

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4624684号
(P4624684)

(45) 発行日 平成23年2月2日(2011.2.2)

(24) 登録日 平成22年11月12日(2010.11.12)

(51) Int.Cl.	F I
C07K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705 Z N A
C07K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06
C07K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08
A61K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U
請求項の数 55 (全 75 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号 特願2003-582189 (P2003-582189)
 (86) (22) 出願日 平成15年4月3日(2003.4.3)
 (65) 公表番号 特表2006-505500 (P2006-505500A)
 (43) 公表日 平成18年2月16日(2006.2.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/IL2003/000278
 (87) 国際公開番号 W02003/084995
 (87) 国際公開日 平成15年10月16日(2003.10.16)
 審査請求日 平成18年3月31日(2006.3.31)
 (31) 優先権主張番号 148993
 (32) 優先日 平成14年4月4日(2002.4.4)
 (33) 優先権主張国 イスラエル(IL)

(73) 特許権者 501479721
 イースム、リサーチ、デベロプメント、カンパニー、オブ、ザ、ヘブライ、ユニバーシティー、オブ、イエルサレム
 YISSUM RESEARCH DEVELOPMENT COMPANY OF THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM
 イスラエル国イエルサレム、ビー、オー、ボックス、39135、ジバット、ラム、エドモンド、ジェイ、サフラ、キャンパス、ハイ、テク、パーク、ザ、ヘブライ、ユニバーシティー、オブ、イエルサレム
 (74) 代理人 100075812
 弁理士 吉武 賢次
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD28と超抗原との相互作用に基づく *in-vivo* にて有効な広域スペクトルの超抗原毒素アンタゴニストおよびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

超抗原と特異的にかつ直接結合するCD28分子内の超抗原結合部位であって、配列番号3で示されるアミノ酸配列を含んでなる、超抗原結合部位。

【請求項2】

該部位での該CD28分子と超抗原との直接結合がB7-2リガンドとCD28との結合を促進し、かつ、IL-2および/またはIFN- γ 遺伝子発現の誘導により定義されているTh1リンパ球の活性化に必要不可欠である、請求項1に記載のCD28内の超抗原結合部位。

【請求項3】

該部位での該CD28分子と超抗原との直接結合がB7-2リガンドとCD28との結合を促進し、かつ、B7-2リガンドとCD28との該結合がIL-4および/またはIL-10の誘導により定義されているTh2リンパ球の活性化に必要不可欠ではない、請求項2に記載のCD28内の超抗原結合部位。

【請求項4】

発熱性外毒素の空間的に保存されているドメイン(このドメインはMHCクラスII分子およびTCRのいずれとの結合にも関係していない)と特異的にかつ直接結合する、請求項3に記載のCD28内の超抗原結合部位。

【請求項5】

該発熱性外毒素の空間的に保存されている該ドメインがその中にSEBのドメイン番号

に基づき、鎖7内から始まり、鎖7を、短い鎖8を介して、 α -ヘリックス4へと連結し、 α -ヘリックス4内で終わる中央ターンを形成する、請求項4に記載のCD28内の超抗原結合部位。

【請求項6】

超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物の製造における、超抗原と請求項1に記載のCD28内の超抗原結合部位との特異的かつ直接的結合を阻害する、抗CD28分子抗体(MAB342)、B7-2分子の細胞外1~239アミノ酸ドメインを含んでなる可溶性組換え型B7-2(sB7-2)ペプチド、および、配列番号3、配列番号4または配列番号5に示されるアミノ酸配列を含むペプチドからなる群から選択される物質の使用。

【請求項7】

超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物の製造における、超抗原と請求項1に記載のCD28内の超抗原結合部位との特異的かつ直接的結合を阻害する、請求項1~5のいずれか一項に記載の超抗原結合部位を含んでなる配列番号3、配列番号4、もしくは配列番号5に示されるアミノ酸配列を含むペプチドの使用。

【請求項8】

超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物の製造における、超抗原と請求項1に記載のCD28内の超抗原結合部位との特異的かつ直接的結合を阻害する、抗CD28分子抗体としてのMAB342の使用。

【請求項9】

超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物の製造における、超抗原と請求項1に記載のCD28内の超抗原結合部位との特異的かつ直接的結合を阻害する、可溶性B7-2分子の使用。

【請求項10】

配列番号3、配列番号4および配列番号5のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含んでなる、単離および精製されたペプチド。

【請求項11】

pTAと呼ばれ、かつ、配列番号5で示されるアミノ酸配列を有する、請求項10に記載のペプチド。

【請求項12】

CD28分子と該発熱性外毒素との直接相互作用を阻害する、請求項10に記載のペプチド。

【請求項13】

Tリンパ球の毒素媒介性活性化のアンタゴニストであり、かつ、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御する、請求項12に記載のペプチド。

【請求項14】

超抗原と請求項1に記載のCD28内の超抗原結合部位との直接相互作用を阻害する組成物であって、有効成分として、配列番号3、配列番号4および配列番号5のいずれか1つで示されるアミノ酸配列またはそれらの混合物を含んでなる単離および精製されたペプチドを、該相互作用を阻害するのに有効な量で含んでなる、組成物。

【請求項15】

Tリンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を阻害し、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御する組成物であって、有効成分として、配列番号3、配列番号4および配列番号5のいずれか1つで示されるアミノ酸配列またはそれらの混合物を含んでなる単離および精製されたペプチドを、IL-2、INF- α および/またはTNF- α 遺伝子によりコードされるRNAの外毒素誘導性発現を阻害するのに有効な量で含んでなる、組成物。

【請求項16】

単離および精製された該ペプチドが配列番号3、配列番号4および配列番号5のいずれか1つまたはその組合せからなる群から選択されるアミノ酸配列を含んでなり、また、所

10

20

30

40

50

望により、医薬上許容される担体、希釈剤、アジュバントおよび/または賦形剤さらに含んでなってもよい、請求項 14 および 15 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 17】

該ペプチドが p T A と呼ばれ、かつ、配列番号 5 で示されるアミノ酸配列を有する、請求項 16 記載の組成物。

【請求項 18】

哺乳類被験体における超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物であって、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載の単離および精製されたペプチドを含んでなる、医薬組成物。

【請求項 19】

請求項 14 および 18 のいずれか一項に記載の組成物の製造における、請求項 10 ~ 13 のいずれか一項に記載のペプチドの使用。

【請求項 20】

C D 2 8 分子と特異的に結合し、T h 1 リンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を拮抗し、また、所望により、ある発熱性外毒素または少なくとも 2 種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発し得る試験物質に関してスクリーニングする方法であって、

- a . C D 2 8 分子と結合する候補アンタゴニスト物質を得る工程、
 - b . 工程 (a) で得られた C D 2 8 結合物質から C D 2 8 分子と該超抗原との直接相互作用を阻害する物質を選択する工程、および
 - c . 工程 (b) で得られた物質の T h 1 リンパ球の超抗原媒介性活性化に対する拮抗効果を決定する工程
- を含んでなる、方法。

【請求項 21】

該候補アンタゴニスト物質が

- a . C D 2 8 分子またはその断片を含む混合物を準備する工程、
 - b . 該混合物を該結合に好適な条件下にて該試験物質と接触させる工程、および
 - c . 評価項目指標に対する試験物質の効果を判定する工程 (ここで、該評価項目についての変化が C D 2 8 分子と該試験物質とが結合していることを示す)
- により得られる、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

評価項目指標が視覚的に検出可能なシグナルをもたらす抗 C D 2 8 抗体と C D 2 8 分子との結合である、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の C D 2 8 内の超抗原結合部位を介して C D 2 8 分子と特異的に結合し、それにより C D 2 8 分子と該超抗原との相互作用を阻止する該候補アンタゴニスト物質の、所望により、請求項 21 に記載の方法により得てもよい C D 2 8 が結合する物質からの選択が

- a . C D 2 8 分子またはその断片を含む混合物を準備する工程、
 - b . 該混合物を、C D 2 8 内の超抗原結合部位を介する C D 2 8 分子との特異的相互作用に好適な条件下にて該試験物質と接触させる工程、および
 - c . 評価項目指標に対する試験物質の効果を判定する工程 (ここで、該評価項目についての変化が該超抗原結合部位を介して C D 2 8 分子と試験物質とが結合していることを示す)
- により行われる、請求項 20 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 24】

該混合物が

- a . C D 2 8 分子またはその断片、
- b . C D 2 8 分子と請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の C D 2 8 内の超抗原結合部位にて特異的に結合する相互作用分子、および

c. 所望により、該相互作用分子とCD28分子との相互作用に、および該相互作用分子とCD28分子との相互作用に関する評価項目指標の検出に好適な条件を提供する溶液、バッファーおよび化合物

を含んでなる、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

CD28の該断片が配列番号3で示されるアミノ酸配列を含んでなるCD28分子内の超抗原結合部位である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

該相互作用分子が抗CD28モノクローナル抗体、配列番号1で示されるアンタゴニストペプチドp12、配列番号2で示されるアンタゴニストペプチドp14および発熱性外毒素またはその機能的断片のいずれか1つである、請求項24に記載の方法。

10

【請求項27】

評価項目指標が視覚的に検出可能なシグナルをもたらす該相互作用分子とCD28分子との結合である、請求項24に記載の方法。

【請求項28】

該評価項目における阻害が該試験物質と請求項1～5のいずれか一項に記載のCD28内の超抗原結合部位とが直接結合していることを示し、その結合が相互作用分子と該部位との結合と競合する、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

該混合物が細胞混合物または細胞フリー混合物である、請求項21に記載の方法。

20

【請求項30】

混合物が細胞フリー混合物である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

該CD28分子またはその断片が精製された組換えタンパク質、および該CD28分子を発現する形質転換宿主細胞の細胞溶解物または膜調製物のいずれか1つとして提供される、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

該混合物が細胞混合物である、請求項29に記載の方法。

【請求項33】

該細胞混合物がトランスフェクト細胞培養物である、請求項32に記載の方法。

30

【請求項34】

該トランスフェクト細胞がCD28分子またはその断片をコードする核酸配列を含んでなる発現ベクターでトランスフェクトされたBHK-21細胞である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

該候補アンタゴニスト物質がタンパク質系物質、炭水化物系物質、脂質系物質、天然有機物系物質、合成有機物系物質、無機物系物質、およびペプチドミメティック系物質からなる群から選択される、請求項20に記載の方法。

【請求項36】

該物質がペプチドのコンビナトリアルライブラリー、環状ペプチドミメティックのライブラリー、およびランダムまたは特定ファージディスプレイライブラリーのポジショナルスキニングのいずれかの産物である、請求項35に記載の方法。

40

【請求項37】

該候補アンタゴニスト物質がTh1リンパ球の毒素媒介性活性化を拮抗する該物質の能力、および、所望により、ある発熱性外毒素またはこのような発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発するその能力を決定する方法により評価され、その評価方法が

a. CD28分子またはその断片を含んでなる試験系を準備する工程、

b. 該系を相互作用に好適な条件下で請求項20～28のいずれか一項に記載の方法により準備、選択された候補アンタゴニストと接触させる工程、および

50

c. 評価項目指標に対する該候補アンタゴニストの効果を対照との比較により決定する工程（ここで、該効果はCD28分子と発熱性外毒素との直接相互作用を阻害し、それによってTh1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗をもたらす該候補の可能性を示す）を含んでなる、請求項20に記載のスクリーニング方法。

【請求項38】

該試験系が細胞フリー混合物、in-vitro/ex-vivo細胞培養物、およびin-vivo動物モデルのいずれか1つである、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

該試験系が、所望により、T細胞の超抗原誘導性活性化に、および候補アンタゴニストの拮抗効果を決定する評価項目指標の検出に好適な条件を提供する内生および/または外生化合物をさらに含んでなってよい、請求項38に記載の方法。

10

【請求項40】

該T細胞がTh1リンパ球であり、かつ、該活性化がIL-2および/またはIFN- γ 遺伝子発現の誘導により決定される、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

該試験系が可溶性CD28分子(sCD28)および可溶性B7-2分子(sB7-2)を含んでなる細胞フリー系である、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

評価項目指標が好適な手段により検出されるsCD28分子とsB7-2分子との結合である、請求項41に記載の方法。

20

【請求項43】

検出工程において、該候補アンタゴニストの存在下でのCD28分子とsB7-2との相互作用の増大が、超抗原とCD28分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する該候補の可能性を示す、請求項42に記載の方法。

【請求項44】

該試験系が内生的に発現されるCD28分子を含んでなるin-vitro/ex-vivo細胞培養物である、請求項40に記載の方法。

【請求項45】

該細胞培養物が哺乳類供与体から単離されたPBMC培養物である、請求項44に記載の方法。

30

【請求項46】

評価項目指標が視覚的に検出可能なシグナルをもたらすIL-2および/またはIFN- γ の超抗原誘導性発現である、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

該評価項目の阻害が、該超抗原とCD28分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害し、その阻害によってTh1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗をもたらす該候補の可能性を示す、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

該in-vivo試験系が動物モデルである、請求項40に記載の方法。

【請求項49】

該動物モデルが超抗原を投与したD-ガラクトサミン感作マウスである、請求項48に記載の方法。

40

【請求項50】

評価項目指標が該マウスの致死毒素性ショックからの防御および救済である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

決定工程において、該評価項目の増大が、超抗原とCD28分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する、Th1リンパ球の発熱性毒素媒介性活性化を拮抗する、毒素性ショックから防御する、また、所望により、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発する該候補物質

50

の能力を示す、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

該動物モデルが発熱性外毒素を抗原投与したブタである、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 3】

評価項目指標が該ブタの毒素性ショックおよび無能力からの防御および救済である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

決定工程において、該評価項目の増大が、超抗原と C D 2 8 分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する、T h 1 リンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を拮抗する、毒素性ショックおよび無能力から防御する、また、所望により、ある発熱性外毒素または少なくとも 2 種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発する該候補物質の能力を示す、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

哺乳類被験体における超抗原関連疾患の治療のための治療用組成物の製造方法であって、

a . T h 1 リンパ球の超抗原媒介性活性化を拮抗し、また、所望により、ある発熱性外毒素または少なくとも 2 種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発し得るアンタゴニスト物質を同定する工程、および

b . 該アンタゴニスト物質を少なくとも 1 つの医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および / または添加剤と混合する工程を含んでなる、方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の分野】

【0 0 0 1】

本発明は、超抗原と特異的にかつ直接結合する C D 2 8 分子内の超抗原結合部位に関する。本発明はさらに、C D 2 8 分子と特異的に結合し、T h 1 リンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を拮抗し得る試験物質に関してスクリーニングする方法における C D 2 8 分子または該超抗原結合部位を含んでなるその断片の使用に関する。

【発明の背景】

【0 0 0 2】

本願を通じて、種々の公報を参照する。これらの公報および本明細書に記載の参考文献は、全開示内容が引用することにより本明細書の一部とされる。

【0 0 0 3】

T 細胞活性の調節は、T 細胞表面受容体、C D 2 8 および C T L A - 4 (C D 1 5 2) により提供される抗原非依存性共刺激シグナルに依存している。C D 2 8 の抗原提示細胞で発現される B 7 - 1 (C D 8 0) および B 7 - 2 (C D 8 6) リガンドとの結合により T 細胞活性化に関する刺激シグナルが提供されるが、これらの同じリガンドとその後 C T L A - 4 が結合することにより応答の減衰が起こる [Oosterwegel et al., Curr. Opin. Immunol. 11: 294-300, 1999; Lenschow et al., Annu. Rev. Immunol. 14: 233-258, 1996; Greenfield et al., Crit. Rev. Immunol. 18: 389-418, (1998) に概説されている]。これらの相互作用の変化は試験疾患モデルの免疫応答に大きな影響を与える。C T L A - 4 関連シグナル伝達経路および C D 2 8 関連シグナル伝達経路は、自己免疫疾患、移植片対宿主病、移植片拒絶の予防および腫瘍免疫の増強に関する主要な治療標的である [Oosterwegel et al., (1999) 前掲; Ikemizu et al., Immunity 12: 51-60, (2000) に概説されている]。抗腫瘍免疫応答の増強は、B 7 - 1 をネズミ腫瘍にトランスフェクトするか、または抗 C T L A - 4 抗体を用いて C T L A - 4 の B 7 - 1 および B 7 - 2 との相互作用を遮断することにより起こる。逆に、B 7 / C D 2 8 相互作用を阻害すると、一般に免疫抑制が生じ、自己抗体産生が減少し、皮膚および心臓の同種移植臓器の生着率が高まる。そのため、ヒト B 7 相互作用の制御についてはかなり関心が寄せられ、すでにこのようなアプローチは効果を発揮している [Guinan et al., N. Engl. J. Med. 340: 1704-1714, (

10

20

30

40

50

1999); Ikemizu et al., (2000) 前掲、に概説されている]。

【 0 0 0 4 】

B7 - 1 および B7 - 2 は各々、単一 V 様および C 様免疫グロブリンスーパーファミリー (IgSF) ドメインからなる糖タンパク質である。それらのリガンド、CD28 および CTLA - 4 はまた、構造的にも関係があり、単一 V 様 IgSF ドメインのジスルフィド結合したホモ二量体として細胞表面で発現される。第3のCD28様分子、ICOS は別のB7関連分子と相互作用するが、トランスジェニックマウスの解析により、B7 - 1 および B7 - 2 が CD28 および CTLA - 4 の唯一の機能的リガンドであることが示されている。これらの相互作用の親和性は実質的に異なっている：ヒト CTLA - 4 は溶液 $K_d = 0.2 \sim 0.4 \mu M$ にて B7 - 1 と結合するが、CD28 の B7 - 2 に対する親和性は $40 \sim 100$ 倍低い (B7 - 1 / CD28 および B7 - 2 / CTLA - 4 相互作用は各々、中間の親和性を有している [$K_d = 4 \mu M$]) [Ikemizu et al., (2000) 前掲、に概説されている]。

10

【 0 0 0 5 】

B7 - 1、B7 - 2、CD28 および CTLA - 4 の発現は厳重に調節されている：CD28 が静止期ヒト T 細胞で構造的に発現される一方で、B7 - 2 は免疫応答の初期に抗原提示細胞で迅速に誘導されるが、B7 - 1 および CTLA - 4 の両方の発現はかなり遅れる [Lenschow et al., (1996) 前掲、に概説されている]。B7 分子の CD28 との相互作用により、T 細胞受容体 (TCR) シグナル伝達を増幅し、かつ、アネルギーを予防する共刺激シグナルが生じる一方で、CTLA - 4 との相互作用により T 細胞で強力な阻害シグナルが誘導される。CD28 依存性共刺激については不明のところが多いが、最近の研究では細胞表面分子およびキナーゼ豊富なラフトの受容体リン酸化およびシグナル伝達に有利な TCR 結合部位への大量補充に関しても採り上げている。逆に、CTLA - 4 は、TCR および RAS シグナル伝達経路構成要素の脱リン酸化を誘導することにより、および CD28 シグナル伝達経路の末端事象を妨害することによりシグナル変換を阻害する [Ikemizu et al., (2000) 前掲、に概説されている]。

20

【 0 0 0 6 】

CD28 と CTLA - 4 との相対する作用については明らかであるが、B7 - 1 と B7 - 2 の個別機能についてはまだ明確にはなっていない。Th0、Th1、または Th2 分化の役割が提示されている [Freeman et al., Immunity 2: 523- 532, (1995); Kuchroo et al., Cell 80: 707-718, (1995)] が、他の研究では B7 - 1 と B7 - 2 がサブセット分化の結果よりも共刺激シグナルの大きさを左右することを示唆している。さらに、遺伝子破壊研究では B7 - 1 と B7 - 2 の共刺激機能はかなり重複することが示されている。B7 - 1 と B7 - 2 との重要な機能の差は、異なる CD28 依存性共刺激の役割を有することよりもむしろ、CD28 および CTLA - 4 とのそれらの結合の強さおよび / または様式に関係していることが提示された [Ikemizu et al., (2000) 前掲、に概説されている]。さらに、すでに上述した B7 - 2 と B7 - 1 ならびに CD28 と CTLA - 4 の発現のタイミングの違いが細胞免疫応答期間の初期の事象において重大であると思われる [Lenschow et al., (1996) 前掲、に概説されている]。

30

【 0 0 0 7 】

T 細胞の完全活性化には、抗原特異的とも、もう一つには、抗原非依存性とも呼ばれる共刺激シグナルが必要である。特異な抗原群は黄色ブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) および化膿連鎖球菌 (Streptococcus pyogenes) により産生される、超抗原毒素としても知られる発熱性外毒素のファミリーからなっている。黄色ブドウ球菌エンテロトキシン (SE 類) からなっている外毒素は、摂取後に嘔吐と下痢症状が現れる大多数のヒト食中毒の原因となっている [Schlievert, J. Infect. Dis. 167: 997(1993)]。黄色ブドウ球菌は自然界で広く見られ、人間と関連している場合が多い。SE のファミリーに属する主要な血清型 (限定されるものではないが、SEA ~ SEE および SEG が挙げられる) の中では、SEB が有名である [Marrack and Kappler, Science 248: 705 (1990)]。SEB はまた、手術創感染または外傷創感染、ならびに子供が特に引き起こしやすいインフルエ

40

50

ンザ患者気道のウイルス感染に伴って起こり得る非月経時毒素性ショック症候群のヒト症例の主要な原因としても認識されている[Schlievert (1993) 前掲; Tseng et al., *Infect. Immun.* 63: 2880 (1995)]. 毒素性ショック症候群のその最も重度な例ではショックおよび死を引き起こす[Murray et al., *ASM News* 61: 229 (1995); Schlievert (1993) 前掲]。より一般に、S E A ~ S E E および毒素性ショック症候群毒素 1 (T S S T - 1) をはじめとするブドウ球菌の外毒素ファミリーのメンバーは、毒素性ショック症候群、アトピー性皮膚炎[Schlievert (1993) 前掲]および川崎症候群[Bohach et al., *Crit. Rev. Microbiol.* 17: 251 (1990)]に関係している。

【 0 0 0 8 】

エアゾール吸入後にヒトにおいて致死ショックが起こる可能性から、また、比較的容易に超抗原毒素が大量に産生され得ることから、懸念されるのはこれらの毒素が単独または組合せて生物兵器として使用され得ることである[Lowell et al., *Infect. Immun.* 64: 1706 (1996)]。S E B は、主にその致死能力から見て有力な生物兵器であると思われる。しかしながら、ブドウ球菌および連鎖球菌超抗原は、嘔吐と下痢を引き起こすそれらの強い能力から、戦闘部隊の実効性を一時的にでも大きく損なわせ、それにより通常の手段に対する脆弱性を強化する無能力化剤でもある。さらに、高い死亡率を伴う民間人の大量無能力化は、たとえ死亡率が低くとも深刻なバイオテロの脅威となり、言うまでもなく、S E B および超抗原外毒素ファミリーの他のメンバーの有害性には、軍事面に関してだけでなく一般に対処する必要がある。

【 0 0 0 9 】

超抗原は感染生物において逆説的な応答：一方では免疫系の莫大な刺激、他方では免疫応答により妨げられない感染細菌の増殖を可能にし得る重大な免疫抑制、を引き起こす毒性有糸分裂促進物質である[Hoffman, *Science* 248: 685 (1990); Smith and Johnson J. *Immunol.* 115: 575 (1975); Marrack et al., *J. Exp. Med.* 171: 455 (1990); Pinto et al., *Transplantation* 25: 320 (1978)]。細胞免疫応答期間、抗原または有糸分裂促進物質により、インターロイキン - 2 (I L - 2)、インターフェロン - (I F N -) および腫瘍壊死因子 - (T N F -) などの T h 1 型サイトカインの遺伝子発現の活性化と、もう一方での、C D 8 細胞および他の細胞サブセットによる[Ketzinel et al., *Scand. J. Immunol.* 33: 593 (1991); Arad et al., *Cell Immunol* 160: 240 (1995)]、ならびに T h 2 細胞由来の抑制性サイトカイン、I L - 4 および I L - 1 0 による[Mosmann and Coffman, *Annu. Rev. Immunol.* 7: 145 (1989)]その細胞媒介性抑制との間の動的相互作用が誘導される。

【 0 0 1 0 】

細菌超抗原は普通の抗原よりも 5 ~ 5 0 0 0 0 倍高い割合の齧歯動物またはヒト T 細胞を刺激する外毒素である。例えば、S E B はあるマウスの全 T 細胞のうち 3 0 ~ 4 0 % を活性化して、分裂させ、サイトカインを生成させる[Marrack and Kappler (1990) 前掲]。実際には、S E B の毒性には T 細胞が必要であり、T 細胞または S E B 応答性 T 細胞を欠いたマウスは S E B の投与による影響を受けない(正常な動物では体重減少および死を引き起こす)[Marrack et al. (1990) 前掲; Marrack and Kappler (1990) 前掲]。正規の抗原とは違い、超抗原はプロセッシングおよび抗原提示を必要としない[Janeway et al., *Immunol. Rev.* 107: 61 (1989)]が、T 細胞受容体の鎖可変部分 (V) にある特定部位にて結合することにより T 細胞を活性化する[Choi et al., *Nature* 346: 471 (1990)]。T 細胞受容体の毒素との相互作用で非常に重要な領域は、V ドメインの外側、通常の抗原認識には関係していない領域にある[Choi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 8941 (1989)]。同時に、発熱性外毒素は M H C クラス II 分子と直接結合し[Scholl et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 4210 (1989)]、そして C D 4 + T 細胞に最初に作用するが、C D 8 + 細胞もまた活性化される[Fleischer and Schrezenmeier, *J. Exp. Med.* 167: 1697 (1988); Fraser, *Nature* 339: 221 (1989); Misfeldt, *Infect. Immun.* 58: 2409 (1990)]。発熱性外毒素が抗原のクラス II M H C および T 細胞受容体との普通の相互作用を回避することで、それらが T 細胞を効果的に活性化するというのが現

10

20

30

40

50

在の一般見解である[Janeway, Cell 63: 659 (1990)]。

【0011】

SEBおよび関連外毒素の毒性は、サイトカイン、特に、IL-2、IFN- γ および腫瘍壊死因子(TNF群)の迅速かつ過剰な産生を誘導するこれらの分子の能力に関係していると考えられる。IL-2、IFN- γ 、およびTNF- α は活性化されたTヘルパー型1(Th1)細胞から分泌され、TNF- α はTh1細胞、単球およびマクロファージにより分泌される。突然産生される高レベルのこれらのサイトカインは毒素に関連した毒性の主要な病原要因に関係があるとされており[Schad et al., EMBO J. 14: 3292 (1995)]、毒素性ショックを引き起こす血圧の急激な降下の原因と考えられている。

【0012】

研究により、SE類によるT細胞の莫大な刺激に関するもっともらしい説明が付けられているが、これらの毒素もまた強い免疫抑制性を有することの理由はまだ明らかではない。それらは抗体産生およびプラーク形成細胞の生成をはじめとする一次T細胞応答およびB細胞応答の両方の低下を誘導する[Hoffman (1990) 前掲; Smith and Johnson (1975) 前掲; Marrack et al. (1990) 前掲; Pinto et al. (1978) 前掲; Ikejima et al., J. Clin. Invest. 73: 1312 (1984); Poindexter & Schlievert, J. Infect. Dis. 153: 772 (1986)]。

【0013】

ヒトのブドウ球菌毒素に対する感受性はマウスを100倍上回っている。例えば、毒素性ショック症候群毒素1、TSST-1、黄色ブドウ球菌由来の別の発熱性外毒素は<0.1 pg/mlにてヒトT細胞を刺激して主要なサイトカイン、IL-2、IFN- γ およびTNF- α を発現させるが、ネズミ細胞では約10 pg/mlを要する[Uchiyama et al., J. Immunol. 143: 3173 (1989)]。マウスは、それらのT細胞のレパトリーから最も高い反応性を有するV β 鎖を提示する細胞を取り除くことにより、またはこれらのV β 遺伝子を欠失させることにより毒性有糸分裂促進物質に対する相対耐性にし得る[Marrack and Kappler (1990) 前掲]。ヒトではこのような欠失は検出されず、はるかに影響を受けやすい。

【0014】

ヒトにおけるSEB(および超抗原の同じファミリーに属する外毒素)の無能力化効果および潜在的致死効果から、民間人または軍人に関係なく、これらの毒素に対する予防および毒素に曝露した個体の治療の必要性が生じる。

【0015】

細菌超抗原は最も致死性の高い毒素の1つであり、それらは兵器化されている。これらの極めて安定したタンパク質は煮沸に耐え、生産し、供給することが容易である。超抗原は通常の抗原の制限された提示を回避して、T細胞の最大50%を活性化して、分裂させ、サイトカインを生成させ得る。例えば、超抗原は普通の抗原よりも少なくとも5,000倍強く細胞免疫応答を活性化する。毒性はIL-2、IFN- γ およびTNFなどのTh1細胞由来のサイトカインの大量誘導によって生じる。死は24~48時間以内に訪れ、致死濃度よりも数対数値低い濃度においてさえ、これらの毒素は重度に無能力化する。

【0016】

一般的な黄色ブドウ球菌および化膿連鎖球菌(「人喰いバクテリア」)により産生される超抗原のファミリーを構成するメンバーは20メンバーをはるかに上回り、ブドウ球菌エンテロトキシンSEA~SEE(その中では、SEBが最も有名である)および毒素性ショック症候群毒素1(TSST-1)、ならびに連鎖球菌発熱性外毒素、とりわけ、SPEAなどが挙げられる。超抗原のアミノ酸配列は極めて多様であり、軍事的問題を悪化させている。SEBおよびSEAは28%相同性を有しているが、TSST-1はSEBに対して6%配列相同性しか示さない。戦闘状況またはバイオテロ状況で直面する毒素または毒素混合物の性質は明確には予測できない。細菌戦争の最も起こりそうな筋書きには、1種類の精製された超抗原ではなく、むしろ細菌の培養により容易に得られる超抗原性毒素の天然混合物の使用が含まれている。この複雑性には広域スペクトルの防衛手段の開

10

20

30

40

50

発が求められる。

【0017】

本発明者らはこれまで、T細胞の活性化が起こる前に毒性カスケードの上部にある超抗原の作用をブロックする可能性を調査してきた。純粹に直観的なアプローチでは、広く異なる超抗原（SEB、SEA、TSST-1およびSPEA）によるヒトTh1サイトカイン遺伝子発現誘導を阻害し、これらの毒素の致死効果からマウスを防御する一方で、毒素の攻撃に対する広域スペクトルの免疫性の迅速な付与を可能にし[Arad et al., Nature Medicine 6: 414-421 (2000); Arad et al., J. Leuk. Biol. 69: 921-927 (2001)]、および毒素性ショック初期にヒトで見られるような無能力症状からブタを守る[出願者の日本出願番号2001-377682 JP、および出願者の米国出願10/172,425]、12または14アミノ酸ペプチドアンタゴニスト[各々が配列番号1 (daYNKKKATVQELDda) ("da"はD-アラニンを表す) および配列番号2 (daVQYNKKKATVQELDda) でも示されるp12Aおよびp14A] の設計をなし得た。ブタはマウスよりも免疫系がヒトに近いことから、マウスとは違い、超抗原の毒性作用への前感作を必要としない。この発見は、適切な取り組みによりヒトにおける有効性の範囲に達し得るという予想を支持している。アンタゴニストペプチドの副作用はマウスまたはブタでは検出されなかった。アンタゴニストに対する抗体は見つけることができず、実際には、短いペプチド(12~14アミノ酸)の小規模かつ比較的急速なクリアランスが治療上の利益となっている。アンタゴニストは、約100倍モル過剰にて超抗原のヒトリンパ球様細胞に対する作用をブロックし(通常の抗原の作用はブロックしない)、約20~40倍だけモル過剰にてマウスの致死ショックおよびブタの無能力を防止することから、それがその細胞標的としっかりと結合することおよびこの標的がT細胞の超抗原媒介性活性化に重要であることが示される。超抗原のアンタゴニストドメインは、調査した全ての超抗原では空間的にかつ順序正しく保存されている 鎖/ヒンジ/ 鎖/ -ヘリックスモチーフからなる。このことからアンタゴニストペプチドの広域スペクトル効力が分かる。

【0018】

本発明者らは、超抗原はTh1応答の過剰刺激を可能にするためにこのドメイン(「アンタゴニストドメイン」)を通じて、細胞受容体標的と結合するにちがいないと主張した。本発明者らはこの受容体がCD28受容体であると確認することに成功した。従って、Th1リンパ球の活性化に必要不可欠であることが分かっているCD28と超抗原の驚くべき直接相互作用から、CD28が致死毒素性ショック治療の第1の薬剤標的となった。アンタゴニスト剤とこの受容体との相互作用により超抗原毒素の作用がブロックできる。この受容体標的の性質およびアンタゴニストとのまたは超抗原とのその相互作用の性質を洞察して、さらに効果的なアンタゴニストを設計する新規なアプローチを提供する。

【0019】

T細胞の完全活性化はMHCクラスII分子、超抗原およびTCRの相互作用だけによるものではない。TCR結合を持続することはT細胞活性化に必要不可欠であるが、多くの障害に直面する。第一に、TCR結合は小型のTCRおよびMHC分子により阻止される。第二に、TCRの抗原に対する親和性が低い。第三に、抗原提示細胞とT細胞との抗原性複合体の数が極めて少ない。

【0020】

最後に、T細胞の移動は抗原認識の持続に支障となる。超抗原はこれらの制約の克服においては普通の抗原よりはるかに優れ、多くのTCR V鎖と結合しながらMHC拘束を回避するが、それらはT細胞活性化に共刺激リガンド(抗原提示細胞ではB7ファミリーのものおよびT細胞ではCD28およびCTLA-4など)をなお必要とする。

