20

30

【0058】

免疫療法に用いる場合、本発明のモノクローナル抗体を治療剤で標識しなくても標識してもよい。これら治療剤は、本発明のモノクローナル抗体と直接にでも間接にでもカップリングすることができる。間接カップリングの一例は、スペーサー部分の使用によるものである。これらスペーサー部分は不溶性であっても可溶性であってもよく(Dienerら, Science, 231: 148, 1986)、標的部位においてモノクローナル抗体分子から医薬品放出ができるように選択することができる。免疫療法用に本発明のモノクローナル抗体にカップリングさせることのできる治療剤の例は、医薬品、放射性同位元素、レクチン、及びトキシンである。

40

【0059】

本発明のモノクローナル抗体に結合できる医薬品には、非タンパク質医薬品のみならずタンパク質医薬品も含まれる。この“非タンパク質医薬品”という用語は、古典的に医薬品と言われている化合物、例えば、マイトマイシンC、ダウノルピシン、及びビンブラスチンを包含する。

【0060】

本発明のモノクローナル抗体を標識してもよいタンパク質医薬品には、免疫調節剤及び他の生物学的応答調節剤が含まれる。この“生物学的応答調節剤”という用語は、例えば、本発明のモノクローナル抗体が特異的である本発明のポリペプチドを含むEBV抗原を有

50

するEBV関連疾患細胞の破壊を増進するようなやり方で、免疫応答の調節に關与する物質を含めようとするものである。免疫応答調節剤の例には、リンフォカインのような化合物が含まれる。リンフォカインには、腫瘍壊死因子、インターロイキン1、2及び3、リンフォトキシン、マクロファージ活性化因子、遊走阻止因子、コロニー刺激因子、及びインターフェロンが含まれる。本発明のモノクローナル抗体を標識してもよいインターフェロンには、 $\alpha$ -インターフェロン、 $\beta$ -インターフェロン、及び $\gamma$ -インターフェロン及びそれらのサブタイプが含まれる。

#### 【0061】

免疫療法用に放射性同位元素を結合させた本発明のモノクローナル抗体を用いるに際しては、白血球分布並びにアイソタイプ安定性及び放射性のような要因に依っては、一定のアイソタイプが他のものよりも好ましいといえる。所望により、腫瘍細胞分布は、上記の *in vivo* 診断技術により評価することができる。悪性度に依っては、あるエミッターが他のものよりも好ましいといえる。一般に、 $\alpha$ 及び $\beta$ 粒子放出性の放射性同位元素が免疫療法に好ましい。例えば、動物が中実の腫瘍病巣を有する場合は、 $^{90}\text{Y}$ の如き数ミリメートルの組織を透過できる高エネルギーエミッターが好ましいといえる。一方、悪性腫瘍が白血病の場合のような単純な標的細胞からなる場合は、 $^{212}\text{Bi}$ の如き短レンジの高エネルギーエミッターが好ましいといえる。治療目的で本発明のモノクローナル抗体に結合させてもよい放射性同位元素の例は、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{212}\text{Pb}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{109}\text{Pd}$ 、及び $^{188}\text{Re}$ である。

10

20

#### 【0062】

レクチンは、通常は植物原料から単離されるタンパク質であって、特異的糖部分に結合する。多くのレクチンは細胞の凝集及びリンパ球の刺激もできる。しかしながら、リシン(*ricin*)は、免疫療法に用いられてきた毒性レクチンである。これは、好ましくは、毒性の原因になっているリシンのペプチド鎖をこの抗体分子に結合させて、その毒性作用の部位特異的送達を可能にすることによって行われる。

#### 【0063】

トキシンは、植物、動物、又は微生物により作られる有毒物質であって、十分量でしばしば致命的となる。ジフテリアトキシンは、*コリネバクテリウム・ジフテリア*によって産生される治療に用いることができる物質である。このトキシンは、適当な条件下で分離できる $\alpha$ 及び $\beta$ サブユニットからなる。その毒性A成分は抗体に結合することができるので、本発明のモノクローナル抗体が特異的であるEBV抗原保有細胞への部位特異的送達に用いることができる。本発明のモノクローナル抗体にカップリングさせてもよい他の治療剤は、当業者により知られているか、又は容易に探知され得る。

30

#### 【0064】

本発明の標識又は非標識モノクローナル抗体は、上記の如き治療剤と組み合わせて用いることもできる。特に好ましいのは、本発明のモノクローナル抗体及び免疫調節剤及び他の生物学的応答調節剤を含む治療的組み合わせである。かくして、例えば、本発明のモノクローナル抗体を $\alpha$ -インターフェロンと組み合わせて用いることができる。この治療法は、モノクローナル抗体反応性抗原の発現を増やすことによってEBV含有細胞のモノクローナル抗体指向性を高める(*Greinerら, Science, 235: 895, 1987*)。また、本発明のモノクローナル抗体は、例えば、 $\alpha$ -インターフェロンと組み合わせて用い、それによってエフェクター細胞によるFcレセプターの発現を活性化及び増やすことができるだろう。このことは、そのエフェクター細胞へのモノクローナル抗体の結合を増進して標的腫瘍細胞を死滅させるだろう。当業者は、本発明のモノクローナル抗体の効力を高める所期のエフェクター機能を創り出す種々の生物学的応答調節剤からを選択できるであろう。

40

#### 【0065】

本発明のモノクローナル抗体をここに記載したものの如き種々の治療剤と組み合わせて用いる場合、そのモノクローナル抗体と治療剤は、通常は実質的に同時に投与される。この

50

“実質的に同時に”という用語は、このモノクローナル抗体と治療剤が時間に関して適度に接近して一緒に投与されることを意味する。通常、モノクローナル抗体より先に治療剤を投与するのが好ましい。例えば、モノクローナル抗体より1～6日間先に治療剤を投与してもよい。治療剤の投与は、例えば、腫瘍の性質、患者の状態及びその治療剤の半減期の如き要因に依って、毎日であっても、何らかの他の間隔をあけて行ってもよい。

