

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-528484
(P2008-528484A)

(43) 公表日 平成20年7月31日(2008.7.31)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 14/74 (2006.01)	C O 7 K 14/74 Z N A	4 C O 8 5
C07K 7/06 (2006.01)	C O 7 K 7/06	4 H O 4 5
A61K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	
GO1N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2007-552078 (P2007-552078)	(71) 出願人	507249373 ヘット ネーデルランツ カンケル イン スティテュート オランダ国, エヌエル-1066 セーイ ックス アムステルダム プレスマンラン 121
(86) (22) 出願日	平成18年1月25日 (2006.1.25)	(71) 出願人	504403840 ステフティン サンクイン ブロードフォ ルツィーニング オランダ国 エヌエル-1066 セーエ ックス アムステルダム, プレスマンラ ーン 125
(85) 翻訳文提出日	平成19年9月19日 (2007.9.19)	(74) 代理人	100085545 弁理士 松井 光夫
(86) 国際出願番号	PCT/NL2006/000038		
(87) 国際公開番号	W02006/080837		
(87) 国際公開日	平成18年8月3日 (2006.8.3)		
(31) 優先権主張番号	05075196.5		
(32) 優先日	平成17年1月25日 (2005.1.25)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子間の非共有結合性相互作用の破壊のための手段および方法

(57) 【要約】

本発明は、非共有結合性相互作用の領域を介して互いに結合する少なくとも2の構成員を含む多量体タンパク質において、該構成員の第1は、活性化されると該第1の構成員中の共有結合を開裂する条件的反応基を含む、多量体タンパク質に関する。共有結合の開裂は、該非共有結合性相互作用の領域を介して少なくとも2の構成員を互いに結合する結合強度の減少という結果になる。結合強度の減少は、穏やかな条件化での構成員の分離をもたらす。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

非共有結合性相互作用の領域を介して互いに結合する少なくとも 2 の構成員を含む多量体タンパク質において、該構成員の第 1 は、化学的または物理的な信号により活性化されると、該第 1 の構成員中の共有結合を開裂し、該非共有結合性相互作用の強度を減少させる条件的反応基を含み、該第 1 の構成員はペプチドを含み、かつ第 2 の構成員はポリペプチドを含む、上記多量体タンパク質。

【請求項 2】

該多量体タンパク質が主要組織適合複合体 (MHC) 分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体を含む、請求項 1 に記載の多量体タンパク質。

10

【請求項 3】

該条件的反応基が光感受性または過ヨウ素酸塩感受性基、あるいはその機能的等価体を含む、請求項 1 または 2 に記載の多量体タンパク質。

【請求項 4】

該光感受性基が 3-アミノ-3-(2-ニトロフェニル)プロピオン酸またはその機能的等価体を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載の多量体タンパク質。

【請求項 5】

該過ヨウ素酸塩感受性基がジヒドロキシ部分を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一つに記載の多量体タンパク質。

【請求項 6】

該 MHC 分子または該 MHC 分子の機能的な部分、誘導体および/または類似体のペプチド結合性の溝にペプチド抗原を含み、かつ該ペプチド抗原が条件的反応基を含む、請求項 5 に記載の MHC 分子。

20

【請求項 7】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一つに記載の多量体タンパク質を含む組成物。

【請求項 8】

該多量体タンパク質が、主要組織適合複合体 (MHC) 分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体を含み、かつ該構成員の少なくとも 1 が該 MHC 分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体のペプチド結合性の溝中のペプチド抗原である、請求項 7 に記載の組成物。

30

【請求項 9】

該ペプチド抗原が該条件的反応基を含む、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

さらに追加的ペプチドを含む請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 11】

該追加的ペプチドが該 MHC 分子のペプチド結合性の溝中で結合することができる抗原性ペプチドである、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

一時的ペプチドを、MHC 分子に対する弱められた結合親和性を示す少なくとも 2 のより小さなペプチドへと、活性化されると開裂する少なくとも 1 の条件的反応基を有する該一時的ペプチドを含む MHC 分子を製造することを含む、MHC 分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体を製造する方法。