【0021】

数人の研究者が超抗原によるT細胞の活性化にB7-1およびB7-2が果たす役割を提示したが、それらの結果は矛盾していた。例えば、Muraille et al. [Int. Immunol. 7: 295-304, (1995)]は、CD28またはB7-1でトランスフェクトした細胞を使用して

10

20

30

40

50

、共刺激が細菌超抗原によるナイーブT細胞の活性化の閾値を低下させたことを報告した。その一方で、Muraille et al., [Cell. Immunol. 162: 315-320 (1995)]は、ネズミB7-1およびB7-2分子に対するモノクローナル抗体の組合せがナイーブT細胞のSEB、SEB、およびTSS T-1に対するin vitro応答を抑制すると主張した。T細胞応答の抑制にはB7-1およびB7-2の同時ブロックが必要であった。彼らはB7-1またはB7-2のいずれかが細菌外毒素に応答することで共刺激シグナルをナイーブT細胞に提供するに足ることを示した。B7関連分子に対する抗体によるT細胞活性化の阻害はCD28に対する抗体により克服されることから、CD28媒介性シグナルが細菌超抗原によるT細胞活性化に関与しているという仮説が提起された[Muraille et al. (1995) 前掲]。しかしながら、同じグループによるさらにもう1つの研究では、抗B7-2抗体の単回投与でT細胞活性化を著しく阻害し、D-ガラクトサミン感作マウスにおいてSEBの致死効果を低下させるが抗B7-1抗体ではそうならないという結論に達した[Muraille et al., Eur. J. Immunol. 25: 2111-2114, (1995)]。実際には、CTLA-4 Igまたは抗B7-1抗体はナイーブT細胞の超抗原媒介性活性化に対してほとんどまたは全く効果がなかった[Muraille et al., (1995) 前掲、に概説されている]。これらの結果はその後、特異的なモノクローナル抗体によりCD80またはCD86誘導性シグナルをブロックすることで、SEBに応答してゆっくりとした速度でIL-2産生が誘導されるという同じグループからの報告により疑わしいものとなった[Muraille et al., Immunology 89: 245-249, (1996)]。Krummel et al., [Int. Immunol. 8: 519-523, (1996)]は同様に、B7-1/B7-2に対する抗体または抗CD28抗体のFabフラグメントが脾細胞のSEBに対する応答を著しく抑制することを報告した。Mittrucker et al., [J. Exp. Med. 183: 2481-2488, (1996)]は、CD28欠損マウスにおいてSEBにより不応答およびT細胞の増殖障害が誘導されることを示した。CD28^{-/-}およびCD28^{+/-}マウス両方由来のV8⁺T細胞がSEB注入後最初の24時間以内に同じ表現型の変化を示し、細胞周期解析では同じ割合のV8⁺T細胞が増殖し始めたことが示されたことから、増殖の欠如はSEBがV8⁺T細胞を活性化しないことが原因ではなかった。しかしながら、その後になってV8⁺T細胞の表現型および増殖状態は異なっていた。彼らは、CD28共刺激がSEBのT細胞媒介性毒性に決定的なものであるという結論に達した。CD28欠損マウス(CD28^{-/-})はTSS T-1誘導性致死TSSに対して完全に耐性であるが、CD28^{+/-}同腹マウスはTSS T-1に対して部分的に耐性であることを報告したSaha et al. [J. Exp. Med. 183: 2675-2680, (1996)]によりCD28遺伝子の標的破壊による致死毒素性ショックに対する防御が示された。CD28^{-/-}マウスの耐性に関する機構は、TSS T-1の注入に応答して血清中のTNF- α の蓄積を完全に廃止し、IFN- γ 分泌をほぼ完全に(90%)阻害することであった。その一方、IL-2の血清レベルはCD28発現の変化により適度にしか影響を受けなかった。CD28野生型(CD28^{+/+})、CD28ヘテロ接合体(CD28^{+/-})およびCD28^{-/-}マウス間のTSS T-1耐性の階層は遺伝子量効果を示唆しており、T細胞表面のCD28発現レベルが超抗原媒介性共刺激を決定的に調節することがうかがえる。これらの結果はin vivoサイトカインカスケードの開始におけるCD28受容体の中心的で非冗長な役割を立証し、超抗原媒介性免疫病理学の治療的アプローチを示したが、具体的なアプローチを示していなかった。Wang et al. [J. Immunol. 158: 2856-2861, (1997)]は、CD28の結合によりIL-10発現が誘導され、マウスの細菌毒素誘導性敗血性ショックが回避されると主張した。彼らは抗CD28抗体を投与することでSEBが媒介する敗血性ショック症候群および死を回避できることを観察した。彼らは、抗CD28抗体による処置が脾細胞およびT細胞系両方でのIL-10の発現を刺激すると主張した。さらに、抗IL-10の注入により敗血性ショックに対する抗CD28の防御効果を無効にすることができた。Wang et al. (前掲)の結果は、本明細書に記載の研究成果に照らして、以下のように説明することができる：彼らの試験では、抗CD28は、IL-10を誘導するのではなく、彼らが主張したように、本発明者らが示している通り、SEBによるTh1サイトカイン遺伝子発現の誘導(

10

20

30

40

50

次には致死ショックを引き起こす)に不可欠であるCD28とSEBの直接結合を、本発明者らが示している通り、CD28結合とは無関係である超抗原によるTh2サイトカインIL-10の誘導に干渉することなく、ブロックして、SEBの作用を阻害した。このように、SEBの作用は、Wang et al. (前掲)では防御的なTh2応答の誘発においてのみ明らかであった。Wang et al.はSEBとCD28との直接結合について示しておらず、示唆もなかった。また、彼らはこのような結合がTh1応答で選択的に必要とされ、Th2応答では必要されないことについて示しておらず、示唆もなかった。実際には、Wang et al.はSEBとCD28との直接結合、および本発明者らが示している通り、このような結合がTh1応答で選択的に必要とされ、Th2応答では必要されないという概念から離れて教示している。このことは、例えば、Wang et al.の題名「CD28 ligation prevents bacterial toxin-induced septic shock in mice by inducing IL-10 expression (CD28の結合によりIL-10発現が誘導され、マウスの細菌毒素誘導性敗血症ショックが回避される)」および彼らの文「anti-CD28 Ab treatment stimulated the expression of IL-10, both in splenocytes and in T cell lines (抗CD28抗体による処置が脾細胞およびT細胞系両方でのIL-10の発現を刺激した)」を見ても分かる。先行技術およびWang et al. [前掲]から見ても、本発明者らによって得られた新たな結果は驚くべきことである。本結果は、Wang et al. (前掲)の主張を実証するものではない。実際には、図10にて示すように、抗CD28 mAb (モノクローナル抗体)はヒト末梢血単核細胞(PBMC)集団でのIL-10発現を誘導することはできない。さらに、アンタゴニストペプチドは超抗原によるIL-10の誘導を損なわない(図3)。

【0022】

要するに、先行技術では次のことを示している：

1. B7-1およびB7-2はT細胞と結合するが、Th1またはTh2細胞の活性化という観点から各補助リガンドの役割はまだ議論の余地がある；
2. いずれかのB7リガンドが超抗原の作用を共刺激することを主張する報告書が存在する一方で、B7-2の役割を提言する報告書もあり、超抗原毒素によるT細胞活性化におけるB7-1およびB7-2の役割もまた、まだ議論の余地がある；
3. CD28は、MHCクラスII分子により示される通常の抗原の場合と同じように、超抗原の共刺激リガンドとして作用する；
4. CD28によるB7-1および/またはB7-2との超抗原媒介性T細胞応答の共刺激機構は分かっていないが、超抗原と通常の抗原は同じであると考えられる。さらに詳しく言えば、先行技術では超抗原の共刺激機構と通常の抗原の共刺激機構が異なるという概念から離れて教示している；
5. 超抗原によるTh1およびTh2応答のCD28媒介性活性化におけるB7-1およびB7-2各々の特定の役割は分かっていない。

【0023】

SEBはMHCクラスII鎖と低い親和性($K_d, 0.34 \mu M$)で結合する[Papageorgiou, A. C. et al., EMBO J. 18: 9-21 (1999)]。超抗原は一層弱く、 $1 \sim 100 \mu M$ の範囲の親和性でTCRと結合する[Leder L, Llera A, Lavoie PM, et al., J. Exp. Med. 187: 823-33 (1998); Andersen PS, et al., Biol. Chem. 276: 33452-7 (2001); Redpath S, et al., J. Immunol. 163: 6-10 (1999)]。

【0024】

リガンド/受容体接触の平均時間を決定する低い親和性と高いオフレートがTCRを介するシグナル伝達強度を決定すると思われる。実際には、TCR V_{8.2}ドメインに対する親和性が高い突然変異型ブドウ球菌超抗原SEC3はT細胞に対して高い有糸分裂促進能力も示した[Andersen PS, et al., (2001) 前掲]。SEC3変異体のTCRに対する結合親和性とそれらが引き起こすT細胞応答の強さとの間には直接的な相関関係が認められた。この発見は超抗原をTCRに対してより高い親和性を有するものへと発展させ得ることを示唆する。そういったものは自然界には存在せず、それどころか、SEAなどの強力な超抗原でさえもTCRに対して低い親和性を保持している[Kiecke MC, et al., J M

10

20

30

40

50

ol Biol 307: 1305-15 (2001)]. 表面プラズモン共鳴研究では、絶対的には、超抗原と個々のリガンド、MHCクラスII分子またはTCRのいずれかとの相互作用が極めて弱いことが分かる[Redpath S, et al., (1999) 前掲; Seth A, et al., Nature 369: 324-7 (1994)].

【0025】

このことは、T細胞活性化を達成するために、超抗原はさらなるリガンド相互作用に依存する必要があり、また、本願に記載のアンタゴニストペプチドは超抗原のCD28受容体との相互作用、すなわち、有害なTh1サイトカイン応答の超抗原媒介性活性化に重要である相互作用をブロックすることを示している。

【0026】

超抗原上にTCR結合ドメインを占有させることが超抗原の作用をブロックするもう一つの戦略である。このアプローチを利用して、SEC3と1000倍強く(Kd, 7nM)結合する可溶性突然変異型TCR V₈鎖を選択した[Kieke MC, et al., (2001) 前掲]。この突然変異型V₈タンパク質はSEC3媒介性特異的T細胞活性に拮抗作用を示した。本明細書に記載の短いアンタゴニストペプチドとは違い、可溶性V₈タンパク質は高分子量のものであり、そのため、送達はより困難である。異なる超抗原が広く多様な分子表面を有するTCRと結合するという事実がさらに問題となっている。さらに、各超抗原はV₈鎖レパートリーの限られた個々のサブセットとのみ優先的に結合する[Kieke MC, et al., (2001) 前掲; Kline JB, et al., Mol Microbiol. 24: 191-202 (1997); Li H, et al., Immunol Rev 163: 177-86 (1998)].

【0027】

実際には、異なる超抗原では、効率性の高いT細胞活性化がTCR結合の構造的に多様な戦略を通じて達成され得る[Sundberg EJ, et al., Structure (Camb) 10: 687-99 (2002)]. よって、可溶性突然変異型V₈タンパク質は超抗原に限定された特異性を示す。

【0028】

実施例にて詳述する本発明の新規かつ予想外の結果は、問題となる先行技術に照らし、驚くべきことに、致死毒素性ショックを媒介するサイトカインを発現するTh1細胞の活性化には、超抗原とMHCクラスIIおよびTCRリガンドとの相互作用が必要であるが、この相互作用単独では活性化には不十分であることを示している。一度結合すれば、超抗原はアンタゴニストドメインを介して作用して、B7-2/CD28リガンド相互作用を可能にし、そのことがTh1細胞活性化を推進する主要なシグナルであるこの本質的に弱い相互作用の強い促進作用となる。超抗原はこの相互作用が存在しないとTh1細胞を活性化させることができない。このように、超抗原はTh1細胞活性化のためのその必須の不可避的な経路としてB7-2/CD28リガンド相互作用を利用する。それに対して、普通の抗原はTCRのMHCクラスIIポケット内に提示され、必須のリガンドよりもむしろ共刺激としてB7-2およびCD28分子を利用する。本発明者らは、アンタゴニストペプチドはTh1細胞のCD28受容体内にある特異的な結合部位と直接結合し、それによりその活性化をブロックすることをさらに示した。さらに、本発明の結果は、Th2細胞の活性化がTh1細胞の活性化と対照的にB7-2/CD28リガンド相互作用とは無関係であることを示している。このように、超抗原によるTh1細胞の活性化は独自にB7-2/CD28リガンド相互作用を必要とする。これらの結果から、超抗原アンタゴニストペプチドの標的、すなわち、本発明の新規な受容体がCD28であることが分かる。アンタゴニストペプチドはCD28分子と結合し、それによってこの受容体への超抗原の接近を妨害して、Th1細胞活性化をブロックする。さらに、CD28分子内の超抗原結合部位から誘導された新規なアンタゴニストペプチドは、超抗原との結合にて膜CD28と競合することにより、Th1細胞活性化を特異的にブロックする。そのため、アンタゴニストペプチドまたは他の小分子によろうが、他の手段によろうが、超抗原とCD28の細胞外ドメインとの複合体形成を阻害することにより、超抗原ファミリーに属する発熱性外毒素が媒介する致死毒素性ショックおよび無能力を予防する新規かつ驚くべき方法を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

それゆえ、本発明の1つの目的は、毒素による敗血性ショック、毒素性ショックまたは無能力を問わない超抗原誘導性毒素性ショック症状の解毒剤の開発のための有力な新規標的としてCD28を使用することである。

本発明の前記ならびにその他の目的は次の説明により明らかになるであろう。

【 発明の概要 】

【 0 0 3 0 】

第1の態様において、本発明は、超抗原と特異的にかつ直接結合するCD28分子内の超抗原結合部位に関する。

【 0 0 3 1 】

特に好ましい実施形態によれば、この結合部位は抗CD28モノクローナル抗体、MAB342と呼ばれるマウス抗CD28モノクローナル抗体(R & D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USAのクローン 37407.111)により認識されるCD28分子内にあるエピトープと少なくとも一部が重複する。この抗体により認識される特定のエピトープは配列番号3で示されるアミノ酸配列(HVKGKHLCP)を有している。そのため、CD28分子内の超抗原結合部位は配列番号3で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる。配列番号3の一部についての限定されない例は、配列番号4で示されるHVKGKHMモチーフによっても提供し得る。

【 0 0 3 2 】

本発明のCD28内の超抗原結合部位でのCD28分子と超抗原との直接結合がB7-2リガンドとCD28との結合を促進する。さらに詳しく言えば、この特異的な結合がIL-2および/またはIFN- γ 遺伝子発現の誘導により定義されているTh1リンパ球の活性化に必要不可欠である。しかしながら、B7-2リガンドとCD28との結合はIL-4および/またはIL-10の誘導により定義されているTh2リンパ球の活性化に必要不可欠ではない。

【 0 0 3 3 】

好ましい実施形態によれば、新規なCD28内超抗原結合部位は発熱性外毒素の空間的に保存されているドメインと特異的にかつ直接結合する。好ましくは、この空間的に保存されているドメインはMHCクラスII分子およびTCRのいずれとの結合にも関係していない。最も好ましくは、発熱性外毒素の空間的に保存されている該ドメインはその中にSEBのドメイン番号に基づき、鎖7内から始まり、鎖7を、短い鎖8を介して、 α -ヘリックス4へと連結し、 β -ヘリックス4内で終わる中央ターンを形成する。

【 0 0 3 4 】

第2の態様として、本発明は、超抗原関連疾患の治療を必要とする哺乳類被験体における超抗原関連疾患の治療のための方法に関する。本発明の方法はCD28分子と該超抗原との相互作用を阻害することを含んでなる。

【 0 0 3 5 】

特定の実施形態によれば、CD28分子と該超抗原との直接結合の阻害は、該被験体に、CD28分子と該超抗原との直接相互作用を阻害する物質または該物質を含んでなる組成物の治療上有効な量を投与することにより行われる。本発明の組成物は、所望により、医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および/または添加剤をさらに含んでなってもよい。さらに詳しく言えば、該物質は超抗原と本発明のCD28超抗原結合部位との結合を阻害する。

【 0 0 3 6 】

さらに詳しく言えば、CD28分子と発熱性外毒素との直接相互作用を阻害することにより、Th1リンパ球の外毒素媒介性活性化の阻害、毒素性ショックに対する防御をもたらし、また、所望により、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫の直接誘発をもたらす。

【 0 0 3 7 】

さらにもう1つの好ましい実施形態では、超抗原が発熱性外毒素であり得、好ましくは

10

20

30

40

50

、この発熱性外毒素が細菌外毒素であり得、最も好ましくは、この外毒素が黄色ブドウ球菌および化膿連鎖球菌のいずれか1つにより産生され得る。

【0038】

本発明の方法により治療される超抗原関連疾患は、特定の実施形態によれば、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される、毒素性ショック、無能力および死のいずれか1つであり得る。

【0039】

本発明はさらに、このような治療を必要とする被験体においてTh1リンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を阻害し、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御する方法を提供する。この方法は、被験体に、CD28分子と該発熱性外毒素との直接相互作用を阻害する物質または該物質を含んでなる組成物の治療上有効な量を投与することを含んでなる。本発明の組成物は、所望により、医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および/または添加剤をさらに含んでなってもよい。

【0040】

さらに、本発明は、このような治療を必要とする被験体においてある発熱性外毒素により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発する方法を提供する。このような方法は、被験体に、CD28分子と該発熱性外毒素との直接相互作用を阻害する物質または該物質を含んでなり、また、所望により、医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および/または添加剤をさらに含んでなってもよい組成物の治療上有効な量を投与することを含んでなる。この阻害物質は毒素性ショックをもたらす細胞免疫応答を誘導する毒素の能力をブロックすることにより、超抗原にそれ自身に対して向けられる活発な体液性免疫応答を誘導させ、それにより、間接的に防御免疫を誘発する可能性がある。

【0041】

さらにもう1つの態様では、本発明は、超抗原と新規なCD28内超抗原結合部位との結合を阻害する物質に関する。具体的に言えば、該超抗原は発熱性外毒素であり得る。

【0042】

好ましい実施形態によれば、本発明の物質により発熱性外毒素と該CD28超抗原結合部位との結合を阻害することにより、Th1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗もたらし、それにより、間接的に、該発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫の誘発をもたらし得る。さらに詳しく言えば、この結合は新規なCD28内超抗原結合部位を介する。

【0043】

もう1つの実施形態では、本発明の物質は超抗原関連疾患の治療における使用に向けられる。

【0044】

本発明はさらに、超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物の製造における本発明の物質の使用に関する。

【0045】

第4の態様において、本発明は、超抗原関連疾患の治療および/または予防のための医薬組成物に関する。本発明の組成物は、有効成分として、CD28分子と該発熱性外毒素との直接相互作用を阻害する物質の治療上有効な量を含んでなる。このような阻害により、Th1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗をもたらす。本発明のこの組成物は、所望により、少なくとも1つの医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および/または添加剤をさらに含んでなってもよい。

【0046】

さらなる態様において、本発明は、CD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する単離および精製されたペプチドに関する。

【0047】

1つの好ましい実施形態では、本発明のペプチドは抗CD28モノクローナル抗体により認識されるCD28分子内にあるエピトープを含んでなるアミノ酸配列を有する。さら

10

20

30

40

50

に詳しく言えば、この抗CD28モノクローナル抗体はMAB342と呼ばれるマウス抗CD28モノクローナル抗体(R & D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USAのクローン 37407.111)であり得る。

【0048】

もう1つの好ましい実施形態では、本発明のペプチドは配列番号3、4および5のいずれか1つで示される配列またはその機能的断片および誘導体を含んでなる。

【0049】

特に好ましい実施形態によれば、本発明のペプチドはpTAと呼ばれ、かつ、配列番号5のアミノ酸配列またはその機能的断片および誘導体を有する。

【0050】

実施例により示すように、本発明のペプチドはCD28分子と該発熱性外毒素との直接相互作用を阻害する。

【0051】

このペプチドはTリンパ球の毒素媒介性活性化のアンタゴニストであり得、かつ、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御する。

【0052】

さらにもう1つの態様では、本発明は、超抗原とCD28内の超抗原結合部位との直接相互作用を阻害する組成物に関する。この組成物は有効成分として、単離および精製されたペプチドを、該相互作用を阻害するのに有効な量で含んでなる。この実施形態によれば、このペプチドはCD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する。

【0053】

さらに、本発明は、Tリンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を阻害し、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御する組成物に関する。この実施形態によれば、本発明の組成物は有効成分として、単離および精製されたペプチドを、IL-2、INF- および/またはTNF- 遺伝子によりコードされるRNAの外毒素誘導性発現を阻害するのに有効な量で含んでなる。このペプチドはCD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する。

【0054】

好ましい実施形態では、本発明の組成物に含まれる単離および精製されたペプチドは配列番号3、配列番号4および配列番号5のいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列またはその機能的断片を有する。注目すべきは、これらの組成物は本発明に記載されているペプチドの組み合わせを含んでなっており、また、所望により、医薬上許容される担体、希釈剤、アジュバントおよび/または賦形剤をさらに含んでなってもよいことである。

【0055】

特定の好ましい実施形態では、本発明の組成物に含まれるペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列またはその機能的断片および誘導体を有するpTAと呼ばれるペプチドであり得る。

【0056】

もう1つの実施形態では、本発明は、哺乳類被験体における超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物に関する。この組成物は有効成分として本発明の単離および精製されたペプチドを含んでなる。

【0057】

本発明はさらに、このような治療を必要とする患者においてTリンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を阻害し、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御する方法を提供する。本発明の方法は、患者に、CD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する単離およ

10

20

30

40

50

び精製されたペプチドまたはそれを含んでなる組成物の阻害に有効な量を投与することを含んでなる。

【0058】

この態様の好ましい実施形態では、本発明の方法に使用するペプチドは配列番号3、配列番号4および配列番号5のいずれか1つ、好ましくは、配列番号5のアミノ酸配列を有するペプチドから選択され得る。

【0059】

もう1つの実施形態では、本発明は、超抗原関連疾患を予防および/または治療する方法であって、このような治療を必要とする患者に、少なくとも1つの単離および精製されたペプチドまたはそれを含んでなる組成物の治療上有効な量を投与する工程を含んでなる方法に関する。よって、このペプチドは本発明に記載されているように、CD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する。好ましくは、この方法に使用するペプチドはpTAと呼ばれ、かつ、配列番号5のアミノ酸配列またはその機能的断片および誘導体を有する。

【0060】

本発明はさらに、本発明に記載されている組成物の製造におけるこのペプチドの使用に関する。

【0061】

さらなる態様において、本発明は、CD28分子と特異的に結合し、Th1リンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を拮抗し得る試験物質に関してスクリーニングする方法に関する。さらに、該試験物質は特異的かつ間接的に、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発し得る可能性がある。本発明のスクリーニング方法は

- (a) CD28分子と結合する候補アンタゴニスト物質を得る工程、
 - (b) 工程(a)で得られたCD28結合物質からCD28分子と該超抗原との直接相互作用を阻害する物質を選択する工程、および
 - (c) 工程(b)で得られた物質のTh1リンパ球の超抗原媒介性活性化に対する拮抗効果を決定する工程
- を含んでなる。

【0062】

好ましい実施形態では、本発明のスクリーニング方法に使用する候補アンタゴニスト物質は

- (a) CD28分子またはs-Ag結合部位を含んでなるその断片を含む混合物を準備する工程、
- (b) (a)の混合物を該結合に好適な条件下にて試験物質と接触させる工程、および
- (c) 評価項目指標(end point indication)に対する試験物質の効果を判定する工程(ここで、該評価項目についての変化がCD28分子と該試験物質とが結合していることを示す)

により得ることができる。

【0063】

特定の実施形態によれば、評価項目指標は抗CD28抗体とCD28分子との結合であり得る。この結合は視覚的に検出可能なシグナルをもたらす。

【0064】

本発明のスクリーニング方法の第2の工程では、(好ましくは、上記のように得られた)CD28と結合する候補アンタゴニスト物質を、CD28分子と新規なCD28内超抗原結合部位にて特異的に結合するそれらの能力に関してさらに選択し得る。このように選択された物質は、望ましくは、CD28分子と該超抗原との相互作用を阻止し得る。この実施形態によれば、このような物質の選択は

- (a) CD28分子またはs-Ag結合部位を含んでなるその断片、例えば、配列番号3で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる断片を含む混合物を準備する工

10

20

30

40

50

程、

(b) 該混合物を、C D 2 8 内の超抗原結合部位によるC D 2 8 分子との特異的相互作用に好適な条件下にて該候補試験物質と接触させる工程、および

(c) 評価項目指標に対する試験物質の効果を判定する工程(ここで、該評価項目についての変化が該超抗原結合部位によりC D 2 8 分子と試験物質とが結合していることを示す)

により行われ得る。

特に好ましい実施形態によれば、選択プロセスに使用する混合物は

(a) C D 2 8 分子またはその断片、もしくは、好ましくは、s - A g 結合部位を含んでなる断片、

(b) C D 2 8 と本発明のC D 2 8 内の超抗原結合部位にて特異的に結合する既知分子である相互作用分子、および

(c) 所望により、このような相互作用分子とC D 2 8 分子との相互作用に、および相互作用分子とC D 2 8 分子との相互作用に関する評価項目指標の検出に好適な条件を提供する溶液、バッファーおよび化合物を含んでなる。

【0065】

注目すべきは、C D 2 8 断片の例として、配列番号3で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる超抗原結合部位を選択用混合物に使用し得ることである。

特定の実施形態では、相互作用分子は、限定されるものではないが、抗C D 2 8 モノクローナル抗体、アンタゴニストペプチド(例えば、p 1 2 A および p 1 4 A (配列番号1 (d a Y N K K K A T V Q E L D d a) でも示される)、p 1 4 A (配列番号2 (d a V Q Y N K K K A T V Q E L D d a) でも示される) ("d a" はD - アラニンを表す))、発熱性外毒素またはその機能的断片のいずれか1つであり得る。ペプチドp 1 2 (配列Y N K K K A T V Q E L D を有する) および p 1 4 (配列V Q Y N K K K A T V Q E L D を有する) は好適な超抗原アンタゴニストでもある。

【0066】

評価項目指標は、1つの実施形態によれば、視覚的に検出可能なシグナルをもたらす相互作用分子とC D 2 8 分子との結合であってよい。この評価項目の阻害または減少が該試験物質とC D 2 8 内の超抗原結合部位とが直接結合していることを示す。例えば、このような結合は相互作用分子と該部位との結合と競合する。

【0067】

本発明のスクリーニング方法で候補物質を準備、選択するのに使用する混合物は細胞混合物または細胞フリー混合物であり得る。

【0068】

1つの別の実施形態によれば、本発明の方法で使用する混合物は細胞フリー混合物であってよい。このような混合物は、該C D 2 8 分子またはその断片が精製された組換えタンパク質、融合タンパク質、および該C D 2 8 分子を発現する形質転換された宿主細胞の細胞溶解物または膜調製物のいずれか1つとして提供され得る、C D 2 8 分子またはs - A g 結合部位を含んでなるその断片を含む。

【0069】

あるいは、本発明の方法で使用する混合物は細胞混合物であってよい。好ましくは、細胞混合物がトランスフェクトされた細胞培養物である。

【0070】

特定の好ましい実施形態では、トランスフェクト細胞がC D 2 8 分子またはその断片をコードする核酸配列を含んでなる発現ベクターでトランスフェクトされたB H K - 2 1 細胞である。これらのトランスフェクト細胞は、好ましくは、C D 2 8 分子と超抗原との相互作用に必要な不可欠である内生的または外生的に発現される分子をさらに含む。

【0071】

本発明のスクリーニング方法で準備、選択される候補物質は、タンパク質系物質、炭水

10

20

30

40

50

化物系物質、脂質系物質、天然有機物系物質、合成有機物系物質、無機物系物質、およびペプチドミメティック系物質のいずれか1つであり得る。

このような物質は、例えば、ペプチドのコンビナトリアルライブラリーのポジショナルスクランニング、環状ペプチドミメティックのライブラリー、およびランダムまたは専用ファージディスプレイライブラリーの産物であってよい。

【0072】

本発明のスクリーニング方法の第3の工程は選択された候補物質の評価である。この段階において、候補アンタゴニスト物質はTh1リンパ球の毒素媒介性活性化を拮抗するその能力に関して評価され、また、ある発熱性外毒素またはこのような発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発するその能力に関して評価される。選択された物質（好ましくは、本発明の選択方法により得られたもの）の評価は

10

(a) CD28分子またはその断片を含んでなる、好ましくは、s-Ag結合部位を含んでなる試験系を準備する工程、

(b) 該系を本発明の方法により準備、選択された候補アンタゴニストと接触させる（該接触は相互作用に好適な条件下で行われる）工程、および

(c) 評価項目指標に対する評価する候補アンタゴニストの効果を対照との比較により決定する工程

により行われ得る。

【0073】

評価項目指標に対する候補アンタゴニストの効果はCD28分子と発熱性外毒素との直接相互作用を阻害し、それによってTh1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗をもたらす該候補の能力を示す。

20

【0074】

本発明のスクリーニング方法による候補アンタゴニストの評価に使用する試験系は細胞フリー混合物、in-vitro/ex-vivo細胞培養物、またはin-vivo動物モデルであり得る。

【0075】

このような試験系は、所望により、T細胞の超抗原誘導性活性化に、および候補アンタゴニストの拮抗効果を決定する評価項目指標の検出に好適な条件を提供する内生および/または外生化合物をさらに含んでなるとよい。さらに詳しく言えば、T細胞がTh1リンパ球であり、かつ、該活性化がIL-2および/またはIFN- γ 遺伝子発現の誘導により決定される。

30

【0076】

特定の実施形態によれば、候補アンタゴニストの評価に使用する試験系は可溶性CD28分子(sCD28)および可溶性B7-2分子(sB7-2)を含んでなる細胞フリー系であり得る。

【0077】

特に好ましい実施形態では、このような細胞フリー系に関する評価項目指標は好適な手段により検出されるsCD28分子とsB7-2分子との結合であり得る。さらに詳しく言えば、該候補アンタゴニストの存在下でのCD28分子とsB7-2との相互作用の増大が超抗原とCD28分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する該候補の可能性を示す。

40

【0078】

あるいは、本発明のスクリーニング方法による評価に使用する試験系は内生的に発現されるCD28分子を含んでなるin-vitro/ex-vivo細胞培養物であり得る。

【0079】

特定の例では、試験系として使用する細胞培養物は哺乳類供与体から単離されたPBMC培養物であり得る。

【0080】

よって、この特定の試験系での評価項目指標は視覚的に検出可能なシグナルをもたらすIL-2および/またはIFN- γ の超抗原誘導性発現であり得る。そのため、該評価項

50

目の阻害あるいは減少は超抗原とCD28分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する該候補の可能性を示す。このような阻害によってTh1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗をもたらす。

【0081】

さらにもう1つの別の例では、本発明のスクリーニング方法による候補アンタゴニストの評価に使用するin-vivo試験系は動物モデルであり得る。

【0082】

1つの特定の実施形態によれば、動物モデルは超抗原を投与したD-ガラクトサミン感受マウスであり得る。このような試験系に関する評価項目指標は該マウスの致死毒素性ショックからの防御および救済であり得る。該評価項目の増大が、超抗原とCD28分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する、Th1リンパ球の発熱性毒素媒介性活性化を拮抗する、毒素性ショックから防御する、また、所望により、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発する該候補物質の可能性を示す。

10

【0083】

代替的動物モデルは発熱性外毒素を抗原投与したブタであり得る。このような方法では、評価項目指標は該ブタの毒素性ショックおよび無能力からの防御および救済であり得る。このような評価項目の増大は超抗原とCD28分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する、Th1リンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を拮抗する、毒素性ショックおよび無能力から防御する、また、所望により、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発する該候補物質の可能性を示す。

20

【0084】

本発明はさらに、哺乳類被験体における超抗原関連疾患の治療のための治療用組成物の製造方法を提供する。この方法は

(a) Th1リンパ球の超抗原媒介性活性化を拮抗し得、また、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発もし得るアンタゴニスト物質を同定する工程、および

(b) 該アンタゴニスト物質を少なくとも1つの医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および/または添加剤と混合する工程

を含んでなる。

30

【0085】

治療用組成物の製造方法で使用するアンタゴニスト物質は、好ましくは、本発明に記載されているスクリーニング方法により同定され得る。

【0086】

本発明はさらに、本発明の方法による超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物の製造におけるCD28分子またはその断片、好ましくは、s-Ag結合部位を含んでなる断片の使用に関する。

【0087】

後記の図面により本発明はさらに説明されるが、これらは単なる例示にすぎず、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の範囲を限定するものではない。

40

【発明の詳細な説明】

【0088】

超抗原はほとんどのMHCクラスII分子と直接結合し、抗原提示細胞によるプロセッシングを必要としないでTCRの鎖可変部分に特定のドメインを有する全てのT細胞を実質的に刺激する。TCRはそのVドメインの外面、普通の抗原認識には関係していない領域を介して超抗原と相互作用する。そのため、超抗原は通常の抗原の制限された提示を回避し、それらはT細胞の最大50%のを活性化して、分裂させ、サイトカインを生成させ得る[Arad et al., (2000) 前掲]。

【0089】

50

図1～27にて示した次の実施例の結果から、今やT細胞におけるTh1サイトカインの発現を活性化するためには超抗原がT細胞でCD28受容体を拘束して、それと直接結合する必要があるという驚くべき概念が導かれている。超抗原とCD28との結合は、p12またはその誘導体、p14などのアンタゴニストペプチド(「アンタゴニストドメイン」と少なくともある程度まで相同性を共有する超抗原ドメインを通じて起こる。驚くべきことに、短いアンタゴニストペプチド、12～14 L-アミノ酸長は、T細胞の活性化に関する主要経路であるところまで考えられていた超抗原分子におけるMHCクラスII分子またはTCRとの結合部位を競合することによるのではなく、その代わりに超抗原とCD28との直接結合に干渉することにより、全長超抗原(SEBは238アミノ酸からなる)の作用をブロックする。本発明は最初に抗原とCD28受容体との結合を例示する。