【0066】

本発明のモノクローナル抗体を用いると、ここに記載した全ての特徴を組み合わせた治療法をデザインすることが可能である。例えば、所与の状況において、単一又は複数の治療剤を投与してから、本発明のモノクローナル抗体をエフェクター細胞及び同じか又は異なる単一又は複数の治療剤と組み合わせて投与するのが望ましいといえる。かくして、白血病又はリンパ腫の患者を、まず - インターフェロン及びインターロイキン - 2 を毎日3～5日間投与し、そして5日目に本発明のモノクローナル抗体をエフェクター細胞並びに - インターフェロン及びインターロイキン - 2 と組み合わせて投与することにより治療するのが望ましいといえる。

10

【0067】

リポソームをその膜内にある本発明のモノクローナル抗体と共に用いて、EBV関連疾患細胞の領域にこのリポソームを特異的に送達することも可能である。これらリポソームは、それらがモノクローナル抗体に加えて上記の如き免疫治療剤を含有するように作ることができ、そうすればそれら治療剤は腫瘍部位で放出されるであろう (Wolf ら, Biochemical et Biophysical Acta, 802:259, 1984)。

20

【0068】

本発明のモノクローナル抗体の投与量の範囲は、EBV関連疾患の症状が改善される所期の作用をもたらすのに十分多い量である。この投与量は、望ましくない交叉反応、アナフィラキシー反応、及びそれに類したものの如き副作用を起こすほど多くあるべきではない。一般に、投与量は、患者の年齢、状態、性別及び疾患の程度で変動するであろうが、当業者が決定することができる。投与量は、複雑な場合には個々の医師が調節してもよい。投与量は、毎日1又は2以上の投与で1日又は数日間、約0.1～約2000mg/kg、好ましくは約0.1～約500mg/kgで変動してもよい。一般に、本発明のモノクローナル抗体を治療剤と併せて投与する場合には、in vivo 免疫診断的画像化に用いる量に比較して、より少ない投与量を用いることができる。

30

【0069】

本発明のモノクローナル抗体は、注射により又は時間をかけて徐々に灌流することにより非経口で投与することができる。本発明のモノクローナル抗体は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、洞内、又は経皮で、単独で投与してもエフェクター細胞と組み合わせて投与してもよい。非経口投与用製剤には、滅菌した水性又は非水性の溶液剤、懸濁剤、及び乳剤が含まれる。非水性溶剤の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油の如き植物油、及びオレイン酸エチルの如き注射可能な有機エステルである。製剤上の水性担体には、食塩水及び緩衝媒質を含む水、アルコール/水性の溶液、乳濁液又は懸濁液が含まれる。非経口用賦形剤には、塩化ナトリウム溶液、リンガールのデキストロース、デキストロース、及び塩化ナトリウム、乳酸加リンガー液、又は固定油が含まれる。静脈内用賦形剤には、流体及び栄養補液、電解質補液(例えば、リンガールのデキストロースを主成分としたもの)、及びそれらに類したものが含まれる。保存剤及び他の添加剤、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、及び不活性ガス、及びそれらに類したものの如きものが存在してもよい。

40

【0070】

本発明は、本発明のポリペプチド、又はモノクローナル抗体を含む医薬品又は医薬組成物を製造する方法であって、該医薬品がEBV関連疾患の治療に用いられる方法にも関する。

【0071】

50

E A - D , 5 0 . 1 0 ペプチド又は抗 E A - D ペプチド抗体とのサンプルの反応性は、好ましくは、鼻咽頭癌及び感染性単核球症に関係している。同様に、E A - R , 1 7 . 1 ペプチド又は抗 E A - R ペプチド抗体との反応性は、好ましくは、リンパ腫に関係している。これら特定のペプチド及びそれらの対応するモノクローナル抗体は、特定の疾患状態と関係する E A - D 及び E A - R 移行を検出するのに特に有用である。

【 0 0 7 2 】

以上の開示は本発明を一般的に説明するものである。以下の具体的な実施例を参照することによってより完全な理解を得ることができる。それらは、説明することだけを目的として示されたものであって、本発明の範囲を限定することを意図したものではない。

【 0 0 7 3 】

【 実施例 】

実施例 1 p 1 7 及び p 5 0 ポリペプチドの合成

p 1 7 タンパク質上の潜在的 T 細胞エピトープを Berzofsky のアルゴリズム ( AMPHI program ) ( 1 9 8 7 ) を用いて同定した。このアルゴリズムは、T細胞が、両親媒性でありかつヘリックス構造を形成するペプチドと優先的に相互作用することを前提とする。これら特徴に基づき、p 1 7 及び p 5 0 タンパク質上の候補エピトープをマッピングして、この分子全体に散在していることが分かった。最高の両親媒性評点を有するエピトープを合成してこの研究に用いた。p 1 7 上の 8 の予測エピトープから、最高評点を有する 3 つのエピトープを、これら推定エピトープをコードするヌクレオチド配列に基づく 1 5 アミノ酸残基として合成した ( 図 1 , 表 1 ) 。ペプチド合成は、Applied Biosystems ABI 430-A 自動ペプチド合成装置で Merrifield ( 1 9 6 3 ) の固相法を用い、記載された通りにヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 / ジシクロヘキシルカルボジイミド活性化を用いて行った ( Curtis , L . K . ら , J . Biol . Chem . , 2 6 3 : 1 3 7 7 9 - 1 3 7 8 5 , 1 9 8 8 ) 。生成したペプチド樹脂を 1 0 % アニソール / フッ化水素で - 4 で 1 時間処理した ( Leonard , J . ら , J . Am . Chem . Soc . , 8 9 : 1 8 1 - 1 8 2 , 1 9 6 7 ) 。このペプチド試料 ( 1 0 μ g / 分析 ) を VYDAC C 1 8 カラムを用いて HPLC により分析した。出発緩衝液は、水中の 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 ( 溶媒 A ) とアセトニトリル中の 0 . 1 % トリフルオロ酢酸 ( 溶媒 B ) を含むものであった。溶媒 B を 2 0 分間に 2 0 ~ 7 0 % 勾配で増加させながら 4 0 で分析した。2 1 4 nm の吸収で分離を追跡した。このペプチドの分取精製に、WATERS AUTO 5 0 0 分取 HPLC ( 5 0 × 2 5 0 mm VYDAC C 1 8 カラム , 1 5 ~ 2 0 μ m ) でのクロマトグラフィーを、分析クロマトグラフィーについて記載したのと同じ条件で用いた。全てのペプチドのアミノ酸組成を、Beckman 6 3 0 0 高速分析装置と内部標準とで、加水分解後に測定した。全てのペプチドを凍結乾燥して減圧下で保存した。p 5 0 ポリペプチドの合成は、p 1 7 について上に記載した通りに行った。