40

【請求項 13】

さらに、該条件的反応基を活性化することを含む請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

さらに、該 MHC 分子のペプチド結合性の溝へ結合するための所望のペプチドを該 MHC 分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体に備える、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

開裂した一時的ペプチドを該 MHC 分子から効果的に除去する条件下で、該所望ペプチ

50

ドを有する該MHC分子を温置することを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

請求項12～15のいずれか一つに記載の方法により入手可能なMHC分子。

【請求項17】

請求項16に記載のMHC分子を含む組成物であって、条件的反応基を含むペプチドまたはその誘導体を含むMHC分子複合体、および追加ペプチドを含むMHC分子複合体を含む組成物。

【請求項18】

請求項1～6のいずれか一つに記載の少なくとも2の多量体または請求項16に記載の少なくとも2のMHC分子を含む複合体。

10

【請求項19】

請求項1～6のいずれか一つに記載の少なくとも2の多量体、請求項7～11のいずれか一つに記載の組成物、または請求項16に記載のMHC分子を含む、固体表面。

【請求項20】

さらに、該所望ペプチドが該MHC分子に結合することを検出することを含む、請求項12～15のいずれか一つに記載の方法。

【請求項21】

該結合が、該ペプチドに関連づけられた標識を検出することにより検出される、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

20

該ペプチドが該標識を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

該ペプチドの該MHC分子への該結合が蛍光異方性的手段により測定される、請求項20～22のいずれか一つに記載の方法。

【請求項24】

被検または対照化合物の存在下で該所望ペプチドの結合を判定するための、請求項20～23のいずれか一つに記載の方法。

【請求項25】

ワクチン中で、アミノ酸配列AMDSENTLELを含む単離されたおよび/または合成されたペプチドを使用する方法。

30

【請求項26】

インフルエンザに対するワクチンの調製のために、アミノ酸配列AMDSENTLELを含む単離されたおよび/または合成されたペプチドを使用する方法。

【請求項27】

アミノ酸配列AMDSENTLELを含む単離されたおよび/または合成されたペプチドを含む、請求項16に記載のMHC分子。

【請求項28】

該ペプチドに特異的であるT細胞を検出するための請求項27に記載のMHC分子。

【請求項29】

該ペプチドに特異的であるT細胞のための組成物の調製のために請求項27に記載のMHC分子を使用する方法。

40

【請求項30】

個人の血液サンプルに請求項27に記載のMHC分子を備える、および該血液サンプル中の細胞への該MHC分子の結合を分析することを含む、該個人のインフルエンザを診断する方法。

【請求項31】

アミノ酸配列AMDSENTLELを含む単離されたおよび/または合成されたペプチド、および任意的に免疫増強剤および/または適当な添加剤を、個人に与えることを含む、インフルエンザに対して該個人を免疫する方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、分子を結合する分野に関するものである。特に、タンパク質性多量体分子の構成員間の非共有結合性相互作用を破壊する手段及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

非共有結合性相互作用は非常に重要であり、特に生物学の分野においてそうである。非共有結合性の結合はDNA 2重らせんの2本の鎖を一緒に保持し（水素結合）、ポリペプチドをヘリックスおよびコンフォメーションのような2次構造へと折りたたみ、酵素をそれらの基質と結合できるようにし、抗体をそれらの抗原と結合できるようにし、転写因子を互いに結合できるようにし、転写因子をDNAに結合できるようにし、タンパク質（例えばいくつかのホルモン）をそれらの受容体に結合できるようにし、リボソーム、アクチンフィラメント、微小管等々のような巨大分子機構の会合を可能にする。

非共有結合性の力の3つの基本的種類がある。すなわち、イオン相互作用、疎水性相互作用および水素結合である。

【0003】

タンパク質相互作用により例示されるイオン相互作用

何らかのpHで、タンパク質は、互いにまたは他の種類の分子とそれが結合することに関与しうる荷電基を有している。例えば、アスパラギン酸（Asp）やグルタミン酸（Glu）残基の負に荷電したカルボキシル基は、リジン（Lys）やアルギニン（Arg）残基の正に荷電したプロトン化アミノ基により引き寄せられうる。

