

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5431628号
(P5431628)

(45) 発行日 平成26年3月5日(2014.3.5)

(24) 登録日 平成25年12月13日(2013.12.13)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08
CO 7 K 14/46 (2006.01)	CO 7 K 14/46

請求項の数 15 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-521505 (P2002-521505)
(86) (22) 出願日	平成13年8月17日 (2001. 8. 17)
(65) 公表番号	特表2004-506921 (P2004-506921A)
(43) 公表日	平成16年3月4日 (2004. 3. 4)
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003702
(87) 国際公開番号	W02002/016410
(87) 国際公開日	平成14年2月28日 (2002. 2. 28)
審査請求日	平成20年6月16日 (2008. 6. 16)
(31) 優先権主張番号	0020618.5
(32) 優先日	平成12年8月21日 (2000. 8. 21)
(33) 優先権主張国	英国 (GB)
(31) 優先権主張番号	0114547.3
(32) 優先日	平成13年6月14日 (2001. 6. 14)
(33) 優先権主張国	英国 (GB)

(73) 特許権者	504294754 アビトープ テクノロジー (ブリistol)) リミテッド イギリス国 BS8 1TD ブリistol , ユニバーシティ ウォーク, ユニバ ーシティ オブ ブリistol, デパート メント オブ パソロジー アンド マイ クロバイオロジー
(74) 代理人	100067736 弁理士 小池 晃
(74) 代理人	100086335 弁理士 田村 榮一
(74) 代理人	100096677 弁理士 伊賀 誠司

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ペプチド調査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫寛容を誘導するペプチドの免疫寛容原性を調べるペプチド調査方法において、抗原処理することなく、上記ペプチドがMHCクラスI又はクラスII分子に結合できるかを判定し、T細胞に提示できるかを判定するステップを有し、

上記ペプチドがMHCクラスI又はクラスII分子に結合できるかどうかの判定は、

(i) 定着された抗原提示細胞と、MHCクラスI又はクラスII分子を含む脂質膜又は平面結合MHCクラスI又はクラスII分子とを有する提示組織非依存抗原系で上記ペプチドを処理し、

(ii) 上記提示組織非依存抗原系内のMHCクラスI又はクラスII分子に対する上記ペプチドの結合性を分析して、行い、

上記提示組織非依存抗原系内のMHCクラスI又はクラスII分子に結合し、T細胞に提示できるペプチドは、生体内で免疫寛容を誘導できるペプチドとして識別されるペプチド調査方法。

【請求項 2】

上記抗原処理することなく、MHCクラスI又はクラスII分子に結合して、T細胞に提示でき、生体内で免疫寛容を誘導できると識別されたペプチドを抽出するステップとを更に有する請求項1記載のペプチド調査方法。

【請求項 3】

上記判定するステップでは、上記ペプチドが、抗原処理することなく、MHCクラスI

10

20

I 分子のみに結合可能であるかどうかを判定することを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 記載のペプチド調査方法。

【請求項 4】

上記ペプチドは、T 細胞エピトープを構成する複数のペプチドから選択されることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 のいずれか 1 項記載のペプチド調査方法。

【請求項 5】

複数のペプチドは、抗原提示細胞の MHC クラス II 分子から溶出されることを特徴とする請求項 4 記載のペプチド調査方法。

【請求項 6】

複数のペプチドのうちの各ペプチドは、免疫助成剤が被検者に投与されたとき、該被験者内にて抗原と結合される疾患を誘発可能であることを特徴とする請求項 4 又は 5 記載のペプチド調査方法。

10

【請求項 7】

上記ペプチドは、切断されたペプチドの入れ子集合から選択されることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のペプチド調査方法。

【請求項 8】

請求項 1 記載のペプチド調査方法によって識別される免疫寛容原性ペプチドであって、
 ミエリン塩基性タンパク質ペプチド：30 - 44 (PRHRDTGILDSIGRF)、
 80 - 94 (TQDENPVVHFFKNIV)、83 - 99 (ENPVVHFFKNIVTPRTP)、81 - 95 (QDENPVVHFFKNIVT)、82 - 96 (DENPVVHFFKNIVTP)、83 - 97 (ENPVVHFFKNIVTPR)、84 - 98 (MPVVHFFKNIVTPRT)、110 - 124 (SLSRFSWGAEGQRPG)、130 - 144 (RASDYKSAHKGFKGV)、131 - 145 (ASDYKSAHKGFKGVDA)、及び 133 - 147 (DYKSAHKGFKGVDAQ) から選択されたものであり、多発性硬化症の治療及び / 又は予防に用いられることを特徴する免疫寛容原性ペプチド。

20

【請求項 9】

請求項 8 記載の免疫寛容原性ペプチドを含み、多発性硬化症用であることを特徴とする医薬品組成物。

【請求項 10】

30

請求項 8 記載の複数のミエリン塩基性タンパク質ペプチドを含むことを特徴とする請求項 9 記載の医薬品組成物。

【請求項 11】

請求項 8 記載の上記ミエリン塩基性タンパク質ペプチドを 2 ~ 12 種類含むことを特徴とする請求項 10 記載の医薬品組成物。

【請求項 12】

請求項 8 記載の上記ミエリン塩基性タンパク質ペプチドを 4 種類含むことを特徴とする請求項 11 記載の医薬品組成物。

【請求項 13】

上記幾つかのペプチド又はそれぞれのペプチドは、同時にかつ別々にキットの形で準備され、別々に又は順次投与されることを特徴とする請求項 9 乃至 12 のいずれか 1 項記載の医薬品組成物。

40

【請求項 14】

当該医薬品組成物は、鼻腔投与されることを特徴とする請求項 9 乃至 13 のいずれか 1 項記載の医薬品組成物。

【請求項 15】

請求項 8 記載の免疫寛容原性ペプチドを用いて、多発性硬化症に対する医薬品組成物を製造する製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

50

【発明の属する技術分野】

本発明は、免疫寛容原性ペプチド (tolerogenic peptide) を選択する方法、この方法によって識別されるペプチド、及び疾患の治療及び/又は予防におけるこの方法を用いることに関する。また、本発明は、このような複数の免疫寛容原性ペプチドを含む医薬品組成物 (pharmaceutical composition) に関する。

【0002】**【従来の技術】**

適応免疫反応 (adaptive immune response) において、Tリンパ球 (T lymphocytes) は、タンパク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 (Antigen presenting cells、以下、APCという。) は、タンパク質抗原を取り込み (take up) 、短いペプチドの断片に分解する。ペプチドは、細胞内の主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex、以下、MHCという) クラスI又はII分子に結合し、細胞表面に運ばれる。ペプチドは、MHC分子と共に細胞表面に提示されると、T細胞 (T細胞レセプタ (T cell receptor、以下、TCRという。)) によって認識される。この場合、ペプチドは、T細胞エピトープ (T cell epitope) である。

10

【0003】

T細胞エピトープは、外来か自己かに関わらずあらゆる抗原に対して、適応免疫反応における中心的な役割 (central role) を果たす。過敏性症候群 (アレルギー、自己免疫性疾患、移植拒絶反応を含む) におけるT細胞エピトープの中心的な役割は、実験的モデルを用いることにより証明されている。(T細胞エピトープの構造に基づく) 合成ペプチドを、免疫増強剤 (adjuvant) と共に注射することによって、炎症又はアレルギー疾患を誘発することができる。

20

【0004】

これとは対照的に、ペプチドエピトープを可溶性の形で投与することによって、特定のペプチドエピトープに対する免疫寛容を誘導できることが示されている。可溶性ペプチド抗原の投与は、実験的な自己免疫脳脊髄炎 (autoimmune encephalomyelitis (EAE - 多発性硬化症 (multiple sclerosis (MS))) のモデル、Metzler and Wraith (1993) Int. Immunol. 5: 1159-1165; Liu and Wraith (1995) Int. Immunol. 7: 1255-1263; Anderton and Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28: 1251-1261)、並びに関節炎、糖尿病及びブドウ膜網膜炎 (uveoretinitis) の実験的なモデル (上述のAnderton and Wraith (1998)) において疾患を抑制する有効な手段として、証明されている。また、これは、EAEにおける進行性疾患を治療する手段として、証明されている (上述のAnderton and Wraith (1998)) 。

30

【0005】

免疫寛容原性ペプチドを病気の予防又は治療に使用することは、大いに注目すべきことである。その理由は、特定の免疫寛容原性エピトープが、同じ組織内の異なる抗原に対するT細胞反応を抑制できることが示されていることである。この現象は、特定の免疫寛容原性ペプチド (上述のAnderton and Wraith (1998)) を用いることによって、所定の抗原内の1つ以上のエピトープ (好ましくは全てのエピトープ) に対し、及び所定の疾患の1つ以上の抗原に対して寛容を誘導できなければならない「非特異的抑制 (bystander suppression)」手段として知られている。これは、特定の疾患内の全ての病原性抗原を識別する必要性を無くしている。

40

【0006】

また、ペプチドは、比較的低コストであり、ペプチド類似物が、免疫学的性質を変えることによって生産することができるという事実があるので、治療における有利な選択肢である。このように、ペプチドは、MHC (major histocompatibility complex) 又はTCR (T cell receptor) との相互作用を変えるために、変性することができる。

【0007】**【発明が解決しようとする課題】**

この手法において考えられる1つの問題点は、全てのペプチドが、寛容を誘導できるT

50

細胞エピトープとして機能するのではないことが示されていることである。ミエリン塩基性タンパク質 (myelin basic protein、以下、MBPという。) ペプチド89-101は、免疫化の後の免疫優性抗原であり、また、T細胞反応の初回抗原刺激 (priming) 及びEAEの誘導の両方観点から、非常に有効な免疫抗原 (immunogen) である。しかしながら、このペプチドは、溶液で投与した場合、寛容を誘導する効果がないことが示されている (上述のAnderton and Wraith (1998))。

【0008】

寛容を誘導するT細胞の能力における観察された階層構造 (hierarchy) についての幾つかの説明が提案されている (上述のAnderton and Wraith (1998))。特に、MHCのペプチドの親和性 (affinity) と免疫寛容原性 (上述のLiu and Wraith (1995)) とに相関があることが提案されているが、観察結果には、一致しないものもある。例えば、MBP [89-101] は、免疫寛容原性ではないが、比較的高い親和性を有するI-A^Sに結合する。このように、どのペプチドが寛容を誘導するかを直接予測できない。

10

【0009】

一部のペプチドエピトープのみが寛容を誘導できることについて合理的な説明がある場合、過敏性疾患 (hypersensitivity disorder) の予防及び治療に有効な免疫寛容原性ペプチドの選択が容易になる。

【0010】

そこで、本発明に係るペプチド選択方法は、過敏性疾患等の免疫系疾患の予防及び治療に有効な免疫寛容原性ペプチドの選択を容易にすることを目的とする。

20

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、ペプチドのエピトープが抗原処理することなく未成熟のAPCによって提示されるような適切なサイズであるか否かを示している。それが免疫寛容原性を誘発することができる。あるT細胞エピトープが免疫寛容原性であって、他は寛容を誘導できない点は、エピトープの中には、MHC分子によって提示され得る以前に、更なる抗原処理が必要なものもあるという事実によって説明される。これらの抗原処理が必要なエピトープは、溶液状態にて投与されたとき、寛容を誘導できないにもかかわらず、エピトープは、免疫増強剤 (adjuvant) とともに投与されると疾患を誘発することができる。

【0012】

30

更なる抗原処理を必要としないエピトープは、免疫寛容を誘導することができ、これは本発明者によって「アピトープ (apitopes) (抗原処理非依存エピトープ (Antigen Processing Independent epitopes)) 」と称される。

【0013】

この知見は、生体内におけるペプチドの寛容能力を検査する必要性を不要にする免疫寛容原性T細胞エピトープを規則に基づいて選択する方法を提供するものである。これは、特に、動物モデルが対応できない疾患を予防する又は治療するための方法の発展に有益である。生体内に用いられる前に、試験管内でヒトT細胞 (ヒトMHC分子に結合する抗原を認識する。) を使って、ペプチドの寛容誘導能がテストされ、機構が提供されるため、動物モデルを持つ疾患があるが、その選択方法は、寛容性誘導構造を単純かつ安全に発展される。

40

【0014】

第1の特徴は、本発明者は、更に抗原処理することなく、MHCクラスI又はクラスII分子に結合できるペプチドを選択するステップを含む免疫寛容原性ペプチドを選択する方法を提供する。好ましい例としては、ペプチドは、更に抗原処理することなく、MHCクラスII分子に結合できる。

【0015】

所定の抗原に対してT細胞エピトープとして機能できるペプチドを分類する技術には、多くの方法が知られている。したがって、一般的に、この方法は、T細胞エピトープを構成する複数のペプチドの中から免疫寛容原性ペプチドを選択することに用いられる。