10

【0090】

現在まで、CD28はMHCクラスII分子により提示される抗原のTCRへのシグナル伝達、同様に、超抗原によるシグナル伝達を手助けする共刺激リガンドとして作用すると考えられている。本発明者らはここでCD28が共刺激リガンドよりもむしろ超抗原の作用に必須のリガンドであることを示す。上に述べたように、超抗原はCD28と直接結合し、Th1細胞活性化のためのその必須の不可避的な経路としてB7-2/CD28リガンド相互作用を利用する。これは新しくかつ驚くべき結果である。図22ではこの一連の共同結合作用を図式にまとめている。

【0091】

よって、第1の態様において、本発明は、超抗原と特異的にかつ直接結合するCD28分子内の超抗原結合部位に関する。

20

【0092】

次の実施例により示すように、CD28内の超抗原結合部位は抗CD28モノクローナル抗体、例えば、MAB342と呼ばれるマウス抗CD28モノクローナル抗体(R&D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USAのクローン 37407.111)と結合するCD28分子内にあるエピトープと少なくとも一部が重複する。該抗CD28モノクローナル抗体と結合するCD28分子内にあるエピトープは、実施例7で記載されているように、PhD-12コンビナトリアルファージディスプレイライブラリーをパンニングすることにより同定された。固定化された抗CD28 mAbと結合する能力およびsCD28によって表示される能力に関してこのライブラリーをパンニングした。22ファージから得られたペプチド配列ではヒトCD28の細胞外ドメインの134～142位にあるHVKGKHLCPモチーフ(配列番号3でも示される)と重複するコンセンサスアミノ酸配列が得られた。

30

【0093】

そのため、特に好ましい実施形態では、CD28内の超抗原結合部位は配列番号3で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる。

【0094】

本明細書において「エピトープ」とは、抗体が結合でき、その抗体により認識される分子の一部を指すことが意図されている。エピトープまたは「抗原決定基」は通常、アミノ酸または糖側鎖などの化学的に活性な表面分子群で構成され、特定の三次元構造特性ならびに特定の電荷特性を有する。

40

【0095】

次の実施例にて示すデータからは、超抗原によるTh1細胞応答の活性化が弱い相互作用であることが分かっているB7-2/CD28相互作用だけに依存しているという新規な概念が導かれる。CD28はB7イソ型に対してCTLA-4のものより10～100倍低い親和性を示し[Ostrov et al., Science 290: 816-819, (2000)]、また、B7-2はB7-1よりも低い親和性でCD28およびCTLA-4と結合する[Greenfield et al., Crit. Rev. Immunol. 18: 389-418, (1998)]。図1～20のデータからは、超抗原がTCRおよびMHCクラスII分子との結合により所定の位置に保持され、その超抗原がT

50

h 1 細胞の C D 2 8 と一度直接結合すれば、有効な B 7 - 2 / C D 2 8 相互作用が可能になるという新規な概念が導かれる。アンタゴニスト、特に、アンタゴニストペプチドによりブロックされるのはこの後者の結合工程である。それに対して、T h 2 細胞は B 7 - 2 / C D 2 8 相互作用を必要とせず超抗原により活性化されるため、T h 2 応答はアンタゴニストペプチドにより抑制されない。

【 0 0 9 6 】

超抗原およびアンタゴニストペプチド各々が C D 2 8 と直接結合する。これらの結果からは、超抗原が T h 1 細胞活性化に必要な C D 2 8 と B 7 - 2 との機能的相互作用を促進するブリッジを提供するように作用することが示される。この機能は T h 2 細胞活性化には必要ではない。

10

【 0 0 9 7 】

そのため、好ましい実施形態では、本発明の C D 2 8 内の超抗原結合部位での C D 2 8 分子と超抗原の直接結合が B 7 - 2 リガンドと C D 2 8 との結合を促進する。さらに詳しく言えば、この特異的な結合が I L - 2 および / または I F N - γ 遺伝子発現の誘導により定義されている T h 1 リンパ球の活性化に必要不可欠である。しかしながら、以下で記載するように、B 7 - 2 リガンドと C D 2 8 との結合は I L - 4 および / または I L - 1 0 の誘導により定義されている T h 2 リンパ球の活性化に必要不可欠ではない。

【 0 0 9 8 】

実施例 1 により示すように、C D 2 8 受容体は本明細書において S E B による I L - 1 0 の誘導に関して例示される超抗原による T h 2 応答の活性化には必要ではない。実際には、抗 C D 2 8 および s B 7 - 2 の両方もが T h 2 サイトカイン I L - 1 0 の発現を誘導することができなかったが、それらは異なる T h 1 応答を誘導した。超抗原に対する T h 1 応答の C D 2 8 シグナル伝達へのこの独自の依存が新しくかつ驚くべきことであり、B 7 - 2 リガンドは超抗原に対する T h 1 応答に独自に関与するが B 7 - 1 は関与しないという発見と同じである。

20

【 0 0 9 9 】

これらの発見は T h 1 応答のブロッキングにおける超抗原アンタゴニストの選択的作用様式を説明するのに大いに役立つ。超抗原による T h 2 細胞の活性化は C D 2 8 を必要とせず T C R を通じて起こるが、T h 1 細胞の活性化は T C R だけでなく、単に共刺激リガンド経路として普通の抗原が利用する C D 2 8 / B 7 - 2 複合体も絶対要件である。結果として、超抗原による T h 1 細胞の活性化は超抗原と C D 2 8 との直接結合相互作用だけに依存している。この依存により T h 1 細胞の活性化は超抗原と C D 2 8 との相互作用をブロックするよう作用するアンタゴニストに対して選択的感受性を示すことになる。

30

【 0 1 0 0 】

超抗原に対する応答は、B 細胞分化、その後続く抗体応答をもたらすより持続的で長期にわたる T h 2 サイトカインの発現とは対照的に、細胞免疫応答の最初の数時間以内に T h 1 サイトカインの一時的発現を引き起こす。超抗原が活性化するためには M H C クラス II 分子、T C R および C D 2 8 / B 7 - 2 と同時に相互作用しなければならないため、本明細書において明らかになった T h 1 細胞の活性化における超抗原と C D 2 8 との結合および C D 2 8 / B 7 - 2 相互作用を通じたシグナル伝達という選択要件によってこの応答が厳重に調節されている。これに対して、T h 2 細胞の活性化は C D 2 8 / B 7 - 2 要件を回避していることからあまり厳しく制御されない。

40

【 0 1 0 1 】

アンタゴニストペプチドは T C R を通じてシグナル伝達する抗 C D 3 による T h 1 応答または T h 2 応答の活性化いずれもをブロックしない。実際には、アンタゴニストペプチドは T C R と接触する領域から十分に離れたところにある超抗原のドメインと相同である [Arad et al., (2000) 前掲]。アンタゴニストペプチドは T h 1 応答が抑制される条件では超抗原媒介性 T h 2 応答をブロックしない。アンタゴニストペプチドは超抗原と C D 2 8 との結合をブロックし、それにより、T h 2 応答には必要ないが T h 1 応答に必要な C D 2 8 / B 7 - 2 シグナル伝達を妨害するという説がある。アンタゴニストペプチドは T

50

h 1 応答および T h 2 応答の両方に必要とされる T C R を通じたシグナル伝達をブロックしない。

【 0 1 0 2 】

よって、好ましい実施形態によれば、本発明の C D 2 8 内の超抗原結合部位は発熱性外毒素の空間的に保存されているドメインと特異的にかつ直接結合する。好ましくは、この空間的に保存されているドメインは M H C クラス II 分子および T C R のいずれとの結合にも関係していない。最も好ましくは、発熱性外毒素の空間的に保存されている該ドメインはその中に S E B のドメイン番号に基づき、鎖 7 内から始まり、鎖 7 を、短い鎖 8 を介して、 α -ヘリックス 4 へと連結し、 α -ヘリックス 4 内で終わる中央ターンを形成する [Arad et al., (2000), (2001) 前掲]。

10

【 0 1 0 3 】

実施例 5 (図 1 2、1 7 および 2 1) の結果をもとに、超抗原またはアンタゴニストペプチドが B 7 - 2 と C D 2 8 との結合を促進することが分かる。実際には、T h 1 応答の抗 C D 2 8 媒介性活性化はアンタゴニストペプチドによる阻害に対して感受性であるため、抗体により認識される C D 2 8 内のエピトープはアンタゴニストペプチド (および超抗原) に対する結合部位と少なくとも一部が重複するにちがいない。

【 0 1 0 4 】

T h 1 応答の抗 C D 2 8 媒介性活性化は s B 7 - 2 による阻害に対しても感受性であり、抗体により認識される C D 2 8 内のエピトープが B 7 - 2 に対する結合部位に近接してあるはずであることが分かる (図 2 4 によっても示される) 。このように、超抗原 (またはアンタゴニストペプチド) および s B 7 - 2 に対する結合部位は折りたたまれた C D 2 8 タンパク質分子内に近接して存在する。よって、特に好ましい実施形態によれば、C D 2 8 内の超抗原結合部位は折りたたまれた C D 2 8 分子内の B 7 - 2 結合部位に近接してある。

20

【 0 1 0 5 】

第 2 の態様において、本発明は、超抗原関連疾患の治療を必要とする哺乳類被験体における超抗原関連疾患の治療のための方法に関する。本発明の方法は C D 2 8 分子と該超抗原との相互作用を阻害する工程を含んでなる。

【 0 1 0 6 】

特定の実施形態によれば、C D 2 8 分子と該超抗原との直接結合の阻害は、該被験体に、C D 2 8 分子と該超抗原との直接相互作用を阻害する物質の治療上有効な量を投与することにより行われる。さらに詳しく言えば、該物質は超抗原と本発明の C D 2 8 超抗原結合部位との結合を阻害する。あるいは、それを必要とする該被験体に該物質を含んでなる組成物の治療上有効な量を投与してもよい。このような組成物は、所望により、医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および / または添加剤をさらに含んでなってもよい。

30

【 0 1 0 7 】

さらに詳しく言えば、C D 2 8 分子と発熱性外毒素との直接相互作用を阻害することにより、T h 1 リンパ球の外毒素媒介性活性化の阻害、毒素性ショックに対する防御をもたらし、さらに、ある発熱性外毒素または少なくとも 2 種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫の直接誘発もまたもたらし得る。

40

【 0 1 0 8 】

本明細書において用いる治療上「有効な量」とは、当技術分野では公知であるような考慮すべき事柄により決定される量である。その量は C D 2 8 分子と発熱性外毒素との直接相互作用を阻害し、T 細胞の毒素媒介性活性化を拮抗するのに十分である必要がある。

【 0 1 0 9 】

本発明の方法により使用する医薬組成物は単位投与形に調製することができ、製薬業界で周知のいずれの方法によっても調製し得る。さらに、医薬組成物は医薬上許容される担体、賦形剤または安定剤などの医薬上許容される添加剤、および、所望により、他の治療成分をさらに含んでなってもよい。当然、許容される担体、賦形剤または安定剤は使用する用量および濃度においては受容者に対する毒性はない。

50

【0110】

本発明の組成物の治療量の大きさは、当然、患者群（年齢、性別など）、治療する状態の性質、および投与経路に応じて異なり、担当医師が判断する。

【0111】

本発明の方法は、特に、ヒトにおける超抗原関連疾患の治療を対象としているが、他の哺乳類も含まれる。限定されない例示として、哺乳類被験体としては、サル、ウマ、ウシ、イヌ、ネコ、マウスおよびラットなどの齧歯動物、ならびにブタが挙げられる。

【0112】

さらにもう1つの好ましい実施形態では、超抗原が発熱性外毒素であり得る。好ましくは、発熱性外毒素が細菌外毒素であり得、最も好ましくは、この外毒素が黄色ブドウ球菌および化膿連鎖球菌のいずれか1つにより産生され得る。本発明の方法により治療される超抗原関連疾患は、特定の実施形態によれば、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される、毒素性ショック、無能力および死のいずれか1つであり得る。

10

【0113】

本発明はさらに、このような治療を必要とする被験体においてTh1リンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を阻害し、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御する方法を提供する。この方法は、該被験体に、CD28分子と該発熱性外毒素との直接相互作用を阻害する物質または該物質を含んでなる組成物の治療上有効な量を投与することを含んでなる。本発明の組成物は、所望により、医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および/または添加剤をさらに含んでなってもよい。

20

【0114】

さらに、本発明は、このような治療を必要とする被験体においてある発熱性外毒素により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発する方法を提供する。このような方法は、被験体に、CD28分子と該発熱性外毒素との直接相互作用を阻害する物質または該物質を含んでなり、所望により、医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および/または添加剤をさらに含んでなってもよい組成物の免疫学上有効な量を投与することを含んでなる。

【0115】

CD28と超抗原との直接相互作用を阻害する物質が、例えば、低免疫原性と比較的急速なクリアランスを有するペプチド（例えば、p12Aおよびp14A）である場合、このようなアンタゴニストペプチドに対する抗体は検出することができない。しかしながら、アンタゴニストペプチドは毒素性ショックをもたらす細胞免疫応答を誘導する毒素の能力をブロックすることにより、超抗原にそれ自身に対して向けられる活発な体液性免疫応答を誘導させる。これらの条件下で、超抗原はそれ自身のアジュバントとして作用する。そのため、超抗原に曝露されている間にアンタゴニストペプチドにより（CD28-超抗原相互作用を阻害することにより）致死毒素性ショックを阻止する場合、治療した被験体は、異なる毒素によるものであってもさらなる毒素攻撃に対する防御免疫を獲得し、防御抗毒素抗体を生み出し得る。よって、CD28分子と超抗原毒素との直接相互作用を阻害する物質を使用することにより、該発熱性外毒素により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を間接的に誘発し得る。

30

40

【0116】

「免疫学上有効な量」とは、発熱性外毒素により誘導されるT細胞活性化をブロックし、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を与える抗体の産生を増強させるのに十分な量を意味する。

【0117】

さらにもう1つの態様では、本発明は、超抗原と本発明に記載のCD28内超抗原結合部位との結合を阻害する物質に関する。具体的に言えば、該超抗原は発熱性外毒素であり得る。

【0118】

50

本発明のこの態様の好ましい実施形態によれば、本発明の物質により該発熱性外毒素と該CD28超抗原結合部位との結合を阻害することにより、Th1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗もたらし、さらに、該発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫の間接的な誘発ももたらし得る。さらに詳しく言えば、この結合は本発明に記載のCD28内超抗原結合部位を介する。

【0119】

本願を通じて用いる「毒素媒介性活性化」とは、1種類の発熱性外毒素またはこのような毒素の混合物により媒介されるT細胞の活性化を意味し得る。

もう1つの実施形態では、本発明の物質は超抗原関連疾患の治療における使用を対象としている。

【0120】

アンタゴニスト物質、好ましくは、アンタゴニストペプチドは、急性毒素性ショック、および発熱性外毒素により誘導される、例えば、食中毒事故が原因とされ得る悪影響いづれもの緊急治療に、ならびにこのような毒素性ショックに対する長期的な防御免疫の付与に用いることができる。

【0121】

本発明はさらに、超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物の製造における本発明のアンタゴニスト物質の使用に関する。このような疾患はある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される、毒素性ショック、無能力および死のいずれか1つであり得る。

【0122】

ヒトにおいて、例えば、発熱性外毒素への曝露によって起こる毒素性ショックは2つの異なる要素：(1)無能力および(2)死を有する。致死濃度よりも数対数値低い濃度においてさえ、発熱性外毒素は重度に無能力化し、高い死亡率の原因となる[USAMRIID Manual, (1998) Eitzen E, Pavlin J, Cieslak T, Christopher G, Culpepper R, eds. Medical Management of Biological Casualties Handbook. 3rd ed. Fort Detrick, Maryland: United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, 1998]。例えば、集団中毒となり得る食中毒で認められる無能力応答は数多くの人々に影響を与える。さらに、無能力応答は 軍事的脅威および国家安全保障に対する脅威であり得る。

【0123】

第4の態様において、本発明は、超抗原関連疾患の治療および/または予防のための医薬組成物に関する。本発明の組成物は、有効成分として、CD28分子と該発熱性外毒素との直接相互作用を阻害する物質の治療上有効な量を含んでなる。このような阻害により、Th1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗をもたらす。この組成物は、所望により、少なくとも1つの医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および/または添加剤をさらに含んでなってもよい。

【0124】

次の実施例により示すように、可溶性CD28分子(sCD28)は超抗原(SEB)と膜CD28受容体分子内の超抗原結合部位との相互作用を阻害するアンタゴニスト物質としての機能を果たし得る。さらに詳しく言えば、図7および8から、sCD28分子はTh1リンパ球のSEB媒介性活性化を特異的に阻害する(IL-2およびIFN-)が、Th2活性化を阻害しないことがはっきりと示されている(IL-10)。よって、sCD28またはCD28の超抗原結合部位を含んでなるその断片は超抗原との結合に関してCD28トランスメンブラン型受容体と競合し得る。

【0125】

このように、sCD28、ならびにCD28分子の超抗原結合部位を含んでなる断片をCD28と超抗原との相互作用を阻害する物質として使用してもよい。

【0126】

よって、このような物質の特定の例は、CD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する単離および精製されたペプチドに関する

10

20

30

40

50

本発明のさらなる態様により提供される。

【0127】

本発明のペプチドとCD28分子内の相当する領域との相同性は、10%~100%相同性、好ましくは、20%~90%相同性、最も好ましくは、30%~80%相同性に及ぶと思われる。

【0128】

1つの好ましい実施形態では、本発明のペプチドは抗CD28モノクローナル抗体により認識されるCD28分子内にあるエピトープを含んでなるアミノ酸配列を有する。さらに詳しく言えば、この抗CD28モノクローナル抗体はMAB342と呼ばれるマウス抗CD28モノクローナル抗体(R & D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USAのクローン 37407.111)であり得る。

10

【0129】

もう1つの好ましい実施形態では、本発明のペプチドは配列番号3および5のいずれか1つで示される配列またはその機能的断片および誘導体を含んでなる。配列番号3の断片の特定の限定されない例は配列番号4のHVKGKHモチーフで提供される。

【0130】

特に好ましい実施形態によれば、本発明のペプチドはpTAと呼ばれ、かつ、配列番号5のアミノ酸配列またはその機能的断片および誘導体を有する。

【0131】

実施例により示すように、本発明のペプチドはCD28分子と該発熱性外毒素との直接相互作用を阻害する。

20

【0132】

このペプチドはTリンパ球の毒素媒介性活性化についてのアンタゴニストであり得、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御し、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を間接的に誘発もし得る。アンタゴニストペプチドは毒素性ショックをもたらす細胞免疫応答を誘導する毒素の能力をブロックすることにより、超抗原にそれ自身に対して向けられる活発な体液性免疫応答を誘導させ得る。そのため、治療した被験体は、さらなる毒素攻撃に対する防御免疫を獲得し、防御抗毒素抗体を生み出し得る。

【0133】

よって、アンタゴニスト物質、好ましくは、アンタゴニストペプチドは、急性毒素性ショック、および発熱性外毒素により誘導される、例えば、食中毒事故が原因とされ得る悪影響いずれもの緊急治療、ならびにこのような毒素性ショックに対する長期的な防御免疫の付与に用いることができる。

30

【0134】

本明細書において用いる「誘導体および機能的誘導体」とは、CD28と超抗原との相互作用を抑制する、外毒素により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発する、および/またはT細胞の毒素媒介性活性化を拮抗するペプチドの能力に干渉しないペプチドへの挿入、欠失、置換および修飾を有する、配列番号3のアミノ酸配列を含んでなるペプチドを意味する(以下、「誘導体」と呼ぶ)。誘導体は該超抗原結合部位に対して最小限の相同性(例えば、30%未満でも)を維持すべきである。当然のことではあるが、本明細書において用いる「挿入」とは、本発明のペプチドへのアミノ酸残基(1~50アミノ酸残基、好ましくは、1~20アミノ酸残基、最も好ましくは、1~10アミノ酸残基)の付加を意味する。特定の例が配列番号5のpTAアンタゴニストペプチドを創生する7アラニン残基のエピトープへの付加である。

40

【0135】

可能性ある立体構造のいくつかのものだけが活性であり得るため、直鎖ペプチドの構造の欠落はそれらをヒト血清中のプロテアーゼに対して弱くならしめ、標的部位に対するそれらの親和性が低下する。そのため、例えば、本発明の種々のペプチドの異なる誘導体を創生することにより、アンタゴニストペプチド構造を最適化することが望ましい。

50

【0136】

ペプチド構造を改良するため、本発明のペプチドをそれらのN末端を通じてラウリル-システイン(LC)残基と、および/またはそれらのC末端を通じてシステイン(C)残基と、または以下にさらに詳細に述べるように免疫化のためのペプチドのアジュバントへの連結に好適な他の残基と結合してもよい。

【0137】

本発明のペプチド、ならびにその誘導体は全てが正に帯電していてもよいし、負に帯電していてもよいし、または中性であってもよく、また、二量体、多量体形態であってもよいし、または制限のあるコンホメーションであってもよい。制限のあるコンホメーションは内部ブリッジ、近域環化、伸長または他の化学修飾により得ることができる。

10

【0138】

さらに、本発明のペプチドは同じまたは異なるアミノ酸残基各種を用いてそのN末端および/またはC末端にて伸長し得る。このような伸長の例として、ペプチドは同じまたは異なる疎水性アミノ酸残基(天然または合成アミノ酸残基であってもよい)を用いてそのN末端および/またはC末端にて伸長してもよい。好ましい合成アミノ酸残基はD-アラニンである。

【0139】

このような伸長のさらなる例は、システイン残基を用いてそのN末端および/またはC末端の両方にて伸長されたペプチドにより与え得る。当然、このような伸長は、ジスルフィド結合の形成によって起こるCys-Cys環化により制限のあるコンホメーションを

20

【0140】

もう1つの例はN末端リシル-パルミトイルテール、リンカーとして働くリジンおよび疎水性アンカーとしてのパルミチン酸の組み込みである。

【0141】

さらに、ペプチドは芳香族アミノ酸残基(天然または合成アミノ酸残基であってもよい)により伸長し得る。好ましい芳香族アミノ酸残基はトリプトファンである。あるいは、ペプチドを天然に起こる発熱性外毒素のアミノ酸配列の相当する位置に存在するアミノ酸を用いてそのN末端および/またはC末端にて伸長してもよい。

【0142】

それでもなお、本発明によれば、本発明のペプチドは同じまたは異なる有機部分各種(天然または合成アミノ酸ではない)を用いてそのN末端および/またはC末端にて伸長し得る。このような伸長の例として、ペプチドはN-アセチル基を用いてそのN末端および/またはC末端にて伸長してもよい。

30

【0143】

本発明により使用し、本明細書において開示する1つ1つのペプチド配列に対し、本発明はペプチド鎖の方向が逆になっており、かつ、全てのアミノ酸がD型に属している対応するretro-inverso配列を包含する。

【0144】

当然のことではあるが、本発明はまた、配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部または全てを含んでなる塩基性エピトープ配列、またはpTAの塩基性ペプチド配列(配列番号5)が約2~約100回反復される長いペプチドも包含する。

40

【0145】

さらにもう1つの態様では、本発明は、超抗原とCD28内の超抗原結合部位との直接相互作用を阻害する組成物に関する。この組成物は有効成分として、単離および精製されたペプチドを、該相互作用を阻害するのに有効な量で含んでなる。この実施形態によれば、このペプチドはCD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する。

【0146】

さらに、本発明は、Tリンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を阻害し、ある発熱性外毒

50

素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御する組成物に関する。この実施形態によれば、本発明の組成物は有効成分として、単離および精製されたペプチドを、IL-2、INF- および/またはTNF- 遺伝子によりコードされるRNAの外毒素誘導性発現を阻害するのに有効な量で含んでなる。このペプチドはCD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する。

【0147】

好ましい実施形態では、本発明の組成物に含まれる単離および精製されたペプチドは配列番号3、配列番号4および配列番号5のいずれか1つからなる群から選択されるアミノ酸配列またはその機能的断片を有する。注目すべきは、これらの組成物は本発明に記載されているペプチドの組み合わせを含んでなってよく、また、所望により、医薬上許容される担体、希釈剤、アジュバントおよび/または賦形剤をさらに含んでなってもよいことである。

10

【0148】

特定の好ましい実施形態では、本発明の組成物に含まれるペプチドは、配列番号5のアミノ酸配列またはその機能的断片および誘導体を有するpTAと呼ばれるペプチドであり得る。

【0149】

もう1つの実施形態では、本発明は、哺乳類被験体における超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物に関する。この組成物は有効成分として本発明の単離および精製されたペプチドを含んでなる。

20

【0150】

本発明はさらに、このような治療を必要とする患者においてTリンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を阻害し、ある発熱性外毒素または発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックから防御する方法を提供する。本発明の方法は、患者に、CD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する単離および精製されたペプチドまたはそれを含んでなる組成物の阻害に有効な量を投与することを含んでなる。

【0151】

この態様の好ましい実施形態では、本発明の方法に使用するペプチドは配列番号3、配列番号4および配列番号5のいずれか1つのアミノ酸配列またはその機能的断片および誘導体を有するペプチドから選択され得る。好ましくは、ペプチドは配列番号5で示されるアミノ酸配列を有する。

30

【0152】

特定の実施形態では、この方法に使用するペプチドは配列番号5のアミノ酸配列またはその機能的断片および誘導体を有するpTAと呼ばれるペプチドであり得る。

【0153】

もう1つの実施形態では、本発明は、超抗原関連疾患を予防および/または治療する方法であって、このような治療を必要とする患者に、少なくとも1つの単離および精製されたペプチドまたはそれを含んでなる組成物の治療上有効な量を投与する工程を含んでなる方法に関する。よって、このペプチドは本発明に記載されているように、CD28分子内の超抗原結合部位内に含まれるアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を有する。好ましくは、この方法に使用するペプチドはpTAと呼ばれ、かつ、配列番号5のアミノ酸配列またはその機能的断片および誘導体を有する。

40

【0154】

本発明はさらに、本発明に記載されている組成物の製造におけるこのペプチドの使用を提供する。

【0155】

本発明の医薬組成物は良質の医療に従って投与することができるし、服用させることもできる。投与は静脈注射、筋肉注射または皮下注射をはじめとする種々の方法により実施

50

し得る。しかしながら、経鼻投与などの他の投与方法もまた可能である。

【0156】

本発明の組成物は活性物質を自由な形態で含んでなっており、治療する被験体にそのまま投与してもよい。あるいは、活性分子の大きさに応じて、投与の前にそれを担体と複合体化することが望ましいと思われる。治療用の製剤は従来の剤形で投与し得る。製剤は、一般に、上記のような少なくとも1種の有効成分を1種以上のその許容される担体とともに含んでなる。

【0157】

各担体は他の成分と適合性があり、かつ、患者にとって有害ではないという意味で医薬上許容されるべきであり、また、生理学上許容されるべきである。製剤としては、経口、直腸、経鼻、または非経口（皮下、筋肉内、腹膜内（IP）、静脈内の（IV）および皮内を含む）投与に好適なものが挙げられる。製剤は便宜には、単位投与形で与えられ、製薬業界で周知の方法により製剤され得る。被験体に望ましい効果を与えるのに必要な有効量を含むそのような全ての化合物の性質、アペイラピリティーおよび供給元、ならびに投与については当技術分野では周知であり、本明細書においてはこれ以上述べる必要はない。

【0158】

さらに詳しく言えば、該アンタゴニスト物質またはそれを含んでなる組成物は、経口、静脈内、非経口、経皮、皮下、腔内、鼻腔内、粘膜、舌下、局所および直腸投与ならびにその組合せから選択される経路により投与され得る。好ましくは、これらのアンタゴニストまたは組成物はIVまたはIP注射される。

注入用に好適な剤形としては、滅菌水性溶液または分散液および滅菌注入用溶液または分散液の即時調合用滅菌粉末が挙げられる。いかなる場合でも、製剤は滅菌状態でなければならず、また、注射針を容易に通過し得る程度に流動性がなければならない。製造および保管条件下では安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用から守らなければならない。

【0159】

微生物の作用は種々の抗菌薬および抗真菌薬、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどにより防止し得る。多くの場合、等張化剤、例えば、糖類または塩化ナトリウムを含んでいることが好ましいであろう。注入用組成物において吸収を遅延する薬剤（例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチン）を使用することで組成物の長期吸収をなし得る。

【0160】

滅菌注入用溶液は、好適な溶媒に所要量の活性化化合物と上記の様々な他の成分とを合せ、必要に応じて、その後、滅菌濾過することにより調製される。一般に、分散液は、種々の滅菌済み有効成分を、塩基性分散媒と上記のものうち必要な他の成分を含有する滅菌ピヒクルに合せることにより調製される。

【0161】

滅菌注入用溶液の調製用滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は有効成分にさらなる所望の成分を加えた予め滅菌濾過した溶液からその粉末を得る真空乾燥および凍結乾燥法である。

【0162】

本発明の医薬組成物は、一般に、緩衝剤、その浸透圧を調整する薬剤、および、所望により、当技術分野で公知の1種以上の医薬上許容される担体、賦形剤および/または添加剤を含む。また、組成物に追加有効成分を入れることもできる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど）、その好適な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒であってよい。適当な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング剤の使用により、分散液の場合には必要な粒径の維持により、および界面活性剤の使用により維持され得る。

10

20

30

40

50

【0163】

本明細書において用いる「医薬上許容される担体」としては、あらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌薬および抗真菌薬などが挙げられる。医薬活性物質に関するこのような媒質および薬剤の使用については当技術分野では周知である。従来の媒質または薬剤が有効成分と混合できない場合を除き、治療用組成物におけるその使用が意図される。

【0164】

本発明により示すように、超抗原アンタゴニストペプチドの細胞標的はCD28である。これは、毒素性ショックおよび細胞免疫応答（および特に、Th1応答）の超抗原媒介性過剰刺激の他の結末、例えば、死、ならびに吐き気、嘔吐、および下痢症状が現れる毒素無能力を阻止するアンタゴニストの設計のために初めて細胞薬剤標的を提供する。最も重要なことだが、本発明によってようやく超抗原とCD28受容体との相互作用の新たなアンタゴニストの設計が、本明細書において例示するアンタゴニストペプチドによっても、小分子または酵素もしくはタンパク質によっても可能になった。本発明は、例えば、ランダムまたは特定の(dedicated)ペプチドライブラリーのファージディスプレイを通じて、ペプチドライブラリーのポジショナルスキニングを通じて、または環状ペプチドミメティックスのライブラリーから、選択されたアンタゴニスト分子の結合のためのペイト（おとり）としてCD28（好ましくは、可溶性であるか、または自然発生的か、トランスフェクション後に細胞で発現されるものである）を使用することによる毒素性ショックアンタゴニストを見つけるための新たな戦略を提供する。

【0165】

よって、さらなる態様において、本発明は、CD28分子と特異的に結合し、Th1リンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を拮抗し得る試験物質に関してスクリーニングする方法に関する。さらに、該物質はある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を間接的に誘発し得る可能性がある。本発明のスクリーニング方法は

- (a) CD28分子と結合する候補アンタゴニスト物質を得る工程、
 - (b) 工程(a)で得られたCD28結合物質からCD28分子と該超抗原との直接相互作用を阻害する物質を選択する工程、および
 - (c) 工程(b)で得られた物質のTh1リンパ球の超抗原媒介性活性化に対する拮抗効果を決定する工程
- を含んでなる。

【0166】

ポジショナルスキニングおよび環化化学により生み出されるアンタゴニストペプチドの高親和性結合に関するハイスループットスクリーニングの適用への鍵が感度の良い便宜なスクリーニングアッセイの開発である。

【0167】

アンタゴニスト物質、好ましくは、アンタゴニストペプチドの、超抗原により認識されるドメインにあるCD28標的に対するそれらの親和性による強力なスクリーニングアッセイの開発が該スクリーニング方法における第一歩であろう。

【0168】

好ましい実施形態では、本発明のスクリーニング方法に使用する候補アンタゴニスト物質は

- (a) CD28分子またはその断片（具体的に言えば、好ましい断片は、例えば、本発明に記載の結合部位を含む可溶性細胞外ドメインまたはその一部、さらに具体的に言えば、配列番号3で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる断片であり得る）を含む混合物を準備する工程、
- (b) (a)の混合物を該結合に好適な条件下にて試験物質と接触させる工程（条件はCD28とアンタゴニストペプチド p12およびp14などの相互作用分子との相互作用に関して最適化する）、および
- (c) 評価項目指標に対する試験物質の効果を判定する工程（ここで、該評価項目につ

10

20

30

40

50

いての変化がCD28分子と該試験物質とが結合していることを示す)により得られ得る。

【0169】

特定の実施形態によれば、評価項目指標は抗CD28抗体とCD28分子との結合であり得る。この結合は視覚的に検出可能なシグナルをもたらす。このような場合には、この評価項目の増大が該試験物質とCD28分子とが結合していることを示す。

【0170】

さらに詳しく言えば、各候補物質、または、好ましくは、ペプチドをウェルに入れ、sCD28の直接結合を、好ましくは、CD28に対する市販のタグ付きポリクローナル抗体により検出する。プレート上のsCD28とアンタゴニストペプチドとを効率的に結合させる条件はアンタゴニストペプチドp12およびp14を用いて最初に最適化する。これにはpH、塩およびバッファの組成研究、BSAなどの担体タンパク質を必要とする。この強力なスクリーニングによりsCD28と結合する物質、好ましくは、ペプチドが得られる。