イオン相互作用は、pHの変化に高い感受性がある。pHが落ちると、H⁺ はアスパラギン酸（Asp）およびグルタミン酸（Glu）のカルボキシル基（COO⁻）に結合し、それらの負の電荷を中和し、そしてH⁺ はリジン（Lys）およびアルギニン（Arg）のアミノ（NH₂）基の窒素原子上の占有されていない電子対に結合して、それらに正の電荷を与える。その結果、分子上の正味の電荷が変化する（より正に荷電する）だけでなく、その側鎖または主鎖の集団が他の分子およびイオンとイオン（静電的な）相互作用を有する機会の多くが変えられる。pHが上昇すると、H⁺がAspおよびGluのCOOH基から除去されて、それらに負の電荷を与え（COO⁻）、そしてH⁺がLysおよびArgのNH₃⁺基から除去されて、それらの正電荷を除去する。その結果、分子上の正味の電荷が変化し（より負に荷電する）、そしてやはり、その側鎖または主鎖の集団が他の分子またはイオンと静電的な相互作用を有する機会の多くが変えられる。

イオン相互作用は塩濃度にも感受性がある。塩濃度の上昇は、荷電残基に競合イオンを供与することによりイオニックな結合の強度を下げる。

【0004】

タンパク質相互作用により例示される疎水性相互作用

フェニルアラニンおよびロイシンのようなアミノ酸の側鎖（R基）は非極性であり、この故に水のような極性分子とはほとんど相互作用しない。この理由のために、球状タンパク質中の非極性残基の多くは分子の内側を向いており、一方、アスパラギン酸やリジンのような極性基群は、溶媒にさらされる表面にある。非極性残基が2つの異なる分子の表面にさらされている場合には、それら2つの“油性”の非極性表面が、互いに緊密に近寄り、それらの間の極性水分子を追いやるのが、エネルギー的に有利である。

疎水性相互作用の強度は、pHまたは塩濃度の変化によって、感知できるほど影響されない。

【0005】

タンパク質相互作用により例示される水素結合

水素結合は、強く電気陰性の原子（例えば、酸素、窒素）が水素原子に近づくとはいつも生じ、該水素原子は第2の強く電気陰性の原子と共有結合的に結合されている。

いくつかの一般例がある；タンパク質中の別々のペプチド結合の-C=O基とH-N-基の間（ヘリックスおよびコンフォメーションを生じる）；タンパク質中のセリンおよびスレ

10

20

30

40

50

オニン残基中の-C=O基とヒドロキシル(H-O-)基およびシステインのSH基の間、さらに糖の中のそれらとの間。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

非共有結合性相互作用は、一つ一つは弱いが集合すると強いという特性がある。非共有結合性相互作用の3つの種類すべては、共有結合(結合エネルギーは90-100 kcal/mole)と比較すると、一つ一つは弱い(ほぼ5kcal/mole程度)。中間の結合エネルギー(すなわち、15および70 kcal/moleの間)を有する結合の種類がある。本発明では、そのような種類の結合は、もし或る環境下でふたつのタンパク質性分子を会合させるためにそれらでは不十分であるならば、非共有結合性であるとみなされる。言い換えると、非共有結合性の結合は、互に作用する相当な数の相互作用が、構造を一体に維持するために必要とされるものである。これらの相互作用が有する限定的な強度は、相互に作用する基が互いに緊密に(1オングストロームまたはそれ以下)近づくことができることを必要とする。