【 0 0 7 4 】

【 表 1 】

10

20

30

表 1

17 K d 早期抗原 (E A - R) 領域及び 5 0 K d 早期抗原  
(E A - D) 領域からの合成ペプチドのアミノ酸配列

ペプチド	アミノ酸配列	配 置 <sup>a</sup>	
		ゲノミック	ペプチド
p17.1	ETFTETWNRFIHTE	54.562-54.604	62-76
p17.2	GMLEASEGLDGWIHQ	54.766-54.808	130-144
p17.3	HQQGGWSTLIEDNIP	54.805-54.847	143-157
p50.10	KQKHPKVKQAFNPL	81.063-81.108	---
p17.1 <sup>b</sup>	QNSETFTETWNRFIHTEHVD	54.553-54.613	59-79
p50.10 <sup>b</sup>	ARQKQKHPKVKQAFNPLI	81.054-81.111	---

10

20

<sup>a</sup> Baerら (Nature, 310:207, 1984) のプロトタイプEBV (B 95.8) DNA配列中のヌクレオチドの予測位置に基づく配置

<sup>b</sup> 数個のアミノ末端及びカルボキシ末端アミノ酸の付加による p 17.1 及び p 50.10 それぞれの伸長体

## 【 0 0 7 5 】

実施例 2 合成ペプチドに対する P B L の増殖応答

細胞 P<sub>3</sub> HR - 1 細胞系、つまりアフリカバーキットリンパ腫 (A B L) 生検材料を  
これら実験における E A - R 複合体の天然 p 17 成分の供給源とした (H i m u n a ,  
Y . ら , J . V i r o l . , 1 : 1 0 4 5 - 1 0 5 1 , 1 9 6 7) 。これら  
細胞を 1 0 % 熱不活性化 ( 5 6 、 3 0 分間 ) ウシ胎児血清 ( F C S ) 、 2 m M L - グ  
ルタミン及び 5 0 μ g / m l ゲンタマイシンを補充した R P M I 1 6 4 0 培地の存在下で  
3 7 °C で生育させた。これら細胞を新鮮な培地で 5 × 1 0 <sup>5</sup> 細胞 / m l の細胞濃度に希  
釈することによって 3 ~ 4 日毎に継代した。 30

## 【 0 0 7 6 】

抗原を作るために、P<sub>3</sub> HR - 1 細胞を 2 0 n g / m l T P A ( 1 2 - O - テトラデカ  
ノイル - フォルボール - 1 3 - アセテート ) 及び 3 m M 酪酸ナトリウムで 4 8 時間活性化  
した。この操作は、一般に、免疫蛍光測定法により測定して 7 0 % を越える細胞内でこの  
抗原の発現の誘発をもたらす ( P e a r s o n ら , V i r o l . , 1 6 0 : 1 5  
1 - 1 6 1 , 1 9 8 7) 。 40

## 【 0 0 7 7 】

E L I S A p 1 7 、 p 5 0 又は合成ペプチドに対して特異的な抗体を測定するための E  
L I S A を以前に詳細に記載されたようにして行った ( L u k a ら , J . I m m u  
n o l . M e t h o d s , 6 7 : 1 4 5 - 1 5 6 , 1 9 8 4) 。異なる抗原濃度の  
アリコート を 0 . 5 M N a <sub>2</sub> C O <sub>3</sub> 緩衝液 ( p H 9 . 5 ) で希釈して、ポリスチレン  
マイクロタイタープレート ( L i n b r o ) 内のウェルに添加し、そしてこれらプレート  
を 4 °C で一晩インキュベートした。インキュベート時間が経過した後、これらプレートを、  
0 . 0 5 % ツィーン 2 0 、 5 0 m M N a C l 及び 1 0 0 m g / l アルブミン ( S 50

igma) を含有するトリス - HCl (pH 7.4) で5回洗浄し、そして室温で20分間乾燥した。これらプレート異なる抗EA-R又はEA-D抗体陽性ヒト血清及びp17又はp50に対するモノクローナル抗体でスクリーニングして、血清学的研究に用いる抗原の最適濃度を特定した。アルカリ性ホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG (Sigma) 又はヤギ抗マウスIgG (Sigma) を指示系として用いた。