50

【 0 0 1 6 】

ペプチドが、更なる抗原処理することなく、MHCクラスI又はクラスII分子に結合できるか否かを調べるために、ペプチドのMHCクラスI又はクラスII分子に対する結合能を提示組織非依存抗原系 (antigen processing independent presentation system、以下、APIPSという。)を用いて調べることができる。好ましくは、(i) APIPSでペプチドを処理する。(ii) APIPS内のMHCクラスI又はクラスII分子に対するペプチドの結合性を分析する。

【 0 0 1 7 】

第2の特徴としては、本発明により、第1の特徴の方法によって選択されたペプチドを抽出することである。

10

【 0 0 1 8 】

ペプチドは、疾患の予防及び/又は治療に有用である。特に、ペプチドは、自己反応性T細胞によって媒介される疾患の予防及び/又は治療に有用である。例えば、アレルギー、自己免疫疾患及び移植による拒絶反応のような過敏症反応に対しては、特に本発明のペプチドを用いて治療/予防するとよい。

【 0 0 1 9 】

本発明者は、ミエリン塩基性タンパク質の多くのエピトープを既に識別した。これは、多発性硬化症における自己抗原でもある。特に好ましい例としては、本発明に係るペプチドは、多発性硬化症の予防及び/又は治療に有用である。

【 0 0 2 0 】

幾つかのペプチドは、同一抗原由来の他のエピトープ及び異なる抗原由来の他のエピトープに対して寛容を誘導できると知られている(非特異的抑制として知られている現象によって)。

20

【 0 0 2 1 】

しかしながら、本発明者は、全ての自己反応性T細胞を十分に抑制するためには、種々のエピトープを組み合わせて疾患の治療/予防のために患者に投与することが有効であろうことを予測した。

【 0 0 2 2 】

第3の特徴としては、本発明者は、発明の第2の特徴による複数のペプチドからなる医薬品組成物を提供するものである。ここで、各々のペプチドは、T細胞エピトープに基づいている。

30

【 0 0 2 3 】

第4の特徴としては、本発明者は、発明の第2の特徴に基づいて被験者にペプチドを投与するステップを含み、被験者の疾患を予防及び/又は治療する方法を提供する。

【 0 0 2 4 】

予防及び/又は治療のための一般的な方法は、以下のステップを含む。すなわち(i)疾患の抗原を識別する。(ii)抗原のエピトープを識別する。(iii)被験者にエピトープを投与する。

【 0 0 2 5 】

【発明の実施の形態】

40

第1の特徴として、本発明は、免疫寛容原性ペプチド(tolerogenic peptide)を選択する方法に関する。

【 0 0 2 6 】

・寛容(Tolerance)

ここでは、用語「寛容原性(tolerogenic)」は「寛容(tolerance)を誘導できる能力」を意味するものとして用いる。

【 0 0 2 7 】

寛容は、抗原に反応できないことである。自己抗原に対する寛容は、免疫系(immune system)の本質的特徴であり、これが失われると、自己免疫疾患(autoimmune disease)が起こる。適応免疫系では、それ自身の組織内に含まれる自己抗原の自己免疫攻撃を避け

50

る一方で、膨大な種類の病原菌に反応する能力を維持しなければならない。これは、胸腺（中枢性免疫寛容（Central tolerance））におけるアポトーシス細胞死（apoptotic cell death）に対して未成熟のTリンパ球の感応性によって、大幅に制御される。しかしながら、胸腺において全ての自己抗原が検出されるわけではないので、自己反応胸腺リンパ球の死は、不完全のまま残る。そのため、末梢組織における成熟した自己反応Tリンパ球によって獲得できる免疫寛容（末梢性免疫寛容）の機構がある。中枢性及び末梢性免疫寛容の機構の検討がAnderton等によってなされている（1999, Immunological Reviews 169: 123-137）。

【0028】

免疫寛容は、CD4+T細胞の少なくとも一部によってアレルギを誘発することにより、その結果として生じ、又は特徴付けられる。T細胞を活性化するために、ペプチドは、T細胞に2つのシグナルを伝達できる「専門の」APCに結合しなければならない。第1のシグナル（シグナル1）は、APCの細胞表面のMHCペプチド複合体によって伝達され、TCRを介してT細胞によって受け取られる。第2のシグナル（シグナル2）は、APCの表面の共刺激分子（costimulatory molecules）、例えばCD80、CD86によって伝達され、T細胞の表面のCD28によって受け取られる。T細胞が、シグナル2がない場合にシグナル1を受け取ったとき、T細胞は活性化されず、アレルギ性になると考えられる。アレルギ性T細胞は、連続的な抗原投与（antigenic challenge）に対して不応性であり、他の免疫反応を抑制できる能力がある。アレルギ性T細胞は、T細胞寛容をもたらす際に、関与すると考えられる。

【0029】

理論に縛られることなく、本願発明の発明者は、ペプチドは、成熟した抗原提示細胞（antigen presenting cells）によって処理されるべきものである。MHC分子と共に提示できるようになる前に、処理（processing）を必要とするペプチドは、寛容を誘導しないと予測している。成熟した抗原提示細胞（例えばマクロファージ、B細胞及び樹状細胞）は、抗原処理の能力を有するが、また、シグナル1及びシグナル2をT細胞に伝達して、T細胞を活性化する。一方、アピトープ（Apitopes）は、未成熟のAPC上のクラスIIのMHCに結合することができる。このように、アピトープは、同時刺激（costimulation）なしで、T細胞に提示され、結果として、T細胞アレルギ及び寛容を誘導する。

【0030】

当然、アピトープも、成熟したAPCの細胞表面でMHC分子に結合することができる。しかしながら、免疫系は、成熟したAPCよりも大量の未成熟のAPCを含んでいる（10%未満の樹状細胞が活性化されていることが、Summers等によって示唆されている（2001）Am. J. Pathol. 159: 285-295）。したがって、アピトープに対するデフォルトの立場（default position）は、活性化というよりはむしろ、アレルギ/寛容である。

【0031】

寛容がペプチドの吸引によって誘導されるとき、増殖に対する抗原特異性CD4+T細胞の能力は、低減される。また、IL-2並びにIFN- γ の生成及びこれらの細胞によるIL-4の生成は、抑制されるが、IL-10の生成は増加する。ペプチドによって誘導された寛容の状態にあるハツカネズミ中のIL-10の無効化（neutralisation）は、疾患に対する感受性を完全に回復することが示されている。IL-10を生成し、免疫制御（immune regulation）をもたらす（mediate）制御細胞の個体数（population of regulatory cells）は、寛容状態を維持することが示されている（Burkhart et al (1999) Int. Immunol. 11: 1625-1634）。

【0032】

したがって、寛容の誘導は、

- (a) 生体内の標的エピトープであるペプチドに対して疾患となる感受性を低下させる
- (b) CD4+T細胞におけるアレルギの誘導（試験管内で抗原を連続投与することによって検出される）
- (c) 以下、(i)、(ii)、(iii)によるCD4+T細胞の個体数の変更

10

20

30

40

50

(i) 培養の減数 (reduction)

(i i) I L - 2、I F N - 及び I L - 4 の生成のダウンレギュレーション

(i i i) I L - 1 0 の生成の増加

を含む種々の手法によって観察することができる。

抗原処理非依存エピトープ (Antigen Processing Independent Epitopes、以下、アピトープ (APITOPES) という。)

【 0 0 3 3 】

本発明の方法は、更なる抗原処理をすることなく、MHCクラスI又はIIタンパク質に結合することができるペプチドを選択するステップを有する。このようなペプチドを、本明細書では、「アピトープ (apitopes) 」 (抗原処理非依存エピトープ (Antigen Proc

10

essing Independent epiTOPES) と称する。

【 0 0 3 4 】

所定の抗原から誘導されるペプチドの細胞表面提示は、ランダムではなく、頻繁に生じる少量のエピトープによって支配される傾向がある。特定のペプチドの優位性は、多くの因子、例えばMHC分子を結合する相対親和度 (relative affinity)、APC内における生成時の空間的な位置及び耐崩壊性に依存する。抗原のエピトープ階層構造 (epitope hierarchy) は、免疫反応の進行によって変化することができ、このエピトープ階層構造の変化は、自己寛容及び自己免疫に対して重要な影響を及ぼす。主要抗原決定基領域 (Immunodominant determinant regions) は、優れた免疫寛容原である可能性がある。したがって、好ましい実施の形態において、本発明に係るアピトープは、優性エピトープ (domi

20

nant epitope) に基づいている。

【 0 0 3 5 】

しかしながら、免疫優性ペプチド (immunodominant peptides) に対する一次免疫反応の後、エピトープの「拡散 (spreading) 」が亜優性決定基 (sub-dominant determinants) に起こる (Lehmann et al (1992) Nature 358: 155-157)。亜優性エピトープ (subdominant epitope) の提示は、自己免疫性のトリガとして重要である。本発明に係るアピトープは、亜優性エピトープに基づくことができる。

【 0 0 3 6 】

また、あらゆる所定の抗原に対して、潜在エピトープ (cryptic epitopes) が存在することができる。潜在エピトープは、ペプチドとして投与されたときには、T細胞反応を刺激することができるが、全ての抗原として投与されたときには、このような反応を起こすことはできない。抗原のAPCのペプチド内への処理中に、潜在エピトープは、破壊 (de

30

stroyed) される。本願の発明者は、ペプチド92 - 98がMBP (例2Cに示す。) に対して潜在エピトープであることを示している。興味深いことに、このペプチド領域内のアスパラギニルエンドペプチダーゼ (asparaginyl endopeptidase) の推定上の切断部位 (putative cleavage site) があり、自然処理 (natural processing) 中には、この領域を含んだペプチドは、APCによって生成されない。

【 0 0 3 7 】

潜在エピトープは、更なる抗原処理をすることなく、MHC分子に結合できるという点で、試験管内でアピトープとして働き、潜在エピトープを認識するT細胞にアネルギを誘導する。しかしながら、このようなアピトープは、抗原の自然に処理されたエピトープ (naturally processed epitope) を認識するT細胞を寛容がある (tolerising) ようにしな

40

なければならないので、治療には役に立たない。

【 0 0 3 8 】

抗原のエピトープは、APCによって提示されるとき、抗原全体に亘ってペプチドが部分的に一致するT細胞反応を測定することによって、識別することができる (下記参照)。このような研究により、通常、結果として、ペプチドの「入れ子集合 (nested sets) 」が得られ、特定のT細胞株/クローン (T cell line/clone) の最小のエピトープ (minimal epitope) は、切断されたペプチド (truncated peptides) の反応を測定することによって、評価することができる。

50

【 0 0 3 9 】

抗原の最小のエピトープがアピトープとして機能するとみなすことはできない。多分、最小のエピトープの側面に位置する (flanking) アミノ酸が MHC に最適に結合することが必要である。アピトープは、異なる T 細胞クローンの最小のエピトープ間の微妙な差異の可能性をカバーするように設計しなければならない。

【 0 0 4 0 】

全てのエピトープ用のアピトープを識別できないことは、強調すべきである。幾つかのエピトープが MHC に結合することは、ある意味では、エンドソームにおける MHC の取込 (MHC-loading) に依存し、したがって、処理 (processing) を必要とするという明確な証拠がある (Viner et al (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 2214-2218)。これは、各最小のエピトープが必然的にアピトープとして機能するとみなすことができないもう 1 つの理由である。

10

【 0 0 4 1 】

T 細胞エピトープを含むペプチドの識別

所定の抗原内の T 細胞エピトープを識別する技術的に知られた幾つかの方法がある。

【 0 0 4 2 】

自然に処理されたエピトープは、抗原取込 APC (antigen-loaded APC) から溶出されたペプチドの質量分光光度分析 (mass spectrophotometric analysis) によって識別される。これらは、抗原を取り込む (take up) ように促進させた APC、又は適切な遺伝子による変化によって、細胞内にタンパク質を生成することを強制された APC である。通常は、APC は、タンパク質によって溶液中で培養され、又は APC 細胞表面に対して適切にターゲットとされる。37 °C での培養の後、細胞は、表面活性剤 (detergent) 及び、例えばアフィニティークロマトグラフィ (affinity chromatography) により精製されたクラス II タンパク質によって、溶解される。精製 MHC を、適切な化学環境 (suitable chemical medium、例えば酸性条件 (acid conditions)) によって処理することにより、MHC からペプチドが溶出される。このペプチドプールを分離し、同様に処理された制御 APC からのペプチドとプロフィールを比較する。細胞を提示する又は細胞から得られる (expressing/fed) タンパク質の特徴ピークを (例えば、質量分析法により) 解析し、ペプチド断片を識別する。この手法により、通常、抗原処理によって特定の抗原から得られるペプチドの部位 (通常、「入れ子集合 (nested sets)」として確認される) についての情報が得られる。