【0171】

sCD28と結合する物質(特にペプチド)をプールした後、下記のようにアッセイする。

【0172】

本発明のスクリーニング方法の第1の工程に使用する抗CD28抗体はポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体のいずれか1つであってよい。タンパク質に対するポリクローナル抗体の作製については、例えば、Current Protocols in Immunologyの第2章, Wiley and Sons Inc.に記述されている。

【0173】

モノクローナル抗体は免疫動物、特にラットまたはマウスの脾臓またはリンパ節から採取したB細胞から、ハイブリッド細胞の増殖に有利な条件下での不死化B細胞との融合により作製し得る。モノクローナル抗体の作製方法については、上記の、Current Protocols in Immunologyの第2章などの数多くの論文およびテキストで記述されている。

【0174】

「抗体」とは、抗原と結合し得る無傷分子ならびに例えば、FabおよびF(ab')₂などのそのフラグメントを包含するよう意図される[Wahl et al., J. Nucl. Med. 24, 316-325, 1983]。

【0175】

当然のことではあるが、本発明において有用な抗体のFabおよびF(ab')₂ならびに他のフラグメントは、無傷抗体分子に関して本明細書において開示する方法による結合したCD28分子の検出および定量に使用し得る。このようなフラグメントは、一般に、パパイン(Fabフラグメントを生ずる)またはペプシン(F(ab')₂フラグメントを生ずる)などの酵素を用いるタンパク分解性切断により生ずる。

【0176】

本発明のスクリーニング方法の第2の工程では、(好ましくは、上記のように得られた)CD28と結合する候補アンタゴニスト物質を、CD28分子と本発明の新規なCD28内超抗原結合部位にて特異的に結合するそれらの能力に関してさらに選択し得る。このように選択された物質は、望ましくは、CD28分子と該超抗原との相互作用を阻止し得る。この実施形態によれば、このような物質の選択は

(a) CD28分子またはs-Ag結合部位を含んでなるその断片を含む混合物を準備する工程、

(b) 該混合物を、CD28内の超抗原結合部位によるCD28分子との特異的相互作用に好適な条件下にて該候補試験物質と接触させる工程、および

(c) 評価項目指標に対する試験物質の効果を判定する工程(ここで、該評価項目についての変化が該超抗原結合部位によりCD28分子と試験物質とが結合していることを示す)

10

20

30

40

50

により行われ得る。

【0177】

特に好ましい実施形態によれば、選択プロセスに使用する混合物は

(a) CD28分子またはその断片(例えば、本発明の結合部位、好ましくは、配列番号3で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる結合部位を含む可溶性細胞外ドメインまたはその一部である)、

(b) CD28と本発明のCD28内の超抗原結合部位にて特異的に結合する既知分子である相互作用分子、および

(c) 所望により、このような相互作用分子とCD28分子との相互作用に、および相互作用分子とCD28分子との相互作用に関する評価項目指標の検出に好適な条件を提供する溶液、バッファーおよび化合物を含んでなる。

10

【0178】

本明細書において用いる「断片および機能的断片」とは、超抗原結合部位を含み、かつ、超抗原と結合することができ、そして、B7-2分子の結合を促進し、それによりTh1細胞の特異的活性化を誘導する、挿入、欠失、置換および修飾を有するCD28標的分子またはその断片を意味する(以下、「断片」と呼ぶ)。

【0179】

特定の実施形態では、相互作用分子は、限定されるものではないが、MAB342と呼ばれるマウス抗CD28抗体(R & D Systemsのクローン 37407.111)をはじめとする抗CD28モノクローナル抗体、配列番号1で示されるアンタゴニストペプチドp12、配列番号2で示されるアンタゴニストペプチドp14および発熱性外毒素またはその機能的断片のいずれか1つであり得る。本発明により例示されるように、このような相互作用分子はCD28内の本発明の超抗原結合部位に対して特異的な親和性を提示する。

20

【0180】

本発明のスクリーニング方法に使用するアンタゴニストp12およびp14、ならびにその誘導体は全てが正に帯電していてもよいし、負に帯電していてもよいし、または中性であってもよく、また、二量体、多量体形態であってもよいし、または制限のあるコンホメーションであってもよい。制限のあるコンホメーションは内部ブリッジ、近域環化、伸長または他の化学修飾により得ることができる。

30

【0181】

評価項目指標は、1つの実施形態によれば、視覚的に検出可能なシグナルをもたらす相互作用分子とCD28分子との結合であってよい。この評価項目の阻害または減少が試験物質とCD28内の本発明の超抗原結合部位とが直接結合していることを示す。この結合は相互作用分子と該部位との結合と競合する。この競合アッセイを実施するために、相互作用分子を、例えば、ビオチン化によるか、またはフルオレセインの付加により直接標識してもよいし、あるいは、二次抗体により間接的に標識してもよい。

【0182】

本発明のスクリーニング方法で候補物質を準備、選択するのに使用する混合物は細胞混合物または細胞フリー混合物であり得る。

40

【0183】

1つの別の実施形態によれば、本発明の方法で使用する混合物は細胞フリー混合物であってよい。このような混合物は、精製された組換えタンパク質、融合タンパク質および該CD28分子を発現する形質転換された宿主細胞の細胞溶解物または膜調製物のいずれか1つとして提供され得るCD28分子またはその機能的断片(好ましくは、s-Ag結合部位を含んでなる)を含んでなる。

【0184】

実施例9に記載されているように、本明細書において用いる精製された組換えCD28タンパク質の特定の限定されない例は、CD28分子の細胞外ドメインを含んでなるキメ

50

ラ s C D 2 8 / F c ホモ二量体分子である。s C D 2 8 は R & D Systems (Minneapolis) 提供のものであり、キメラ s C D 2 8 / F c ホモ二量体（各単量体はグリコシル化前には 42.2 kDa のタンパク質であるが、実際に発現される高度にグリコシル化された形においては 60 ~ 70 kDa に達している）からなる。もう一つの特定の例が配列番号 3 の一部または全てを含んでなるアミノ酸配列を有する s - A g 結合部位を含む C D 2 8 の断片であってよい。

【 0 1 8 5 】

本発明のスクリーニング方法のこのような選択工程は、例えば、s C D 2 8 をマイクロプレートのウェル上に固定化して実施してもよい。アンタゴニストペプチドとプレート上の s C D 2 8 とを効率的に結合させる条件はアンタゴニストペプチド p 1 2 および p 1 4 を用いて最初に最適化する。次いで、各ウェルをアンタゴニスト物質、好ましくは、ペプチド（単独またはプール）の存在下で相互作用分子として限界量の抗 C D 2 8 m A b とともにインキュベートする。各ウェルの上清を集める。上清中の結合していない m A b を二次抗体 E L I S A により検出する。アンタゴニスト物質が m A b により認識されるドメイン内の s C D 2 8 としっかりと結合すれば、それは抗 C D 2 8 と s C D 2 8 との結合において競合し、自由な m A b が放出される。この m A b はゼロのバックグラウンドに対して検出され得るためにアッセイの感度が高まる。候補アンタゴニスト物質またはペプチドの、抗 C D 2 8 / C D 2 8 相互作用に参与するドメインの外側での結合はこのアプローチにより排除される。本発明のデータは、本発明者らが使用したモノクローナル抗 C D 2 8 が超抗原の結合部位と重複しているエピトープを認識することを示している。図 2 4 により示すように、このエピトープ（配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる）はヒト、ネズミ、ラットおよびウサギ C D 2 8 および C T L A - 4 分子間ならびに B 7 - 2 リガンドの結合部位の一部を構成するヒト C T L A - 4 で保存される M Y P P P Y モチーフ（配列番号 8 でも示される）に近接してある [Schwartz et al., Nature 410: 604-608, (2001)]。このことから、C D 2 8 での超抗原のアンタゴニストドメインの結合または C D 2 8 での近接した B 7 - 2 結合部位の結合のいずれかをブロックする特定の物質またはペプチドを得てもよい。

【 0 1 8 6 】

別のアプローチは、相互作用分子としてビオチン化した S E B (Toxin Technologies) を使用し、標識した S E B をプレート上の s C D 2 8 との結合から外すペプチドの能力に関してアッセイすることである。さらにもう一つの別のアプローチは、相互作用分子として標識した p 1 2 を使用し、標識をプレート上の s C D 2 8 との結合から外すペプチドの能力に関してアッセイすることである。システインタグ付き p 1 2 を使用して、ビオチンまたはフルオレセインを連結してもよい。明確で一見便宜ではあるが、これらのワン工程スクリーニング方法は対照における 100% 結合状態からの減少を測定するために感度が低いと思われる。

【 0 1 8 7 】

あるいは、本発明の方法による選択工程に使用する混合物は細胞混合物であってよい。好ましくは、細胞混合物はトランスフェクトされた細胞培養物であり得る。

【 0 1 8 8 】

特定の好ましい実施形態では、トランスフェクト細胞が C D 2 8 分子またはその断片（好ましくは、s - A g 結合部位を含んでなる断片）をコードする核酸配列を含んでなる発現ベクターでトランスフェクトされた B H K - 2 1 細胞である。C D 2 8 c D N A を本発明者らの研究室でトランスフェクトされた B H K - 2 1 細胞での一時的発現に通常使用されているベクターに、強力な骨髄増殖性肉腫ウイルスプロモーター下に、かつ S V 4 0 ポリアデニル化シグナルの上流にクローニングする [Ben-Asouli et al., Cell 106: 221-232 (2002)]。

【 0 1 8 9 】

この特定の実施形態では、各候補アンタゴニスト、好ましくは、ペプチドをウェルに入れ、次いで、ウェルを B S A またはウシ胎児血清でブロックする。肉眼でまたは抗 C D 2

10

20

30

40

50

8 ELISAにより細胞表面でCD28を発現するBHK-21細胞の結合にスコアをつける。あるいは、CD28発現細胞から準備した細胞膜を使用してもよく、結合を抗CD28抗体を用いて検出する。次いで、決定的な候補アンタゴニスト物質を競合相手として相互作用分子、例えば、SEBまたはp14の存在下で再検討する。

【0190】

本明細書において用いる「ベクター」とは、宿主のゲノムにDNA断片を組み込むことが可能なプラスミド、ウイルス、バクテリオファージ、組み込み可能なDNA断片および他のビヒクルを包含する。発現ベクターは、一般に、所望の遺伝子またはその断片を含むDNAまたはRNA構築物を自己複製するものであり、好適な宿主細胞で認識され、所望の遺伝子の発現をもたらす遺伝子制御エレメントに機能しうる形で連結される。これらの制御エレメントは好適な宿主内での発現を達成することができる。一般に、遺伝子制御エレメントとしては、原核生物プロモーター系または真核生物プロモーター発現制御系を挙げることができる。これは、一般に、転写プロモーター、転写開始を制御する任意のオペレーター、RNA発現レベルを高める転写エンハンサー、好適なりボソーム結合部位をコードする配列、RNAスプライス部位、転写および翻訳を終結させる配列などを含む。発現ベクターは通常、宿主細胞とは無関係にベクターを複製させる複製起点を含む。

【0191】

ベクターはベクターを含む細胞の選択に好適な制限部位、抗生物質耐性または他のマーカーをさらに含んでもよい。プラスミドが最も一般に使用される種類のベクターであるが、同等の機能を果たし、かつ、当技術分野では公知であるか、または公知となる他の種類のベクターも本明細書における使用に好適である。例えば、引用することにより本明細書の一部とされる、Pouwels et al., Cloning Vectors: a Laboratory Manual (1985および追補版), Elsevier, N. Y.;およびRodriquez, et al. (eds.) Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and their Uses, Butterworth, Boston, Mass (1988)を参照。

【0192】

本発明のスクリーニング方法で準備、選択される候補物質は、タンパク質系物質、炭水化物系物質、脂質系物質、天然有機物系物質、合成有機物系物質、無機物系物質、およびペプチドミメティックス系物質のいずれか1つであり得る。

【0193】

このような物質は、例えば、ペプチドのコンビナトリアルライブラリー、環状のペプチドミメティック (peptidomimetics) のライブラリー、およびランダムまたは特定 (dedicated) ファージディスプレイライブラリーのポジショナルスキニングの産物であってよい。

【0194】

特に好ましい実施形態では、本発明のスクリーニング方法で準備、選択される候補アンタゴニスト物質はペプチドであってよい。よって、CD28受容体に対してナノモル以下の親和性を有する超抗原アンタゴニストペプチドに関してスクリーニングするためにはコンビナトリアルファージライブラリーを使用し得る。特定の限定されない例では、New England BiolabsのPhD-12ライブラリーを使用し得る。

【0195】

パンニングは2段階で行われ、第1の段階では、結合したファージをpH2.2での溶出によりマイクロプレートに結合したsCD28から溶出する。これにより、超抗原との相互作用と関係のないCD28内のドメインとのバインダーをはじめとするCD28と結合する全ておよびファージを選択する。従って、第2の段階では、上記のように選択されたファージをsCD28と結合させ、過剰の遊離p14またはSEBを用いて特異的に溶出させる。結合したファージを溶出し、パンニングをさらに2~3サイクル行う。次いで、ファージと固定化したsCD28またはs-Ag結合部位を含んでなるその断片との直接結合をファージELISAにより検出し、プレート上のM13に対してスコアをつけてもよい。線形ペプチドの合成前に決定的なファージクローンを増幅し、配列決定する。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 6 】

別法としてのパンニング戦略では、上記のようにトランスフェクト BHK - 21 細胞で一時的に過剰発現される CD28 cDNA を使用してもよい。細胞をプレート上に固定化してもよい。ファージにディスプレイされたペプチドのパンニングをまずベクターでトランスフェクトされた BHK - 21 細胞で行って非特異的なバインダーを排除した後、CD28 をそれらの細胞表面で過剰発現する BHK - 21 細胞（または s - Ag 結合部位を含んでなる CD28 の断片を過剰発現する細胞）で行ってもよい。あるいは、全細胞膜調製物を細胞の代用にしてもよい。CD28 と結合したファージを過剰の遊離相互作用分子（例えば、p14 または SEB）で溶出させる。

【 0 1 9 7 】

第2の段階では、Enshell-Seijffers et al. Nucleic Acids Res 29: E50-60 (2001)] により開発された有利な fd ファージの pVIIII を用いてディスプレイされたペプチドの数残基が一定に保持される特定(dedicated)ライブラリーを構築してもよい。この fd ファージは2コピーの pVIIII 遺伝子を有し、そのうちの一方が挿入用に設計されたオリゴヌクレオチドのカセットを保有するため、通常 pVIIII の使用の際のヘルパーファージの必要をなくし、ラウンド間のファージ増幅を容易にする。次いで、以下で記述する本発明のスクリーニング方法の評価工程に従い、ランダムおよび特定(dedicated)ライブラリー各々から選択された20ペプチドの小規模合成物をアンタゴニスト活性に関して評価し得る。

【 0 1 9 8 】

特に好ましい実施形態では、本発明のスクリーニング方法で準備、選択された候補アンタゴニストペプチドをさらに、ポジショナルスキニングにより解析し、改良してもよい。

【 0 1 9 9 】

pepscanポジショナルスキニングでは、開始親和性は 10^{-3} M と低く、ペプチド長は難なく15残基で可能である。リードペプチドは、特定のタンパク質配列由来のランダムコンビナトリアルライブラリーまたはペプチドライブラリーをはじめとするいかなるタイプのペプチドライブラリー由来であってもよい。音響信号対雑音比により特異的な低親和性相互作用の検出が可能である。それは固体支持体上で使用する場合もある[参照、Schroei jers et al., Cancer Res. 60: 1104-1110 (2000)]し、または支持体からペプチドを分離した後に使用する場合もあるし、さらにそれらを可溶性形態で使用する場合もある[Kast et al., Cell 59: 603-614 (1989); Kast et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88 : 2283-2287 (1991); De Samblanx et al., Pept. Res. 9: 262-268 (1996); Oosterom et al., J. Biol. Chem. 274: 16853-16860 (1999)]。固定ポジショナルスキニングでは、全ての候補ペプチドが非短縮型(non-reducible)ループとして合成される。それを用いてリードペプチドの親和性をさらに改良する。こうして、ペプチドを固体支持体と連結する(pepscan - I)か、または可溶性遊離ペプチドとしてアッセイする(pepscan - II)かしてリードペプチドの親和性を最適化する。スキニングでのリードペプチドは p12 (Y N K K K A T V Q E L D) である。上記の本発明の方法により得られる他の候補ペプチドも同様にスキニングし得る。

【 0 2 0 0 】

候補アンタゴニストペプチドに対してアラニンスキニングを実施してもよい。このようなアッセイは p12 に対して行い、受容体との結合に、また、それとは別に、in vitro における超抗原アンタゴニスト活性に重要な残基を同定する。以下で記述する本発明のスクリーニング方法の評価工程に従い、in vitro におけるアンタゴニスト活性を評価し得る。ペプチドはN末端アセチルおよびC末端 - CONH₂ を有する可溶型で合成され、評価工程としてのPBM Cを用いたin vitroアッセイでのより高いプロテアーゼ耐性に関係するフランキングD - アラニンを保持する。同定されたリードペプチドに対してもう一度アラニンスキニングを実施してもよい。リジンは超抗原アンタゴニストドメインにおいて顕著であるため、同様に、ペプチドのリジンスキニングを実施してもよい。

10

20

30

40

50

【0201】

一度、アラニンスキャンによりアンタゴニスト活性に重要な残基が同定されれば、全20アミノ酸(400ペプチド)の完全に置換されたpepscanで2つのこのような位置が選択され、次いで、同様に、2つのさらなる位置がスキャンされる(400ペプチド)。ペプチドは最初チップ上に保持するが、これは遊離可能な形態である。sCD28と各ペプチドとの結合にこの受容体に対する市販のポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を用いたELISAによりスコアをつける。次ぎに、決定的なペプチドを解放し、スクリーニングアッセイ ELISAフォーマット(上記を参照)による受容体結合アッセイに向けて、さらに、PBMCアッセイ(下記で詳述)によるin vitroにおけるアンタゴニスト活性に関するアッセイに向けてプール(グループ化)し、次いで、そのグループをデコンボリューションする(deconvoluted)。段階的に、得られた改良リードに対してもう一度ポジショナルスキャンを行う。合計4回のポジショナルスキャンを実施し、受容体に対して最大の親和性を有するペプチドに対してもう一度固定ポジショナルスキャンを実施する。

10

【0202】

環化スキャンでは、m-マレインイミド安息香酸N-ヒドロキシ-スクシンイミド(MBS)エステルなどのリンカーを用いて、その活性エステルを介して特定のペプチドのN末端と、また、そのマレインイミド基を介してシステインの遊離チオール基と反応させる。システインはペプチドの一部である。

【0203】

ループスキャンでは、各ペプチドのN末端をMBSを用いてシステインの遊離SH基と連結し得る。このシステインは別々に同じウェルの底と連結している。このように、固定されたループが形成される。

20

【0204】

環状ペプチドミメティックは個々に合成され、以下に記述するように、ELISAおよびプラズモン共鳴アッセイにてPBMCにおけるアンタゴニスト活性およびsCD28またはs-Ag結合部位を含んでなるその断片に対する親和性に関して評価される。

【0205】

ポジショナルスキャン、ファージディスプレイまたは環状ペプチドミメティック合成により得られたバックアップは、相互作用分子としてのp12およびp14アンタゴニストペプチドと、標的受容体と結合するそれらの能力に関してプラズモン共鳴測定ならびにELISAアッセイにより比較し得る。直接結合およびsCD28に対してSEBと競合する能力の両方がアッセイされる。sCD28と抗CD28抗体との結合を阻止するアンタゴニストペプチドの能力もまた試験し得る。sCD28とB7-2との複合体形成を促進するアンタゴニストペプチドの能力もまた、以下に記述するような評価工程と同様に検討される。

30

【0206】

よって、本発明のスクリーニング方法の第3の工程は選択された候補物質の評価である。この段階では、候補アンタゴニスト物質がTh1リンパ球の毒素媒介性活性化を拮抗するその可能性に関して評価され、ある発熱性外毒素またはそのような発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発するその潜在的な可能性に対しても評価され得る。選択された物質(好ましくは、本発明の選択方法により得られたもの)の評価は

40

(a) CD28分子または配列番号3で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を有するs-Ag結合部位を含むその断片を含んでなる試験系を準備する工程、

(b) 該系を好ましくは、本発明の方法により準備、選択された候補アンタゴニストと接触させる(接触は相互作用に好適な条件下で行われる)工程、および

(c) 評価項目指標に対する評価する候補アンタゴニストの効果を対照との比較により決定する(効果はCD28分子と発熱性外毒素との直接相互作用を阻害し、それによってTh1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗をもたらす該候補の可能性を示す)工程

50

により行われ得る。

【0207】

本発明のスクリーニング方法による候補アンタゴニストの評価に使用する試験系は細胞フリー混合物、in-vitro/ex-vivo細胞培養物、またはin-vivo動物モデルであり得る。このような試験系は、所望により、T細胞の超抗原誘導性活性化に、および候補アンタゴニストの拮抗効果を決定する評価項目指標の検出に好適な条件を提供する内生および/または外生化合物をさらに含んでなるとよい。さらに詳しく言えば、T細胞がTh1リンパ球であり、かつ、該活性化がIL-2および/またはIFN- γ 遺伝子発現の誘導により決定される。

【0208】

実施例4により示すように、アンタゴニストペプチド単独ではヒトPBMCに対して超抗原アゴニストとして作用せず[Arad et al., (2000) 前掲]、それどころか、超抗原とCD28との結合に干渉する。しかしながら、アンタゴニストペプチドはsB7-2によるシグナル伝達を刺激する超抗原の能力を共有している(実施例5)。超抗原によるT細胞の活性化は抗原提示細胞を必要とし、T細胞単独の存在下では起こらない[Marrack and Kappler, Science 248: 705-711, (1990)]。よって、事実上、超抗原の作用は抗原提示細胞上のMHCクラスII分子とT細胞上のTCRとの超抗原媒介性架橋により接近する、細胞に定着したB7-2およびCD28と主に関連している[Salomon and Bluestone, Annu. Rev. Immunol. 19: 225-252, (2001)を参照]。その意味で、アンタゴニストペプチドはCD28と結合する超抗原の能力をブロックし、それにより超抗原によるB7-2/CD28媒介性シグナル伝達の促進を妨げる。Th1細胞刺激が抗CD3によるものである場合のアンタゴニスト活性の欠落により示されるように、アンタゴニストはTCRと相互作用しない。

【0209】

よって、特定の実施形態によれば、候補アンタゴニストの評価に使用する試験系は可溶性CD28分子(sCD28)またはs-Ag結合部位を含んでなるその断片、および可溶性B7-2分子(sB7-2)を含んでなる細胞フリー系であり得る。

【0210】

特に好ましい実施形態では、このような細胞フリー系に関する評価項目指標は、好適な手段により、例えば、実施例5での直接結合の立証にも使用されたようにELISAおよびプラズモン共鳴により検出されるsCD28分子とsB7-2分子との結合であり得る。さらに詳しく言えば、候補アンタゴニストの存在下でのCD28分子とsB7-2との相互作用の増大が超抗原とCD28分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する該候補の能力を示す。

【0211】

あるいは、本発明のスクリーニング方法による評価に使用する試験系は内生的に発現されるCD28分子を含んでなるin-vitro/ex-vivo細胞培養物であり得る。

【0212】

特定の例では、試験系として使用する細胞培養物は哺乳類供与体から単離されたPBMC培養物であり得る。このような哺乳類は、好ましくは、ヒトおよびアカゲザルのいずれかであってよい。

【0213】

よって、この特定の試験系での評価項目指標は視覚的に検出可能なシグナルをもたらすIL-2および/またはIFN- γ の超抗原誘導性発現であり得る。そのため、該評価項目の阻害あるいは減少は超抗原とCD28分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する候補物質の能力を示す。このような阻害によってTh1リンパ球の毒素媒介性活性化の拮抗がもたらされる。IL-2および/またはIFN- γ の超抗原誘導性発現は、例えば、定量的ドットプロットハイブリダイゼーションおよびRNアーゼプロテクションアッセイにより検出し得る。

【0214】

10

20

30

40

50

次の実施例によって例示されるように、本発明者らは細胞免疫応答に關与する全ての細胞サブセットを含む新たに単離された全ヒトP B M C集団におけるT h 1 サイトカインm R N Aの超抗原誘導性発現を阻害するアンタゴニストペプチドの能力に基づいた、超抗原アンタゴニスト活性に關しての強力なin vitroスクリーニングツールを開発した[Arad et al., (2000) 前掲]。本発明者らは、この系が種々の疾患におけるヒト免疫応答を厳密に反映し、この系によりその応答の異常調節が検知されることを示し[Gerez et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 58: 152-266 (1991); Gerez et al., Kidney International 40: 266-272 (1991); Gerez et al., Clin. Exp. Immunol. 109: 296-303 (1997); Kaempfer et al., J. Clin. Oncol. 14: 1778-1786 (1996)]、従って優れた代用マーカーを提供している。このP B M Cアッセイがアンタゴニストペプチドp 1 2およびp 1 4の発見[Arad et al., (2000), (2001) 前掲]におよび毒素アゴニスト活性の欠落の提示[Arad et al., (2000) 前掲]に効果的であることが分かった。よって、この系は本発明のスクリーニング方法により得られた候補アンタゴニスト物質のアンタゴニスト活性の評価に効果的に使用し得る。

10

【0215】

本発明者らは、ヒトP B M Cで誘導されるI L - 2およびI F N - m R N Aの発現を測定し、少数の細胞のそれらの存在量の少ないm R N A種を定量するための感度の良い定量方法を考案した。この方法は大量のサンプルの便宜なプロセッシングを考慮に入れていたため、そのようなものとして、可能性ある毒素アンタゴニストのスクリーニングに好適である。さらに、それは同時にいくつかの異なるヒト供与体由来のP B M Cの応答の数多くのパラメーターに關する研究を可能にする。このことから、再現性ある形でアンタゴニスト活性を提示するのに効果的なツールがもたらされる。m R N Aは即座に発現され、正確にアッセイすることができるが、I L - 2およびI F N タンパク質は誘導中、徐々にしか現れず、それらの細胞受容体との結合により抑えられることから、これらのタンパク質の測定はm R N Aの測定よりも情報量が少ない。I L - 2およびI F N - m R N Aの測定は、免疫刺激の数時間後にはこれらの遺伝子の一次応答についての動的情報を与える。アッセイは広い範囲にわたって線形である。このような解析により得られた情報はR N Aアーゼプロテクション解析により確認される。

20

【0216】

所望のアンタゴニストペプチドの最も重要な特性は、それがT h 2 応答を損なわないことである。このことはバックアップの必要条件でもあり、T h 1 サイトカインm R N Aの毒素誘導性発現がアンタゴニストペプチドにより阻害されるP B M Cの培養培地を用いたI L - 1 0に關するE L I S Aにより試験し得る。

30

さらにもう1つの別の例では、本発明のスクリーニング方法による候補アンタゴニストの評価に使用する試験系はin-vivo系、特に動物モデルであり得る。

【0217】

1つの特定の実施形態によれば、動物モデルは超抗原、好ましくは、発熱性外毒素を投与したD - ガラクトサミン感作マウスであり得る。このような試験系に關する評価項目指標は該マウスの致死毒素性ショックからの防御および救済であり得る。該評価項目の増大が、超抗原とC D 2 8分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する、T h 1 リンパ球の発熱性毒素媒介性活性化を拮抗する、毒素性ショックから防御する該候補物質の能力を示し、また、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を間接的に誘発する該候補の能力も示し得る。

40

【0218】

もう1つの動物モデルとしては、発熱性外毒素を抗原投与したブタであり得る。このような方法では、評価項目指標は該ブタの毒素性ショックおよび無能力からの防御および救済であり得る。このような評価項目の増大は超抗原とC D 2 8分子との相互作用を特異的に拮抗し、阻害する、T h 1 リンパ球の発熱性外毒素媒介性活性化を拮抗する、毒素性ショックおよび無能力から防御する、また、所望により、ある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発

50

する該候補物質の可能性を示す。

【0219】

本発明はさらに、哺乳類被験体における超抗原関連疾患の治療のための治療用組成物の製造方法を提供する。この方法は

(a) Th1リンパ球の超抗原媒介性活性化を拮抗し得、好ましくはさらにある発熱性外毒素または少なくとも2種の発熱性外毒素の混合物により誘導される毒素性ショックに対する防御免疫を誘発し得るアンタゴニスト物質を同定する工程、および

(b) 該アンタゴニスト物質を少なくとも1つの医薬上許容される担体、希釈剤、賦形剤および/または添加剤と混合する工程を含んでなる。

10

【0220】

治療用組成物の製造方法で使用するアンタゴニスト物質は、好ましくは、本発明のスクリーニング方法により同定され得る。

【0221】

本発明はさらに、本発明の方法による超抗原関連疾患の治療のための医薬組成物の製造におけるCD28分子またはその断片、特に、最も好ましくは、配列番号3で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる超抗原結合部位を含む断片の使用に関する。

【0222】

当然のことではあるが、開示し、記述する本発明は本明細書において開示する特定の実施例、方法工程および組成物に限定されないため、そのようなものとして、方法工程および組成物は多少変更し得る。さらに当然のことではあるが、本発明の範囲は添付の特許請求の範囲およびその等価物によってのみ限定されるものであるため、本明細書において用いる専門用語は特定の実施形態を説明することを目的として使用しており、限定を意図したものであるものではない。

20

【0223】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いる単数形および「その」は、特に明示されない限り、複数の言及を包含することに留意しなければならない。

【0224】

本明細書ならびに後に続く実施例および特許請求の範囲を通じて、文脈上他の意味に解すべき場合を除き、「含む」および「含んでなる」などの変形は、ある整数もしくは工程または整数群もしくは工程群を含めるが、その他の整数もしくは工程または整数群もしくは工程群を除外しないという意味を含むと解釈される。

30

【0225】

次の実施例は本発明の態様の実施において本発明者らが使用する技術の例示である。当然のことではあるが、これらの技術は本発明の実施のための好ましい実施形態の例示であり、当業者ならば、本開示内容に照らして、本発明の精神および意図された範囲を逸脱することなく数多くの修飾をなし得ることが分かるであろう。

【実施例】

【0226】

試験手順

40

細胞培養物およびヒトサイトカイン遺伝子発現の誘導

健常なヒト供与体由来のPBMCをFicoll Paque(Pharmacia)で分離し、50mlのRPMI 1640培地で2回洗浄し、 $4 \times 10^6 / \text{ml}$ の密度に再懸濁し、この培地に2%ウシ胎児血清、2mMグルタミン、10mM MEM非特異的アミノ酸、100mMピルビン酸ナトリウム、10mM HEPES pH7.2、 $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ 2-メルカプト-エタノール、100u/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイシンおよび5μg/mlナイスタチンを添加して培養した。SEB(ロット14-30、米国陸軍感染症研究所(U. S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases)毒物学部門より提供)、SEAまたはTSST-1(Sigma)を添加して100ng/mlにした。

【0227】

50

R N アーゼプロテクション解析

トータルRNAをグアニジンイソチオシアネートで抽出した[Chomezynski and Sacchi, Anal. Biochem. 162: 156 (1987)]. p B S (Promega)に挿入されたDNAから ^{32}P UTPを用いてin vitro転写されたゲノムアンチセンスRNAプローブを用いてRNアーゼプロテクション解析を行った[Arad et al. (1995) 前掲]。T7プロモーターから転写されたIL-2プローブ(600ヌクレオチド(nt))は、IL-2遺伝子の第3エクソンおよび第3イントロンの一部と相補的である; 8M尿素-ポリアクリルアミドゲルでは、IL-2 mRNAにより保護された117ntのRNA断片が得られる。T3プロモーターから転写されたIFN- γ プローブ(274nt)はIFN- γ 遺伝子の第3エクソンおよび第3イントロンの一部と相補的であり、IFN- γ mRNAにより保護された183ntのRNA断片が得られる。T3プロモーターから転写されたTNF- α プローブ(700nt)はエクソン1の一部、エクソン2、エクソン3、ならびにイントロン3の一部およびエクソン4と相補的である; TNF- α mRNAは274および263ntの2断片を保護する。ハイブリダイゼーションにてセンスRNA転写物からは検出可能なシグナルが得られなかった。18SrRNA(90ntを保護する)またはアクチン(415ntを保護する)のアンチセンスRNAプローブをローディング対照とした。

【0228】

IL-2およびIFN- γ RNAの定量的ドットプロットハイブリダイゼーション

1ml培養物由来のPBMCを回収し、7.5Mグアニジン-HClで溶解した。20にて一晚エタノール沈殿したRNAをホルムアルデヒドに溶かし、60にて15分間インキュベートした。10 \times クエン酸ナトリウム生理食塩水で4連続2倍希釈したものを96ウェルドットプロット装置を使用してニトロセルロースシートに適用した(二重試験)。真空炉で80にて焼き付けた後、シートをヒトIL-2およびIFN- γ 各々の ^{32}P 標識したアンチセンスRNAプローブとそれぞれハイブリダイズさせた。ELISAリーダーにより630nmにて、露光したオートラジオグラムをスキャンした。RNAレベルをA₆₃₀を単位にして表す。与えられたRNAサンプルの連続2倍希釈物では、各サンプルに存在する特異的なRNAの濃度に比例する遺伝子発現の200倍範囲の強度に対して線形光学密度応答を得る[Arad et al. (1995) 前掲; Gerez et al., Clin. Immunol. Immunopathol. 58: 251 (1991); Kaempfer et al., J. Clin. Oncol. 14: 1778 (1996)]。