#### 【0078】

天然p17、p50又は合成ペプチドに対する抗体についてヒト血清を試験するために、ELISA緩衝液で血清を1:10に希釈し、最適濃度の抗原をコーティングしたウェルに0.1ml容量で添加し、そしてこれらプレートを室温で60分間インキュベートした。ELISA緩衝液で4回洗浄した後、ELISA緩衝液中のアルカリ性ホスファターゼ標識ヤギ抗ヒトIgG 100µlを各ウェルに添加し、そしてこれらプレートを室温で1時間インキュベートした。緩衝液中で4回以上洗浄してから、1mM MgCl<sub>2</sub> 及び0.1mM ZnCl<sub>2</sub> を含有する1Mジエタノールアミン緩衝液(pH 10.4)中に1mg/mlのSigmaアルカリ性ホスファターゼ基質を溶解し、次いで100µlのこの混合液を各ウェルに添加することによって酵素反応を行った。反応を37で30分間進行させてから、プレートを直接にマイクロプレートリーダー、TITERTEK MULTISKAN MC (Flow) で420nmでスクリーニングした。抗体陰性血清で認められたバックグラウンドの2倍である0.1を越える読み取り値を陽性反応と考えた。

#### 【0079】

天然p17の精製 p17を発現する細胞を食塩加リン酸緩衝液(PBS)で2回洗浄し、0.5%NP-40及び0.5%デオキシコール酸ナトリウムを0.02Mトリス塩酸(pH 7.4)、0.15M NaCl、1mM -メルカプトエタノール及び10mMフッ化フェニルメチルスルホニル(PMSF)中に含有する抽出緩衝液中に再懸濁し、そして各20秒間で5サイクル音波処理した。次いで、Beckman JA-20ローターで40,000×gで4で60分間遠心分離することによってこの抽出液を清澄にして、生成した細胞不含上澄み液をp17に対するモノクローナル抗体で調製したアフィニティカラムに通した(Pearsonら, Cancer, 51:260-268, 1983)。このカラムを5容量の抽出緩衝液で1回洗浄してから洗浄剤なしの緩衝液で1回洗浄した後、結合したp17を20mM トリス-HCl(pH 7.4)で緩衝した3M MgCl<sub>2</sub> で溶離させた。これら溶出物をウェスタンブロットティング及びELISAにより特異性について試験し、そしてELISAにより特異性抗原活性について滴定した(Lukaら, J. Immunol. Methods, 67:145-156, 1984)。タンパク質濃度はBio-Rad測定法を用いて測定した。次いで、p17含有溶離物を100容量の10mMトリス-HCl(pH 7.4)、150mM NaClに対して透析した後、10%ヒトAEBV抗体陰性血清を含有するRPMI 1640培地に対して透析した。この抗原をアリコートに分けて異なる免疫学的測定法に用いるまで-70で保存した(p50の精製は、p17について上に記載した通りに行った)。

#### 【0080】

増殖反応測定法 陰性p17又はp50ポリペプチド又は合成ペプチドを用いるT細胞増殖反応測定法を以前に詳細に記載された通りに行った(Pothenら, Int. J. Cancer, 49:656-660, 1991)。簡単に説明すると、血清陽性ドナーからの末梢血リンパ球(PBL)をFICOLL-HYPaque勾配で単離し、血清陰性ドナーからの10%熱不活性化ヒトA+血清を含有するRPMI 1640培地中に再懸濁した。次いで、細胞(0.1ml当たり $1 \times 10^5$ )を96ウェル丸底組織培養プレート(Costar, Cambridge, MA)中の各ウェルに添加した。異なる抗原試料を0.1ml容量で3ウェルずつに添加して、それらプレートを37で5日間インキュベートした。3H-チミジン(5Ci/mM)を1µCi/ウェルの濃度で培養の最後の4時間にわたって添加した。次いで、それら細胞を多

用途サンプル採取器で採取し、Beckman Model LS 3801 液体シンチレーションカウンターを用いて  $^3\text{H}$ -チミジン取り込みを測定した。試験抗原についての刺激指数を、試験抗原についての分当たりの平均カウント(CPM)を培地コントロールウエルの平均CPMで割ることによって計算した。

【0081】

無症候性EBV感染個体からのPBLを、陰性p17の存在下で増殖することを前もって示したリンパ球を用いる増殖反応測定法により、これら3種のp17合成ペプチド(表1)のいずれかに対する応答について試験した(Pothenら, Int. J. Cancer, 49:656-660, 1991)。異なる濃度の合成ペプチドをこのPBLと5日間インキュベートしてから、 $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みにより増殖を検査した。抗VCA陽性、抗EA陽性ドナーからのPBLを用いるこの初回実験からの結果を表2に示す。活性化P<sub>3</sub>HR-1細胞から精製した天然p17は、この実験で15.8のS.I.を示した。50及び12.5 µg/mlの濃度では、p17.1ペプチドも有意な増殖応答を誘発した(それぞれ10.8及び4.7のS.I.)。他の合成ペプチドのいずれも試験した濃度で増殖応答を誘発しなかった。EBV抗体陰性個体からのPBLもいずれの合成ペプチドにも応答しなかった。

10

【0082】

抗VCA陽性抗EA抗体陰性個体からのPBLも、これら3種の合成ペプチドでの増殖反応測定法で検査した。これら結果を図2に示す。やはり、全ての3PBL試料は、最高濃度のp17.1に3.5~11の範囲のS.I.で応答した。これら試料のうち2種(図2A、C)も、より低い濃度の抗原の存在下でそれぞれ3及び5のS.I.で増殖した。これらPBL試料のどれもp17.2及びp17.3の存在下では増殖しなかった。これら実験は、EBV感染個体からのTリンパ球が、EAに対する抗体の存在に関わらず、p17上の優勢エピトープを認識することを証明した。