20

30

【 0 0 4 3 】

エピトープを識別する他の方法は、試験管内の定量法によって、抗原の長さに重複及び亘っているペプチドの合成ライブラリを調べることである。例えば、ペプチド鎖内には 15 のアミノ酸があり、5 又は 10 のアミノ酸が重複して使用されている。ペプチドは、抗原提示細胞と T 細胞とを含む抗原提示系 (antigen presentation system) にて、識別される。例えば、抗原提示系は、ラットの脾細胞 (murine splenocyte) の調製物を使用し、ヒト細胞は P BMC 又は扁桃腺の調製物を使用する。若しくは、抗原提示系は、特定の T 細胞株又は T 細胞クローン、及び/又は特定の抗原提示細胞タイプを含む。

【 0 0 4 4 】

T 細胞活性化は、T 細胞培養 (例えば、³H - チミジン取込) 又はサイトカイン (cytokine) 産生により測定される。TH1 型 CD4 + T 細胞の活性化は、例えば、ELISPOT 試験のような一般的な手法によって検出される IFN γ の産生により測定される。

40

【 0 0 4 5 】

重複するペプチドを調べることは、大抵、エピトープが検出された抗原部位を示している。特定の T 細胞に対する最小のエピトープは、切断されたペプチド (truncated peptides) への反応を測定することによって評価できる。例えば、重複ライブラリの中で 1 - 15 の残基を含むタンパク質が得られれば、最小のエピトープの識別に用いることのできる両端が欠損している (例えば、1 - 14、1 - 13、1 - 12、2 - 15、3 - 15、4 - 15 等)。

50

【 0 0 4 6 】

試験管内の試験により用いられた抗原の免疫優位残基の識別（特に、T細胞株を用いるもの）は、本発明によるペプチドの好反応性結果の非対称性を導くものと予測される。実例に示されたMBPエピトープを識別する実験では、MS患者由来のPBMCの培養における動的反応性を分析し、健康な固体は重複ペプチドのライブラリに対して測定される。この試験は、健康な固体を形成するT細胞及びMS患者のT細胞は精製されたタンパク質抗原に類似した種類に反応するが、MBP配列に基づいたペプチドとは異なる方法で反応するとの知見に基づいている。MS患者由来のT細胞は、正常で健康な被験者と比較して、かなりの量が、ペプチド抗原に対してより急激に動的に反応する。これは、特定患者が特定時期に反応するエピトープの識別及びエピトープの検出を可能たらしめる。ここで示した実験では、この手法によって、基本的な手法を用いて識別されないエピトープ含有残基の数を明らかにしている。そしてまた、T細胞の認識は、ある時点に現れて、消失し、その後再度現れるという周期的パターンを示すことが明らかになった。

10

【 0 0 4 7 】

患者が特定時期に反応するエピトープを明らかにするため、本発明者が提案する運動反応性の測定は、非常に貴重な手段である。この情報は、関連性のあるエピトープ（1つでもあれば。）に対するアピトープを識別し、投与管理することによって、治療する上で、アピトープの投与方法を個々の患者に適応させることに役立つ。また、この情報によれば、疾患の進行に対する一般的なパターンが作成できるため、治療合成薬は、疾患の進行段階に適合すると考えられるエピトープにアピトープを含んで調製することができる。

20

【 0 0 4 8 】

提示組織非依存抗原系（Antigen Processing Independent Presentation Systems、以下、APIPSという。）

一旦、エピトープが識別されると、次の段階は、このエピトープがアピトープとして作用するか否かを調べることである。

【 0 0 4 9 】

アピトープは、抗原処理を必要とすることなく、成熟のT細胞に提示されなくてはならない。アピトープは、T細胞エピトープを含む識別されたペプチドを持ち、処理のない系（processing free system）を用いて識別されてもよい。切断されたペプチド及びペプチド類似体は、提示組織非依存抗原系（APIPS）を使って活性化がテストされる。

30

【 0 0 5 0 】

APIPSには、以下のものが含まれる。

- a) 固定APC（CD28に対する抗体を持つもの又は持たないもの）。
- b) MHC分子のクラスI又はIIを含む脂質膜（CD28に対する抗体を持つもの又は持たないもの）。
- c) 平面結合構造にある精製された本来の又は組換型のMHC（CD28に対する抗体を持つもの又は持たないもの）。

【 0 0 5 1 】

例えば、切断されたペプチドへの反応を測定することによって、ポリペプチド内の最小のエピトープを調査する研究（Fairchild et al (1996) Int. Immunol. 8: 1035-1043）において、T細胞の反応を調べるために固定APCを使用することは知られている。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される。

40

【 0 0 5 2 】

脂質膜（平面膜又はリポソーム）としては、人工脂質を用いるか、又はAPC由来の原形質膜（plasma membrane）/ミクロソーム画分画（microsomal fractions）を用いる。

【 0 0 5 3 】

使用に際して、APIPSは、組織培養プレートの穴（wells）に適用されてもよい。ペプチド抗原は、選択されたT細胞株又はT細胞クローンの付加によって検出されるAP

50

I P S の M H C 部にペプチドを付加されるとともに結合している。T細胞株又はT細胞クローンの活性化は、例えば、³H - チミジン取込又はサイトカイン分泌を介するような、既知の如何なる方法によって測定されてもよい。

【0054】

ペプチド

ペプチドに関する発明の第2の様相

「ペプチド」という語は、典型的なL - アミノ酸や、隣接するアミノ酸のカルボキシル基と - アミノ酸との間のペプチド結合によって典型的に互いに結合した一連の残基を表す通常の意味で使用されている。また、この語は、変性ペプチド及び合成ペプチド類似物を含む。

10

【0055】

本発明に係るペプチドは、更なる抗原処理をすることなく、M H C のクラス I 又は I I に結合できれば、如何なる長さであってもよい。

【0056】

M H C のクラス I 分子と結合するペプチドの分子長は、典型的には7 ~ 13個のアミノ酸からなり、より一般的なものは8 ~ 10個のアミノ酸からなる。

ペプチド結合は、全M H C クラス I 分子のペプチド結合溝において、ペプチド主鎖の原子と不変部位との間の接触によって両端にて安定化されている。ペプチドのカルボキシ末端とアミノ末端との結合溝の両端には不変部位がある。ペプチド長の変動は、ペプチド骨格において起こる縫れ、またしばしば要求される柔軟性を持たせるプロリン又はグリシン残基にて起こる縫れによって決まる。

20

【0057】

M H C のクラス I I 分子に結合するペプチドは、典型的には8 ~ 20個のアミノ酸長であり、より一般的なものは10及び17個のアミノ酸長であるが、これより長くもなり得る。これらのペプチドは、両端がオープンになったM H C I I ペプチド結合溝に沿って伸張された構造になっている (M H C クラス I ペプチド結合溝とは異なる。)。ペプチドは、主に、ペプチド結合溝に沿った保護残基に接した主鎖原子によって適切に保持されている。

【0058】

本発明に係るペプチドは、化学的方法を用いて生成されてもよい (Peptide Chemistry, A practical Textbook. Mikos Bodansky, Springer-Verlag, Berlin.)。例えば、ペプチドは、固相法によって合成することができ (Roberge JY et al (1995) Science 269: 202-204)、樹脂から割削され、高性能液体クロマトグラフィによって精製できる (e. g., Creighton (1983) Proteins Structures And Molecular Principles, WH Freeman and Co, New York NY)。例えば、A B I 43 1 A ペプチド合成装置 (Perkin Elmer) を用いて製造業者から提供された指示にしたがって自動的に合成してもよい。

30

【0059】

あるいは、ペプチドは、組換手段によって、又はより長いポリペプチドを分割することによって生成されるものであってもよい。例えば、ペプチドは、標的抗原からの分裂によって得られる。ペプチドの合成は、アミノ酸解析又は配列決定法により確立されている (例えばエドマン分解法)。

40

【0060】

好ましい実施の形態において、ペプチドは、標的抗原から提供される。標的抗原は、疾患が生じている間、A P C によって処理される分子 (例えば、タンパク質又は糖タンパク質) 及びT細胞によって認識される分子である。当然のことながら、標的抗原は、標的疾患に依存する。好ましくは、ペプチドは、A P C による抗原の自然の処理によって生じた抗原の断片から誘導される。

【0061】

実際には、ペプチドには様々な他の特性もある。例えば、ペプチドは、生体における許容濃度で可溶でなくてはならない。好ましくは、ペプチドは、最高でも0.5 mg / ml

50

の濃度で可溶でなくてはならない。より好ましくは、ペプチドは、最高でも 1 mg / ml の濃度で可溶でなくてはならない。また、最も好ましくは、ペプチドは、最高でも 5 mg / ml の濃度で可溶でなくてはならない。

【 0 0 6 2 】

鼻腔投与における服用量の最大値は、最新の方法では、鼻腔当たり約 200 μ l である。仮にペプチドが 1 mg / ml の濃度で可溶であれば、各鼻腔に 2 服することで 800 μ g が患者に投与される。一回の服用が 5 mg を超えることは、例外的である。

【 0 0 6 3 】

また、ペプチドが治療に有効であるためには、体内で十分に安定していることも重要である。本発明者は、体内で投与後 30 分経過して、試験ペプチドの全量が 50 % に低下し、投与後 4 時間経過して、ペプチド量が約 30 % に低下することが判った。しかしながら、5 日経過後にも依然として検出可能な程度含まれる (約 5 %) ことが判った。体内におけるペプチドの半減期は、少なくとも 10 分程度は必要であり、好ましくは 30 分、より好ましくは 4 時間、更に好ましくは 24 時間である。

【 0 0 6 4 】

本発明者は、ペプチドを鼻腔内へ投与すると、流出するリンパ節中のペプチドの量が投与後約 4 時間経過後に最大値となるが、5 日経過後もペプチドが依然として検出できる (最大約 5 % 程度のレベルで) ことを見出した。ペプチドは、流出するリンパ節に長期間に亘って治療効果を発揮できる治療活性濃度で十分に安定していることが好ましい。

【 0 0 6 5 】

また、ペプチドは、体内で良好な生物学的利用能を示さなくてはならない。ペプチドは、体内で、障害なく細胞表面で MHC 分子に結合できる構造を保持しなくてはならない。

【 0 0 6 6 】

標的疾患

一具体例において、本発明を第 2 の知見から みた ペプチドは、疾患の予防及び / 又は治療に有用である。

【 0 0 6 7 】

MHC クラス II に対するアピトープは、CD4 + T 細胞反応が介在する疾患に対して特に有用であると思われる。例えば、異常な又は過剰な CD4 + T 細胞反応によって引き起こされる又は継続される疾患に対して有用である。

【 0 0 6 8 】

このようなペプチドは、特に過敏性疾患の治療に有用である。過敏性反応には、以下のものを含む。

- (i) 無害な体外異物に対する異常反応により生じるアレルギー
- (i i) 自己組織抗原に対する反応から生じる自己免疫疾患
- (i i i) 移植に対する反応から生じる移植片拒絶反応

【 0 0 6 9 】

アレルギーの例としては、枯草熱 (hay fever)、外因性喘息 (extrinsic asthma)、昆虫刺症及び毒針アレルギー (insect bite and sting allergies)、食品及び薬物アレルギー (food and drug allergies)、アレルギー性鼻炎 (allergic rhinitis)、気管支喘息慢性気管支炎 (bronchial asthma chronic bronchitis)、アナフィラキシー症候群 (anaphylactic syndrome)、蕁麻疹 (urticaria)、血管神経性浮腫 (angioedema)、アトピー性皮膚炎 (atopic dermatitis)、アレルギー性接触皮膚炎 (allergic contact dermatitis)、結節性紅斑 (erythema nodosum)、多形性紅斑 (erythema multiforme)、スティーブンス - ジョンソン症候群 (Stevens-Johnson Syndrome)、鼻腔性結膜炎 (rhinconjunctivitis)、結膜炎 (conjunctivitis)、皮膚壊死 (cutaneous necrotizing)、細静脈炎 (venulitis)、炎症性肺疾患 (inflammatory lung disease)、水疱瘡性皮膚疾患 (bullous skin diseases) 等がある。ただし、この例に限定されない。