【0229】

SEB関連ペプチドの合成

ペプチドは、一般に、引用することにより本明細書の一部とされるW098/2944にて記載されているように合成した。

p12およびp14(各々、配列番号1および2でも示される)はフルオロニル(fluoronyl)-メトキシカルボニル化学を利用して合成し、開裂させ、側鎖をトリフルオロ酢酸で脱保護した。培養培地中、トリフルオロ酢酸-ペプチドスラットは可溶性であった。同じ手順を用いてD-A1aを連結した。

ペプチドはHPLCでは>95%純粋であった。

【0230】

表面プラズモン共鳴

タンパク質-タンパク質相互作用は表面プラズモン共鳴(BIAcore instrument, Pharmacia)により検出される(ここで、共鳴単位(RU)の増大が注入されたタンパク質と表面上に固定化されたタンパク質とが結合していることを示す)。Seth et al.[Nature 369: 324-327 (1994)]により報告されているような標準アミン化学により、固定化するタンパク質をデキストランマトリックスと結合させた。センサー表面を流れるHBS(10mM HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTA、0.05%界面活性剤 Tween 20 pH7.4)の流速を10 μ l/分にて維持した。サンプルを10 μ l/分にて、それらの量に応じて(20または40 μ l)2または4分間注入し、アンタ

10

20

30

40

50

ゴニストペプチドに対してだけは40 µlを使用した。各注入後は、50 mM H₃PO₄により表面を再生した。固定化レベルは3,000~4,000 RUであった。センサーグラムでは、注入前、応答のピーク時、注入中、および洗浄終了時の共鳴シグナルを示す。

【0231】

毒素性ショックからのマウスの防御

10匹の10~12週齢の雌BALB/cマウス(Harlan, Jerusalem, Israel)群をIP注射による毒素抗原投与に際して、20 mg D-ガラクトサミン(Sigma)の腹膜内(IP)注射により感作させた。

【0232】

毒素性ショックからのブタの防御

各試験条件に対し、5日齢の雑種ブタ(主としてヨークシャー種; 2.5 kg)を6匹の子ブタからなる無作為化群(各群、雌ブタである)として、SEA(25 g)にIP注射を施した。SEA前ならびにSEA1、2、3、4および5時間後にアンタゴニストペプチドを30分間IPにて投与した。嘔吐と下痢について、8時間まで1時間おきに、その後、12時間まで3時間おきに、さらに、21および24時間にスコアをつけた。

【0233】

実施例1

SEBなどの超抗原がTh1サイトカイン、IL-2およびIFN-の早期の同時発現、ならびにTh2サイトカイン、IL-4およびIL-10の早期の同時発現を誘導する
SEBはTh2サイトカイン、IL-4およびIL-10の早期発現を誘導する

超抗原はIL-2、IFN-およびTNF-の発現を伴うTh1応答の過剰刺激によりそれらの毒性作用を発揮すると考えられている。さらに、免疫抑制性サイトカイン、特にIL-10の発現を伴うTh2応答は初期のTh1応答を遮断しようとする以後の事象であると一般に考えられている。リンパ節[Litton et al., J. Immunol. Methods 175: 47-58, (1994)]またはSEB処置したマウスから新たに単離されたCD4細胞[Cardell et al., Eur. J. Immunol. 23: 523-529, (1993); Nagelkerken et al., Eur. J. Immunol. 23: 2306-2310, (1993)]では、IL-2およびIFN-に関してmRNAの迅速な誘導があったが、IL-4およびIL-10に関してはなかった。ネズミCD4細胞では、IL-2およびIL-4の存在下でSEBによるIL-10のかなりの誘導が見られたが、それらの不在下では見られなかった[Cardell et al., 前掲]。ヒト末梢血単核細胞(PBMC)では、SEBおよびSEAによりIL-2およびIFN-の発現は誘導されたが、IL-4またはIL-10の誘導は検出されなかった[Krakauer, J. Leukoc. Biol. 57: 450-454, (1995), Litton et al., 前掲]。これらの発見から、超抗原に対する一次応答時、Th2サイトカインの発現はTh1サイトカインの発現にかなり遅れを取るといふ知見が導かれた。

【0234】

本発明者らはヒトPBMCにおけるTh2応答のSEB誘導性発現の動態を研究した。図1にて示すように、SEBは2~4時間以内に低いが有意なレベルのIL-4を誘導し(図1A)、同様にIL-10の産生を誘導もする(図1B)。誘導はSEB量とともに高まった。

【0235】

図1Cは長期にわたる誘導動態を示しており、SEBが8~20時間以内にこれらのTh2サイトカインの最大レベルを誘導すること、また、IL-4およびIL-10の発現が持続することがはっきりと示されている。しかしながら、IL-4およびIL-10のレベル(pg/ml)はSEB処置したマウスの血清に関して報告されたレベル(ng/ml)よりもはるかに低かった[Florquin et al., Autoimmun. 9: 609-615, (1996)を参照]; 実際、他の研究では、SEBによるIL-4またはIL-10のこのような初期誘導は検出されなかった[Cardell et al., 前掲; Litton et al., 前掲; Nagelkerken et al., 前掲; Krakauer, 前掲を参照]。

10

20

30

40

50

【 0 2 3 6 】

IL - 4 および IL - 1 0 の同時誘導による SEB 媒介性 IL - 2 および IFN - m RNA 発現の阻害

新規な毒素受容体の検討において、本発明者らは次ぎに、観察された Th 2 型サイトカインの初期誘導が毒素性ショックをもたらす Th 1 サイトカインの強力な SEB 媒介性誘導に關与するかどうかを調査した。この調査結果から、SEB は IL - 2 および IFN - 遺伝子発現の誘導と同時に、IL - 4 および IL - 1 0 の早期出現を低くとも IL - 2 および IFN - 遺伝子発現の誘導を著しく阻害するのに十分である、少なくとも 1 0 ~ 2 0 倍低いレベルに誘導することが示された。IL - 2 および IFN - m RNA の SEB 誘導性発現は IL - 4 または IL - 1 0 を中和する抗体 (A b s) の存在下で大いに高まる ; これらの A b s は SEB の不在下では誘導効果がない (図 2) 。よって、SEB による誘導の発生から、IL - 2 および IFN - 遺伝子の発現は同時に誘導される IL - 4 および IL - 1 0 によりダウンレギュレートされる。これらの Th 2 型サイトカインの誘導は一次応答であり、それらが誘導されるとすぐに、IL - 2 および IFN - 遺伝子の発現の調節が開始される (図 2) 。この本来備わっている抑制機構がなければ、それらの有害な誘導はさらに大きくなるであろう。

10

【 0 2 3 7 】

IL - 4 および IL - 1 0 の SEB 媒介性誘導 (図 1) の IL - 2 および IFN - 遺伝子の SEB 誘導性発現に対する効果を評価するため、中和 A b s IL - 4 また IL - 1 0 を使用して、IL - 4 または IL - 1 0 の作用をブロックした。IL - 2 m RNA の誘導波の振幅は IL - 4 また IL - 1 0 いずれかの存在下でかなり増大した (図 2 A) 。イソ型の適合対照 A b (ラット抗ヒト I g G) では効果はなかった。IFN - 遺伝子の IL - 4 または IL - 1 0 の枯渇に対する応答は一層大きかった。図 2 C にて示すように、A b s による IL - 4 または IL - 1 0 いずれかの枯渇は、誘導される IFN - m RNA 波の振幅および継続時間を増大するだけでなく、はるかに早期の発現をもたらした。このように、中和 A b s を使用することで、SEB による誘導の発生から、IL - 2 および IFN - 遺伝子の発現は IL - 4 および IL - 1 0 の同時誘導により大きく減少する (2 0 倍) ことが分かった。これらの結果は、SEB などの超抗原による Th 1 型サイトカイン遺伝子の過剰な活性化にもかかわらず、この応答は同時に誘導される IL - 1 0 および IL - 4 により制限されるためにその最大の可能性をはるかに下回った状態のままであることを示している。これらの Th 2 サイトカインの阻害量の早期発現は超抗原に対する一次応答の不可欠な要素である。

20

30

【 0 2 3 8 】

アンタゴニストペプチドは SEB 誘導性 Th 1 応答を阻害するが、SEB に対する Th 2 応答はブロックしない

アンタゴニストペプチドにより、Th 1 サイトカイン応答のブロッキングを通じて、致死毒素抗原投与から防御されたマウスは異なる毒素によるさらなる毒素抗原投与に対する防御免疫も迅速に発達させる [Arad et al. , (2000) 前掲 ; Arad et al. , (2001) 前掲] 。防御抗体を必要とするこのような免疫 [Arad et al. , (2000) 前掲] は、致死 Th 1 応答がアンタゴニストペプチドによりブロックされる状況での超抗原による Th 2 サイトカインの活発な誘導を介していると思われる。実際には、アンタゴニストペプチド p 1 4 A は SEB による Th 1 サイトカイン遺伝子発現の誘導をブロックした (IL - 2 については図 3 A 、 IFN - については図 3 B) が、Th 2 型サイトカイン IL - 1 0 の誘導は損なわれなかった (図 3 C) 。IL - 1 0 のこの発現は同時に起こる B 細胞へのヘルパー機能により免疫能力をフラグする。

40

【 0 2 3 9 】

この結果では、超抗原の作用に必要な不可欠であるアンタゴニストペプチド受容体の有望な担体として Th 1 細胞を指摘している。図 2 および 3 のデータは図 4 で示されるようなモデルを示唆する。超抗原毒素により誘導される過剰な Th 1 応答が致死ショックを起こし、その場合に IFN - が Th 2 応答を抑制している。図 2 および 3 のデータを受けて

50

、実際に認められるようにアンタゴニストペプチドは毒素によるTh1細胞活性化の選択的ブロックを誘発する上、残留Th1応答を抑制するだけでなく、防御免疫の急速な発達を促進する役割も果たすTh2サイトカイン(IL-4、IL-10)の活発な同時誘導には干渉しないという仮説を立てた[Arad et al., (2000), (2001) 前掲]。

【0240】

超抗原によるT細胞の活性化が主にTh1応答であるという臨床的根拠がある。毒素により誘導されるIFN- γ の大量放出により防御中和抗体の発達が妨げられる。例えば、月経時ブドウ球菌毒素性ショック症候群を発症している女性の85%は回復後TSST-1に対する抗体を発達させず、多くは再発する[Schlievert, Nature Medicine 6: 378-379. (2000)]。

10

【0241】

アンタゴニストの不在下(図4A)では、毒素はTh1サイトカイン、IL-2、IFN- γ 、およびTNFの大量産生を誘導し、それらが一方でTh2応答を阻害するように作用し、もう一方で臓器不全および死をもたらす。しかしながら、アンタゴニストの存在下ではTh1応答は阻害され、Th2応答は弱まることなく進行する(図4B)。すぐに、高レベルのIL-4およびIL-10が残留Th1応答を抑制し、同時に防御免疫を誘導する。

【0242】

本発明者らの見解では、アンタゴニストペプチドは致死Th1応答を防御Th2応答へと転換するアジュバントとしての機能を果たす。理論にとらわれるものではないが、アンタゴニストがいかに毒素によるTh1細胞活性化の選択的ブロックを引き起こすのに関する魅力的な概念は、新規な毒素受容体がTh1細胞の活性化に選択的に使用されるということである。本発明者らの研究仮説は、超抗原毒素がTh1細胞を活性化するためには、T細胞受容体だけでなく、新規受容体も拘束しなければならないが、Th2応答にこの受容体は必要ではないということであった(図5A)。

20

【0243】

よって、アンタゴニストペプチドが新規受容体と結合することで毒素によるTh1細胞活性化の選択的なブロックがなされ、それにより、生存が可能になる(図5B)。

【0244】

Th1細胞の完全活性化はMHCクラスII分子、超抗原およびTCRの相互作用だけによるものではない。TCR結合を持続することは、T細胞活性化に必要不可欠であるが、多くの障害に直面する。第一に、TCR結合は小型のTCRおよびMHC分子により阻止される。第二に、TCRの抗原性MHCペプチドに対する親和性が低い。第三に、抗原提示細胞での抗原性複合体の数が極めて少ない。最後に、T細胞の移動は抗原認識の持続に支障となる[Grakoui et al., Science 285: 221-227, (1999)]。超抗原はこれらの制約の克服においては普通の抗原よりはるかに優れ、MHC拘束を回避するが、それらはT細胞活性化に共刺激リガンド(抗原提示細胞でのB7ファミリーのもの、遅れてT細胞でのCD28など)をなお必要とする[Lenschow et al., (1996) 前掲、に概説されている]。

30

【0245】

実施例2

40

Th1細胞の超抗原活性化へのB7-2の特異的な関与 / 要件

抗B7-2はSEBに対するTh1応答をブロックするが、SEBに対するTh2応答はブロックしないのに対し、抗B7-1はTh1またはTh2応答をブロックしない

本発明者らは、ヒトPBMCにおいてB7-2に対するmAbがSEBによるIL-2およびIFN- γ mRNAの誘導をブロックするのに対し、B7-1に対するmAbにそのような効果がないことを見出した(IL-2については図6AおよびIFN- γ については6B)。抗B7-1および抗B7-2抗体はいずれもIL-10産生に対する阻害効果を示さなかった(図6C)。一方でのアンタゴニストペプチドによるIL-10産生阻害の欠如と、もう一方での抗B7-2によるIL-10産生阻害の欠如とのこの相互関係はTh1応答が阻害される状況での超抗原の作用様式へのB7-2共リガンドの関与を

50

裏付けている。これらの結果に基づいて、本発明者らは、S E BがB 7 - 2リガンドまたはこれらのB 7リガンドを拘束するC D 2 8共刺激受容体と結合するかどうか、また、このような結合がアンタゴニストペプチドによる阻害に対して敏感であるかどうかを調査した。

【 0 2 4 6 】

理論にとらわれるものではないが、以下で詳述する結果は次の解釈を裏付けている。致死毒素性ショックを媒介するサイトカインを発現するT h 1細胞の活性化は超抗原のM H CクラスIIおよびT C Rリガンドとの相互作用に完全依存しているが、この相互作用だけでは活性化に不十分である。一度結合すれば、超抗原はアンタゴニストドメインを介して作用して、B 7 - 2 / C D 2 8リガンド相互作用を可能にし、そのことがT h 1細胞活性化を推進する主要なシグナルであるこの本質的に弱い相互作用の強い促進作用となる。超抗原はこの相互作用が存在しないとT h 1細胞を活性化させることができない。重要なことは、超抗原はC D 2 8と直接結合し、B 7 - 2と後者との結合を促進するという点である。また、超抗原はそれよりも弱くではあるがB 7 - 2とも結合する。超抗原はC D 2 8およびB 7 - 2と三重複合体を形成することにより、T h 1細胞活性化のためのその必須の、実際には不可避的な経路としてC D 2 8 / B 7 - 2リガンド相互作用を利用することに注目すべきである。このように、超抗原によるC D 2 8およびB 7 - 2の利用は、B 7 - 2およびC D 2 8を拘束できない代わりにこれらのリガンドを間接的に、必須のリガンドよりもむしろ共刺激としてただ利用するように、T C RのM H CクラスIIポケット内にプロセッシングを受けたペプチドとして提示される通常の抗原の利用とは根本的に異なっている。

【 0 2 4 7 】

以下の実施例3にて示すように、超抗原S E BはT h 1細胞のC D 2 8受容体と直接結合する。これらの結果から、アンタゴニストペプチドの標的である新規受容体がC D 2 8であることが分かる。アンタゴニストペプチドはC D 2 8分子と結合し、それによってこの受容体への超抗原の接近を妨害して、T h 1細胞活性化をブロックする。さらに、本発明者らは、T h 2細胞の活性化がT h 1細胞の活性化と対照的にB 7 - 2 / C D 2 8リガンド相互作用とは無関係であることを示している。このように、超抗原によるT h 1細胞の活性化は独自にB 7 - 2 / C D 2 8リガンド相互作用を必要とする。

【 0 2 4 8 】

実施例 3

T h 1細胞の超抗原媒介性活性化はアンタゴニストの標的となるC D 2 8受容体に依存するが、T h 2細胞の活性化は依存しない
可溶性C D 2 8受容体はT h 1サイトカイン遺伝子発現のS E B媒介性誘導をブロックするが、S E Bに対するT h 2応答はブロックしない

以下の一連の観察により、C D 2 8受容体がアンタゴニストの標的であるという有力な証拠が示される。ヒトP B M Cは種々のプロトコールにより誘導した。I L - 2およびI F N - γ mRNAの発現をT h 1応答のデータとして、また、I L - 1 0タンパク質の発現をT h 2応答のデータとして用いた。

【 0 2 4 9 】

組換え可溶性C D 2 8受容体 (s C D 2 8) はヒトI g G (R & D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USAのカタログ番号3 4 2 - C D) のC末端ヒスチジン。タグ付きF c領域と融合したヒトC D 2 8分子の細胞外1 ~ 1 5 2 - アミノ酸ドメインからなるキメラ分子である。S E BによるI L - 2 mRNAの誘導は単独ではこの遺伝子を誘導しないs C D 2 8により3 . 5倍阻害された (図7 AおよびB)。これに対し、同じ細胞培養物におけるS E BによるI L - 1 0の誘導は本質的にs C D 2 8による影響を受けなかった (図7 C)。S E BによるI F N - γ mRNAの誘導は最大発現時の6時間の時点でs C D 2 8により約2 0倍阻害された ; s C D 2 8は単独ではI F N - γ mRNAを誘導しなかった (図7 DおよびE)。これに対し、同じ細胞培養物におけるS E BによるI L - 1 0の誘導は本質的にs C D 2 8による影響を受けなかった (図7 F)。

【0250】

sCD28はIL-2 mRNAのSEB媒介性誘導を用量依存的に阻害した(図8AおよびB)。これに対し、同じ細胞集団でのIL-10の誘導は使用したsCD28の最高濃度においてさえも阻害されなかったが、その代わりにかなり刺激を受けた(図8C)。IL-2またはIFN- γ 遺伝子の発現およびIL-10の発現各々により明らかになるTh1およびTh2サイトカイン産生細胞の異なる正反対の応答がこれらの試験を通じて繰り返し現れる主題である。

【0251】

別のスプライシングにより、ヒト血清で検出され、機能的共刺激分子であるように思われる、トランスメンブランダメインを欠いた天然可溶性B7-2リガンドが生じる[Jeannin et al., Immunity 13: 303-312, (2000)]。この可溶性B7-2の共刺激活性は抗CD3によるTh1サイトカインの誘導を増強するその能力により示された[Jeannin et al., 前掲]。本発明者らは、本明細書において、ヒトIgG(R & D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USAのカatalog番号141-B2)のC末端ヒスチジン₆タグ付きFc領域と融合したB7-2分子の細胞外1~239アミノ酸ドメインを含んでなる可溶性組換え型B7-2(sB7-2)を使用した。そして、sB7-2がCD28との相互作用を通じてSEBの作用を阻害する可能性を調べた。図8Dおよび8Eにて示すように、sB7-2はIL-2 mRNAの誘導を強く阻害し、モル単位ではこの点においてsCD28よりもはるかに効果的であった。これに対し、IL-10の誘導はsCD28およびsB7-2のいずれによっても阻害されなかった(図8F)。

【0252】

抗CD28およびsB7-2は各々、強いTh1サイトカイン遺伝子発現を誘導するが、Th2サイトカイン遺伝子発現の有意な誘導はない

これまで、SEBをTh1およびTh2応答のインデューサーとして使用した。CD28およびその共リガンドB7-2の特別な役割を細かく調べるために、抗CD28 mAb(カatalog番号MAB342、R & D Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USAのクローン 37407.111)またはsB7-2をこれらの応答の唯一のアクチベーターとして使用し、それらの誘導効果をTCRを通じてシグナル伝達する抗CD3の効果と比較した。CD3はTCRの不可欠な部分を形作り、抗CD3 mAbはT細胞を強く活性化する[Schlossman et al., Leukocyte Typing V: White cell differentiation antigens. Oxford University press, NY, (1995); Sancho et al., J. Biol. Chem. 267: 7871-7879, (1992)]。抗CD3はIFN- γ mRNAの発現を誘導した(図9A)。抗CD28およびsB7-2は各々、IFN- γ mRNAの活発な誘導を誘発し、これらの誘導は抗CD3よりも早期に起こった。

【0253】

より一般には、本発明者らは抗CD28に対する応答と同じPBMC集団でのsB7-2に対する応答とに一貫した関係を認めた。すなわち、抗CD28がTh1応答を誘導する場合には、sB7-2もまたその応答を誘導する。図9Bにて例示するPBMC集団では、抗CD28またはsB7-2が各々、IFN- γ mRNAの誘導をもたらしたが、抗CD28とsB7-2との組合せでは相互阻害が起こった。この結果から、sB7-2はCD28と相互作用して、Th1細胞におけるIFN- γ 遺伝子発現の誘導に関するシグナルを送達しているという概念が確立される。

【0254】

実施例4

CD28とB7-2との相互作用を促進する超抗原とCD28との結合はアンタゴニストペプチドにより阻害される

抗CD28誘導性Th1応答はアンタゴニストペプチドにより阻害される

抗CD28により誘導される、PBMCにおけるIL-2およびIFN- γ mRNAの発現はアンタゴニストペプチドp14Aによる阻害の影響を受けた(図10A、上の2列)。

10

20

30

40

50

【0255】

抗CD28 / 抗CD3 誘導性Th1 応答はアンタゴニストペプチドにより阻害される

T細胞集団の活性化には抗CD3および抗CD28の組合せによるT細胞の刺激が広く採用されている[例えば、Jeannin et al., 前掲]。図10AではmAbのこの組合せによるIL-2 mRNAの発現増幅が認められる。抗CD3 / 抗CD28が媒介するIL-2 mRNAの誘導はアンタゴニストペプチドp14Aにより大幅に阻害され、同様の結果がIFN- γ mRNAでも得られた(図10A)。抗CD28単独ではIL-10を誘導しなかった(図10B)。抗CD28は抗CD3によるIL-2 mRNAの誘導を増強したが、抗CD3によるIL-10の誘導を増強しなかった(図10B)。さらに、アンタゴニストペプチドがIL-10の誘導を低下することはなかった。よって、アンタゴニストペプチドは抗CD28単独による誘導か、抗CD3 / 抗CD28の組合せによる誘導かにかかわらず、Th1サイトカイン遺伝子発現の特異的な阻害剤である。

10

【0256】

抗CD3 / sB7-2 誘導性Th1 応答はアンタゴニストペプチドにより阻害されるが、Th2 応答は阻害されない

本発明者らは、抗CD3とsB7-2との組合せによるT細胞の二重刺激が超抗原による刺激とよく似ていると仮定した。実際には、この組合せにより、IFN- γ mRNAの強い初期誘導もたらされ、この誘導はp14Aにより排除された(図11A)。これに対し、p14Aは抗CD3単独によるIFN- γ mRNAの誘導を阻害せず、sB7-2単独による誘導をより早期に移行させた。

20

【0257】

この結果は、アンタゴニストペプチドがB7-2ひいてはTh1細胞でのその共リガンド、CD28を必要とするその阻害作用に特異的であることを示している。sB7-2単独では抗CD3よりも早期にIFN- γ mRNAの誘導をもたらした。これに対し、sB7-2単独では抗CD3で認められる誘導に匹敵するIL-10の誘導をもたらすことはなく、また、CD3とsB7-2との組合せによってもCD3単独による誘導よりも大幅に増強された誘導もたらされなかった(図11B)。sB7-2 / 抗CD3によるIL-10の誘導がp14Aアンタゴニストペプチドによる阻害に大きな耐性を示すことが証明された(図11B)。抗CD28がIL-10を誘導することができず(図10B)、また、sB7-2が抗CD3の存在下で得られるものに匹敵するレベルまでIL-10を誘導し得ない(図11B)という発見は、図6のデータにより最初に提示したB7-2分子およびCD28のいずれもがIL-10誘導に関与しないという概念を裏付けている。

30

抗CD3 / sB7-2による二重刺激は超抗原によるTCRおよびCD28を介する刺激とよく似ており、本明細書においてはアンタゴニストペプチドにより阻害されることにおいて一致している(図11AおよびB)。

【0258】

アンタゴニストペプチドはTh1サイトカイン遺伝子発現のsB7-2媒介性誘導を刺激する

図12で使用したPBMC集団では、sB7-2はIFN- γ mRNAの短い一時的な誘導しかもたらさなかった。この制限条件でp14Aを添加した場合には、図11Aの結果と一致してこの誘導を阻害し得ないだけでなく、アンタゴニストペプチドは誘導を強く刺激しさえした。

40

この結果は、超抗原とCD28との結合が共リガンド、B7-2とCD28との相互作用を促進し、また、p14Aは超抗原の不在下ではこの点において超抗原によく似ているという概念を裏付けている。

【0259】

実施例5超抗原とCD28 標的受容体との直接結合

プラズモン共鳴による平衡結合研究によりSEBと組換え可溶性CD28との結合およびアンタゴニストペプチドと組換え可溶性CD28との結合を示す

50

超抗原とCD28との相互作用およびアンタゴニストペプチドによるこの相互作用の阻害についてのこれまでの証拠はヒトPBMCにおけるTh1サイトカイン遺伝子誘導の機能研究に基づいたものである。そのため、超抗原またはアンタゴニストペプチドとCD28標的受容体との直接結合を示す必要がある。溶解状態にあるこれらの分子の結合を定量するために、プラズモン共鳴による測定を採用した。この方法は超抗原、MHCクラスII分子およびTCRでの複合体形成を立証するのに用いられている[Seth et al., Nature 369: 324-327 (1994)]。図13の試験では、sCD28をBiacoreチップ上に固定化し、抗CD28、SEBまたはp14Aを複合体形成に関する解析物として用いた(複合体形成は共鳴単位(RU)で測定される)。図13Aでは抗CD28とsCD28との結合がRUの上昇により観察される。SEBの結合を図13Bで示し、p14Aの結合を図13Cで示している。SEBで予想されるこの結合は低親和性であり、T細胞アクチベーターとしてのその役割での複数のリガンド、MHCクラスII、TCRおよびCD28との結合に依存する。

【0260】

プラズモン共鳴は平衡条件下の結合をリアルタイムで測定するため、これらの結果はSEBおよびp14A各々がCD28と直接結合することを立証している。

【0261】

Biacore プラズモン共鳴による平衡結合研究により抗CD28とsCD28との高親和性結合がSEBにより阻害されることを示す

抗CD28とsCD28との結合に関するプラズモン共鳴シグナルを図14で示す。この結合はSEBによって、抗CD28抗体と等モル比で存在するときでさえも減少した。モノクローナル抗体である抗CD28がCD28に対するその高親和性で選択されるのに対し、超抗原がより低い親和性でsCD28と結合する(参照、図13Aの抗CD28は約200RUの増加、図13BのSEBは約30RUの増加)ことから、抗CD28 mAbと競合するSEBの能力は驚くべきものである。この結果は、SEBがsCD28と直接相互作用することも示している。

【0262】

Biacore プラズモン共鳴による平衡結合研究により抗CD28とsCD28との高親和性結合がp14Aにより阻害されることを示す

抗CD28とsCD28との結合に関するプラズモン共鳴シグナルはアンタゴニストペプチドp14Aにより低下し、阻害の程度はCD28抗体濃度の低下に伴い漸増した(図15)。mAbがそのリガンド、sCD28に対してアンタゴニストペプチドよりも高い親和性を有することから、抗CD28 mAbと競合するアンタゴニストペプチドの能力は驚くべきものである(図13Aと図13C)。この結果は、毒素アンタゴニストペプチドがsCD28と直接相互作用することを示している。

【0263】

ELISA形式での結合研究により抗CD28とsCD28との高親和性結合がアンタゴニストペプチドにより阻害されることを示す

さらにもう1つのアッセイを考案してアンタゴニストペプチドとsCD28との直接相互作用を示した。本発明者らは、sCD28をマイクロタイターELISAプレートのウェルに固定化し、抗CD28の結合をアルカリ性ホスファターゼを結合した二次抗体を用いて測定する酵素免疫定量法(ELISA)を開発した。図16では、1,000倍希釈した抗CD28とプレートとの結合がたった0.1μg/mlの濃度のp14Aによってさえも阻害されたことが分かる。p14Aの量が高くなるほどもたらされる阻害のレベルが高くなることはなく、ある程度にしかそうならなかった。しかしながら、抗CD28の濃度が2倍低くなると、p14AはsCD28との結合に対して著しい阻害効果を示し、この阻害はp14A濃度に伴って漸増した。よって、アンタゴニストペプチドp14Aは抗CD28とsCD28との相互作用の強力な阻害剤である。このことは、図13Cのデータに基づいた結論を強化して、p14AがsCD28と直接結合することを示している。

。

10

20

30

40

50

【0264】

プラズモン共鳴による平衡結合研究によりSEBのsCD28との相互作用がsB7-2との相互作用よりも弱いことを示す

抗SEBと固定化されたSEBとの結合に関するプラズモン共鳴シグナルを図17Aに示す。図17Bの試験では、この結合を漸増濃度のsCD28の存在下で調べた。sCD28は抗SEBとSEBとの相互作用を効果的に阻害し、結合が約5倍減少した。sB7-2も、それよりも弱くではあるがこの相互作用を阻害した。抗SEBはSEBと十分に結合した(図17AおよびC)が、CD28とは結合し得なかった(図17C)。よって、図17Bの結果はCD28とSEBとの直接相互作用を立証している。それらもまた、直接相互作用がsB7-2とSEBとの間に生じることを示している。

10

【0265】

sB7-2と固定化されたCD28との結合に関するプラズモン共鳴シグナルをKd 19nMに従い、図17Dに示す。B7-2/CD28複合体がSEBと結合することができるかどうかを解析するため、sB7-2およびsCD28を等モル量で図17Aのアッセイ系に投入した。sB7-2単独では調べた濃度において阻害性はなかったが、それはsCD28の阻害効果を高め、2種のリガンドが超抗原とのそれらの相互作用において協力することを示した(図17E)。

【0266】

sCD28とSEBとの結合をさらに研究するため、長時間のプラズモン共鳴解析を採用した(図18)。解析物としての抗SEBとチップ上に固定化されているSEBとの結合を漸増濃度のsCD28により段階的に阻害した(図18A)。4nM抗SEB AbとSEBとの結合に対して1μM sCD28により起こる84%の阻害は漸増濃度の抗SEB Abにより段階的に軽減される(図18Bは結合率%を示す)。この結果は、抗SEB AbとSEBとの強い相互作用に関係なく、sCD28が競合し得ることを示している。これに対し、sCD28をチップ上に固定化した後、チップを抗SEB Abに曝露した場合には観察できるシグナルはなかった(図17C上記)。よって、sCD28は抗体を外すのに十分な親和性でSEBと結合する。

20

【0267】

sCD28とSEBとの相互作用に関する独立した証拠はELISAにより与えられる。図19の試験では、抗SEB AbとELISAプレート上に固定化されているSEBとの結合をアッセイした。この結合に対して、漸増濃度のsCD28が効果的に競合し得た、最大約75%(図19Aおよび19B)。アッセイの読み出しの最も早い時点でより強い阻害効果を示した(図19A)。図18Bのプラズモン共鳴データに従い、抗体をより広く希釈するにつれて阻害の範囲が広がった(図19B)。よって、ELISAに基づいた試験的証拠もまた、sCD28が抗体を外すのに十分な親和性でSEBと結合することを示している。

30

【0268】

これに対し、sCD28を用いてELISAプレートをコーティングした後、プレートを抗SEB抗体に曝露した場合には観察できるシグナルはなかった。よって、sCD28はSEBと結合して、抗SEBとSEBとの結合に干渉する。

40

【0269】

ELISA研究によりp14AがCD28と相互作用することを示す

sCD28とp14Aとの相互作用に関する証拠は図20のELISAによりさらに与えられる。抗p14A AbとELISAプレート上に固定化されているp14Aとの結合をアッセイした。この結合に対して、漸増濃度のsCD28が効果的に競合することができ、90%を超える阻害をもたらした。抗体をより広く希釈するにつれて阻害の範囲が広がった。よって、sCD28は抗p14A抗体を外すのに十分な親和性でp14Aと結合する。

【0270】

p14AがSEBのドメインと相同であること、また、sCD28がp14Aと抗p1

50

4 A A bとの結合およびS E Bと抗S E B A bとの結合の両方を阻害することから、当然S E Bがp 1 4 Aとの相同性を有するドメインを介してs C D 2 8と相互作用するということになる。この結論は、S E BによるT h 1サイトカイン遺伝子発現の誘導を阻害するs C D 2 8の能力(図7および8ならびに図25および26下記)と抗C D 2 8 m A bによるT h 1サイトカイン遺伝子発現の誘導を阻害し(図10A)、また、抗C D 2 8 m A bとs C D 2 8との結合を阻害する(図16) p 1 4 Aの能力からの裏付けを受ける。

【0271】

プラズモン共鳴による平衡結合研究によりs C D 2 8とs B 7 - 2との結合がアンタゴニストペプチドにより増強されることを示す

s C D 2 8とs B 7 - 2との結合に関するプラズモン共鳴シグナルはアンタゴニストペプチドp 1 4 Aによりかなり増強されたが、p S E B(41-61)、アンタゴニスト活性のないペプチドでは少ししか増強されなかった[Arad et al., (2000) 前掲](図21)。この結果より、アンタゴニストペプチドがs B 7 - 2によるI F N - m R N Aの初期誘導を増強し得るといふ観察結果(図12)の説明がつく。