20

【0083】

【表2】

表 2  
EBV感染ドナーからの末梢血リンパ球の  
p17合成ペプチドに対する増殖応答

抗原 <sup>1</sup>	濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	<sup>3</sup> H-チミジン取り込み (cpm + S.D.)	S. I.
-	-	147 ± 78	-
PHA	10	391567 ± 55800	-
天然 p17 <sup>2</sup>	35	2327 ± 73	15.8
p17.1	50	1584 ± 37	10.8
	12.5	689 ± 88	4.7
	3.12	263 ± 57	1.8
p17.2	50	277 ± 175	1.9
	12.5	278 ± 58	1.9
	3.12	157 ± 23	1.1
p17.3	50	190 ± 47	1.3
	12.5	132 ± 3	0
	3.12	194 ± 65	1.3

10

20

<sup>1</sup> 抗原を $1 \times 10^5$  リンパ球と5日間インキュベートした。分当たりのカウント (cpm) ±標準偏差 (S.D.) は3重に行った培養から決定した。

30

<sup>2</sup> P<sub>3</sub> HR-1細胞から免疫アフィニティクロマトグラフィーにより精製した。

【0084】

実施例3 CD4<sup>+</sup> 及びCD8<sup>+</sup> 亜集団へのPBLの分画

T細胞亜集団について富化したPBLを、抗体/補体媒介細胞障害により特定集団を減らすことによって単離した。CD4<sup>+</sup> 細胞は抗CD8抗体及びウサギ補体でCD8<sup>+</sup> 細胞を溶解することによって調製し、CD8<sup>+</sup> T細胞亜集団は抗CD4抗体及びウサギ補体でCD4<sup>+</sup> 細胞を溶解することによって富化した。

40

【0085】

PBLを2mM L-グルタミン、25mM HEPES、及び10 $\mu\text{g/ml}$  ゲンタマイシンを含有するRPMI-1640培地(HEPES培地)中に $20 \times 10^6$  細胞/mlの濃度で再懸濁した。T細胞特異性MAb、つまりOKT4又はOKT8 (Ortho Diagnostics Inc.) をこれら細胞に最適濃度(最大の溶解が得られるように滴定によって前もって測定しておいた)で添加して、氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞を新鮮なHEPES培地で洗浄し、そしてHEPES培地で適当な濃度(最大の抗体特異的細胞障害が得られるように前もって測定しておいた)に希釈した乳児ウサギ補体 (Pel-Freez Clinical Systems)

50

中で  $10 \times 10^6$  細胞/ml で再懸濁した。37 水浴中で 15 分毎に緩やかに混合しながら細胞を 45 分間インキュベートした。インキュベート後、細胞を HEPES 培地で徹底的に洗浄し、少量の細胞 ( $1 \sim 2 \times 10^6$ ) を取って以下に記載するようにして行ったフロー・サイトメトリー分析用に染色した。各ドナー内の  $CD4^+$  及び  $CD8^+$  のもとのパーセンテージを確認するために、抗体及び補体のいずれともインキュベートしていない PBL も並行してフロー・サイトメトリー用に処理した。>95% 純度及び生存度をもたらす集団を増殖反応測定法に用いた。

#### 【0086】

血清陽性ドナーからの  $CD4^+$  又は  $CD8^+$  富化 PBL を用いる増殖反応測定法を上記のように合成ペプチドの濃度を変動させて行った。しかしながら、これら実験においては更に照射した自家 PBL を抗原提示細胞 (APC) として  $5 \times 10^5$  APC 対  $1 \times 10^5$   $CD4^+$  又は  $CD8^+$  細胞の比率で用いた。

10

#### 【0087】

FACS 分析 上のインキュベーション後にとった細胞 ( $1 \sim 2 \times 10^6$ ) を、フルオレセインイソチオシアネート結合抗 *leu3a* ( $CD4$  マーカー) 及びフィコエリトリン結合抗 *leu2a* ( $CD8$  マーカー) を含有する  $20 \mu l$  の SIMULTEST 試薬 (Becton-Dickinson) で 45 分間染色した。細胞を徹底的に洗浄して、5% FCS 及び 0.02% ナトリウムアジドを含む RPMI-1640 中に再懸濁し、そして細胞選別機 (FACSTAR Plus, Becton-Dickinson) で分析した。

20

#### 【0088】

$CD4^+$  及び  $CD8^+$  T 細胞亜集団の両方が p17.1 に対して応答していたかどうかを確認するために、2 ドナーからのリンパ球をこれら 2 種の亜集団に分け、この増殖反応測定法に用いた。結果を図 3 に示す。両ドナーからの PBL は、この実験で試験した最高濃度 (ドナー A については  $100 \mu g/ml$  でありドナー B については  $50 \mu g/ml$ ) の p17.1 の存在下で増殖した。ドナー A からの  $CD4^+$  亜集団も異なる濃度の p17.1 に対して 5.3 もの S.I. で活発に応答した。このドナーからの  $CD8^+$  亜集団はこの合成ペプチドに対して応答しなかった。この応答パターンは、もう 1 つの血清陽性ドナーから分画した  $CD4^+$  及び  $CF8^+$  T 細胞でも認められた。対照的に、ドナー B からの  $CD4^+$  及び  $CD8^+$  T 細胞亜集団の両方が p17.1 に対して応答し、 $CD8^+$  亜集団は試験した最高抗原濃度 ( $50 \mu g/ml$ ) で 3 を越える S.I. を示した。従って、これら結果は、 $CD4^+$  及び  $CD8^+$  T 細胞の両方がこの p17 エピトープを認識したことを示した。