【 0 0 7 0 】

自己免疫疾患の例としては、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis (RA))、重

10

20

30

40

50

症筋無力症 (myasthenia gravis (MG))、多発性硬化症 (multiple sclerosis (MS))、全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus (SLE))、慢性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis (橋本病) (Hashimoto's thyroiditis))、バセドウ病 (Graves' disease)、炎症性腸疾患 (inflammatory bowel disease)、自己免疫ブドウ膜網膜炎 (autoimmune uveoretinitis)、多発性筋炎及び糖尿病の特定種 (polymyositis and certain types of diabetes)、全身性脈管炎 (systemic vasculitis)、多発性筋炎及び皮膚筋炎 (polymyositis-dermatomyositis)、全身性硬化症 (強皮症) (scleroderma)、シェーグレン症候群 (Sjogren's Syndrome)、強直性脊椎炎及びそれに関連した脊椎関節症 (ankylosing spondylitis and related spondyloarthropathies)、リウマチ熱 (rheumatic fever)、過敏症肺臓炎 (hypersensitivity pneumonitis)、アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 (allergic bronchopulmonary aspergilliosis)、無機ダスト塵肺症 (inorganic dust pneumoconioses)、サルコイドーシス (sarcoidosis)、自己免疫溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia)、免疫性血小板障害 (immunological platelet disorders)、クリオフィブリノーゲン血症のような寒冷症 (cryopathies such as cryofibrinogenemia)、自己免疫多線性内分泌障害 (autoimmune polyendocrinopathies) 等がある。ただし、この例に限定されない。

10

【0071】

臨床医学では、腎臓、肝臓、心臓肺、皮膚、角膜、骨髄を含む種々の組織は、一般的に移植される。現在では、角膜及び一部の骨髄を除く全ての移植片は、通常長期に亘って免疫抑制する必要がある。

20

【0072】

本発明をこの知見からみた一具体例では、ペプチドは、糖尿病の予防及び/又は治療に有用である。この例では、ペプチドは、標的抗原 I A 2 から誘導される。

【0073】

本発明の他の具体例として、ペプチドは、多発性硬化症 (MS) の予防及び/又は治療に有用である。多発性硬化症 (MS) は、CNS 白質に散在的に広まった多発性脱髄性障害によって特徴付けされる慢性の炎症性疾患であって、あらゆる部位及び時点にて発症する (McFarlin and McFarland, 1982 New England J. Medicine 307: 1183-1188 and 1246-1251)。MS は、自己反応性 T 細胞によって引き起こされると考えられる。

【0074】

本具体例では、ペプチドは、自己抗原の1つ、特にミエリン塩基性タンパク質 (MBP) 又はプロテオリピドタンパク質 (PLP) から得られる。PLP は高い疎水性を有し、PLP から誘導されるペプチドは互い凝集する傾向にあるので、MBP が、PLP よりも適している可能性がある。動物において、MBP は、免疫原性であり、MBP 特性 T リンパ球は、脳炎誘発性活性を持っている (Segal et al., 1994 J. Neuroimmunol. 51: 7-19; Voskuhl et al., 1993 J. Neuroimmunol 42: 187-192; Zamvil et al., 1985 Nature 317: 355-8)。

30

【0075】

好ましい例としては、ペプチドは、MBP の免疫優性残基、すなわち 1 - 24、30 - 54、75 - 99、90 - 114、105 - 129、120 - 144、135 - 159、150 - 170 の中の1つから得られる。

40

【0076】

特に好ましくは、ペプチドは、本発明者によってアピトープとして作用することが確認された MBP ペプチド、すなわち、30 - 44、80 - 94、83 - 99、81 - 95、82 - 96、83 - 97、84 - 98、110 - 124、130 - 144、131 - 145、132 - 146、133 - 147 の1つから選択される。

【0077】

MHC クラス I に対するアピトープは、例えば、免疫寛容原性型にて、抗ウイルス性 CD8 + 反応を変化させるために用いられる。

【0078】

50

医薬品組成物

本発明者は、寛容を効果的に誘導するために、「非特異的抑制 (bystander suppression)」にも関わらず、多くの異なる T 細胞クローンを標的にすることが必要であると予測した。したがって、疾患を防止又は治療するために、複数のペプチドが患者に投与される。

【0079】

第3の特徴では、本発明は、複数のアピトープを含む医薬品組成物に関する。

【0080】

医薬品組成物は、例えば、2～50個のアピトープからなることが好ましい。より好ましくは、2～15個のアピトープからなる。アピトープは、同一又は異なる標的抗原から誘導されるのがよい。アピトープは、更なる抗原処理をすることなく、全てが MHC クラス I に結合できること、又は全てが MHC クラス II に結合できることが好ましい。好ましい例では、医薬品組成物中の全アピトープは、更なる抗原処理をすることなく、MHC クラス I 又はクラス II 分子に結合できる。

【0081】

医薬品組成物は、キットの形で投与することができ、キットにおいては、幾つかのアピトープ又は各アピトープは、同時に独立して投与され、あるいは別々に、すなわち順番に投与される。

【0082】

若しくは、医薬品組成物 (又はそのあらゆる部位) は、多回服用にて投与されるべきものであるが、各服用分は、別々にパックされていてもよい。

【0083】

医薬品組成物は、治療上又は予防上効果的なアピトープ量からなってもよく、また、少なくとも1つのアピトープは、選択的に、希釈液又は賦形剤等の製薬上許容できる担体に含まれている。

【0084】

また、本発明に係る医薬品組成物において、少なくとも1つのアピトープは、最適な結合剤 (s)、滑沢剤 (s)、懸濁剤 (s)、コーティング剤 (s)、又は可溶化剤 (s) と混合されてもよい。

【0085】

投与

ペプチドは、補助剤がない場合、可溶状態で投与されなくてはならない。

【0086】

ペプチドは、粘膜経由で投与されることが好ましい。

【0087】

研究は、ペプチドが可溶状態にて与えられれば、腹膜内に (i.p.)、静脈内に (i.v.)、鼻腔内に (i.n.)、又は経口にて T 細胞寛容を誘導できる (上述の Anderton and Wraith (1998)、上述の Liu and Wraith (1995)、Metzler and Wraith (1999) Immunology 97: 257-263) ということを示している。

ペプチドは、鼻腔内に投与されることが好ましい。

【0088】

ハツカネズミによる研究では、寛容を誘導するために要求されるペプチドの継続投与が、レセプタ中の T 細胞の前駆体頻度に依存することが示されている (上述の Burkhardt et al (1999))。また、多くの研究にて、ペプチドの反復投与が寛容を誘導することが証明されてきている (上述の Burkhardt et al (1999))。ペプチドの服用回数と適切な服用とは、個体に依存するものであるが、好ましい具体例では、多回服用にて投与されている。

【0089】

仮に、多数のペプチドが同時に投与されるのであるなら、ペプチドは、単一又は多回服用にて投与するために適切な「混合薬」の形態が適している。また、ペプチドは、多回服用にて与えられることが好ましいが、各服用間の相対的なペプチド濃度を変更してもよい

10

20

30

40

50

【0090】

好ましい例として、濃度を段階的に上昇させて患者に多回服用させる「服用量の段階的増加 (dose escalation)」プロトコルが挙げられる。このような用例としては、例えば、蜂毒針アレルギーに対する免疫療法用途としてホスホリパーゼ A 2 ペプチドが使用される (Muller et al (1998) J. Allergy Clin Immunol. 101: 747-754 and Akdis et al (1998) J. Clin. Invest. 102: 98-106)。

【0091】

【実施例】

以下の例は、本発明の実例を説明するのに役立つが、これらに限定されるものではない。本発明は、特にこれらの例にて説明される詳細な実施例に関連付けられる。

【0092】

例 1 - MBP における T 細胞エピトープの 識別
物質及び方法

【0093】

抗原

ヒト MBP は、Deibler 等によって示された方法によって脳白質から抽出し (Deibler et al., 1972 Preparative Biochemistry 2: 139)、この純度を SDS-PAGE によって評価する。MBP 及びヒト型結核菌精製タンパク質誘導体 (PPD) (英国サリー州の英国中央獣学研究所 (UK Central Veterinary Laboratory)) は、予め決定された最適濃度での増殖定量法に使用される。すなわち、各抗原に対する最適濃度は 50 pg/ml である。MBP 分子全体に 亘るペプチドに重複した 15 mer のパネル (panel) は、Abimed AMS 422 多重ペプチド合成装置 (Abimed, Langenfeld, Germany) で標準的な Fmoc 化学を用いて合成される。各ペプチドは、5 aa 及び重複する 10 aa によって置換される。発明者らは、33 個のペプチドを、3 つのグループのプールに生成し、各プールは、50 µg/ml の最適濃度にて検査される。各ペプチドは、試験管内で 16.6 µg/ml の濃度に調製される。

【0094】

患者及び被験対象

この研究の被験者は、臨床的に明白若しくは研究室的にも明白に MS であると認められ (Poser et al., 1983)、29 歳 ~ 51 歳の年齢幅がある 12 人の患者からなる。12 人のうち 8 人は、インターフェロン- γ の試験中であるが、ほかの MS 患者は、研究開始以前の少なくとも 3 ヶ月間は、コルチコステロイド治療を行っていない。また、対象群は、25 歳 ~ 55 歳の年齢幅のある 13 人の健康な個人を含んでおり、血液サンプルを得る以前の少なくとも 3 ヶ月間は免疫抑制療法を受けていない。

【0095】

組織培養基

20 mM の HEPES (英国ドーセット州プールの Sigma 社製) を含む RPMI-1640 基、ペニシリン (100 U/ml)、ストレプトマイシン硫酸エステル (100 mg/ml)、4 mM の L-グルタミン (以上は全て、スコットランド、ペイズリーの Life Technologies 社製) を組織培養基として用いる。血清を除いた培養基は、リンパ系細胞及び TCL を洗浄するために使用する。培養組織の調節及び評価分析のために、培養基は、10% を熱不活性化された自己由来の血漿にて補う。

【0096】

培養組織の調製及び T 細胞の増殖性評価

クエン酸塩添加血 (50 ~ 100 ml) は、書面による情報開示に基づいて同意を得た後、静脈穿刺により各被験者から収集した。末梢血単核細胞 (PBMC) は、Histopaque-1077 (英国ドーセット州プールの Sigma 社製) による密度遠心分離にて血液から分離され、24 穴組織培養プレート (米国ニューヨークの Nunc International 社製、Costar 社製、Corning 社製) に PPD、MBP 又は MBP のペプチドを含む 1 x 10

10

20

30

40

50

$6 \text{ cell} / \text{ml}$ を 1.5 ml 用いて培養される。プレートは、湿度 5%、 CO_2 濃度 9.5%、 37°C の温度調節装置内で培養される。5 日乃至 14 日の間に各培養組織から $100 \mu\text{l}$ の部分標本を一つずつ回収し、 96 穴丸底マイクロタイタープレートの底部周辺に移し、 $0.4 \mu\text{Ci}$ にて $[^3\text{H}]$ -チミジン (英国アマシャムの Amersham International 社製) を律動的に送り込む。18 時間経過後、細胞は、マッハ 111 ハーベスタ 96 (Mach 111 harvester 96、米国ニュージャージー州オレンジの Tomtec 社製) を用いたガラス繊維マット (フィンランド、トゥルクの LKB-Wallac 社製) から回収される。 ^3H -チミジン取込は、マクロベータ液体シンチレーションカウンタ (LKB-Wallac) を用いて検出される。抗原を含む試験床は、 $\text{cpm} > 1000$ 、刺激指数 (SI) > 3 、であれば陽性とされる。ここで、SI は、(培養組織に含まれる CPM 抗原) / (抗原を除く培養組織 CPM) である。

10

【0097】

T 細胞株及び T 細胞クローンの生成

MBP 特異性 T 細胞株 (TCL) は、8 人の MS 患者及び 2 人の健康な被験者から生成する。各被験者からの PBM C は、上述のように分離され、 6 穴プレートにおいて、MBP ($50 \mu\text{g} / \text{ml}$) の存在の下で、 $1 \times 10^6 \text{ cell} / \text{ml}$ に培養される。各被験者からの PBM C の一部は、完全に凍結され引き続き行われる再刺激 (restimulation) のために保管される。7 日後、細胞は、2% の IL-2 (英国パーミンガムの Lymphocult-HT ; Biotest 社) の新鮮な培地に移され、培養の 12 日目において、全細胞が、抗原提示細胞 (APC) の供給源として、抗原、IL-2 及び放射線処理された自己由来の PBM C (2500 Red) によって、T 細胞 : APC = 1 : 5 の割合にて再刺激 (restimulate) される。細胞は、IL-2 において、3、4 日毎に増殖し、上述したように、14 日目に抗原、IL-2 及び PBM C によって再刺激される。最初の再刺激 (restimulation) のときに、MBP に対する細胞の特異的な増殖を調べる。すなわち、この MBP において、 2×10^4 個の T 細胞及び 1×10^5 個の放射線処理された自己由来の PBM C は、 96 穴丸底プレートで約 3 倍に培養される。細胞は、2 日間培養され、培養の最後の 18 時間をかけて、 $[^3\text{H}]$ -チミジン (英国アマシャムの Amersham International 社製) を $0.4 \mu\text{Ci}$ にて律動的に送り込む。この後、細胞は、上述したように回収される。TCL は、 $\text{cpm} > 1000$ 、及び SI > 3 で MBP 特異性に対して陽性とされる。