10

【0007】

従って、2以上の構成員を含む多量体は、ひとつの観点では、もし90-100 kcal/mole未満の結合エネルギーをそれぞれ有する少なくとも3および好ましくは少なくとも5の結合により、2またはそれ以上の構成員が連結されているならば、非共有結合性の結合により互いに保持されていると言われる。2本のタンパク鎖を連結する典型的なシステインジスルフィド架橋は約65 kcal/moleの結合エネルギーを有する。しかしながら、この結合の強度は、還元性/酸化性の環境に非常に依存している。従って、本発明では、2またはそれ以上の構成員の鎖を連結する結合が、65 kcal/mole未満、典型的には20 kcal/mole未満の結合エネルギーをそれぞれ有するときは、多量体は非共有結合性の結合により互いに保持されていると言われる。通常は、該結合のそれぞれは約5 kcal/moleの結合エネルギーを有する。従って、非共有結合性の結合により互いに保持される多量体中の2またはそれ以上の構成員は、構造を一体に維持するために共に作用する相当な数の非共有結合性相互作用を有し、そして少なくとも2つの相互作用する表面の実質的な面積が互いに緊密に近づくことができるようにする表面トポグラフィを有する;すなわち、それらはお互いにフィットしなければならない。

20

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、非共有結合性相互作用の領域を介して、タンパク質性多量体分子中の構造を一体に維持するために、多くの弱い結合が必要とされる特徴を利用する。本発明では、多量体中の該非共有結合性相互作用に関与する少なくとも1の構成員が、多量体の該少なくとも1の構成員の少なくとも1の共有結合を開裂することにより、少なくとも2の新規構成員に分解される。1の共有結合の開裂は、もともとの多量体よりもひとつ多い構成員を有する多量体を生じる。2の共有結合の開裂は、2つ多い構成員を有する多量体を生じる、など。多量体中の少なくとも1の共有結合の開裂は、多量体の構成員当たりの非共有結合性相互作用の数の減少を生じる。本発明では、この減少が、多量体から少なくとも1の構成員の解離を引き起こすために用いられる。本発明では、共有結合の開裂は、非共有結合性の結合が多量体の一体性を維持するために不十分であるように、多量体中の構成員当たりの非共有結合性の結合の数を減らすために用いられ、または共有結合の開裂は、変更が起こった構成員のコンフォメーションを変化させるために用いられ、そしてその結果、多量体から少なくとも1の構成員の遊離を引き起こす。少なくとも1の構成員の遊離の後、生じた構成員は単量体、多量体またはそれらの組み合わせでありうる。ペプチド中の共有結合の開裂は、酵素的な手段、化学的な手段または物理的な手段によりなされる。本発明で用いられた共有結合の開裂は、好ましくは化学的または物理的であり、すなわち、好ましくは非酵素的である。より好ましくは、結合の開裂は化学的または光により誘発可能なものである。さらには、共有結合はペプチド骨格中で開裂されることが好

40

50

ましい。好ましく開裂される共有結合は、ペプチド結合の隣にある結合である（従って、窒素原子の反対側の結合である）。

【0009】

本明細書で用いられる語、タンパク質性多量体分子は、非共有結合性相互作用の領域を介して互いに会合される2またはそれ以上の構成員を含むタンパク質性分子を言う。少なくとも2の構成員は、非共有結合性相互作用を介して互いに連結されるのみであり、そして共有結合を介してではない。語「タンパク質性多量体分子」と「多量体タンパク質」は、本明細書中では交換可能に用いられる。本発明のタンパク質性多量体分子は概して少なくとも1のポリペプチドを含む。

【0010】

非共有結合性相互作用の領域という言葉は、2またはそれ以上の構成員が少なくとも3、好ましくは少なくとも5の非共有結合性の結合を介して互いに会合および相互作用する領域を示す。非共有結合性相互作用のこの領域は、好ましくは該2またはそれ以上の構成員を互いに連結する共有結合を含まない。全ての原子が該領域での非共有結合性相互作用に関与するわけではないことは、明白である。同様に、もしその領域が2の（ポリ）ペプチドが会合する領域であるならば、全てのアミノ酸が該領域での非共有結合性相互作用に関与することは必要とされない。

【0011】

「単量体」は、全ての非共有結合性の結合が破壊された場合に、構成要素がいまだ共有結合的に互いに会合されている分子を云うために、本明細書では用いられる。多量体中の1より多い単量体が、互いに同じまたは異なっていてよい。