30

#### 【0089】

##### 実施例 4 p17 合成エピトープに対する血清学的応答

p17 合成エピトープとの血清学的反応性を測定するための研究をデザインした。この目的のために、87 抗 EA 抗体陽性血清 (力価 > 160) を前もって測定した p17 合成ペプチドの最適濃度 ( $2 \mu g$  / ウェル) に対して ELISA で試験した。これら血清は、ガーナ・バーキット腫瘍プロジェクトの間に集めたアフリカバーキットリンパ腫 (ABL) の 28 の患者から、及び中度大細胞又は高度非ホジキンリンパ腫 (NANHL) の 28 の北アメリカ人患者から得た。これらドナーには、HIV 陽性及び HIV 陰性個体の両方が含まれていた。加えて、31 の北アメリカ鼻咽頭癌 (NANPC) 患者からの血清をこの研究で調べた (Pearson, G. R. ら, Cancer, 51: 260-268, 1983)。血清学的反応の EA 特異性を確認するために、これら血清での結果を 23 VCA 及び EA 抗体陰性血清及び 30 VCA 抗体陽性、EA 抗体陰性血清での結果と比較した。結果を図 4 に示す。T 細胞増殖結果と対照的に、3 種全ての合成ペプチドが程度のバラツキはあるものの EA 抗体陽性血清と反応し、p17.1 がやはり優勢エピトープであった。約 60% の抗 EA 陽性血清が p17.1 と、48% が p17.2 と、そして 23% が p17.3 と反応した。これら血清学的結果の抗 EA 特異性は、これら 3 種いずれかの合成ペプチドとのいずれかの 53 抗 EA 抗体陰性血清の反応性の欠如によっ

40

50

て確認された。従って、これら結果により p 17 上の 3 種の B 細胞エピトープが同定された。

【 0 0 9 0 】

幾つかの抗 E A 抗体血清がこれら合成ペプチドと反応するのになぜ他のものは反応しないのかを確認するために、血清ドナーに応じてこれらデータを解析した。これら結果を図 5 に示す。顕著な特異性が、正常では抗 E A - D 陽性 N P C に対立するものとして彼らの血清中に抗 E A - R 抗体を有するリンパ増殖性疾患の患者で認められた。A B L 患者からの血清の 7 1 % 及び N A N H L 患者からの血清の 9 3 % が p 1 7 . 1 と反応し、これは北アメリカ人 N P C 患者からの血清の 2 3 % に対立するものとなった。類似の特異性が p 1 7 . 2 及び p 1 7 . 3 で認められた。これら結果は、リンパ増殖性疾患の患者の血清中の抗 E A - R 抗体を測定するための 1 又は 2 以上のこれら合成ポリペプチドの潜在的価値を証明したものであり、表 3 に纏めた。

10

【 0 0 9 1 】

【 表 3 】

表 3

17Kd EA-R合成ペプチドとの血清反応性のまとめ

血清ドナー <sup>1</sup>	陽性数/試験数 (%)		
	p 17.1	p 17.2	p 17.3
正常 (VCA-EA-)	0/23(0)	0/23(0)	0/23(0)
正常 (VCA+EA-)	0/30(0)	0/30(0)	0/30(0)
リンパ腫 (合計)	46/56(82)	36/56(64)	16/56(29)
a) パーキットリンパ腫 (アフリカ人)	20/28(71)	13/28(46)	9/28(32)
b) 非ホジキンリンパ腫 (北アメリカ人)	26/28(93)	23/28(82)	7/28(25)
鼻咽頭癌 (北アメリカ人)	7/31(23)	6/31(19)	4/31(13)

20

30

<sup>1</sup> 全てのリンパ腫及び鼻咽頭癌血清ドナーは、免疫蛍光測定法により測定して > 160 の E A に対する抗体力価を有した。これら血清は、E L I S A により測定して、P<sub>3</sub> H R - 1 細胞から精製した天然 17 K d E A - R タンパク質に対する抗体につ

40

いても陽性であった。

【 0 0 9 2 】

実施例 5 E A - D 領域からの p 5 0 . 1 0

E B V の E A - D 領域内に見出される 5 0 K d タンパク質は、5 0 . 1 0 と呼ばれる優勢エピトープを含有する。このエピトープは、B a e r らの前記文献 ( 実施例 1 の表 1 を参照のこと ) のプロトタイプ E B V ( B 9 5 . 8 ) D N A 配列に基づき、E B V ゲノム上で 8 1 . 0 6 3 ~ 8 1 . 1 0 8 に位置する。実施例 1 に記載した方法に従い、5 0 . 1 0 の合成ペプチドを調製した。このエピトープの合成ペプチドのアミノ酸配列は、

50

【 0 0 9 3 】

【 化 1 】

KQKHPKVKQAFNPL である。

A      B

【 0 0 9 4 】

上に下線を引いた部分 A を含む 8 1 . 0 3 6 ~ 8 1 . 0 7 8 からのエピトープの領域は感染性単核球症 ( I M ) 血清と弱い反応性を示すに過ぎず、部分 B を含有する 8 1 . 0 8 1 ~ 8 1 . 1 2 0 からの領域は I M 血清との反応性を示さない。全縁 5 0 . 1 0 ペプチドを I M 血清と処理した場合には、この血清の 2 4 / 3 2 又は 7 5 % が E A - D 反応性抗体 ( I g G ) を含有した ( 表 4 ) 。比較すると、試験した I M 血清の 1 2 / 3 2 又は 3 8 % が E A - R 反応性抗体を示した。

10

【 0 0 9 5 】

【 表 4 】

表 4

## EAペプチド17.1及び50.1でのEBV IMの評価

サンプル No.	EA-Rペプチド 17.1		EA-Dペプチド 50.10		
	O. D.	評価	O. D.	評価	
2241	0.282	-	0.673	+	
11984	0.542	+	0.722	+	
12005	0.981	+	0.441	-	10
12288	0.700	+	0.610	+	
12407	0.787	+	0.751	+	
12409	0.592	+	0.609	+	
12418	0.463	-	0.382	-	
12498	0.637	+	0.342	-	
12502	0.924	+	0.270	-	
12587	0.571	+	0.890	+	
12600	0.260	-	0.323	-	
12611	0.259	-	0.436	-	
12801	0.601	+	0.605	+	
12828	0.375	-	0.895	+	
12829	0.257	-	0.652	+	
12836	0.692	+	0.722	+	20
12837	0.523	+	1.491	+	
12840	0.488	-	0.723	+	
12888	0.423	-	0.847	+	
12889	0.574	+	1.184	+	
12892	0.430	-	0.634	+	
12893	0.592	+	0.626	+	
12899	0.825	+	0.895	+	
12900	0.264	-	0.498	-	
13075	0.154	-	0.252	-	
13419	0.655	+	0.678	+	
13637	0.719	+	0.886	+	
13769	0.757	+	1.307	+	30
13929	0.332	-	1.031	+	
14043	0.095	-	0.631	+	
14128	0.434	-	0.693	+	
14131	0.182	-	0.530	+	
陽性(%)		12/32=38%		24/32=75%	