20

【0098】

続く、再刺激 (restimulation) と培養の 3 つのサイクルにて、TCL は、APC として自己由来の放射線照射処理されたこの PBM C において、PHA (英国ドーセット州プールの Sigma 社製) を用いて分枝される。T 細胞は、 $0.1 \text{ cell} / \text{well}$ 、 $0.3 \text{ cell} / \text{well}$ 、及び $1 \text{ cell} / \text{well}$ の限界希釈条件の下で、 1×10^4 の放射線処理された PBM C、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ PHA、及び 2% IL-2 とともに寺崎プレート (Nunc International 社製、Costar 社製) を用いて培養される。10 ~ 12 日後、成熟陽性の穴は、 1×10^5 放射線照射処理 PBM C、 $5 \mu\text{g} / \text{ml}$ PHA、IL-2 を用いて 96 穴丸底プレートに増やされる。3 日後に、穴には、IL-2 を含む新鮮な媒体が供給され、7 日目に、クローンが 48 穴プレート上で、 5×10^5 の放射線照射処理 PBM C、PHA 及び IL-2 を用いて培養され、ここで、クローンは、MBP に対する特異的な反応のための増殖反応測定法で試験される。MBP 特異性的クローンは、1 週間後、PHA 又はダイナベッツ (Dynabeads、英国 Dynal 社製) と、IL-2 とともに 1×10^6 放射線照射処理 PBM C を用いて 24 穴プレートで培養される。クローンは、 24 穴プレート内にて、基本的には上述した 7 ~ 10 日間の再刺激 / 培養サイクルが継続して行われる。MBP ペプチドのパネルを認識するための T 細胞クローン (TCC) の機能は、上述した増殖反応測定法によって確認される。

30

40

【0099】

結果

MS 患者と健康な個体との間の MBP ペプチド評価

本発明者は、ヒト MBP の全長に亘る 15 mer の合成ペプチドに重複するパネルに対

50

する反応性について調べられる健康体及びMS患者由来のPBMCに対して動的反応性試験を行う。各培養組織から得たPBMCの増殖反応は、2週間の間の5時点にて調べられ、MBP及びペプチドに対する反応の動的プロファイルは、PPDに対する反応と比較され、後者は、2次反応/記憶抗原を示している。インターフェロン- γ を使用している患者と使用していない患者との間には、PBMCのMBP及び/又はペプチドに対する反応において、大きな差異は見受けられない(データは示さない。)。MS患者と健康な被験者におけるMBPへの反応の最大値は、PPDに対する反応以上に遅い。以下に、非リコール抗原に対する反応の動的指標を示す。図1は、MS患者及び健康体におけるPPD及びMBPの動的評価の典型例を示している。

【0100】

図2に示すように、MS患者に最も一般的に認められる2つのペプチドが90-114と75-99(12人の患者のうち6人に認められる。)であり、残基30-54、135-159、150-170(12人の患者のうち5人に認められる。)、1-24、105-129(12人の患者のうち4人に認められる。)と続いている。3人の患者は、aa15-39と120-144に反応している。また、2人の患者には、45-69が認められる。また、残基60-84に反応したMS患者はいない。

【0101】

図10によれば、ここで全患者は、HLA-DR2陽性であり、MS患者に最も一般的に認められる2つのペプチドは、90-114と75-99であり(11人の患者のうち6人に認められる。)、次いで残基120-144、135-159、150-170(11人の患者のうち5人に認められる。)であり、次いで1-24、15-39、30-54、105-129(11人の患者のうち4人に認められる。)となっている。3人の患者は、aa45-69に反応し、ここでもまた残基60-84に反応したMS患者はいなかった。

【0102】

対照的に、健康な被験者は、僅か2人の被験者が2以上のペプチド(図3におけるCとJ)に反応している点で極僅かなペプチドに重要性が認められる。aa60-84が認められたのは、被験者C及びJの僅か2人であって、この患者群では残基は確認されない。興味深いことに、3人の被験者は何れも、DRB1*0701対立因子(対立遺伝子)を示している。45-69及び105-129は、どの健康な被験者にも認められないが、75-99及び150-170は、4人の健康体に認められ、135-159は、3人の健康体に認められ、1-24、30-54、60-84及び120-144は、2人の健康体に認められ、15-39及び90-114は、1人の健康体に認められている。全体として、13人の健康体のうち8人は、重複したペプチドの何れにも反応していないが、12人のMS患者のうち1人(MS19)は、一貫してMBPペプチドが確認されていない。特に、この患者は、MBPタンパク質に対しても反応していないことに特徴がある。

【0103】

図11には、健康な被験者のMBPペプチドに対する反応が示されている。この研究では、唯一1人の被験者が2つ以上のペプチドに反応している(N11)。また、N11は、この患者群によって確認されていない残基であるaa60-84に反応した唯一の被験者である。15-39、45-69、及び105-129は、何れの健康な被験者にも確認されていないが、120-144及び135-159は、2人の健康な被験者に認められている。また、1-24、30-54、60-84、75-99、90-144、及び150-170は、1人の被験者に認められる。全体として、12人の健康な被験者のうち9人は、何れの重複するペプチドにも反応していない。

【0104】

全体として、MBP及び/又はペプチドへの反応が最大値を達した日は、健康な被験者と患者との間で大きな相違はなく、両グループにおける動的反応性は、これらの初期の抗原反応に類似していた。加えて、MBP及びペプチドに対する反応の度合いは、患者と健康な被験者とでは相違なかった。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 5 】

MBPペプチド認識性の時間変化

MS患者は、MBPペプチドの幅広のスペクトルに反応することが確認されているが、本発明者は、同一の被験者におけるPBMCR認識性がほぼ4～12ヶ月間に集中され安定しているか否かを調べようとした。図2、図10及び図3には、MS患者と健康な被験者の何れも同一のペプチド認識パターンを呈示しないことが示されている。

【 0 1 0 6 】

図4には、2つの異なる時点で複数のペプチドに反応したMS患者(MS49)の例を示しているが、2番目の時点における認識結果は、4ヶ月後に測定したものであるが、著しく異なっている。これは、2番目の動的試験において、PBMCRのaa15-39、30-54、及び150-170に対する反応が残存したものであるが、75-99及び105-129に対する反応が継続し、90-114及び135-159の部位にシフトしたものである。

10

【 0 1 0 7 】

図5に示す(MS60)は、幅広のエピトープ反応が4ヶ月間以上に亘って反応が集中して継続した患者の例である。2巡目に検査された健康な個体では、何れのペプチドに対する反応もみられなかった(図3)。

【 0 1 0 8 】

全体として、この結果は、MS患者が認識のセットパターンを呈示していないことを示している。各患者において、PBMCRは、患者MS49の例が示すように、幾つかのペプチドに対するPBMCRの反応は、残存し、退行し、MBPの新しい部位にシフトしている。

20

【 0 1 0 9 】

ペプチド認識の周期性

12ヶ月間に亘って3若しくはそれ以上の異なる時点にて、ペプチドに対するPBMCRの反応を解析すると、ある患者では、エピトープ反応が変動するというよりむしろ新たなペプチド部位に不可逆的にシフトしていることを表しているということが明らかになっている。例えば、図2及び10に示されるように、患者MS60は、aa120-144及び135-159の認識が周期的なパターンを示しているが、これは、残基120-144及び135-159が最初の検査時点にてほとんど認識され、これらの2部位に対する反応が2番目の検査時点によって退行し、4ヶ月後に測定された3番目の検査時点で再び現れたものである。患者MS41の動的プロファイルは、aa135-159の認識が幾つかの時点で変動していることを近似的に示している(図2及び10参照)。

30

【 0 1 1 0 】

健康な被験者のグループ(図3)では、ある被験者(M)は、部位75-99及び135-159に対する反応が変動していることを示しており、被験者(F)は、3つの時点のうち2時点の解析にて75-99が認められ、被験者(D)は、残基15-39に対して周期的な反応を示している。

【 0 1 1 1 】

MBPに対する反応の最適なマッピング

TCCは、8人のMS患者及び2人の健康な被験者から生成され、動的反応性試験にて識別されたペプチド基の最適な特異性を明確にするのに用いられる。各TCCの特異性は、15merのペプチドのパネルに対する増殖反応性によって調べられる。クローンSD:A7は、1-24にて確認され、この部位内にてこのTCCは、aa5-19に対する反応を示した。部位30-54は、4つのクローン(MS49:D3、MS49:C8、MS49:A8、MS49:B6)及び部位30-44内のエピトープによって認識される。MS患者由来のクローン(MS39:D7)は、ペプチド60-74を認識し、興味深いことに、ある健康な被験者は、我々の動的反応性試験において、この部位60-84に対して反応している。5つのクローン(MS43:A7、MS41:B6、MS41:A2、MS41:C6、N5:8)は、部位75-99に含まれるaa83-99を認識

40

50

する。ある患者は、105-129内に含まれるaa110-124(MS60:A2、MS60:B3)、に対して特異的なTCCを生成し、同一患者由来の他のTCCは、120-144部位内の130-144(MS60:E1)に対して特異的である。5人の被験者は、部位135-159内の認識エピトープであるMS60:F7、MS60:D1、MS59:F1及びN5:19がaa140-154を認識し、MS57:A1が140-149に対して特異的であるというクローンを生成し、MS17:A3は、130-144のシーケンスに対して反応する。このクローンのパネルは、MBPの135-159内に少なくとも2つのT細胞エピトープが存在することを明確にしている。最後に部位150-170は、aa156-169に対して特異的な2つのクローンによって認識される。全TCCの特異性は、図6に要約されている。

10

【0112】

例2-MBP中のアピトープの識別

物質と方法

【0113】

APIPSを用いた抗原提示試験

ペプチドのT細胞クローンに対する提示は、培養によって測定する。APCは、0.5%パラホルムアルデヒドで定着され、96穴組織培養プレートの穴毎に 1×10^5 cell/wellに培養される。T細胞クローンは、種々の濃度のペプチドの存在の下で、1穴当たり 2×10^4 cell/wellに培養される。37にて48時間温置した後、16~20時間に亘って $[^3\text{H}]$ -チミジン取込を行い、増殖を測定する。結果は、活性なAPCによって示されるエピトープに反応するためのT細胞の能力と比較される。

20

【0114】

DR2:MBP82-100の遺伝子導入マウスから分離されたT細胞に対するペプチドの提示は、上述したAPCが1穴当たり 5×10^5 cell/wellに培養され、T細胞が1穴当たり 1×10^5 cell/wellに培養され、 ^3H -チミジンの添加に先立って72時間の温置が行われることを除いては、基本的には上述したように行われる。

【0115】

結果

この実験において、先の例にてエピトープとして識別されたペプチドは、APIPSを用いてその適応性が検査される。結果を図7bに示す。これまで検査された5つのエピトープのうち、4つのエピトープがアピトープであり(30-44、80-94、110-124、及び130-144)、1つはアピトープではないがエピトープとして作用することが明らかになった(156-170)。

30

【0116】

例2A-MBPペプチド30-44、110-124、130-144、及び156-170に関する調査

種々のMBPペプチドがアピトープであるか否かを調査するために、定着されたAPCによってT細胞に示される適応性を調査した。活性化された、すなわち予め刺激されたMgar(HLA-DR2+ve)細胞は、血清中のペプチド又は血清単独で3.5時間予め刺激される。過剰なペプチドを細胞から取り除き、適切なT細胞クローンを添加する。T細胞増殖反応は、 $[^3\text{H}]$ -チミジンを加えて測定する。

40

【0117】

図8及び図9に示されるように、ペプチド30-44(図8A)、110-124(図8B)、及び130-144(図9A)は、更なる抗原処理をすることなく、定着されたAPCによって用意できる。したがって、これらのペプチドは、アピトープとして定義される。一方、ペプチド156-170は、T細胞に対して提示するために、更なる抗原処理を必要とする(図9B)。定着されたAPCは、このエピトープをT細胞に提示することができない。それゆえ、156-170は、アピトープではない。

【0118】

例2B-MBPの部位77-100及び125-148内のアピトープの識別

50

所定の全エピトープに対して、1又は1以上のエピトープが存在し、これらは、更なる抗原処理をすることなく、APCに対して提示される。MBPの2部位内のエピトープの提示は、活性の細胞、又はMBP部位77-100(図12)及び125-148(図13)から得た血清中又は単独の血清中にて、重複するペプチドで培養されたパラホルムアルデヒド固定されたMgar(HLA-DR2+ve)細胞を培養することによって調べられる。T細胞を付加し、72時間後(図12)又は48時間後(図13)にT細胞増殖反応を³H-チミジン取込によって調べた。MBP77-100に関して、T細胞は、DR2:MBP82-100遺伝子導入マウスから分離されるのに対して、MBP130-144については、T細胞クローンMS17:A3が用いられる。