【0272】

よって、プラズモン共鳴により測定される結合とP B M CにおけるT h 1応答の誘導に関する機能アッセイとに直接的な相関関係が存在することが分かる。

【0273】

つまり、図1~21でのデータから、超抗原によるT h 1細胞応答の活性化が非常に弱い相互作用として知られているB 7 - 2 / C D 2 8相互作用(B 7 - 1 / C D 2 8相互作用よりも20倍弱く、また、B 7 - 1 / C T L A - 4相互作用よりも100倍弱い)に完全に依存しており、また、T C RおよびM H CクラスII分子との結合により適所に保持される超抗原がひとたびT h 1細胞のC D 2 8と直接結合すると有効なB 7 - 2 / C D 2 8相互作用が可能になるという新規な概念が導かれる。アンタゴニストペプチドによりブロックされるのがこの後者の結合工程である。これに対し、T h 2細胞の超抗原による活性化にはB 7 - 2 / C D 2 8相互作用の必要性がないために、T h 2応答はアンタゴニストペプチドにより阻害されない。

【0274】

実施例6

S E Bは抗C D 2 8 m A bに対するエピトープを露出するC D 2 8分子の一時的な変化を誘導する

マウス抗ヒトC D 2 8 m A b(R & D Systems, Minneapolis, MinnesotaのM A B 3 4 2)およびC D 2 8に対するヤギ抗ヒトポリクローナル抗体(C D 2 8 A b)を用いてC D 4を濃縮したヒトP B M Cを染色した。C D 4陽性細胞の濃縮は、製造業者の教示に従い、抗体カクテル(RosetteSep, StemCell Technologies, Vancouver, Canada)により行った。C D 4細胞は濃縮前は全P B M Cの18%、濃縮後は90%を構成した。濃縮したC D 4細胞を100ng/mlのS E Bにより誘導し、誘導0、6および24時間後に抗C D 2 8 m A bまたは抗C D 2 8 A bにより染色した。抗C D 2 8 A bでは調べた全ての時点で細胞を染色することができたが、抗C D 2 8 m A b染色はS E Bにより6時間誘導した細胞では検出されたが、0時間の静止期細胞およびS E Bにより24時間誘導し続けた細胞では検出されなかった(図23)。よって、C D 2 8受容体は抗C D 2 8 A bによる染色で分かるように、全ての時点の細胞に存在するが、m A bにより認識されるのはS E Bによる細胞の誘導後だけであった。この結果は、S E BがC D 2 8受容体の一時的変化を誘導し、そうすることでm A bに接近しやすくするという解釈を裏付けている。

【0275】

実施例7

アンタゴニストペプチドにより認識されるC D 2 8エピトープ

アンタゴニストペプチドは抗CD28 mAbとsCD28との結合を阻害する。本発明者らはこのmAbの特異性をうまく利用して抗体により認識されるCD28エピトープをマッピングした。このエピトープは超抗原の、ひいてはアンタゴニストペプチドの結合部位と少なくとも一部が重複しているはずである。この目的に向けて、PhD-12コンビナトリアルファージディスプレイライブラリー(New England Biolabs)を用い、固定化された抗CD28 mAb MAB342上でのファージの反復パンニングおよびsCD28による置き換え、続いて、最も容易に抗CD28 mAbと結合するファージに関するスクリーニングによりエピトープマッピングを行った。このようにして選択された22ファージから得られるペプチド配列をギャップを考慮せずにアラインすると、配列HVKGKH(配列番号4で示される)を含むヒトCD28の19~152アミノ酸細胞外ドメインの134~142位にあるHVKGKHLCPモチーフ(図24で下線を引いた部分で、配列番号3でも示される)で重複する1つのコンセンサス配列がえられた。HVKGKHモチーフの機能は分かっていないが、これは異なる種のCD28内に高度に保存されており、ヒトCTLA-4二量体の界面の一部を構成する6アミノ酸モチーフYVIDPE(配列番号6)を含むCTLA-4の対応する領域とは著しく異なっている[Schwartz et al., Nature 410: 604-608 (2001)]。

【0276】

実施例8

pTA、新規なアンタゴニストペプチドはCD28分子内の超抗原結合部位から誘導される

超抗原の作用におけるヒトCD28のHVKGKHLCP(配列番号3)モチーフの機能を評価するため、このモチーフを含み、かつ、配列AAAAAAHVKGKHLCP(pTA、配列番号5でも示される)を有する16量体ペプチド(p14Aと同じ長さのペプチドを作製するためだけにN末端アラニン残基を付加した)を合成した。

【0277】

抗CD28 mAb MAB342によりPBMCを誘導すると、24時間の時点で顕著なIFN- γ mRNAの発現がもたらされた。この発現はsCD28だけでなくpTAによっても阻害された(図25A)。別のPBMC集団での試験では、抗CD28 mAbによるIFN- γ mRNAの誘導はそれよりも早期に起こり、3時間までに顕著となり、その後は弱まった。この誘導は予想されるようにsCD28によって阻害され、また、pTAによっても用量依存的に阻害された(図25B)。よって、pTAは抗CD28 mAbの機能的アンタゴニストである。

【0278】

PBMCでの抗CD28 mAbの作用はCD28ならびにpTA(配列番号5)によって排除される。抗CD28による誘導においてIFN- γ mRNAの発現が早い(図25Bなどの場合)、遅い(図25Aなどの場合)に関係なく、pTAには阻害性がある。この結果は、可溶性CD28受容体のように、pTAが抗CD28 mAbとの結合において細胞CD28受容体と競合し得ること、および、pTAのCD28配列モチーフがmAbの機能的エピトープであることを示している。抗CD28 mAbによるTh1サイトカイン遺伝子誘導の解析によりエピトープマッピングの妥当性は高まる(図24)。

【0279】

SEBによりPBMCの誘導を行った場合に、IFN- γ mRNAの発現が3~24時間の時点ではっきりと認められた。この発現はsCD28だけでなくpTAによっても阻害された(図26A)。これに対し、SEBによるIL-10誘導はsCD28およびpTAのいずれによっても阻害されなかった(図26B)。

【0280】

別の試験では、PBMCにおけるIL-2 mRNAのSEB誘導性発現が6時間の時点で最も顕著であり、この発現はsCD28だけでなくpTAによっても阻害された(図26C)、24時間までにIL-10の蓄積の阻害はなかった(図26D)。

10

20

30

40

50

【0281】

よって、mAb MAB342により認識されるCD28のエピトープの少なくとも一部を有するペプチドpTA（配列番号5でも示される）がSEBのアンタゴニストである。SEBが細胞CD28受容体とこの受容体の全体または一部にあるHVKGKHLCPモチーフ（配列番号3）を通じて結合するならば、また、この結合がTh1サイトカイン応答の毒素媒介性活性化に必要不可欠であるならば、これは予測される結果である。このことから、CD28が毒素性ショックをもたらし得る有害な細胞免疫応答の超抗原媒介性活性化に関する重要な標的であることが明確になる。

【0282】

CD28のSEB結合部位は、pTAに存在する配列HVKGKHLCPの一部または全てを含んでなる。

10

【0283】

pTAがSEBのアンタゴニストであり、抗CD28 mAbのアンタゴニストもあるという発見は、SEBがCD28と直接相互作用してTh1サイトカイン遺伝子発現を誘導するはずであり、また、この相互作用がHVKGKHLCPモチーフの全てまたは一部を通じて起こるといった概念の強い裏付けを与える。

【0284】

実際には、sCD28分子に別のモチーフを含むペプチドAAAAAAAAAAMYPPPY（配列番号7で示される）を同様に試験した場合（図24）、それはSEBに対してアンタゴニスト活性を示さなかった。

20

【0285】

pTAおよびAAAAAAAAAAMYPPPYは単独ではいずれも、ヒトPBMCにおけるTh1サイトカインmRNA発現またはIL-10発現のインデューサーとして活性でなかった。

【0286】

CD28の配列モチーフを有するペプチドが超抗原アンタゴニストとしての機能を果たし得るといった発見により、p12Aおよびp14Aなどの、超抗原ドメインに対して相同性を有するアンタゴニストペプチドに関する研究が拡張される。原則として、2つの異なる種類の超抗原アンタゴニストペプチドを作製することができる：1つはそのCD28標的受容体に対し超抗原と競合し（各々、配列番号1および2で示されるp12A、p14Aなど）、もう1つのもの（配列番号5で示されるpTAなど）は超抗原に対しCD28標的受容体と競合する（図27）。

30

【0287】

実施例9高親和性アンタゴニストに関するスクリーニングアッセイの開発

これまでのことを受け、超抗原アンタゴニストペプチドの細胞標的はCD28である。これは、毒素性ショックおよび細胞免疫応答（および特に、Th1応答）の超抗原媒介性過剰刺激の他の結末、例えば、吐き気、嘔吐および下痢をはじめとする毒素無能力を阻止するアンタゴニストの設計のために初めて細胞薬剤標的を提供する。最も重要なことだが、本発明によってようやく超抗原とCD28受容体との相互作用の新規なアンタゴニストの設計が、本明細書において例示するアンタゴニストペプチドによっても、小分子、酵素またはタンパク質によっても可能になった。本発明は、例えば、ファージディスプレイまたはポジショナルスキニングまたは環状ペプチドミメティックスにより、アンタゴニスト分子の結合のためのペイト（おとり）として可溶性組換えCD28またはs-Ag結合部位（好ましくは、配列番号3のアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる）を含んでなるその断片を使用することによる毒素性ショックアンタゴニストを見つけるための新たな戦略を提供する。

40

【0288】

可溶性CD28またはs-Ag結合部位を含んでなるその断片の標的としての使用

各候補試験物質、より好ましくは、試験ペプチドをウェルに入れ、可溶性組換えCD2

50

8 (s C D 2 8) の直接結合を s C D 2 8 に対するタグ付き A b により検出する。プレート上で s C D 2 8 と既知のアンタゴニストペプチド (例えば、p 1 2 および p 1 4) とを効率的に結合させる条件を最初に最適化する (p H、塩およびバッファの組成研究、B S A などの担体タンパク質など)。このスクリーニングにより s C D 2 8 と結合する全てのペプチドまたは物質が得られる。

【 0 2 8 9 】

C D 2 8 と超抗原結合部位で特異的に結合するペプチドまたは候補物質を選択するため、s C D 2 8 と結合するペプチドまたは物質をプールした後、下記のように異なる競合試験でアッセイする。s C D 2 8 または s - A g 結合部位 (好ましくは、配列番号 3 のアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる) を含んでなるその断片をマイクロプレートのウェルに固定する。アンタゴニストペプチドとプレート上の s C D 2 8 (または s - A g 結合部位を含んでなる断片) とを効率的に結合させる条件は p 1 2 および p 1 4 などの既知のアンタゴニストペプチドを用いて最初に最適化する。次いで、各ウェルを試験アンタゴニストペプチドまたは物質 (単独またはプール) の存在下で限界量の抗 C D 2 8 m A b とともにインキュベートする。各ウェルの上清を集める。上清中の結合していない m A b を二次抗体 E L I S A により検出する。この選択により、C D 2 8 にある超抗原のアンタゴニストドメイン結合部位または近接する B 7 - 2 結合部位のいずれかをブロックする特異的な候補物質、好ましくは、ペプチドが得られるはずである。次のラウンドではこれをアンタゴニストペプチドまたは超抗原との競合により分離する。また、ビオチン化した S E B を、標識 S E B をプレート上の s C D 2 8 との結合から外すペプチドの能力に関するアッセイに使用してもよい。さらにもう 1 つの別の例では、p 1 2 および p 1 4 などの標識した既知のアンタゴニストペプチドを使用し、また、標識をプレート上の s C D 2 8 (または s - A g 結合部位を含んでなるその断片) との結合から外す試験ペプチドの能力に関してアッセイする。例えば、システインタグ付き p 1 2 を使用して、ビオチンまたはフルオレセインを連結してもよい。

【 0 2 9 0 】

C D 2 8 を過剰発現する細胞の標的としての使用

C D 2 8 c D N A を哺乳類細胞に好適な発現ベクターに、例えば、Ben-Asouli et al . [Cell 108: 221-232 (2002)] により記載されているように骨髄増殖性肉腫ウイルスプロモーター下に、かつ S V 4 0 ポリアデニル化シグナルの上流にクローニングする。各ペプチドをウェルに入れ、次いで、ウェルを B S A またはウシ胎児血清でブロックする。細胞表面で C D 2 8 を発現する細胞、例えば、B H K - 2 1 細胞の結合に肉眼でまたは抗 C D 2 8 E L I S A によりスコアをつける。あるいは、C D 2 8 発現細胞から準備した細胞膜を使用し、結合を抗 C D 2 8 を用いて検出する。次いで、決定的なペプチドを競合相手として S E B または p 1 2 および p 1 4 などの既知のアンタゴニストペプチドの存在下で再検討する。

注目すべきは、s - A g 結合部位 (好ましくは、配列番号 3 のアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなる) を含んでなる C D 2 8 の断片を発現する細胞を上記のように使用し得ることである。

【 0 2 9 1 】

ファージディスプレイ

ランダムライブラリー - C D 2 8 受容体に対して高親和性 (好ましくは、ナノモル以下) を有する超抗原アンタゴニストペプチドに関してスクリーニングするためにはコンビナトリアルファージライブラリーを使用する。具体的に言えば、New England Biolabs の P h D ライブラリーを最初に、一般には、約 4 ~ 6 ラウンドのパニングに使用する。パニングは 2 段階で行われる。第 1 の段階では、結合したファージを低 p H、好ましくは、p H 2 . 2 での溶出によりマイクロプレートに結合した s C D 2 8 (または s - A g 結合部位を含んでなるその断片) から溶出する。第 2 の段階では、上記のように選択されたファージを s C D 2 8 と結合させ、過剰の既知アンタゴニストペプチド (例えば、p 1 2 および p 1 4) または S E B を用いて特異的に溶出させる。結合したファージを溶出し、これらに

対して同様のパニングをさらに(2~3サイクル)行う。次いで、個々のファージクローンと固定化したsCD28との直接結合をファージELISAにより検出し、この場合、プレート上のM13ファージに対してスコアをつける。選択された線形ペプチドの合成およびPBMICにおけるアンタゴニスト活性に関するアッセイの前に合計、例えば、1,000の決定的なファージクローンを増幅し、配列決定する。

【0292】

sCD28を固定標的として使用することが試験に値するという場合には代替パニング戦略を進める。CD28 cDNAをトランスフェクトされた細胞、例えば、BHK-21細胞で一時的に過剰発現させた後、これらの細胞をプレート上に固定化する。ファージにディスプレイされたペプチドのパニングをまずベクターでトランスフェクトされた細胞で行って非特異的なバインダーを排除した後、CD28をそれらの細胞表面で過剰発現する細胞で行う。あるいは、全細胞膜画分を細胞の代用にしてもよい。CD28と結合したファージを過剰の既知アンタゴニストペプチド(例えば、p12およびp14)またはSEBで溶出させる。

10

特定(dedicated)ライブラリー - 第2の段階では、ディスプレイされたペプチドの数残基が一定に保持される専用ライブラリーを構築する。アンタゴニスト活性の評価に向けて、ランダムおよび専用ライブラリーから選択されたペプチドの小規模合成を行う。

【0293】

ファージディスプレイスクリーニングで単離されたか、ポジショナルスキニングまたは環化化学により生み出された候補ペプチドに対して、上記のように、CD28、sCD28または好ましくは、配列番号3で示されるアミノ酸配列の一部または全てを含んでなるCD28分子内のs-Ag結合部位との高親和性結合に関するハイスループットスクリーニングを行う。

20

【0294】

アラニンスキャン

アラニンスキャンをまず、受容体との結合に重要な残基を同定するために既知アンタゴニストペプチド(例えば、p12またはp14)で行うか、またはs-Agとの結合に、また、それとは別に、in vitroにおける超抗原アンタゴニスト活性に重要な残基を同定するために本発明のアンタゴニストpTAで行う。ペプチドはN末端アセチルおよびC末端CONH₂を有する可溶型で合成され、PBMICを用いたin vitroアッセイでのより高いプロテアーゼ耐性に関係するフランキングD-アラニンを持する。同定されたバックアップアンタゴニストペプチドに対してアラニンスキャンのさらなるラウンドを実施する。ペプチドのリジンスキャンを同様に実施する。同定されたバックアップペプチドに対してリジンスキャンのさらなるラウンドを実施する。

30

【0295】

ポジショナルスキニング

一度、アラニンスキャンによりアンタゴニスト活性に重要な残基が同定されれば、全20アミノ酸(400ペプチド)の完全に置換されたpepscanで2つのこのような位置が選択され、次いで、同様に、2つのさらなる位置がスキャンされる(400ペプチド)。ペプチドは最初、解放可能な形態であるが、チップ上に保持される(Pepsan I、下記を参照)。sCD28またはs-Ag結合部位を含んでなるその断片と各ペプチドとの結合にこの受容体に対する市販のウサギポリクローナル抗体を用いたELISAによりスコアをつける。次に、決定的なペプチドを解放し(Pepsan II、下記を参照)、上記の本発明のスクリーニング方法の選択工程に従うスクリーニングアッセイ(ELISAフォーマットによる受容体結合アッセイに向けてプール(グループ化)し、さらに、PBMICアッセイによるin vitroにおけるアンタゴニスト活性に関して評価した後、そのグループをデコンボルトする(deconvoluted)。段階的に、得られた改良リードに対してもう一度ポジショナルスキニングを行う。好ましくは、合計4回のポジショナルスキニングを実施し、受容体に対して最大の親和性を有するペプチドに対して2回の固定ポジショナルスキニングを実施する。

40

50

【0296】

Pepscan - I : ペプチドはミニウエルの底に付着して残る

Pepscanライブラリーを合成し、共有結合したペプチドを含むポリエチレンカードを用いてスクリーニングする[例えば、Slootstra et al., *Molecular Diversity* 1: 87-96 (1995)により記載されている]。ペプチドをN末端がアセチル化され、C末端がミニウエルと連結された固相で合成してもよい。s C D 2 8 (またはs - A g 結合部位を含んでなるその断片)と各ペプチドとの結合にこの受容体に対する市販のウサギポリクローナル抗体を用いたE L I S Aによりスコアをつける。カードを洗浄した後、それらをヤギ抗ウサギペルオキシダーゼとともにインキュベートし、次いで、洗浄後にペルオキシダーゼ基質2, 2'-アジノ-ジ-3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸およびH₂O₂を添加する。着色を例えば、CCDカメラおよび画像処理ソフトウェアを使用して定量する。

10

【0297】

Pepscan - II : ペプチドはミニウエルの底から解放される

ペプチドとミニウエルの底との間に酸で不安定なリンカーを置くことを除き、上記のようにPepscanライブラリーを合成する。低pHにてミニウエルの底からペプチドを解放し、96ウエルマイクロタイタープレートに移す。このプレートを上記の方法により競合E L I S Aフォーマットで使用する。2種類のフォーマット: ミニウエル(1μg/ウエル、15残基)およびピン(1,000μg/ピン、15残基)を使用する。pepscan-IIフォーマットでは、ペプチドのセットをプールのすることができる。例えば、12量体ペプチドの完全シングルポジショナルスキャンにより12の対照を含む240ペプチドが得られる。これらをアッセイに向けて、各々が1箇所異なる(対照ペプチドを除く)12グループにプールすることができる。12グループを、E L I S Aフォーマットで受容体との結合に関して、さらに、in vitroにおけるアンタゴニスト活性に関してアッセイした後、デコンボリューションする(deconvoluted)。

20

【0298】

環化スキャン (pepscan I)

MBS(m-マレインイミド安息香酸N-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル)などのリンカーを用いて、その活性エステル(スクシンイミド)を介して特定のペプチドのN末端と、また、そのマレインイミド基を介してシステインの遊離チオール基と反応させる[参照、Langeveld et al., *J. Virol.* 68: 4506-4513 (1994)]。システインはペプチドの一部である。(例えば、C末端に位置する)。この連結は還元剤に対して反応せず、ジスルフィド架橋と比べて有利な点である。

30

【0299】

ループスキャン (pepscan I)

各ペプチドのN末端をMBSなどの連結剤を用いてシステインの遊離SH基と連結する。このシステインは別々に同じウエルの底と連結している。このように、固定されたループが形成される。ペプチドの合成および同じウエルでのシステインの独立した連結は標準F M O C - およびB O C - ペプチド化学を併用して行われる(参照、Schnolzer et al. *Int. J. Pept. Protein Res.* 40: 180-193 (1992); Guy and Fields, *Method Enzymol.* 289: 67-83 (1997)]。F M O Cは20%ピペリジンで切断され、B O Cは100%トリフルオロ酢酸(TFA)で切断される; ピペリジンはB O Cを切断せず、TFAはF M O Cを切断しない。よって、ペプチドはF M O C - 化学を用いて合成され、システインは独立にB O C - 化学を用いて同じウエルに連結される。各連結後、F M O Cは選択的に除去され、別のアミノ酸が添加される。B O Cはシステインから除去されないため、添加したアミノ酸はそれとは連結し得ない。F M O C合成終了時に、ペプチドが完成すると、B O C - システインが脱保護される。その後、上記のようにペプチドのN末端を1つのシステインと連結することができる。

40

【0300】

一度、上記のようにポジショナルスキャンおよびファージディスプレイによりペプチドが選択されれば、短い種類を合成して最短のアンタゴニストペプチドを獲得すること

50

が可能である。本発明者らは12量体 p 1 2 を、2つのN末端アミノ酸を除去することにより10量体にした。このことによってアンタゴニスト活性の低下が起こった[Arad et al., (2000) 前掲]が、かつて同定されたより強力なアンタゴニストは短縮を受けても活性を維持し得る。短縮はポジショナルスキニングのデータに従って行われる。

【0301】

次いで、P B M Cにおける毒素アンタゴニスト活性の評価に向けて、選択されたペプチドの小規模合成を実施する。

【0302】

末端切断

一度、上記のようにポジショナルスキニングおよびファージディスプレイによりペプチドが選択されれば(上記を参照)、短い種類が合成され、最短のアンタゴニストペプチドが得られる。

D - 鏡像異性体 of アンタゴニスト

【0303】

潜在的薬剤として高親和性 D - ペプチドを得るため(Schumacher et al., Science, 271: 1854-1856 (1996); Miller et al., J. Molec. Struct. 423: 137-152 (1998); Eckhardt et al., Cell 99: 103-115 (1999)の好ましい段階的なプログラムは:

(1) 標的分子の鏡像を作製すること、すなわち、同じ配列を有する D - アミノ酸鏡像異性体を作製すること;

(2) D - 鏡像異性体標的と結合する L - ペプチドアンタゴニストを(ファージディスプレイを利用して)選択すること;

(3) 結合させる L - アンタゴニストリガンドの D - ペプチド鏡像異性体を合成することである。これは天然 L - 標的と結合する。

【0304】

L - ペプチドのReverse-inverso D - 類似体は、側鎖が略図では同じ角度をなして配置されているように見えるが鏡像(鏡像異性体)構造ではない。側鎖はもちろん主鎖も鏡像である必要がある。

【0305】

D - ペプチドは酸およびプロテアーゼに耐性であり、優れた、直接生物利用可能な経口薬剤候補と考えられる。サイクロスポリンは天然 D - ペプチドである。D - ペプチドは M H C 複合体に存在する形態に消化され得ない(C - 主鎖の方向の誤りにより結合が破壊される)ことから、それらは B および T 細胞活性化を誘発し得ないために、それらの免疫原性は低く、ほとんど存在しない[Dintzis et al., Proteins 16: 306-308 (1993)]。D - ペプチドの血清中半減期は L - ペプチドで見られるような数時間ではなく数日間であり[Dintzis et al., (1993) 前掲]、それらは腸から直接吸収され得る(Ptachcinski et al., Clin. Pharmacokinet. 11: 107-132 (1986); Pappenheimer, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 1942-1945 (1994)]。それらは動物モデルおよび細胞培養物では 100 μ M 濃度においてさえもはっきりとした毒性は示さない。

【0306】

D - 鏡像異性体タンパク質を効率的に生産するために、例えば、Gryphon Biosciences, San Francisco, により開発されたペプチドライゲーション技術を利用する。

【0307】

このアプローチの要件は、標的(可溶型の C D 2 8 受容体または s - A g 結合部位を含んでなるその断片)が入手可能であり、そのアミノ酸配列が検証されること、およびこの分子を可逆的に変性させて、その結合活性を取り戻すことができることである。この後者の要件は、D - 鏡像異性体標的の合成により、高親和性 L - アンタゴニストペプチドに関してスクリーニングする目的にそれを使用する前にその活性形へと自然に折りたたまれるべき鎖が得られるという事実に基づいている。そのため、D - アンタゴニストアプローチは、標的再生要件が満たされる場合のみに実現可能な選択肢である。これは s C D 2 8 を用いて試験される。読み出しとしての既知のアンタゴニストペプチド(例えば、p 1 2 お

10

20

30

40

50

よび p 1 4) と結合する能力とともに一連の変性および再生プロトコルを用いる。

【 0 3 0 8 】

環状ペプチドミメティックス

in vitroにおけるヒト P B M C に対する S E B アнтаゴニスト活性についてのアッセイでは、1 5 2 位と 1 5 9 位との間に環を有する S E B ^{1 5 0 - 1 6 1} に基づく主鎖環状ペプチドが線形類似体よりも優れた S E B アнтаゴニストとして機能を果たすことおよび正電荷を有する残基、L y s ^{1 5 3} および L y s ^{1 5 4} がアンタゴニスト活性にとって重要である(その位置は上記のアラニンおよびリジンスキャンにより直接調べられる)ことが示された。

【 0 3 0 9 】

最良の制限は設計および評価の一連のサイクルによってのみ得られる。ファージディスプレイまたはポジショナルスキニングにより C D 2 8 受容体に対して p 1 2 A または p 1 4 A より高い親和性で選択されたアンタゴニストペプチド配列に対して同様の戦略を行う。

ペプチド合成 . ペプチドはフルオロニル(fluoronyl) - メトキシカルボニル (F M O C) 化学を利用して合成する [Arad et al., (2000) 前掲]。同じ手順を用いて D - A 1 a を連結する。高速液体クロマトグラフィーによりペプチドが > 9 5 % 純粋であることが示される [Arad et al., (2000) 前掲]。内部ブリッジを介した近域環化を有するペプチドミメティックスを合成する。非ペプチド結合を提供するアミノ酸の N - - 官能基導入誘導体を用いる、内部ブリッジを介した近域環化 [Toniolo, Int. J. Peptide Protein Res. 3 5: 287-300 (1990); Gilon et al., (1991); Chorev et al., Biopolymers 31: 725-733 (1991)] により、P 物質 [Bitan et al., J. Pept. Sci. 2: 261-269 (1996); Byk et al., J. Med. Chem. 39: 3174-3178 (1996)]、H I V T a t N L S [Friedler et al., J. Biol. Chem. 275: 23783-23789 (2000)]、H I V マトリックスタンパク質 N L S [Friedler et al., Biochemistry 37: 5616-5622 (1998)]、および昆虫フェロモンアンタゴニスト [Altstein et al., J. Biol. Chem. 274: 17573-17579 (1999)] に対するペプチドミメティックスの活性の増強に成功した。ペプチドのごく少数の 4 ~ 8 アミノ酸側鎖がしばしば受容体によるリガンドの認識に関与しているという事実が近域環化アプローチに有利であるということが分かる。そのような場合には、残りの分子フレームワークは活性基を特定の空間的配置に固定する働きをする。環状制限アプローチの別の利点は、より少数のアミノ酸を使用することで、より小さなアンタゴニスト分子を作製し得ることである。ペプチドミメティックスは H P L C により精製し、質量分析により純度を評価する。

【 0 3 1 0 】

新規受容体に対するアンタゴニストバックアップの親和性の評価

バックアップを C D 2 8 受容体と結合するそれらの能力に関してプラズモン共鳴測定ならびに E L I S A アッセイにより p 1 2 および p 1 4 アンタゴニストペプチドと比較する。直接結合と可溶性組換え C D 2 8 (s C D 2 8) または s - A g 結合部位を含んでなるその断片に対して S E B と競合する能力の両方をアッセイする。また、s C D 2 8 (または配列番号 3 で示される配列の全てまたは一部を含んでなるアミノ酸配列を有する s - A g 結合部位を含んでなるその断片) と抗 C D 2 8 抗体との結合に干渉するアンタゴニストペプチドの能力も試験する。注目すべきは、抗 C D 2 8 と配列番号 3 で示されるアミノ酸配列の全てまたは一部を含んでなるそのエピトープとの相互作用に干渉する試験アンタゴニストペプチドの能力もまた試験し得ることである。s C D 2 8 と B 7 - 2 との複合体形成を促進するアンタゴニストペプチドの能力は実施例 5 で記載するように調べる。各リガンド組合せに最適な結合条件は、p 1 2 および p 1 4 を用い、p H およびバッファを最初に変更して得た。

【 0 3 1 1 】

よって、C D 2 8 受容体に対する高親和性により準備、選択される候補アンタゴニストペプチドは、より高いプロテアーゼ耐性に関係する D - アラニン末端を有する線形のものとして [Arad et al., (2000) 前掲]、または環状ペプチドもしくはペプチドミメティク

10

20

30

40

50

スとして合成した後、異なる健常な供与体由来のP B M Cを用いて、新たに単離された全ヒトP B M CにおけるT h 1サイトカインm R N Aの超抗原誘導性発現を阻害する能力に関して試験してもよい[Arad et al., (2000) 前掲]。

【0312】

要するに、健常なヒト供与体由来のP B M Cを100 ng/mlのS E B (ロット14-30、USAMRIIDの毒物学部門より提供)、S P E A (Toxin Technology, Sarasota, Florida)、S E AまたはT S S T - 1 (Toxin Technology; Sigma)により誘導する[Arad et al., (2000) 前掲]。存在する場合には、アンタゴニストペプチドは、好ましくは、0.01 ~ 10 μg/mlにて用いる。単一供与体由来のP B M CでのT h 1サイトカイン遺伝子発現の誘導は3 ~ 4供与体由来の混合P B M Cでの誘導よりも低い傾向がある。混合P B M C集団でのこの応答の高さは、混合リンパ球応答により細胞表面受容体がより高密度に発現する(毒素作用には細胞表面受容体の発現が必要)ことによる可能性が高い。環状ペプチドもしくはペプチドミメティクス、またはD-アラニン末端を有する線形のものとして合成される候補バックアップを、10の異なる健常な供与体由来のP B M Cを用いてT h 1サイトカインm R N Aの超抗原誘導性発現を阻害するそれらの能力に関して試験する。S E Bに対して強いアンタゴニスト活性を示すペプチドをS E B、S E A、T S S T - 1およびS P E Aに対して再試験する。単一供与体および混合供与体P B M Cの両方を評価アッセイに用いる。

10

【0313】

R N Aの定量的ドットプロットハイブリダイゼーション

この方法は少量のP B M Cしか必要としないため、R N Aアーゼプロテクション解析による検証前の大量の候補バックアップの一次レベルのスクリーニングに好適である。R N Aは1ml P B M C培養物から、細胞を回収し、それらを7.5 Mグアニジン-H C lに溶解することにより単離する。R N Aを沈殿させ、連続2倍希釈物を96ウェルドットプロット装置を使用してニトロセルロースシートに適用する(二重試験)。ヒトT h 1サイトカイン遺伝子の発現を検出するため、シートを³²P標識したアンチセンスR N Aプローブとハイブリダイズさせ、それに対してオートラジオグラフィーを行うか、またはホスホイメジャーで読み出す。R N Aレベルを定量する。ハイブリダイゼーション強度はR N A量および細胞数に対して一次であり、200倍範囲にわたり正確に定量できる。ノーザンブロッティングにより解析されるように、このように検出されたI L - 2およびI F N - ハイブリダイゼーションシグナルの85%を超えるものが成熟m R N Aで構成されている[Arad et al., (2000) 前掲]。

20

30

【0314】

T h 1サイトカインm R N Aのリボヌクレアーゼプロテクション解析

リボヌクレアーゼプロテクション解析は困難で費用がかかるが、スプライシングを受けたm R N Aの最も直接的な定量的測度を得られる。グアニジンイソチオシアネートで30ml P B M C培養物から抽出したトータルR N Aに対して、p B S (Promega)に挿入されたD N Aから[³²P] U T Pを用いてin vitro転写されたアンチセンスR N Aプローブを用いてR N Aアーゼプロテクション解析を行う。T 7プロモーターから転写されたI L - 2プローブ(600 nt)は第3エクソンおよび第3イントロンの一部と相補的である; 8 M尿素-ポリアクリルアミドゲルでは、m R N Aにより保護された117 ntのR N A断片が得られる。T 3プロモーターから転写されたI F N - プロブ(274 nt)は第3エクソンおよび第3イントロンの一部と相補的であり、m R N Aにより保護された183 ntのR N A断片が得られる。T 3プロモーターから転写されたT N F - プロブ(700 nt)はエクソン1の一部、エクソン2、エクソン3、ならびにイントロン3の一部およびエクソン4と相補的である; m R N Aは274および263 ntの2断片を保護する。センスR N A転写物からは検出可能なハイブリダイゼーションシグナルは得られない。保護された90 nt断片を与える18 S r R N AのアンチセンスR N Aプローブに関する解析をローディング対照とする[Arad et al., (2000) 前掲]。ゲルをデンシトメトリーにより定量する。

40

50

Th 2 応答についてのアッセイ

【0315】

現行のアンタゴニストペプチドの最も重要な特性は、それがTh 2 応答を損なわないことである。このことは、Th 1 サイトカインmRNAの毒素誘導性発現がアンタゴニストペプチドにより阻害される、PBMCの培養培地を用いてELISAによりIL-10に関して試験されるバックアップの必要条件でもある。本発明者らは、超抗原誘導性IL-4のレベルは入手可能なELISAキットの感度より低い傾向があるが、IL-10は確実に測定できることが分かった。