## 【0096】

> 0.5の値が陽性と考えられる(O. D. 読み取り420nm)。

40

## 【0097】

それらのアミノ末端及びカルボキシ末端に追加のアミノ酸を含有するEAペプチドp17.1及びp50.1の血清学的反応性を、A陽性であるEBV IM急性血清で試験した。表5に示すELISAの結果は、これら追加のアミノ酸が両EAペプチドについて反応性を向上させたことを示している。

## 【0098】

【表5】

表 5

EA陽性EBV IM急性血清中での延長部分を有するEAペプチドp17.1及びp50.1の比較

サンプル No.	EA-R		EA-D	
	17.1	17.1e	50.1	50.1e
2241	0.282	1.277	0.673	>2
12498	0.637	0.502	0.342	0.946
12836	0.692	1.257	0.722	1.718

10

e = 表1に記載した延長体

## 【0099】

実施例6 p50.10での血清学的結果

p50.10合成ペプチドでの異なる血清(VCA-EA-、VCA+EA+、VCA+EA-)の血清学的反応性を P o t h e n らの前記文献に従って、実施例1に記載した通りに行った。この血清学的結果の抗EA特異性は、抗EA抗体陰性血清とのp50.10ペプチドの反応性の欠如によって確認した。従って、これら結果はp50上のB細胞エピトープを示している。

20

## 【0100】

免疫蛍光測定法(IFA)を H e n l e ら ( I n t . J . C a n c e r , 8 : 272-282, 1971) により記載された通りに行った。ウェスタンブロット分析は、当該技術分野で普通に用いられている方法により行った(例えば、C o l i g a n ら, C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , W i l e y I n t e r s c i e n c e , 1991, U n i t 12 を参照のこと)。EBV感染細胞溶解産物(P<sub>3</sub>HR-1)を、陽性のヒトからのヒト全抗血清で試験した ( P e a r s o n ら, V i r o l o g y , 160:151-161, 1987 )。EA-D50.1ペプチド抗血清を用いるIFAによるEA血清学と50.1ペプチドを用いるELISA血清学(実施例2を参照のこと)とを比較した。試験したサンプルはウェスタンブロット分析によりIM陽性かつEA陽性であった(50~55K陽性反応性)が、表6に見られるように、これらサンプルは1:10の希釈度でもIFA-EA陰性であった。

30

## 【0101】

## 【表6】

表 6

免疫蛍光測定法によるエプスタイン-バーウイルス早期抗原 (E  
A) 血清学のEA-D 50.1合成ペプチドELISA<sup>1</sup>との比較

サンプル番号	IFA EA試験	50.1ELISA <sup>2</sup>
12502	<10 <sup>1</sup>	0.409
12840	<10	0.257
13769	<10	1.034

10

<sup>1</sup> EA-Dウェスタンブロット陽性である急性EBV感染性単核球症サンプル (1:10に希釈) で行った。

<sup>2</sup> 0.2より大きいOD読み取り値が陽性と考えられる。

【0102】

1) 抗EA陰性、VCA陰性(ウイルスキャプシッド抗原); 2) 抗EA-R陽性リンパ腫; 及び 3) 抗EA-D陽性, 鼻咽頭癌からの血清の血清学的反応性をELISAにより検討した。表7に見られるように、p17.1反応性とリンパ腫及びp50.10反応性と鼻咽頭癌の間に高い相関関係がある。 20

【0103】

【表7】

表 7

EA-R (p17.1) 及びEA-D (p50.10) 合成ペプチド  
に対する抗EA-R及び抗EA-D血清の比較反応性

血清ドナー	ELISA (420nm) <sup>1</sup>		
	p17.1	p50.10	
抗EA陰性 (VCA陰性)	0.071	0.089	10
	0.027	0.098	
	0.024	0.154	
	0.041	0.086	
抗EA-R陽性 (リンパ腫)	0.682	0.079	20
	1.354	0.078	
	1.793	0.098	
	1.218	0.817	
	1.056	0.318	
	1.104	0.095	
抗EA-D陽性 (鼻咽頭癌)	0.019	1.482	30
	0.014	1.573	
	0.041	>2.0	
	0.025	1.923	
	0.265	0.944	
	0.029	>2.0	

<sup>1</sup> ODは420nmで読み取り; 0.2より大きい値が有意である  
と考えられる。

## 【0104】

## 実施例7 早期抗原D-R移行の検出

早期抗原D-R移行を急性感染性単核球症経過中の患者において追跡した。ペプチド50.10 (EA-D) 及び17.1 (EA-R) に対する抗体を6ヶ月かけて集めた検体についてELISAにより検出した。表8のデータは、ペプチド50.10に対する抗体が88年6月27日にピークに達し、ペプチド17.1に対する抗体が88年7月18日にピークに達することを示している。従って、本発明のペプチドは患者のEBV関連疾患の経過を追跡するのに有用である。