【0119】

MBP部位77-100に対して、以下のペプチドがエピトープとして定義される。

MBP 83-99 ENPVVHFFKNIVTPRTP
 MBP 80-94 TQDENPVVHFFKNIV
 MBP 81-95 QDENPVVHFFKNIVT
 MBP 82-96 DENPVVHFFKNIVTP
 MBP 83-97 ENPVVHFFKNIVTPR
 MBP 84-98 MPVVHFFKNIVTPRT

【0120】

DR2 MBP 82-100遺伝子導入マウス由来のT細胞によって認識される最小のMBPシーケンスは、部位85-94である。

【0121】

MBP部位125-148に対してに関して、以下のペプチドがエピトープとして定義される。

MBP 130-144 RASDYKSAHKGFKGV
 MBP 131-145 ASDYKSAHKGFKGV
 MBP 132-146 SDYKSAHKGFKGVDA
 MBP 133-147 DYKSAHKGFKGVDAQ

【0122】

T細胞クローンMS17:A3によって認識される最小のMBPシーケンスは、部位133-144である。

【0123】

例2C-MBP部位89-101の調査

本発明者は、予め、他のミエリンT細胞エピトープと比べ、溶液状態にて、ペプチド89-101を投与しても全ミエリン又は89-101ペプチド自体の何れかを導入してもマウス試験免疫性脳脊髄炎(EAE)を予防できない(Anderton and Wraith (1998) Eur. J. Immunol. 28: 1251)ということを示している。

【0124】

3つのT細胞エピトープを備えるMBP89-101

MBPの部位81-111に対するT細胞反応を調べるために、試験管内で、81-111を有するマウス由来のリンパ節細胞を81-111で刺激する。これらの細胞は、81-111部位をカバーする2残基を持った10merのペプチドのパネルにて試験される(すなわち、81-90、83-92、85-94、87-96、89-98、91-100、93-102、95-104、97-106、99-108、及び101-111)。89-101をカバーするペプチドに対する反応パターンは、エピトープとは異なる少なくとも2つ(及び約3つ)の提示を示す5つの隣接するペプチド(87-96から95-104までのN末端)を刺激することを示している。

【0125】

更にこの部位を調べるために、元の81-111反応T細胞株から3つの副系を生成し、シフトして84-106部位をカバーしている1つの残基を持つ重複する10merのペプチドのパネルで再試験した。結果は、89-101シーケンスの中に、重複しない8

10

20

30

40

50

9 - 94、92 - 98、及び95 - 101の3つの異なる部位が存在することが明らかになった(図14参照)。

【0126】

MBPペプチド92 - 98は、潜在エピトープである。

3つのエピトープ特異性T細胞株(TCL)は、全組換え型MBP及びペプチド89 - 101に対する反応性をテストしたとき、興味深い相違点を示す。3つのTCLの全ては、ペプチド(89 - 101)に対して反応するが、89 - 94及び95 - 101特異性TCLだけは、全MBPに対して反応する。これは、完全なMBPの抗原処理は、92 - 98を認識しないが89 - 94及び95 - 101を認識するT細胞に対するリガンドを優先的に生成することを示唆している。これは、92 - 98のエピトープが陰性であることを示している(すなわち、自然抗原の処理によって生成され得ない)。MBP89 - 101ペプチドが3つの分離したT細胞集団によって認識されるペプチド又はMHCリガンドに帰するMHC分子とともに3つの異なった相互反応に参与できるものと思われる。しかしながら、MBPの処理は、これらのT細胞集団のうち2つに対してリガンドを生成するのみである(図14参照)。

10

【0127】

EAEの導入は、完全なMBPの減少の結果として生じるCNSにおいて現れる自己抗原エピトープのT細胞認識性を要求する。上記識別された3つのT細胞エピトープのうち1つでも含んだペプチドによるマウスの免疫化は、自然に処理されたエピトープ(89 - 94又は95 - 101)を含んでいるペプチドのみがEAEを誘導できることを示している。これは、92 - 98が潜在エピトープであることの知見を指示するものである。

20

【0128】

MBPペプチド92 - 98は、MBP89 - 101に対して優性なエピトープである。

部位89 - 101は、上述したように、3つの異なった重複しないペプチドを含んでいる。これらのうち、ペプチド92 - 98は、この部位に対して優性種であると思われる。例えば、T細胞クローンが89 - 101ペプチドによって初回抗原刺激を受けたマウスから生成されると、全6つのクローンは92 - 98に対して反応性を持つようになる。それぞれの位置に単一のアラニン置換体を含んだ89 - 101類似のペプチドを用いると、92 - 98位置の何れかの置換基が反応性の欠陥を導き、92 - 98核内の何れの残基が変更されていることがこのエピトープを認識する効果を高めることが判る。MBPペプチド89 - 101は、自然に処理されたMBPエピトープを認識するEAEに関係したT細胞を寛容化することができない。

30

【0129】

上述した知見を要約するために、本発明者は、a)89 - 101シーケンスは、3つの異なるT細胞エピトープを生成する可能性を持ち、b)これらのエピトープのうち2つ(89 - 94及び95 - 101)だけが(生体内及び試験管内の両方で)完全なMBPの抗原処理によって生成され、c)自然に処理されたエピトープを含むペプチド及び潜在エピトープを含まないペプチドがEAEの誘導に効果的であり、d)ペプチド治療試験において89 - 101ペプチドは、EAEから保護することができない、ということを見出した。

40

【0130】

この情報は、T細胞と関係のある疾患を直接結紮することができないことから、ペプチド89 - 101が、EAEに対して寛容化できないという仮説を研究するための基本を与えるものである。この仮説によれば、適切な構造にてMHC抑制因子(I-A^S)に直接結合できないであろうから、ペプチド(89 - 101)は、主要な脳炎誘発性エピトープ(89 - 94)に対して寛容を誘導できない。言い換えれば、89 - 101は、89 - 94に対するT細胞のアピトープとして作用しない。

【0131】

この可能性を確かめるために、寛容性試験は、ペプチド89 - 101及びペプチド87 - 96(図15A及びB)を用いて行われる。ペプチド87 - 96は、EAEを誘導する

50

に最も効果的なエピトープ(89-94)を含んでいる。

【0132】

方法

マウスは、0日目にフロインド完全免疫増強剤であって、100pgのペプチドを投与されるに先立つこと8日、6日、4日に200pgのペプチドを含むPBS又はPBSを単独で腹腔内に投与された。10日後、リンパ節細胞(1穴当たり 6×10^5)は、X-Vivo15培地に 5×10^{-5} Mの2メルカプトメタノール及び2MのL-グルタミンを入れ、抗原を加えたものと加えないものを用意し、72時間培養された。培養組織は、最後の16時間をかけて0.5 μ Ciの³H-チミジンによって刺激され、組織は、液体シンチレーションカウンタを用いて測定された。結果は、培養組織が3倍になるまで毎分にカウントする方法で表される。

10

【0133】

結果

87-96による準備刺激は、それ自体に対して強い再反応を誘導し、89-101に対して弱い反応を誘導した(図15A及びBにおける及びの各々)。これは、89-101から89-94を生成する抗原処理の必要性と関係している。87-96による準備刺激に先立って寛容原として87-96を使用することで、87-96及び89-101(図15Aにおける及び)に対する再反応が抑制された。この89-94による活性化はT細胞に反発し、一旦体内にて反応しなくなれば、89-96又は89-101から生成されたものであっても、試験管内では89-94に対して反応できない。しかしながら、最終的に87-96による準備刺激に先立って寛容原として89-101を用いても、87-96又は89-101の何れに対しての再反応をも抑制できなかった(図15A及びBにおけると)。これらの結果は、免疫寛容原性型におけるペプチド89-101の投与が89-94シーケンスに基づく天然処理された脳髄炎誘発性エピトープを寛容化できないことを示している。すなわち、89-101ペプチドは、89-94エピトープに対するアピトープとして作用することはできない。

20

【0134】

理論的には結合することは望めないが、本発明者は、実験結果が、MHCペプチドの結合側面におけるペプチド89-101の位置によって説明できるものと確信している。仮に、部位92-98がペプチド結合ポケット内にあるためにペプチドが優先的に結合するのであるならば、MBP92-98特異性T細胞によって認識されるはずである。これが、なぜ、マウスがMBP89-101ペプチドによる初回抗原刺激を受けると、生成される全T細胞クローンがMBP92-98を認識するか、また同様に、89-101が寛容化T細胞として用いられると、MBP92-98エピトープを認識する細胞を主に寛容化するか、を説明している。仮に、MBP92-98が潜在エピトープであるならば、全抗原の自然な処理からは生成されず、T細胞が認識するエピトープは、生体内にはおそらく存在しないことになる。たとえ、MBP92-98特異性T細胞が生体内に存在したとしても疾患に関係ない。それゆえ、89-101は、全MBPにおいてEAE起因性を防ぐことができない。

30

【0135】

例3 - MS型マウスのペプチド治療

本発明者は、腹腔経由(Liu and Wraith (1995) Int Immunol 8: 1255-1263)、又は鼻腔経由(Metzler and Wraith (1993) 5: 1159-1165)の何れかの方法にて全身に投与された1用量のペプチド抗原は、3ヶ月間は、実験的な自己免疫性脳脊髄炎(EAE)から効果的にマウスを守ることを予め示した。少なくとも5用量のペプチドは、EAE特異性T細胞レセプタを(Liu et al (1995) Immunity 3: 407-415)表すTg4遺伝子導入マウス(Burkhart et al (1999) 11: 1625-1634)に寛容を誘導することが要求された最近の研究は、両投与方法は、遺伝子非導入マウスでは等しく安全であるが、Tg4マウスにおいては、鼻腔(IN)経由が腹腔(IP)経由よりも安全であることを示している。

40

【0136】

50

M B P の 8 3 - 9 9 ペプチドは、適切な H L A - D R 2 クラス I I M H C 分子及びこのペプチドに特異的なヒト T 細胞クローン由来の T C R の両方を表す F u g / D 6 遺伝子導入マウスにて検査される。マウスは、T g 4 遺伝子導入マウスの治療に用いた標準的な 1 用量 (T g 4 プロトコル)、又はアレルギー患者の治療に用いられるように投与用量を段階的に増大するペプチドの減感プロトコル (減感プロトコル) の何れかのペプチド によって治療される。

【 0 1 3 7 】

T g 4 プロトコル：マウス群は、ペプチド 8 3 - 9 9 (リン酸塩緩衝食塩水 (P B S) 中に 4 m g / m l 混合する) 又は P B S 単独の合計 2 5 μ l を鼻腔投与にて治療される。マウスは、5 週間、週の初日から 5 日目まで毎日、合計 1 0 用量が与えられて治療される。週のはじめには、6 匹のマウスの各々は、フロインド完全免疫増強剤にてペプチド 8 3 - 9 9 を投与され、また、1 日に 1 及び 3 回の百日咳毒素 (2 0 0 n g) I P 射出を受ける。少なくとも 3 0 日間、E A E の進行を監視する。

10

【 0 1 3 8 】

減感プロトコル：マウス群は、ペプチド 8 3 - 9 9 又は P B S 単独の合計 2 5 μ l を鼻腔投与にて段階的に投与用量を増大させて治療される。用量の段階変化は、0 . 1 p g から始めて 1 μ g , 3 μ g , 6 μ g , 1 2 μ g , 5 0 μ g と続けられ、1 0 0 μ g は、3 回投与される。マウスは、5 週間、週の初日から 5 日目まで毎日、合計 1 0 用量が与えられて治療される。週のはじめには、6 匹のマウスの各々は、フロインド完全免疫増強剤にてペプチド 8 3 - 9 9 を投与され、また、1 日に 1 及び 3 回の百日咳毒素 (2 0 0 n g) I P 射出を受ける。少なくとも 3 0 日間、E A E の進行を監視する。

20

【 0 1 3 9 】

例 4 - M S 患者に対するアピトープ複合薬の鼻腔投与

ワクチンは、M B P ペプチド 3 0 - 4 4、8 3 - 9 9、1 1 0 - 1 2 4 及び 1 3 0 - 1 4 4 (すなわち、アピトープとして 識別 される M B P エピトープのうちの幾つか。) からなる。ワクチンは、フェイズ I a / I b 試験において、3 5 人の患者から得られる。試験は、患者にペプチド (I a) を 1 用量投与し、3 ヶ月間は何もしない 一回の交差 試験である。患者は、安全性を評価するためにワクチンの 1 用量投与後の 3 ヶ月間監視される。治療は、鼻腔堆積による週 2 回の投与からなる。各患者に対して：臨床的な活性は、毎月磁気共鳴画像によって解析され、免疫学的活性は、増殖のために動的 反応性 試験を用いて監視される。また、サイトカイン産生は細胞に基づく E L I S A を用いて監視される。