【0012】

語「構成員」は、多量体の他の構成員と非共有結合的に連結されている多量体中の実体を云うために、本明細書では用いられる。これら2の構成員は共有結合を介して連結されていない。構成員は、好ましくはタンパク質性分子であるが、必ずしもそうである必要はない。構成員は概して（ポリ）ペプチドであるが、必ずしもそうである必要はない。本発明のタンパク質性多量体分子は、好ましくは多量体タンパク質である。本発明による多量体タンパク質は、好ましくは、ペプチドを有する第1の構成員および（ポリ）ペプチドおよび/またはタンパク質を含む少なくとも第2の構成員を含む。該ペプチドは、好ましくは該条件的反応基を含む。

【0013】

タンパク質性分子は、互いのペプチド性連結中に少なくとも2のアミノ酸を含む。それは、概して、互いのペプチド性連結中に、少なくとも8アミノ酸またはその機能的等価物を含む。

【0014】

本発明では、ポリペプチドはペプチド結合を介して互いに連結される少なくとも50アミノ酸またはその機能的等価物を含む。その折り畳まれていない状態では、ポリペプチドは概して線状分子であるが、（部分的に）環状であってもよい。ペプチドは概して、ペプチド結合を介して互いに連結される4ないし49アミノ酸を含む。好ましくは、ペプチドは3から49アミノ酸、好ましくは3から30、より好ましくは3から20アミノ酸を含む。本明細書中で用いられる「（ポリ）ペプチド」は任意のアミノ酸またはアミノ酸鎖を含みうる。アミノ酸は、例えばアルファ、ベータ、またはガンマあるいはより高級（オメガ）アミノ酸のような天然または合成アミノ酸でありうる、すなわち、1、2、3、またはそれ以上の炭素の間隔をアミノ基とカルボキシル基の間に含む。アミノ酸（鎖）は天然アミノ酸（鎖）または合成アミノ酸（鎖）あるいはそれらの組み合わせでありうる。ペプチドは、天然ペプチドまたは合成ペプチドあるいはそれらの組み合わせである。また、その折り畳まれていない状態では、ペプチドは概して線状分子であるが、（部分的に）環状であってもよい。ペプチドは、概して量的優位な三次構造をもたない。それは、概してさまざまな三次構造に適合する。本発明で用いられるペプチドは、概して多様な溶媒に容易に溶解することができる。そのような溶媒は、例えば生理的な塩化ナトリウム溶液のような

10

20

30

40

50

、生理的な溶液である。MHC分子のリガンドである抗原的なペプチドは、概してペプチド結合を介して連結された8ないし25アミノ酸を有する。(ポリ)ペプチドは修飾されうる、またはされない。典型的な修飾は、グリカン付加およびリン酸化のように、細胞機械により作られるようなものを含む。しかしながら、他の種類の修飾も本発明の範囲内である。

【0015】

アミノ酸の機能的等価物は、アミノ酸鎖中の1または複数のアミノ酸を置換しうる分子である。機能的等価物は好ましくは、(ポリ)ペプチドまたはペプチド類似鎖の内部部分を形成しうるように、2の離れた位置でアミノ酸と結合を形成することができる。機能的等価物は、天然の対応物を有する必要はない。そのような機能的等価物は本発明のペプチドまたは(ポリ)ペプチドに組み入れられうる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