【0316】

霊長類PBMCの機能アッセイによるアンタゴニスト効果

これまでの節で記載したアプローチはアカゲザル由来のPBMCを用いるアンタゴニスト活性についてのアッセイにも適用できる。これはin vivo効果研究に対してFDAにより承認されているこの動物モデル由来の代用マーカー系でのアンタゴニストペプチドの効果とin vivoプロテクションのデータとの相関関係を確立するのに有用である。このような相関関係は、in vitro効果が現行のアンタゴニストリード、p 12およびp 14ですすでに証明されているヒトでは達成し得ない。

【0317】

アカゲザルは、ヘブライ大学にて、定量的ドットプロットハイブリダイゼーションアッセイ(上記を参照)によるアンタゴニスト活性についての解析に十分である15mlの血液サンプルの収集に対してIACUCにより承認された。アカゲザルおよびヒトIL-2とIFN- γ cDNAは95%ヌクレオチド配列相同性を示し、本発明者らはサルIL-2およびIFN- γ 遺伝子の誘導がドットプロットアッセイにより(ヌクレアーゼの攻撃に対するプロテクションは測定しないが、単に細胞mRNAとアニールする能力を測定する)ヒトリボプローブで容易に検出されることを示した。

【0318】

候補アンタゴニストの防御活性の評価に向けたin vivo試験モデル

致死的な抗原投与を行ったマウスに対する候補アンタゴニストの強力な防御活性:

D-ガラクトサミン感作マウス(超抗原の致死性研究に認められている動物モデル)を用いて、異なるアンタゴニスト候補の防御活性を調査する。アンタゴニスト候補は超抗原、好ましくは、SEB、SEA、TSST-1またはSPEAでの致死的な抗原投与の直前に投与し、マウスの生存を調べる。

【0319】

ブタにおけるSEA誘導性無能力からの候補アンタゴニストの防御活性:

ヒトT細胞はブドウ球菌の超抗原に対してネズミよりも少なくとも2桁感受性が高く、ヒトは毒素性ショック症候群の発生に対して感受性であり、マウスは耐性である。これは、ネズミT細胞のレパトリーから最も高い反応性を有するTCRのV β 鎖を提示する細胞を取り除くか、または関係のあるV β 遺伝子を欠失させたことから明らかとなった[Arad et al., (2000), 前掲を参照]。マウスはこのように超抗原毒素に対する自然耐性を獲得し、それらが毒素性ショックを経験する前に感作したに違いない。さらに、マウスは重量および免疫系に関してはヒトとは遠い。よって、人間に近い動物モデルでアンタゴニストの効果を立てることも重要である。

【0320】

本発明者らは2つの問題: 毒素無能力と高等動物モデルの使用、に取り組んだ。ブタはヒトと類似した免疫系を有する; よって、ショックを媒介するTh 1 サイトカインIFN- γ をコードするmRNAについてのブタとヒトとの間のヌクレオチド配列相同性は85%のオーダーであるが、ヒトとマウスmRNAの間では類似性は全く検出できない。

【0321】

ブタは感作に必要なではない急性超抗原曝露に対し感受性であり、ヒトで見られるものと類似した無能力症状が現れる。吐き気および嘔吐(神経応答)ならびに重度の下痢(腸管免疫応答)をはじめとする毒素性ショックの初期無能力症状を再現できるブタモデルを確

10

20

30

40

50

立した。

【0322】

本発明者らによってこれまでに示されたように、各試験条件に対し、5日齢雑種ブタ（主としてヨークシャー種；2.5kg）を6匹の子ブタからなる無作為化群（各群、雌ブタである）として用い、SEA（25 μ g）によって、IV経路による施与またはIP経路による施与に関係なく類似の動態および強度で2時間内に明らかになり、24～36時間までに治まる重度の無能力を引き起こした。ブタにおける無能力研究にはSEAのIP投与を採用した（この経路は外傷を与えることが少ない上、IVと同様に有効であるため）。この結果から、ブタがSEAに対して特別感受性であることが確認される[Taylor et al., Infect. Immun. 36: 1263 (1982)]。この選択的感受性の理由は、SEAがその - グラスプ(beta-grasp)を利用して独立した第2の部位にあるMHC II分子とも結合して、それと一層強く結合し、また、MHC II分子間に架橋を生じさせることと考えられる[Hudson et al., J. Exp. Med. 182: 711 (1995); Schad et al., EMBO J. 14: 3292 (1995); Abrahmsen et al., EMBO J. 14: 2978 (1995)]。毒素アンタゴニストにより標的化されるドメインはSEAのMHC II結合部位からもTCR結合部位からも遠い。

10

【0323】

ブタにおける無能力の定量には以下の基準を採用する：嘔吐（スコア4）；軽度の下痢（スコア1）、通常の下痢（スコア2）、重度の下痢（スコア4）、および水様性の下痢（スコア6）（データは示していない）。

【図面の簡単な説明】

20

【0324】

【図1】図1A～1Cは、SEBによるIL-4およびIL-10の初期誘導を示す。3 \times 10⁷ヒトPBMCのアリコートに0.1 μ g/ml（白丸）、1 μ g/ml（白三角）または10 μ g/ml（黒四角）のSEBとともにインキュベートした。示した時点で、培養培地中のIL-4（A）およびIL-10（B）をELISA(Amersham, UK)により定量した。別の試験（C）では、4 \times 10⁶ PBMCのアリコートに0.1 μ g/mlのSEBとともにインキュベートした。示した時点で、培養培地中のIL-4（黒丸）およびIL-10（白丸）を定量した。略語：T（期間）、h（時間）、pg（ピコグラム）、ml（ミリリットル）。

【0325】

30

【図2】図2A～2Dは、IL-4およびIL-10の同時誘導によるSEB誘導性IL-2およびIFN- γ mRNA発現の阻害を示す。（A）ヒトPBMCを、Ab不在（白丸）またはイソ型適合抗ヒト免疫グロブリンG（IgG）（黒丸）、ヒトIL-4に対するラット中和Ab（Genzyme, Cambridge, MA）（IL-4）（黒四角と白四角）もしくはIL-10に対するラット中和Ab（PharMingen, San Diego, CA）（IL-10）（黒三角と白三角）いずれかの存在下、SEBなしで（白四角、白三角）または0.1 μ g/ml SEBとともにインキュベートした。抗体は1：10⁴希釈し、SEBでの誘導2時間前に添加した。RNAを抽出し、連続2倍希釈物に対し、³²P標識したIL-2アンチセンスRNAプローブを用いるハイブリダイゼーション解析を行い、フィルムの黒化度を630nmで読み取った；（B）オートラジオグラムで8時間のデータを示す。（C）別々の供与体由来のPBMCを、1：10⁴希釈した上記IL-4またはIL-10の存在下、SEBなしで（-）または40 μ g/ml（C）もしくは0.1 μ g/ml（D）のSEBとともにインキュベートした。IFN- γ mRNAをRNアーゼプロテクション解析により定量した；rRNAをローディング対照とした。略語：T（期間）、h（時間）、 μ g（マイクログラム）、ml（ミリリットル）。

40

【0326】

【図3】図3A～3Cは、アンタゴニストはIL-2およびIFN- γ 遺伝子のSEB媒介性誘導を阻害するが、IL-10の誘導は阻害しないことを示す。（A）ヒトPBMCを10 μ g/ml p14Aの不在（白丸）または存在（黒丸）下、0.1 μ g/ml SEBとともにインキュベートした。（A, B）示した時点で、RNAを抽出し、連続2

50

倍希釈物に対し、 3^2 P 標識した IL - 2 または IFN - γ アンチセンス RNA プロブを用いるハイブリダイゼーション解析を行った（白丸のドットは左側 4 列のものであり、3 時間を超えてからの黒丸のドットは右側 3 列を示す）。（C）同じ細胞の培養培地で IL - 10 を ELISA によりアッセイした。略語：T（期間）、h（時間）、pg（ピコグラム）、ml（ミリリットル）。

【0327】

【図4】図4A～4Bは、超抗原アンタゴニストの作用様式のモデル。（A）超抗原毒素により誘導される過剰な Th1 応答が致死ショックを起こし、IFN - γ が Th2 応答を抑制している。（B）図のように、アンタゴニストペプチドは毒素による Th1 細胞活性化の選択的ブロックを引き起こす上、残留 Th1 応答を抑制するだけでなく、防御免疫の急速な発達を促進する役割も果たす Th2 サイトカイン（IL - 4、IL - 10）の活発な同時誘導には干渉しない[Arad et al., (2000), (2001) 前掲]。略語：s - Ag（超抗原）、Tox.（毒素）、Dea.（死）、Antag.（アンタゴニスト）、Surv.（生存）、Prot. Imm.（防御免疫）。

10

【0328】

【図5】図5A～5Bは、新規受容体は Th1 細胞の活性化に関し、選択的に使用されることを示す。（A）抗原提示細胞および MHC クラス II 分子の役割については本明細書では省略する。本発明者らの研究仮説は、Th1 細胞を活性化するためには、超抗原毒素は T 細胞受容体だけでなく、本明細書では Th1 細胞で発現されることが分かっている、Th2 細胞の活性化には必要ではない新規受容体も拘束せねばならないというものである。（B）よって、アンタゴニストペプチドが新規受容体と結合することで毒素による Th1 細胞活性化の選択的なブロックがなされ、それにより、生存ならびに防御免疫が可能になる。略語：s - Ag（超抗原）、Tox.（毒素）、Nov. Rec.（新規受容体）、TCR（T 細胞受容体）、Dea.（死）、Antag.（アンタゴニスト）、Surv.（生存）、Prot. Imm.（防御免疫）。

20

【0329】

【図6】図6A～6Cは、IL - 2 および IFN - γ mRNA の SEB 誘導性発現ならびに IL - 10 の SEB 誘導性発現に対する抗 B7 mRNA の効果を示す。ヒト PBMC を、mAb 不在（白丸）または $1 : 10^4$ 希釈した抗 B7 - 1（白四角、黒四角）もしくは $1 : 10^4$ 希釈した抗 B7 - 2（白三角、黒三角）いずれかの存在下、SEB なしでインキュベートした。図2Bの場合のように、IL - 2 mRNA（A）および IFN - γ mRNA（B）を定量的ドットプロットハイブリダイゼーションにより解析した（ドットは 8 時間の値を示す）。同じ細胞の培養培地で IL - 10 を ELISA によりアッセイした（C）。略語：T（期間）、h（時間）、pg（ピコグラム）、ml（ミリリットル）。

30

【0330】

【図7】図7A～7Fは、SEB による IL - 2 および IFN - γ mRNA の誘導ならびに IL - 10 の誘導に対する可溶性 CD28 受容体の効果を示す。（A～C）ヒト PBMC を混合し、 100 ng/ml SEB（白四角）、 $1 \mu\text{g/ml}$ sCD28（白三角）（R & D Systems）、またはその両方（黒丸）とともにインキュベートした。示した時点で、IL - 2 mRNA を RNアーゼプロテクション解析により確認した；アクチン mRNA をローディング対照とした（A）。（B）は NIH イメージ 1.61 ソフトウェアを使用した A でのデータの定量である。同じ細胞の培養培地で IL - 10 を ELISA によりアッセイした（C）。（D～F）PBMC を 10 ng/ml SEB（白四角）、 $10 \mu\text{g/ml}$ sCD28（白三角）、またはその両方（黒丸）とともにインキュベートしたことを除き、（A～C）と同様の試験。示した時点で、IFN - γ mRNA を RNアーゼプロテクション解析により解析した（D）；E は D でのデータの定量である。同じ細胞の培養培地で IL - 10 を ELISA によりアッセイした（F）。アクチン mRNA をローディング対照とした（A, D）。略語：T（期間）、h（時間）、

40

50

pg (ピコグラム)、ml (ミリリットル)、Un. (単位)。

【0331】

【図8】図8A~8Fは、SEBによるIL-2 mRNAおよびIL-10の誘導に対する可溶性CD28受容体および可溶性B7-2の効果。ヒトPBMCを1ng/ml SEB (白四角)、および0.1μg/ml sCD28 (黒丸)または10μg/ml sCD28 (黒三角)とともにインキュベートした。示した時点で、IL-2 mRNAをRNアーゼプロテクション解析により確認し(A)、定量した(B); 同じ細胞の培養培地でIL-10をELISAによりアッセイした(C)。(D~F)はPBMCを1ng/ml SEB (白四角)、および10μg/ml sCD28 (黒三角)または0.1μg/ml sB7-2 (黒四角)とともにインキュベートしたことを除き、(A~C)と同様の試験を示す。略語: T (期間)、h (時間)、pg (ピコグラム)、ml (ミリリットル)、Un. (単位)、μg (マイクログラム)、ng (ナノグラム)。

10

【0332】

【図9】図9A~9Bは、抗CD3、抗CD28またはsB7-2によるIFN-γ mRNAの誘導を示す。ヒトPBMCを0.1μg/ml抗CD3、2.5μg/ml抗CD28または1μg/ml sB7-2 (R & D Systems)とともにインキュベートした。; 示した時点で、IFN-γ mRNAをRNアーゼプロテクション解析により定量した(A)。(B)では、ヒトPBMCを2.5μg/ml抗CD28または1μg/ml sB7-2、単独またはその組合せとともにインキュベートした; 示した時点で、IFN-γ mRNAをRNアーゼプロテクション解析により定量した。略語: h (時間)。

20

【0333】

【図10】図10A~10Bは、抗CD3/抗CD28によるIFN-γ およびIL-2 mRNAの誘導、ならびにこの誘導のp14Aアンタゴニストペプチドによる阻害を示す。ヒトPBMCを10μg/ml p14Aの不在 (黒三角)または存在 (黒丸)下、2.5μg/ml抗CD28 (白丸)または0.1μg/ml抗CD3単独 (白四角)またはその両方とともにインキュベートした。示した時点で、IL-2 mRNA、別の試験ではIFN-γ mRNAをRNアーゼプロテクション解析により定量した(A)。IL-2 mRNAの確認に用いた同じ細胞の培養培地でIL-10をELISAによりアッセイした(B)。略語: T (期間)、h (時間)、pg (ピコグラム)、ml (ミリリットル)。

30

【0334】

【図11】図11A~11Bは、sB7-2と組み合わせた抗CD3によるIFN-γ mRNAおよびIL-10の誘導に対するp14Aアンタゴニストペプチドの効果を示す。ヒトPBMCを10μg/ml p14Aの不在 (白の記号)または存在 (黒の記号)下、0.1μg/ml抗CD3 (四角)、1μg/ml sB7-2 (丸印)またはその両方 (三角)とともにインキュベートした。示した時点で、IFN-γ mRNAをRNアーゼプロテクション解析により確認した(A)。同じ細胞の培養培地でIL-10をELISAによりアッセイした(B)。略語: T (期間)、h (時間)、pg (ピコグラム)、ml (ミリリットル)。

【0335】

【図12】図12A~12Bは、IFN-γ mRNAのsB7-2誘導性発現はアンタゴニストペプチドにより増強されることを示す。ヒトPBMCを1μg/ml sB7-2単独 (白丸)または10μg/ml p14A (黒丸)を合せて、ともにインキュベートした。示した時点で、IFN-γ mRNAをRNアーゼプロテクション解析により確認し(A)、定量した(B)。アクチンmRNAをローディング対照とした。略語: T (期間)、h (時間)、Un. (単位)。

40

【0336】

【図13】図13A~13Bは、SEBまたはアンタゴニストペプチドとsCD28との結合のプラズモン共鳴の記録を示す。100μg量のsCD28をBiacoreチップ上に固定化した。sCD28チップとの結合を抗CD28 (200nM) (A)、p14A (

50

2 μM) (B)、またはSEB (200 nM) (C) 解析物に関して別々に記録した。この応答は共鳴単位 (RU) として測定し、経時的 (秒 (s)) に解析物に対して応答する差 (Resp. Diff.) を示している。ベースラインは左側にあり、結合はベースラインに対するRUの増加により示される。BおよびCでは、50 mM H_3PO_4 で解析物を洗浄して、ベースラインの更新を右側に示している。略語: T (期間)。

【0337】

【図14】抗CD28とsCD28との高親和性結合はSEBにより阻害される: プラズモン共鳴による解析。100 μg 量のsCD28をBiacore チップ上に固定化し、図のように、プラズモン共鳴を200 nM抗CD28の存在下、200 nM SEBの不在または存在下で記録した。バーによりプラズモン共鳴シグナルの強度を示している。略語: bou. (結合)、(抗)。

10

【0338】

【図15】抗CD28とsCD28との高親和性結合はp14Aにより阻害される: プラズモン共鳴による解析。100 μg 量のsCD28をBiacore チップ上に固定化し、図のように、プラズモン共鳴を示した濃度の抗CD28の存在下、2 μM p14Aの不在または存在下で記録した。バーによりプラズモン共鳴シグナルの強度を示している。略語: bou. (結合)、(抗)。

【0339】

【図16】抗CD28とsCD28との高親和性結合はアンタゴニストペプチドにより阻害される: ELISAによる解析。250 ng量のsCD28をELISAマイクロタイタープレート上に固定化し、2種類の示した希釈 (各々250および125 ng/mlに相当する) での抗CD28の結合をアルカリ性ホスファターゼを結合した二次抗体を用いて測定し、450 nmでの吸光度を記録した。p14Aは不在 (対照) とするか、または示した濃度では存在させた。略語: bin. (結合)、Un. (単位)、cont. (対照)、ml (ミリリットル)、 μg (マイクログラム)、(抗)。

20

【0340】

【図17】図17A~17Eは、抗SEBとSEBとの結合に対するCD28またはsB7-2の効果: プラズモン共鳴による解析を示す。(A, B) 100 μg 量のSEBをBiacore チップ上に固定化し、プラズモン共鳴を1:1, 000倍希釈したポリクローナル抗SEB抗体 (Sigma) の存在下で記録した; (A) はプラズモン共鳴シグナルの強度を示している。(b) は漸増濃度のsCD28またはsB7-2リガンドの存在下で(A)の場合に形成した抗SEB/SEB複合体の割合%を示している。(C) は抗SEB解析物 (aSEB) と、各々が同じBiacore チップ上の異なるチャンネルに固定化されたSEBまたはsCD28との結合を示している。バーは複合体形成の比較を示している。(D) は漸増濃度のsB7-2と、Biacore チップ上に固定化されたsCD28との結合に関するプラズモン共鳴の記録を示し、曲線は $K_d = 1.9 \times 10^{-8} \text{M}$ を用いている。(E) では、(A) および (B) の100 μg 量のSEBが固定化されたBiacore チップを用いて、1:1, 000倍希釈したポリクローナル抗SEB抗体の存在下、競合相手 (CTRL) の不在下、または250 nM sB7-2、250 nM sCD28、またはその両方 (同時に添加) の存在下、プラズモン共鳴を記録した; バーは抗SEB/SEB複合体形成の比較を示している。略語: T (期間)、sec. (秒)、Resp. (応答)、Diff. (差)、bou. (結合)、Lig. (リガンド)、(抗)。

30

40

【0341】

【図18】図18A~18Bは、抗SEBとSEBとの結合に対するCD28の効果: プラズモン共鳴による解析を示す。(A) 100 μg 量のSEBをBiacore チップ上に固定化し、プラズモン共鳴を8 nMポリクローナルウサギ抗SEB抗体 (Sigma) 単独 (白三角) の存在下、または125 nM (白丸)、250 nM (白四角)、500 nM (黒丸)、1 μM (黒三角)、または2 μM (黒四角) の濃度のsCD28の存在下で記録した。プラズモン共鳴シグナルの強度を示している (Resp. Diff., 応答差; RU, 応答単位)。(B) の別の試験では、100 μg 量のSEBをBiacore チップ上に固定化

50

し、プラズモン共鳴を表の左欄にて示されるように漸増濃度のポリクローナル抗SEB抗体 (SEB) の存在下で記録した。表ではSEB単独の存在下、または一定濃度のsCD28 (1 μ M) の存在下でのRUおよび結合率%を示している。結合率%については、SEB濃度の関数として表の上部に示している。略語：T (期間)、Sec. (秒)、bin. (結合)。

【0342】

【図19】図19A~19Bは、SEBと抗SEBとの結合およびsCD28による干渉に関する酵素免疫定量法 (ELISA) を示す。ELISAプレートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中0.5 μ g SEB/ウェルで4にて一晚コーティングし、0.05% Tween-20含有PBSで2回洗浄した後、PBS中5%ウシ血清アルブミンにより2時間ブロックした。表にて示した濃度のsCD28を50,000倍 (A; B, 白四角) または500,000倍 (B, 黒四角) 希釈したウサギ抗SEB抗体とともに添加した。室温にて2時間インキュベートした後、プレートを2回洗浄し、抗ウサギIgG-AP (AP, アルカリ性ホスファターゼ) を1時間添加した。2回洗浄した後、基質PNPPを添加し、10分 (丸印) または15分 (四角印) 後、405 nMにて色を記録した。略語：bin. (結合)、conc. (濃度)。

10

【0343】

【図20】p14Aと抗p14Aとの結合およびsCD28による干渉に関する酵素免疫定量法 (ELISA)。ELISAプレートをPBS中0.5 μ g p14A/ウェルで4にて一晚コーティングし、0.05% Tween-20含有PBSで2回洗浄した後、PBS中5%ウシ血清アルブミンにより2時間ブロックした。示した濃度のsCD28を50,000倍 (黒丸) または500,000倍 (黒四角) 希釈したウサギ抗p14A抗体とともに添加した。室温にて2時間インキュベートした後、プレートを2回洗浄し、抗ウサギIgG-AP (AP, アルカリ性ホスファターゼ) を1時間添加した。2回洗浄した後、基質PNPPを添加し、405 nMにて色を記録した。結合率%を示している (100%, sCD28不在の場合)。略語：bin. (結合)、pg/ml (ピコグラム/ミリリットル)。

20

【0344】

【図21】アンタゴニストペプチドはCD28とsB7-2との結合を増強する：プラズモン共鳴による解析。100 μ g量のsB7-2をBiacoreチップ上に固定化し；sCD28 (200 nM) が解析物 (CTRL) であった。プラズモン共鳴を図のように2 μ M p14Aまたは2 μ M pSEB (41-61) の不在または存在下で記録した。バーはプラズモン共鳴シグナルの強度の比較を示している。略語：Bou. (結合)。

30

【0345】

【図22】SEB、アンタゴニストペプチドとB7-2およびCD28リガンドとの相互作用を示す略図。sAg, 超抗原；APC, 抗原提示細胞；V, TCR 鎖の可変領域。略語：antag. (アンタゴニスト)、pep. (ペプチド)、ce. (細胞)、s-Ag (超抗原)、APC (抗原提示細胞)。

【0346】

【図23】SEBはヒトCD4細胞においてCD28受容体の変化を誘導する。PBM Cから、CD4細胞を90%に濃縮し、 4×10^6 細胞/mlにて100 ng/mlのSEBとともにインキュベートし、図のように、誘導0、6および24時間後に抗CD28 mAb (二次抗体：cy-2, 緑) または抗CD28 Ab (二次抗体：cy-3, 赤) で染色した。共焦点蛍光顕微鏡検査データを示している。マージ、抗CD28 mAbおよび抗CD28 Abでの二重染色。略語：Mer. (マージ)、mAb (モノクローナル抗体)。

40

【0347】

【図24】ヒトおよびネズミCTLA-4ならびにCD28のアミノ酸配列の一部のアラインメント。示したアミノ酸配列はヒト (h) およびネズミ (m) CTLA-4ならびにCD28に関するものである。全4分子に保存されている残基を太字で表している。ペ

50

プチドのコンビナトリアルファージライブラリーを用いた抗CD28 mAbのエピトープマッピングでは、hCD28内の下線を引いた配列を得、その中のHVKGKHモチーフを影付きにしている；mCD28の対応するモチーフもまた影付きにしている。

【0348】

【図25】図25A～25Dは、抗CD28 mAbによるIFN- γ mRNAの誘導に対する可溶性CD28受容体およびペプチドpTAの効果を示す。ヒトPBMCを250 ng/ml 抗CD28 mAb単独とともにまたは0.1 μ g/ml sCD28または10 μ g/mlのpTAの存在下でインキュベートした。示した時点で、IFN- γ mRNAをRNアーゼプロテクション解析により確認した(A)。(B)はPBMCを250 ng/ml 抗CD28 mAb単独とともに、または1もしくは10 μ g/ml sCD28あるいは1もしくは10 μ g/ml pTAの存在下でインキュベートしたことを除き、(A)と同様の試験を示す。アクチンをRNアーゼプロテクション解析のローディング対照とした。略語：h(時間)、pg(ピコグラム)、ml(ミリリットル)、 μ g(マイクログラム)、ng(ナノグラム)。

10

【0349】

【図26】図26A～26Dは、SEBによるIFN- γ およびIL-2 mRNAの誘導ならびにIL-10の誘導に対する可溶性CD28受容体およびペプチドpTAの効果を示す。ヒトPBMCを100 ng/ml SEB(白四角)単独とともに、または1 μ g/ml sCD28(黒丸)もしくは10 μ g/ml pTA(黒三角)の存在下でインキュベートした。示した時点で、IFN- γ mRNAをRNアーゼプロテクション解析により確認した(A)；同じ細胞の培養培地でIL-10をELISAによりアッセイした(B)。(C～D)はPBMCを100 ng/ml SEB(白四角)単独とともにまたは0.1 μ g/ml sCD28(黒丸)もしくは10 μ g/ml pTA(黒三角)の存在下でインキュベートしたことを除き、(A～B)と同様の試験を示す。アクチンをRNアーゼプロテクション解析のローディング対照とした。略語：T(期間)、h(時間)、pg(ピコグラム)、ml(ミリリットル)、 μ g(マイクログラム)、ng(ナノグラム)。

20

【0350】

【図27】SEB、アンタゴニストペプチドおよびCD28標的の相互作用を示す略図。s-Ag(超抗原)、APC(抗原提示細胞)、V(TCR鎖の可変領域)、target、CD28, antag.(アンタゴニスト)、pep.(ペプチド)、ce.(細胞)。

30

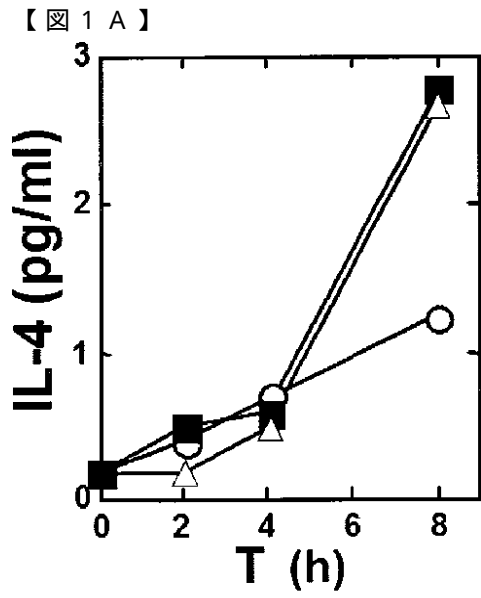


Fig. 1A

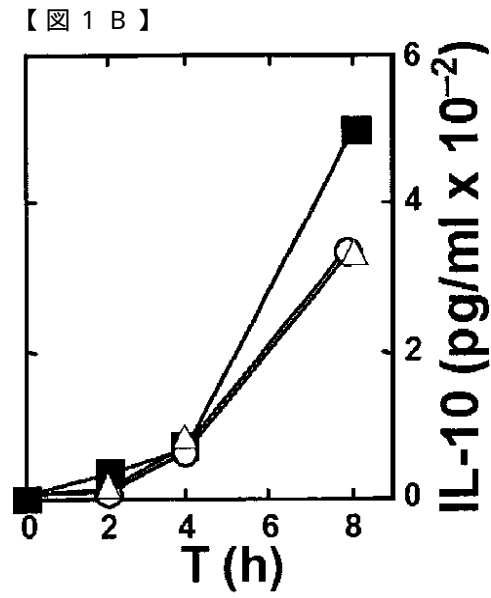


Fig. 1B

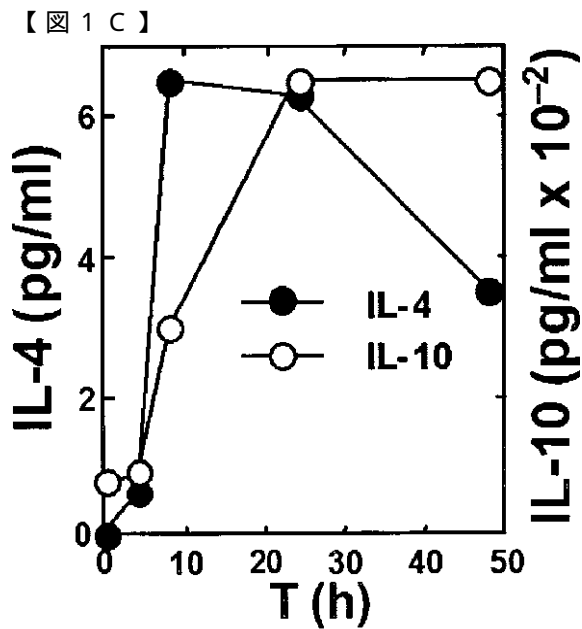


Fig. 1C

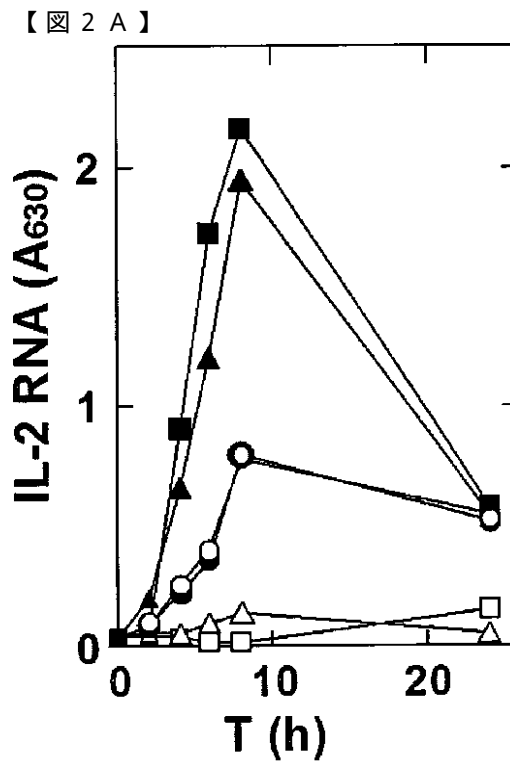


Fig. 2A

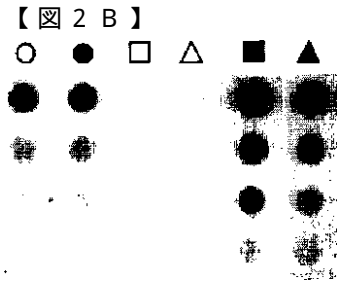
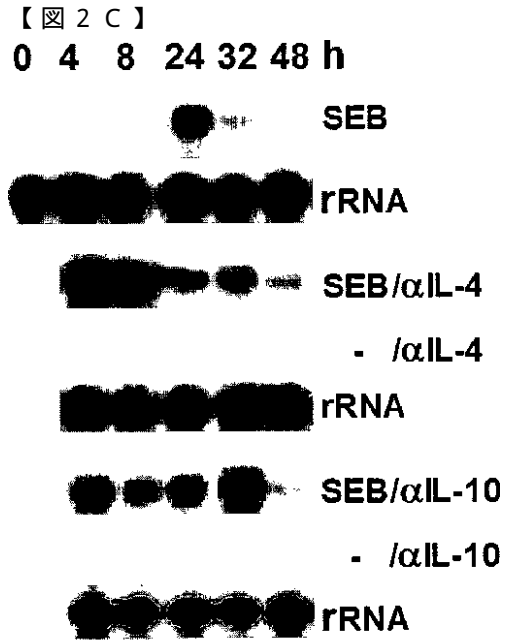