40

## 【0105】

## 【表8】

表 8

I g G E L I S A : 逐次的血清 I g G <sup>1</sup>

年月日	血清 NO.	p17.1	p.50.10
5-26-88	9817	0.158	0.104
5-31-88	9820	0.106	0.094
6-07-88	9829	0.135	0.120
6-20-88	9941	0.169	0.147
6-27-88	9983	0.645	0.817
7-18-88	10064	0.842	0.821
8-29-88	10237	0.260	0.561
9-20-88	10271	0.231	0.100
10-21-88	10488	0.217	0.095
11-15-88	10546	0.193	0.140

10

## 【0106】

<sup>1</sup> O . D . 読み取り ; 血清を 1 . 2 0 希釈度で試験した ; ( + ) > 0 . 2 5

## 【0107】

ここまで記載した明細書は、当業者が本発明を実施するのに十分であると考え、当業者には、ここに示しかつ説明したものの他に種々の修飾が前述の説明から明らかになるであろうが、それらは添付した請求の範囲内に入るであろう。

20

## 【0108】

配列のまとめ

配列番号：1は、EBVの17Kd早期抗原(EA-R)領域からのペプチドp17.1のアミノ酸配列である。

配列番号：2は、EBVの17Kd早期抗原(EA-R)領域からのペプチドp17.2のアミノ酸配列である。

配列番号：3は、EBVの17Kd早期抗原(EA-R)領域からのペプチドp17.3のアミノ酸配列である。

30

配列番号：4は、EBVの50Kd早期抗原(EA-D)領域からのペプチドp50.10のアミノ酸配列である。

## 【0109】

配列表

(2) 配列番号：1の情報：

(i) 配列の特性：

(A) 長さ：15アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ペプチド

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称/記号：Peptide

(B) 存在位置：1..15

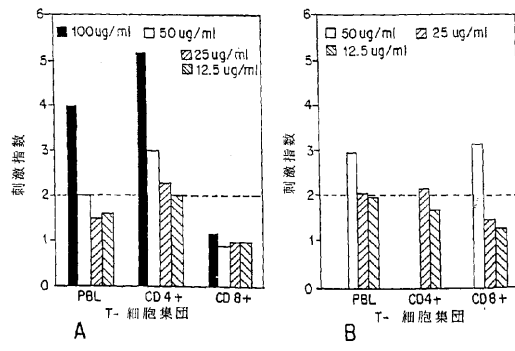
(xi) 配列；配列番号：1：

40

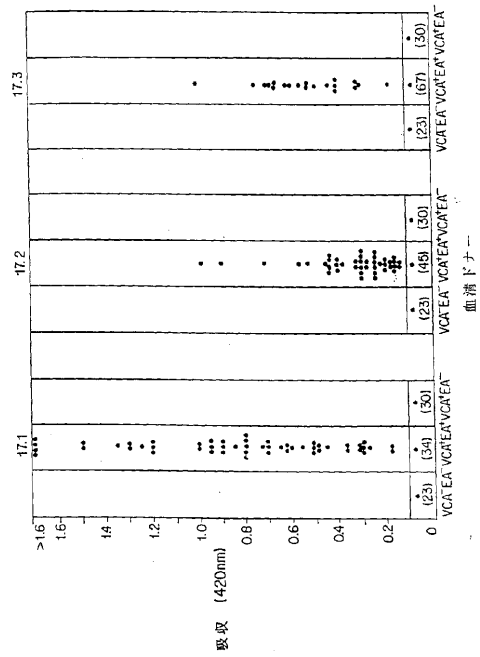




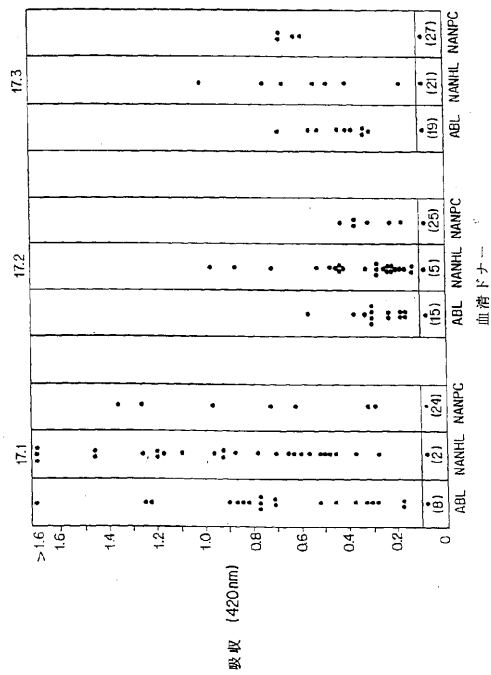
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 7/08	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	N
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 4 1 B
G 0 1 N 33/553	G 0 1 N 33/543	5 4 5 Z
	G 0 1 N 33/543	5 7 5
	G 0 1 N 33/553	
	A 6 1 K 37/02	
(74)代理人 100091096		
弁理士 平木 祐輔		
(74)代理人 100096183		
弁理士 石井 貞次		
(74)代理人 100099128		
弁理士 早川 康		
(72)発明者 スミス, リチャード エス.		
アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州 デル マー, ヴィア ドナダ 1 7 4 9 0 番地		
(72)発明者 ベアソン, ガラリー アール.		
アメリカ合衆国 2 2 0 6 6 バージニア州 グレイト フォールズ, トロツティング ホース レーン 1 1 2 4 番地		
(72)発明者 パークス, エリオット ディー.		
アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州 デル マー, カラマス ドライブ 7 0 9 番地		
F ターム(参考) 4B024 AA01 AA14 BA32 CA04 CA05 HA15		
4C084 AA02 AA07 AA14 BA01 BA08 BA18 BA23 CA01 CA59 NA14		
ZB072 ZB332		
4C085 BB11 CC08 CC21 EE01		
4H045 AA11 AA30 BA17 CA03 DA86 EA29 EA53 FA34		