30

【 0 1 4 0 】

試験は、慢性進行性 (C P) 疾患を 持つ 5 人の患者に対する治療を含んでいる。これらの患者は、低い M R I 活性に基づいて選択され、最初に高い用量のペプチドに治療する。C P 患者群は、M R I 活性の増加によって顕著となる如何なる危険な影響を示しそうなため、治療は C P 患者群にて開始される。回帰熱が小康状態にある患者の治療を一旦開始すれば、単一及び複合投与治療の両方ともが C P 群に対して安全であるということは明らかである。回帰熱が小康状態にある患者 3 0 人からなるグループは、3 ヶ月の監視期間中に M R I 損傷が酷くなることに基づいて集められた。これらは、高用量のペプチド、中程度の用量のペプチド、低用量のペプチドにて治療される 3 つのグループに分けられる。

40

【 0 1 4 1 】

【表 1】

分析時点 (単位:月)	CP患者	RR患者
0	月毎の監視を開始	
3	フェーズIa(ペプチド一容量の試験)開始: 治療後の1~2週間後におけるMRIと月毎の監視を行う	
6	フェーズIb(毎週2倍の容量のペプチドを摂取する試験)開始: 月毎の監視は継続	月毎の監視と症状の悪化した患者の募集
9		フェーズIb(毎週2倍の容量のペプチドを摂取する試験)開始: 月毎の監視は継続
12	治療終了。月毎の監視を6ヶ月間継続	
15		治療終了。月毎の監視を6ヶ月間継続

10

20

【0142】

また、以下に略語略号を示す。

30

A P C = 抗原提示細胞 (antigen presenting cells) ; M H C = 主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex) ; T C R = T細胞レセプタ (T cell receptor) ; E A E = 実験的自己免疫脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis) ; A P I T O P E = 抗原処理非依存エピトープ (antigen processing independent epitope) ; A P I P S = 提示組織非依存抗原系 (antigen processing independent presentation system) ; a a = アミノ酸 (amino acid) ; M S = 多発性硬化症 (Multiple Sclerosis) ; M B P = ミエリン塩基性タンパク (myelin basic protein) ; P L P = プロテオリピドタンパク質 () proteolipid protein) ; T C L = T細胞株 (T cell line) ; T C C = T細胞クローン (T cell clone) ; P B M C = 末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells) ; P P D = ヒト結核菌精製タンパク質誘導体 (Mycobacterium tuberculosis is purified protein derivative) ; P H A = 植物性血球凝集素 (phytohemagglutinin)

40

【0143】

発明のシステム及び方法には、種々の変形例があって、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々の変更が可能である。また、特に好ましい実施例に関して説明されているが、請求された発明はこの特定の実施例に過度に制限されない。発明を実現するために記述された様々な変形例は、化学、生物学、又は本発明が含まれる関連分野では熟練されたものであることは明白である。上記詳細な説明にて言及した全ての刊行物は、ここでは参考として全て含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

50

図1は、多発性硬化症(MS)の患者及び健康な個体における結核菌精製ツベルクリンタンパク質(PPD)及びMBPに対する運動性のプロフィールの代表的な例を示すグラフである。MS患者(A)及び正常個体(B)から分離された末梢血液単核細胞(PBMC)を、PPD及び全部のMBPの存在のもとでの増殖能力に対して試験し、MBPに対する増殖反応の運動性のプロフィールを、二次性抗原PPDのそれと比較したものである。

【図2】

図2は、MS患者におけるMBP及びそのペプチドに対するPBMC反応を示す表である。特定の個体を、約4~7ヵ月の間隔で3回分析した。

【図3】

図3は、健康な個体におけるMBP及びMBPペプチドに対するPBMC反応を示す表である。各分析時点は、4~7ヶ月離れている。

【図4】

図4は、2つの異なる時点における複合ペプチドに反応するMS患者(MS49)の例を示すグラフであり、4ヵ月後に測られた第2の時点間のプロフィールは、かなり異なることが認識された。PBMCは、MBP及びMBPの長さ全体に亘るペプチドのパネルの存在のもとに培養され、増殖は、 ^3H -チミジン取込によって測られた。第1の時点で観察された幅広のT細胞増殖反応は、7ヵ月後の第2の時点で測られた反応とかなり異なっている。

【図5】

図5は、エピトープ反応が広がり(第1の時点)、退行し(第2の時点)、12ヵ月の期間経過後(第3の時点)に再び現れた患者の例を示すグラフである。

【図6】

図6は、MS患者及び健康な個体から生成されるTCCのを使用して得られる運動性の反応分析評価で確認されたペプチド部位の微細特異性のマップを示す図である。スクリーニング分析評価で使われる殆どのペプチドは、長さが15merであるが、少しのペプチドは10merであり、1ペプチドは、17merである。各TCCの特異性は、少なくとも2回試験される。

【図7】

図7aは、MS患者からのTリンパ球によって認められるミエリン塩基性タンパク質内におけるT細胞エピトープの特性を示す表である。図7bは、全てのT細胞エピトープが凝固したAPCによって必ずしも示されるというわけではなく、したがって、アピトープではない。

【図8】

図8は、活性の及び定着したAPCによるT細胞クローンに対する様々なMBPペプチドの現れ方を示す図である。図8Aは、ペプチドが30-44であり、図8Bは、ペプチドが110-124である。

【図9】

図9は、活性の及び定着したAPCによるT細胞クローンに対する様々なMBPペプチドの現れ方を示す図である。図9Aは、ペプチドが130-144であり、図9Bはペプチドが156-170である。

【図10】

図10は、3つの離れた時点において得られるMS患者のMBP及びMBPペプチドに対するピーク刺激指数(SI)を示す表である。第2の時点のサンプルは、第1の時点の4~8ヶ月後に、第3の時点のサンプルは、第2の時点の3~5ヶ月後に収集された。バックグラウンドcpmは、各日毎に測定され、80~700cpm間を変化し、 $SI > 3$ 、 $cpm > 1000$ によって陽性と定義した。(患者MS19及びMS67から全ての3の時点に対するサンプルを集めることできなかった)。

【図11】

図11は、健康な個体におけるMBP及びMBPペプチドに対するピーク刺激指数(S

10

20

30

40

50

I) 値を示す表である。バックグラウンド c p m は、各日毎に測定され、80 ~ 7000 c p m 間を変化し、S I > 3、 c p m > 1000 によって陽性と定義した。

【図12】

図12は、APCによる部位77-100における入れ子MBPペプチド(nested MBP) DR2:MBP82-100の遺伝子導入マウスから分離されたT細胞の反応を示す図である。

【図13】

図13は、APCによる部位125-148におけるMBPペプチドの存在に対するT細胞クローンMS17:A3の反応を示す図である。

【図14】

図14は、MBP89-101の配列内におけるT細胞エピトープ認識を示す図である。配列:89-94、92-98及び95-101内には、異なるが、重なり合った3つのT細胞エピトープがある。アスパラギニルエンドペプチダーゼ(AEP)の作用による残基94及び95間の分割に対する潜在性は示される。

【図15】

図15は、89-94エピトープに反応するT細胞に対して、アピトープとして働くMBPペプチド87-96(A)及び89-101(B)の吸収力を示す図である。

【図1A】

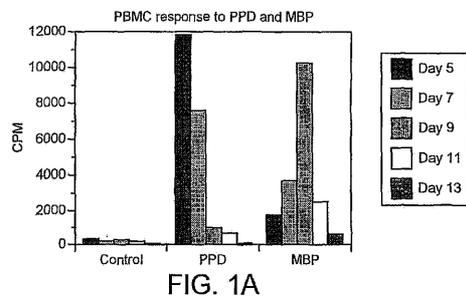


FIG. 1A

【図1B】

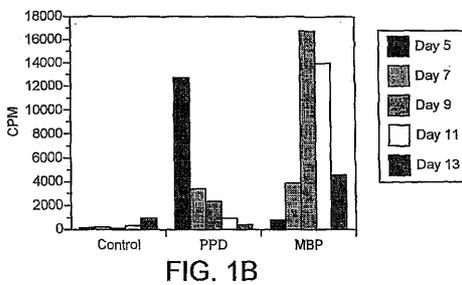


FIG. 1B

【図2】

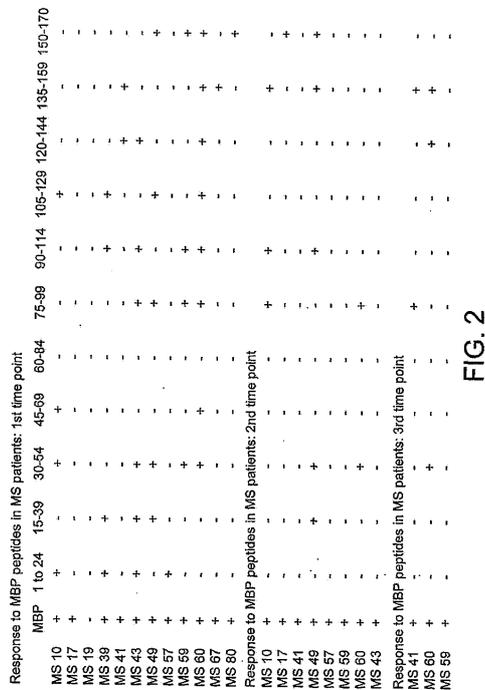


FIG. 2

【 3 】

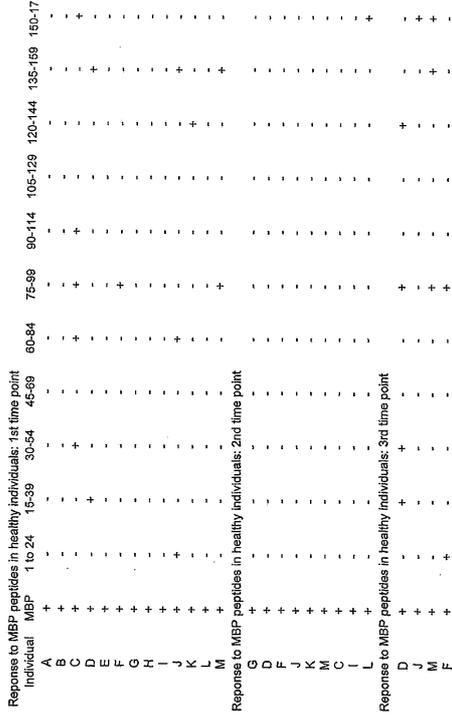


FIG. 3

【 4 】

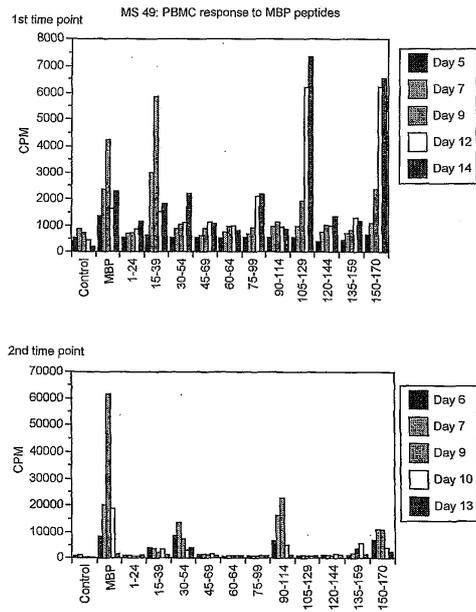


FIG. 4

【 5 】

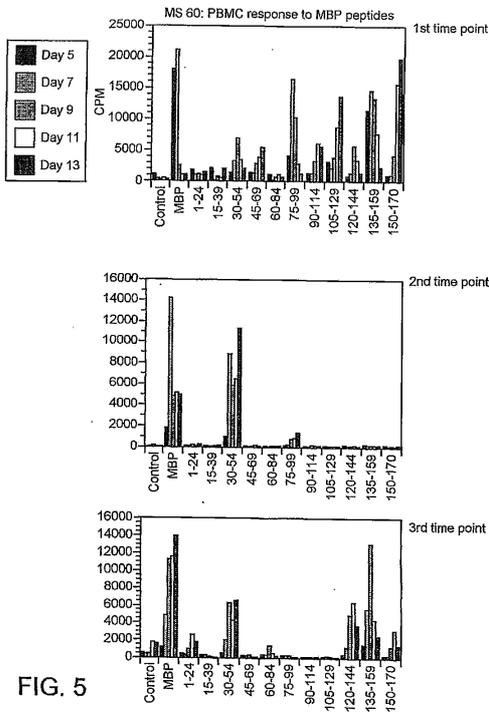


FIG. 5

【 6 】

TCC	MBP region	Specific peptide
MS 39 : A7*	1-24	5-19
MS 49 : D3*	30-54	30-44
MS 49 : C8*	30-54	30-44
MS 49 : A8*	30-54	30-44
MS 48 : B6*	30-54	30-44
MS 39 : D7*	60-84	60-74
MS 43 : A7*	75-99	83-99
MS 41 : B6*	75-99	83-99
MS 41 : A2*	75-99	83-99
MS 41 : C6*	75-99	83-99
NS : 8**	75-99	83-99
MS 60 : A2*	105-129	110-124
MS 60 : B3*	105-129	110-124
MS 60 : E1*	120-144	130-144
MS 17 : A3*	120-144	130-144
MS 60 : F7*	135-159	140-154
MS 60 : D1*	135-159	140-154
MS 57 : A1*	135-159	140-154
MS 59 : F1*	135-159	140-154
NS : 19**	135-159	140-154
MS 43 : A3*	150-170	156-169
MS 43 : D2*	150-170	156-169