Fig. 2B



IFN- γ
Fig. 2C

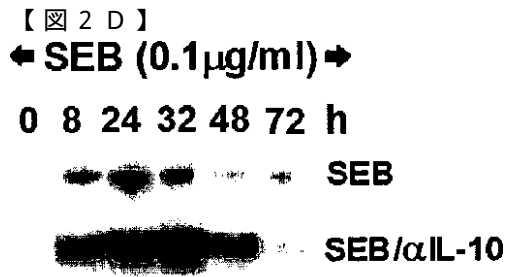


Fig. 2D

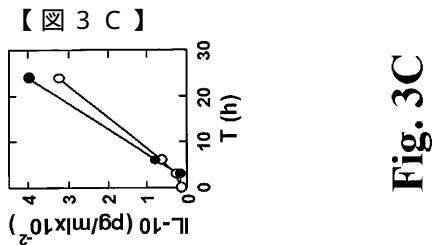


Fig. 3C

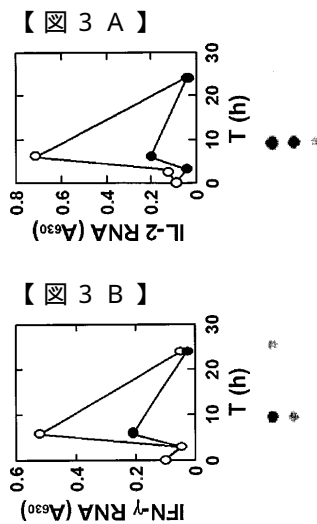


Fig. 3A

Fig. 3B

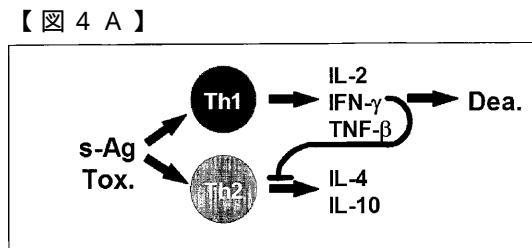


Fig. 4A

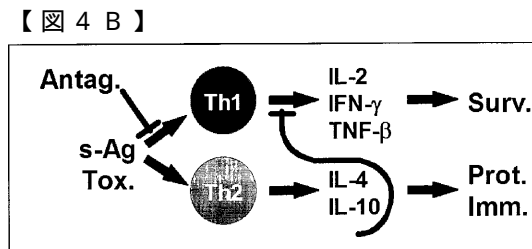


Fig. 4B

【 5 A 】

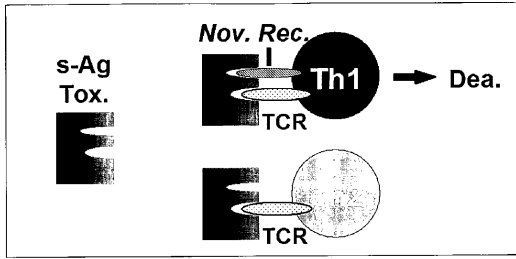


Fig. 5A

【 5 B 】

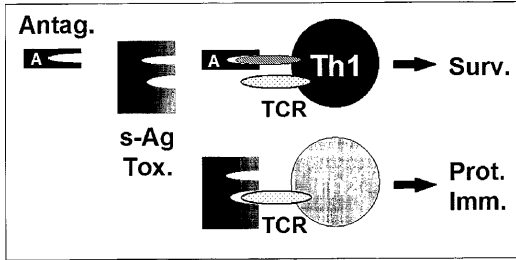


Fig. 5B

【 6 A 】

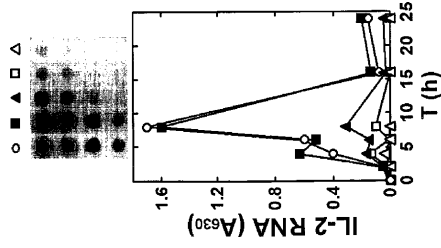


Fig. 6A

【 6 B 】

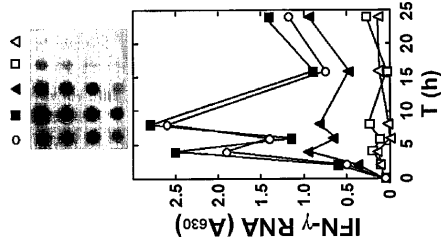


Fig. 6B

【 6 C 】

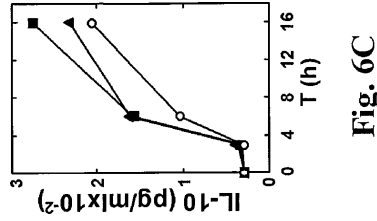
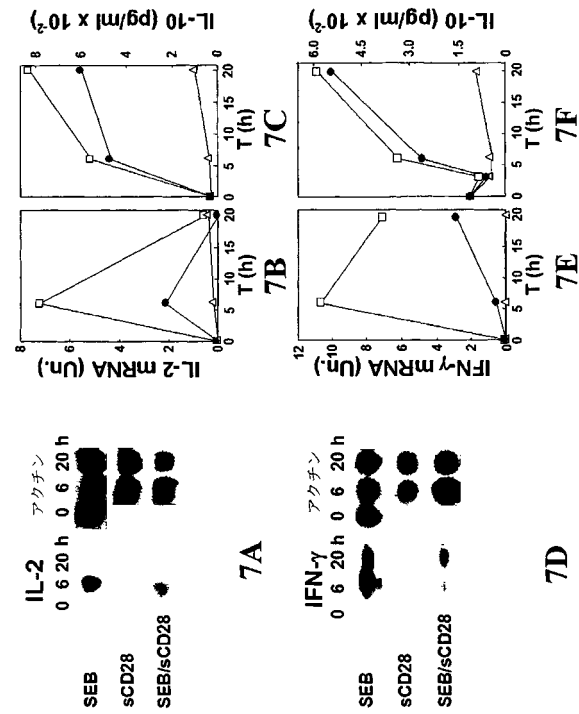


Fig. 6C

【 7 】



【 8 A 】

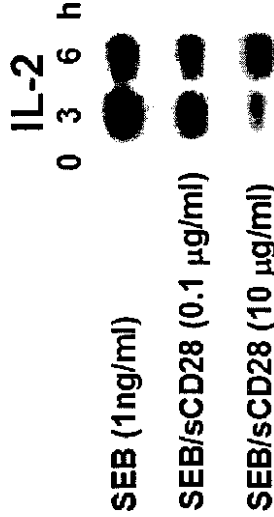


Fig. 8A

【 8 B 】

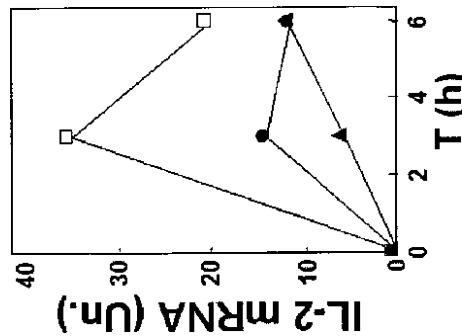


Fig. 8B

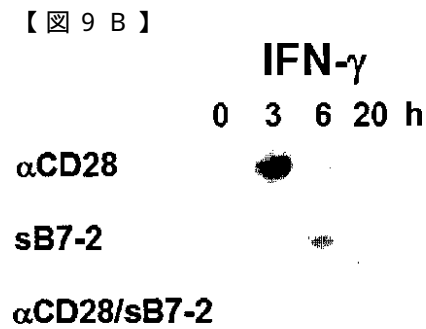
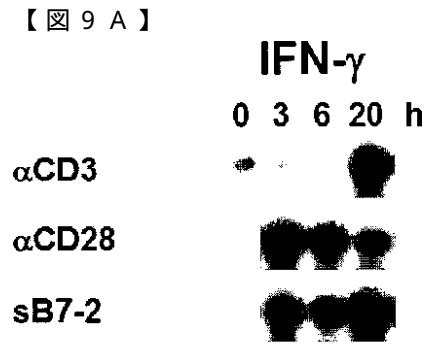
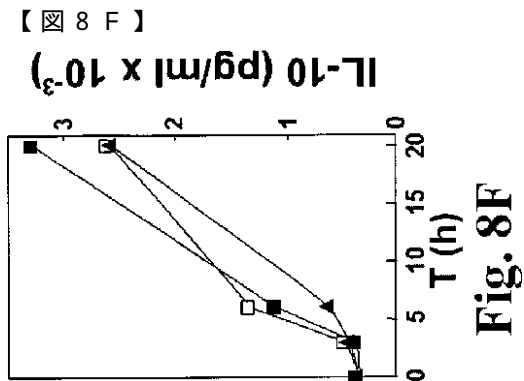
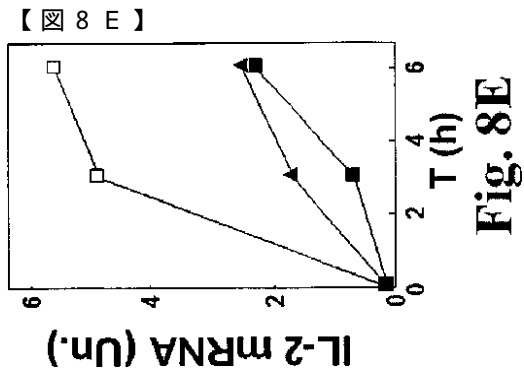
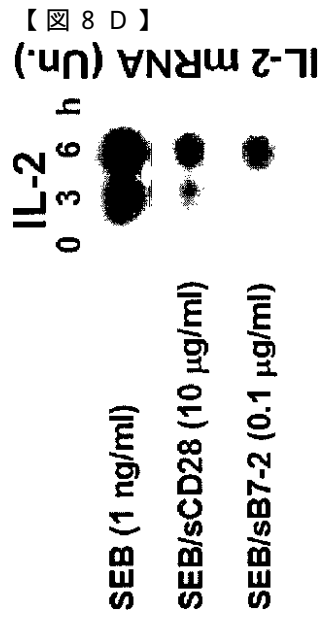
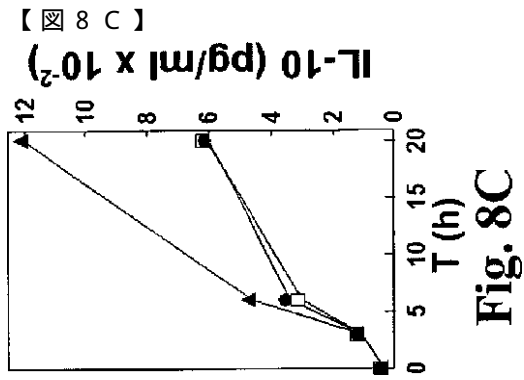


Fig. 9B

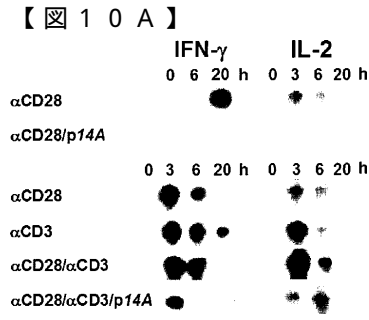


Fig. 10A

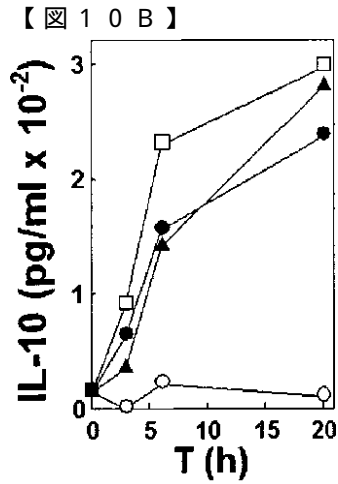


Fig. 10B

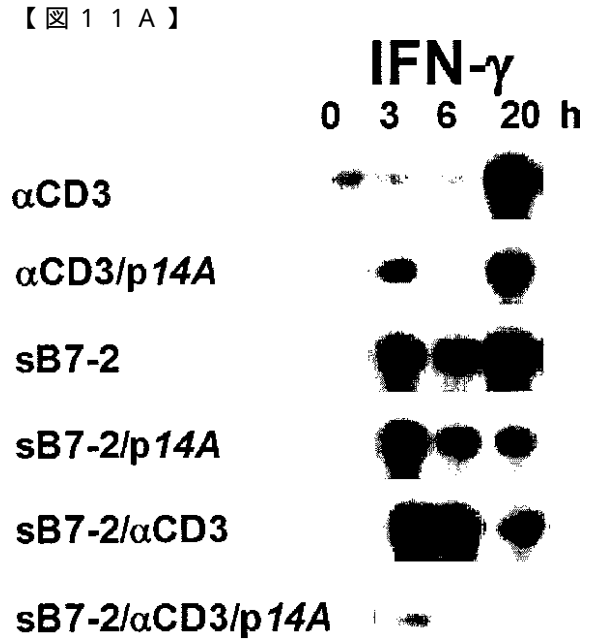


Fig. 11A

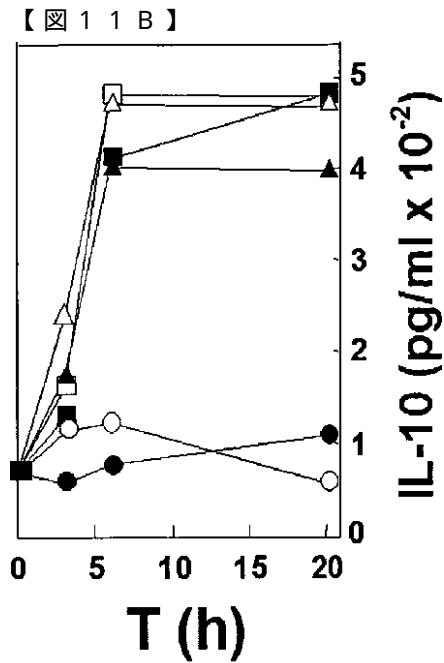
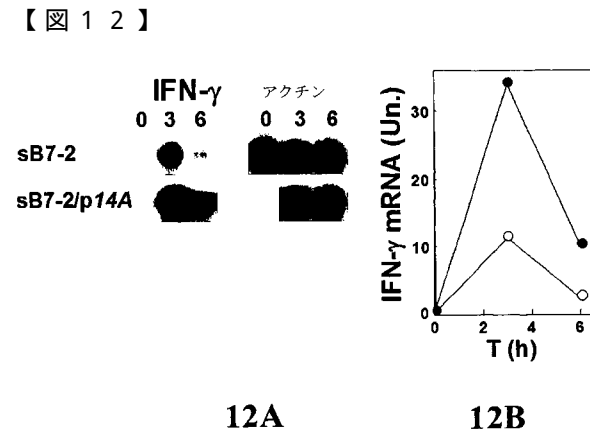


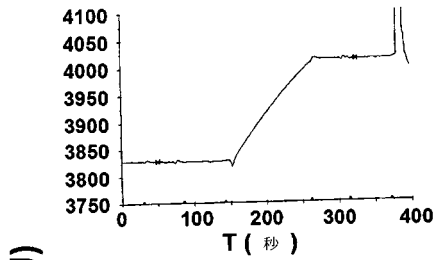
Fig. 11B



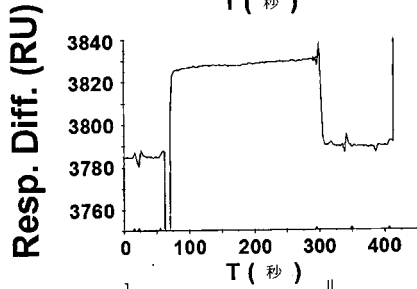
12A

12B

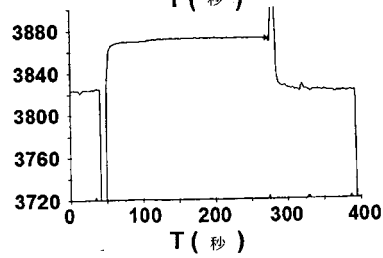
【 13 】



13A



13B



13C

【 14 】

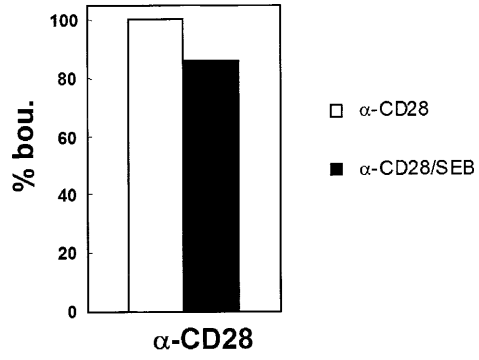


Fig. 14

【 15 】

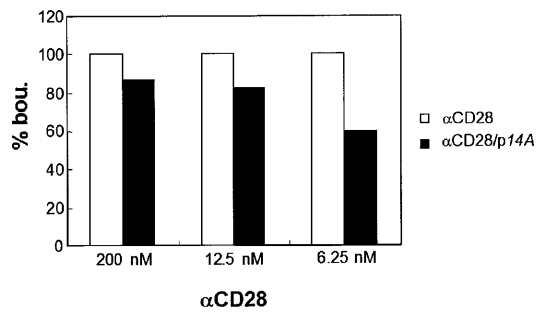


Fig. 15

【 16 】

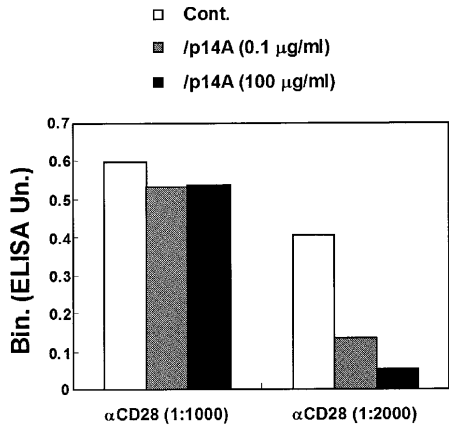


Fig. 16

【 17 B 】

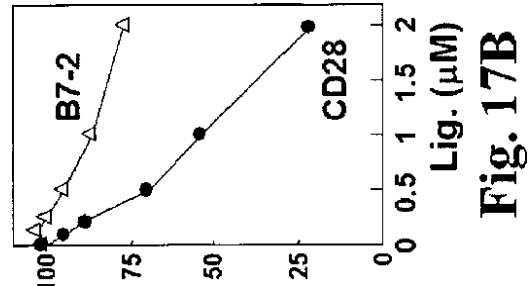


Fig. 17B

【 17 C 】

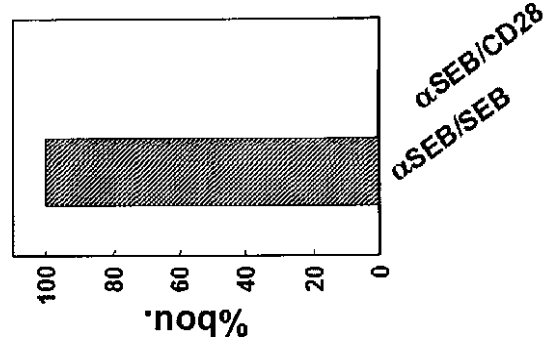


Fig. 17C

【 17 A 】

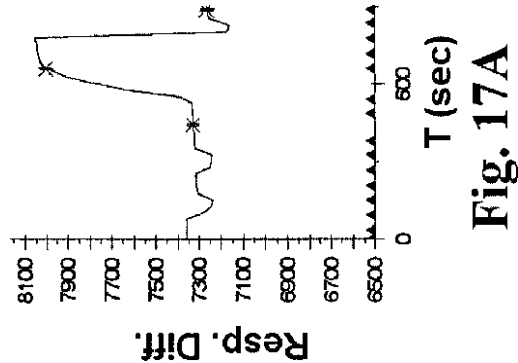


Fig. 17A

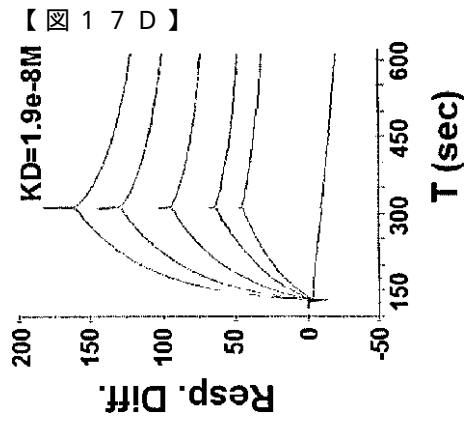


Fig. 17D

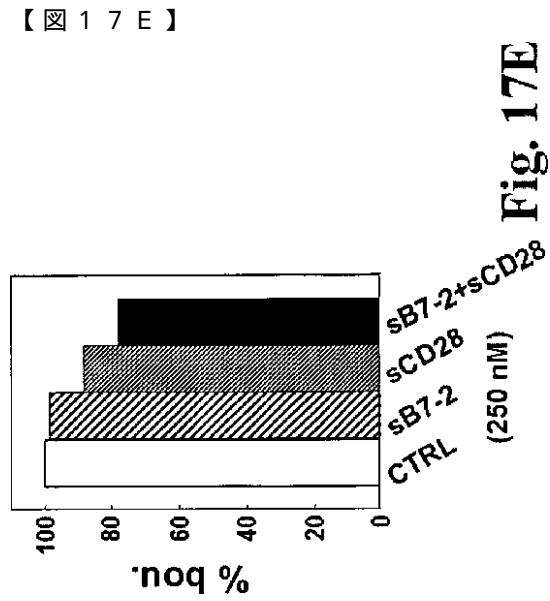


Fig. 17E

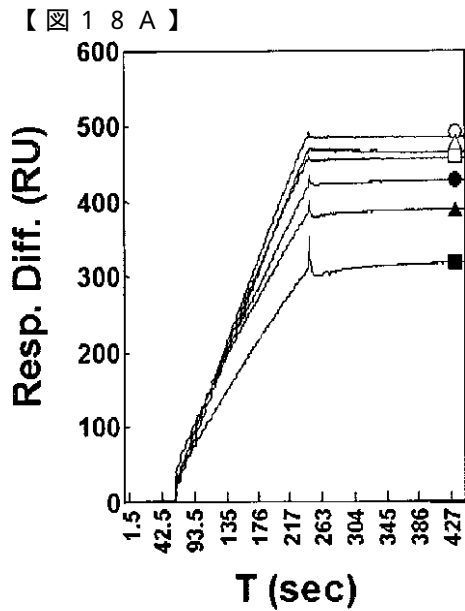


Fig. 18A

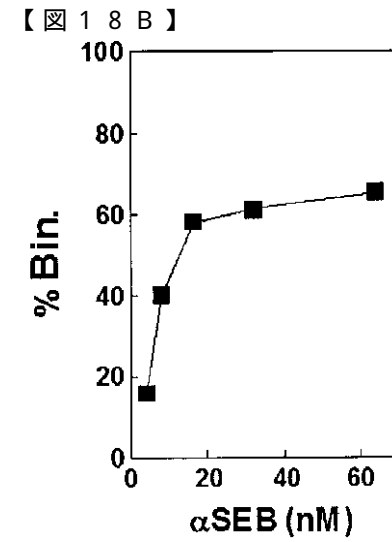
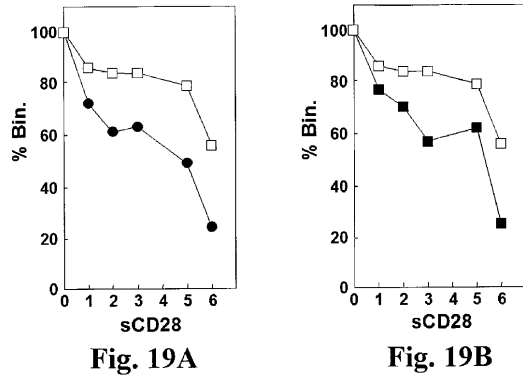


Fig. 18B

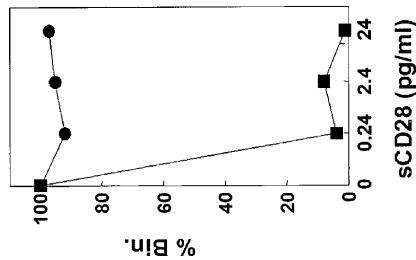
α SEB (nM)	(RU) α SEB	(RU) α SEB/sCD28	% Bin.
4	242	39	16
8	445	179	40
16	810	469	58
32	1440	877	61
64	2346	1533	65

【 19 A - B 】

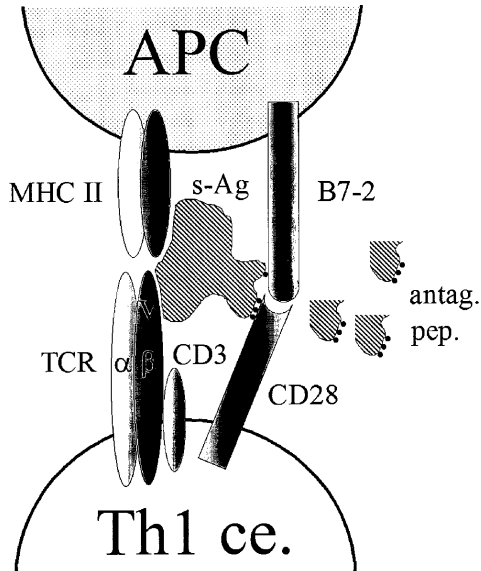


No.	sCD28 conc.
1	0.24 pg/ml
2	2.4 pg/ml
3	24 pg/ml
5	2.4 ng/ml
6	24 ng/ml

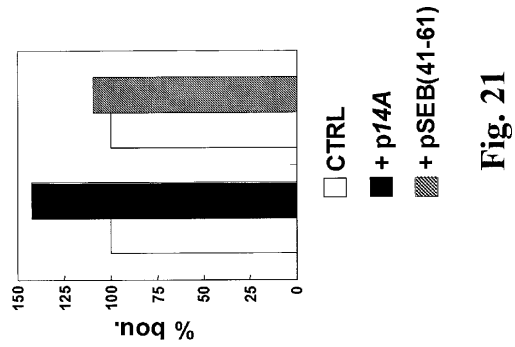
【 20 】



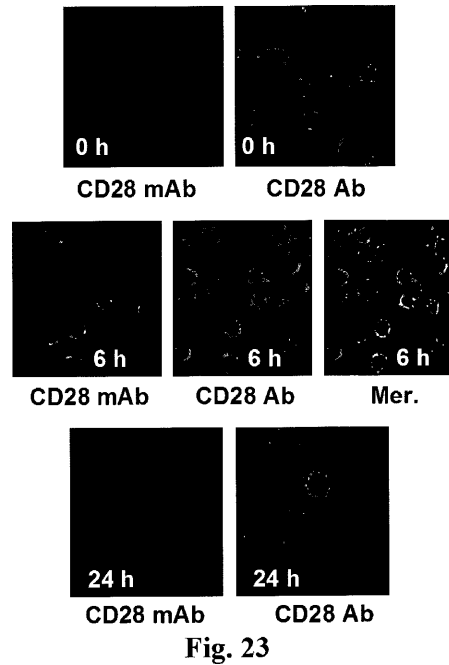
【 22 】



【 21 】



【 23 】



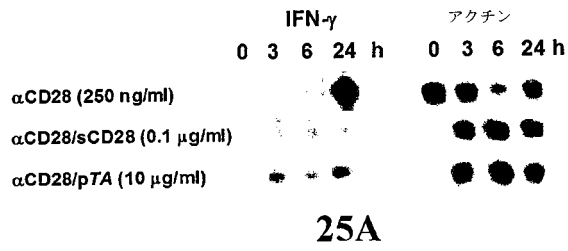
【 24 】

hCTLA4 KAMHVAQPAVVLASRGIASFVCEYASFGKATEVRVTVLRAQDSQVTEVCAATYMMGNELTFDD
mCTLA4 EAIQVTQPGVVLASSHGVSFECESPSHNTDEVRTVLRQNDQNTFVCGATTFTEKNTVGFIDY
hCD28 NKILVKQSEMLVAYDNAVN-LSCRYSYNLFSPRFRASLHKGLDSAV-EVCGVYGNYSQQLQVYSK
mCD28 NKILVKQSEMLLVDSNEVS-LSCRYSYNLLAKEFRASLYKGVNSDV-EVCGVGNFTYQQFRSN

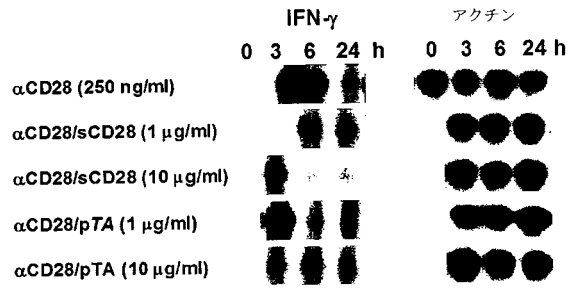
hCTLA4 S--ICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMPPPPYILG-IGNGTQIYVIDEFCPEPDS
mCTLA4 F--FCSGVFNESRNVLTIQGLRAVDLGLLCKVELMPPPPYVCG--MGNCTIYVIDEFCPEPDS
hCD28 TGFNCDGKLGNESVDFYLGKLVVHTDLYCKLEFVMPPPYLDNEKSNCTIITAVKGGKHLCPSP
mCD28 AEFNCDGDFDNETVTFRLNWLNVNHTDLYFCKLEFVMPPPYLDNEKSNCTIITAVKGGKHLCPSP

Fig. 24

【 図 2 5 】

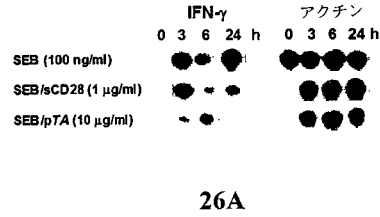


25A

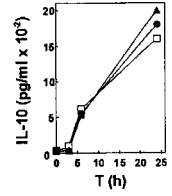


25B

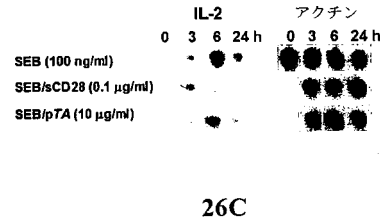
【 図 2 6 】



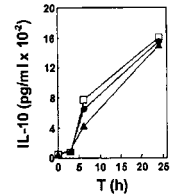
26A



26B

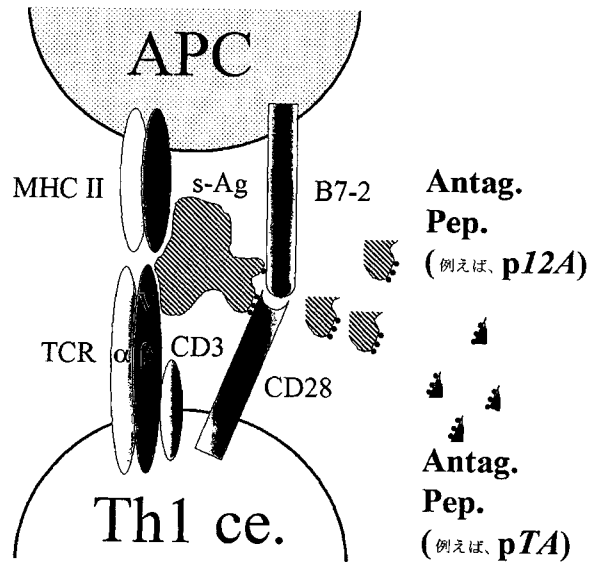


26C



26D

【 図 2 7 】



【配列表】

0004624684000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 31/04	(2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 39/02	(2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 16/28	(2006.01)	C 0 7 K 16/28	
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
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100094640

弁理士 紺野 昭男

(74)代理人 100107342

弁理士 横田 修孝

(72)発明者 レイモンド、ケンプファー

イスラエル国イエルサレム、ネベ、シャーナン、ストリート、18

(72)発明者 ギラ、アラド

イスラエル国メバセレット、シオン、ハチョシェン、ストリート、1

審査官 石丸 聡

(56)参考文献 Eur. J. Immunol., vol. 25, pages 333-339 (1995)

J. Immunol., vol. 166, pages 3107-3113 (2001)

J. Exp. Med., vol. 180, pages 2049-2058 (1994)

Nat. Med., vol. 6, pages 414-421 (2000)

J. Leukoc. Biol., vol. 69, pages 921-927 (2001)

Eur. J. Immunol., vol. 25, pages 2111-2114 (1995)

Cell. Immunol., vol. 162, pages 315-320 (1995)

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C07K 14/705

C07K 7/06

C07K 7/08

C12N 15/09

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	基于CD28与超抗原相互作用的体内有效广谱超抗原毒素拮抗剂及其用途		
公开(公告)号	JP4624684B2	公开(公告)日	2011-02-02
申请号	JP2003582189	申请日	2003-04-03
[标]申请(专利权)人(译)	耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发展公司		
申请(专利权)人(译)	Isumu, 研究, Deberopumento, 公司的, 希伯来语, 大学的李耶路撒冷		
当前申请(专利权)人(译)	Isumu, 研究, Deberopumento, 公司的, 希伯来语, 大学的李耶路撒冷		
[标]发明人	レイモンドケンプファー ギラアラド		
发明人	レイモンド、ケンプファー ギラ、アラド		
IPC分类号	C07K14/705 C07K7/06 C07K7/08 A61K38/00 A61K39/395 A61P31/04 A61P37/06 A61P39/02 A61P43/00 C07K16/28 G01N33/15 G01N33/53 C12N15/09 A61K39/00 C07K		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P39/02 A61P43/00 C07K14/70521		
FI分类号	C07K14/705.ZNA C07K7/06 C07K7/08 A61K37/02 A61K39/395.U A61P31/04 A61P37/06 A61P39/02 A61P43/00.105 C07K16/28 G01N33/15.Z G01N33/53.D C12N15/00.A		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
审查员(译)	石丸聪		
优先权	148993 2002-04-04 IL		
其他公开文献	JP2006505500A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及CD28分子内的超抗原结合位点，其包含部分或全部氨基酸序列HVKGKHLCP（也显示于SEQ ID NO：3）。该位点特异性地直接将超级抗原与热原外毒素的空间保守结构域结合（该结构域不参与MHC II类分子或TCR的结合）。在该位点CD28分子与超抗原的直接结合促进B7-2配体与CD28的结合，并通过诱导Th1淋巴细胞中的IL-2和/或IFN-g基因表达来定义。它对激活至关重要。本发明提供了通过抑制这种相互作用来抑制超抗原介导的Th1淋巴细胞活化的物质，从而保护免受中毒性休克并且还可以诱导保护性免疫。本发明还包括筛选能够特异性结合CD28分子并拮抗热原外毒素介导的Th1淋巴细胞活化的测试物质的方法中的CD28分子或s-Ag结合位点。关于片段的使用。

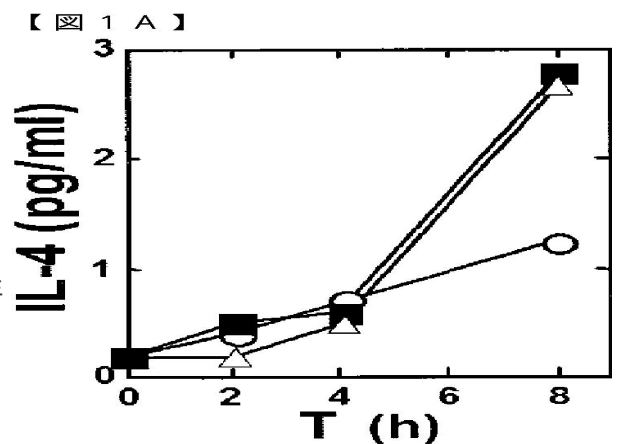


Fig. 1A