FIG. 6

【 7 A 】

PROTEIN REGION STUDIED	EPITOPES IDENTIFIED USING T CELL CLONES
1-24	5-19
15-39	Not common
30-54	30-44
45-69	Not common
60-84	60-74
75-99	80-94 83-99
90-114	Not common
105-129	110-124
120-144	130-144
135-159	130-144 140-154
150-170	150-164 156-169

FIG. 7A

【 8 A 】

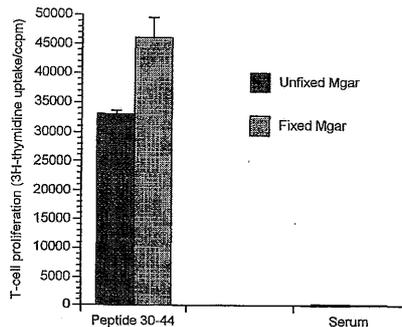


FIG. 8A

【 7 B 】

EPITOPE STUDIED	APITOPE STUDIED
5-19	Not done
30-44	++
60-74	Not done
80-94	++
83-99	++
110-124	++
130-144	++
140-154	Not done
156-170	-

FIG. 7B

【 8 B 】

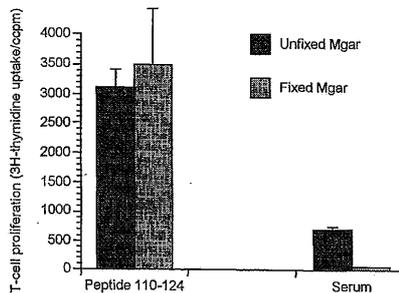


FIG. 8B

【 9 A 】

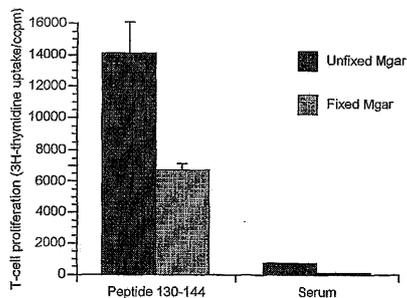


FIG. 9A

【 10 】

Time point	MBP	1-24	15-39	30-54	45-69	60-84	75-99	90-114	105-129	120-144	135-159	150-170
MS 10 1	14	17	3	15	35	2	1	2	15	1	2	1
MS 10 2	4	1	<1	<1	<1	9	4	1	1	<1	4	1
MS 10 3	8	3	1	1	1	1	1	2	1	1	4	0
MS 17 1	28	1	1	1.5	2	<1	<1	<1	1	1	1.5	2
MS 17 2	51	1	1	1	1	<1	<1	<1	<1	<1	1	6
MS 17 3	31	1	1	1	1	<1	<1	2	1	1	1	1
MS 19 1	1	2	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 19 2	1.5	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 19 3	39	3	5	1	3	2	2	7.5	6	<1	2	2
MS 39 1	68	1	<1	<1	2	2	<1	<1	<1	1	<1	<1
MS 39 2	68	1	<1	<1	2	2	<1	<1	<1	1	<1	<1
MS 39 3	50	8	1	1	2	1	1.5	1	1	1	<1	<1
MS 41 1	68	2	3	2	1.5	1	1	2	8	7	9	3
MS 41 2	16	<1	<1	<1	2	1	1	2	1	1	65	<1
MS 41 3	74	2	1.5	1	2	8	1	1	1	1	<1	<1
MS 43 1	33	4	23	3	3	24	4	2	12	3	4	<1
MS 43 2	75	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 43 3	66	2	2	1	13	2	1	2	2	2	7	2
MS 49 1	8	5	9	11	5	4	11	4	35	6	5	31
MS 49 2	202	2	9	23	4	3	2	73	2	2	11	34
MS 49 3	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	11	2
MS 57 1	7	8	2	1.5	1	1	1	2	<1	<1	<1	<1
MS 57 2	6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 57 3	6	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 69 1	57	2	1	6.5	1	1	9	37	1	1	2	14
MS 69 2	27	1	<1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
MS 69 3	14	1	2	1	1	1	1	2	2	63	137	1
MS 69 4	44	3	2	19	8	1	28	8	11	16	16	12
MS 69 5	14	1	1	18	1	1	1	1	1	1	1	1
MS 69 6	33	2	<1	13	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
MS 69 7	148	2	3	2	1	2	2	1	<1	1	1	58

FIG. 10

【 9 B 】

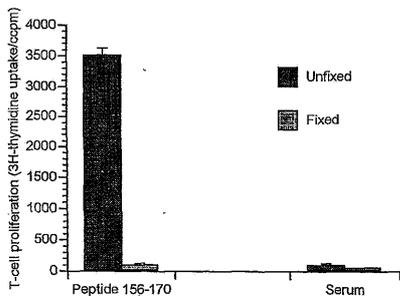


FIG. 9B

【 1 1 】

	MBP	1-24	15-39	30-34	45-69	60-84	75-99	90-114	105-128	120-144	135-159	150-170
N1	20	<1	<1	<1	<1	0	1	<1	1	<1	<1	<1
N2	64	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1
N3	14	2	2	2	1	4	6	1	1	<1	2	3
N4	6	1	1.5	<1	<1	<1	1	1	<1	<1	1	<1
N5	27	<1	1.5	<1	<1	<1	1.5	1	<1	<1	1	<1
N6	29	5	1	1	3	2	5	6	<1	2	3	2
N7	100	2	<1	2	<1	<1	<1	<1	2	<1	2	2
N8	33	3	<1	1.5	<1	1	1	1	1	1	2.5	1.5
N9	104	<1	<1	2	<1	1	1	<1	1	2	1	<1
N10	72	3	<1	1	<1	2	1.5	<1	<1	71	5	<1
N11	11	4	1	18	<1	12	5	<1	2	7	7	8
N12	89	1	<1	<1	<1	<1	1	<1	<1	<1	<1	<1

FIG. 11

【 1 2 】

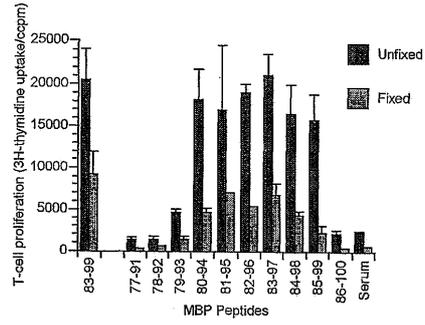


FIG. 12

【 1 3 】

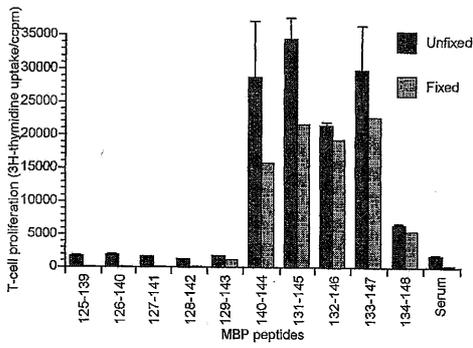


FIG. 13

【 1 4 】

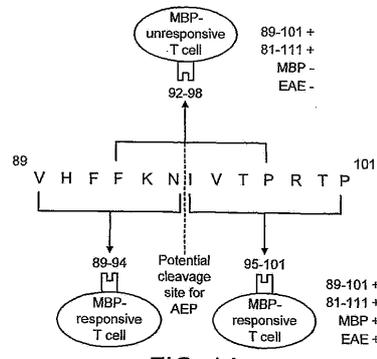


FIG. 14

【 15 A 】

Symbol	Intraperitoneal Peptide	Peptide for priming	Peptide for recall in vitro
□	None	87-96	87-96
○	None	87-96	89-101
■	87-96	87-96	87-96
●	87-96	87-96	89-101

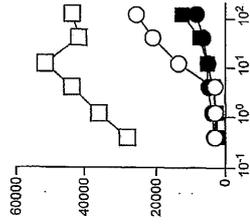


FIG. 15A

【 15 B 】

Symbol	Intraperitoneal Peptide	Peptide for priming	Peptide for recall in vitro
□	None	87-96	87-96
○	None	87-96	89-101
■	89-101	87-96	87-96
●	89-101	87-96	89-101

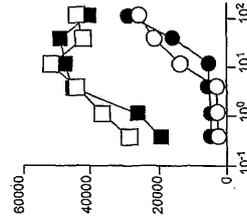


FIG. 15B

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15 Z
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 D
G 0 1 N	33/566 (2006.01)	G 0 1 N	33/566

- (72)発明者 レイス、デイビッド、キャメロン
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー
- (72)発明者 アンダーソン、ステファン、マーク
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー
- (72)発明者 マツァ、グラツィエラ
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー
- (72)発明者 ポンスフォード、メアリー
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー
- (72)発明者 ストリーター、ヘザー、パーバラ
イギリス国 B S 8 1 T D ブリストル ユニバーシティ オブ ブリストル デパートメント
オブ パソロジー アンド マイクロバイオロジー

審査官 浅野 美奈

- (56)参考文献 特表平 1 0 - 5 0 9 1 7 2 (J P , A)
特表平 0 6 - 5 0 7 1 6 8 (J P , A)
特表平 1 0 - 5 0 0 1 0 9 (J P , A)
国際公開第 9 7 / 0 4 1 4 4 0 (W O , A 1)
特表平 0 5 - 5 0 7 9 1 1 (J P , A)
国際公開第 0 0 / 0 1 1 0 2 7 (W O , A 1)
Paul J. Fairchild, et al., An autoantigenic T cell epitope forms unstable complexes with class II MHC: a novel route for escape from tolerance induction, International Immunology, 1993年, Vol. 5, no. 9, 1151-1158
Paul J. Fairchild, et al., The nature of cryptic epitopes within the self-antigen myelin basic protein, International Immunology, 1996年, Vol. 8, No. 7, 1035-1043

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 0
A 6 1 K 3 8 / 0 0
A 6 1 P 3 7 / 0 6
A 6 1 P 3 7 / 0 8
C 0 7 K 1 4 / 4 6
C 1 2 Q 1 / 0 2
G 0 1 N 3 3 / 1 5
G 0 1 N 3 3 / 5 3
G 0 1 N 3 3 / 5 6 6

专利名称(译)	肽调查方法		
公开(公告)号	JP5431628B2	公开(公告)日	2014-03-05
申请号	JP2002521505	申请日	2001-08-17
[标]申请(专利权)人(译)	阿皮托普技术(布里斯托尔)有限公司		
申请(专利权)人(译)	Apitopu科技(布里斯托尔)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Apitopu科技(布里斯托尔)有限公司		
[标]发明人	レイスデイビッドキャメロン アンダートンステファンマーク マツアグラツィエラ ポンスフォードメアリー ストリーターヘザーバーバラ		
发明人	レイス、デイビッド、キャメロン アンダートン、ステファン、マーク マツア、グラツィエラ ポンスフォード、メアリー ストリーター、ヘザー、バーバラ		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/46 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566 A61K39/00 C07K C07K14/47		
CPC分类号	A61P25/00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/4713 G01N33/505 A61K38/10 A61K38/17 C07K14/47 A61K39/0008		
FI分类号	G01N33/50.Z A61K37/02 A61P37/06 A61P37/08 C07K14/46 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/53.D G01N33/566		
代理人(译)	小池 晃		
优先权	2000020618 2000-08-21 GB 2001014547 2001-06-14 GB		
其他公开文献	JP2004506921A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了一种通过选择能够结合MHC I类或II类分子而无需进一步加工的肽来选择致耐受性肽的方法。还提供了通过这种方法选择的肽及其在药物组合物中的用途和治疗和/或预防疾病的方法。

分析時点 (単位:月)	CP患者	RR患者
0	月毎の監視を開始	
3	フェーズ1a(ペプチド一容量の試験)開始: 治療後の1~2週間後におけるMRIと月毎の監視を行う	
6	フェーズ1b(毎週2倍の容量のペプチドを摂取する試験)開始: 月毎の監視は継続	月毎の監視と症状の悪化した患者の募集
9		フェーズ1b(毎週2倍の容量のペプチドを摂取する試験)開始: 月毎の監視は継続
12	治療終了。月毎の監視を6ヶ月間継続	
15		治療終了。月毎の監視を6ヶ月間継続