本発明のひとつの観点では、開裂される共有結合は好ましくは、1の構成員鎖の中の2のアミノ酸またはその誘導体/類似体を連結する骨格の結合である。共有結合の開裂は、好ましくは、構成員中、好ましくはペプチドの構成員であって、その中で少なくとも1の共有結合を破壊されることを必要とするものの中に、条件的反応基を組み入れることによりなされる。本発明では、語「条件的反応基」は該構成員中に組み入れられる反応基を云うために用いられる。語“条件的”は、条件的に、すなわち、シグナルやトリガーに応答して活性化されうる反応基を云うために用いられる。条件的反応基の数は任意に変更されうる。条件的反応基は、例えば当初の(ポリ)ペプチド鎖中にそれを組み入れることにより、構成員中の正確な位置に配置もされうる。ひとつの実施態様では、多量体中で構成員と少なくとも1の他の構成員との非共有結合性相互作用の領域において共有結合が破壊されるように、1またはそれ以上の条件的反応基が配置される。他の実施態様では、多量体の他の構成員との相互作用の親和性が減少されるように、リガンド(例えば構成員)の好ましい立体配座が変化されるように、1またはそれ以上の条件的反応基が配置される。

20

【0017】

ひとつの観点では、非共有結合性相互作用の領域を介して互いに結合する少なくとも2の構成員を含むタンパク質性多量体分子(ここで、該少なくとも2の構成員のうち少なくとも1は、活性化されると、該構成員中で共有結合を開裂し、それにより該構成員を少なくとも2のより小さな構成員へと開裂するとこれは該領域中の非共有結合性相互作用の強度を減少させる、条件的反応基を含む)を本発明は提供する。構成員中の共有結合の開裂は、生じた鎖により多くの折り畳みの自由度を生じ、それにより該1またはそれ以上の生じた鎖が多量体中で有するいずれかの非共有結合性相互作用の強度を減少させる。好ましい実施態様では、該構成員は該非共有結合性相互作用の上記領域中で開裂される。これは、該領域中の非共有結合性相互作用の強度の最大級の減少を生じる。該条件的反応基により開裂される結合は、ペプチド鎖中に反応基を適当に配置することにより選択されうる。該構成員の開裂はより小さいサイズのペプチド鎖を生じる。該生じたペプチドの最も長いものは、該構成員よりも少なくとも20%、好ましくは少なくとも30%短いものであることが好まれる。

30

40

【0018】

本発明はさらに、非共有結合性相互作用の領域を介して互いに結合する少なくとも2の構成員を含むタンパク質性多量体分子(多量体)を提供し、ここで、該少なくとも2の構成員のうち少なくとも1は条件的反応基を伴う(ポリ)ペプチド鎖を含み、そして該反応基が活性化されると、該構成員中の共有結合が破壊されて、該(ポリ)ペプチドの開裂が生じ、少なくとも2のより小さな(ポリ)ペプチドに分かれ、それにより、該非共有結合性相互作用の強度が減少する。

【0019】

好ましい実施態様では、該条件的反応基は光感受性または過ヨウ素酸塩感受性の基を含む。これらの実施態様では、反応基を活性化する条件的段階は、所定の波長領域内の光の

50

存在または不存在、または過ヨウ素酸塩感受性基の過ヨウ素酸塩への曝露のいずれかである。好ましい実施態様では該光感受性反応基は紫外線感受性基である。条件的反応基は好ましくは(ポリ)ペプチド中に組み入れられる。好ましい実施態様では該紫外線感受性基は3-アミノ-3-(2-ニトロフェニル)プロピオン酸である(Carlos J. Bosques and Barbara Imperiali. *Journal of the American chemical society* 2003 vol. 125 page 7530-7531)。このアミノ酸は市販されておりAlpha Aesarから入手でき、固相ペプチド合成法に適合できるようにFmoc保護基により保護されるべきである。あるいはオルト-ニトロフェニル-グリシン(Alvie L. Davis, David R. Smith and Tommy J. McCord. *Synthesis and microbiological properties of 3-amino-1-hydroxy-2-indolinone and related compounds. Journal of Medicinal Chemistry* 1973, vol. 16, pp. 1043-1045)、またはそのような分子の機能的等価物である。3-アミノ-3-(2-ニトロフェニル)プロピオン酸の機能的等価物は3-アミノ-3-(4-ニトロフェニル)プロピオン酸である。オルト-ニトロフェニル-グリシンの機能的等価物はパラ-ニトロフェニル-グリシンである。

10

【0020】

他の好ましい実施態様では、該過ヨウ素酸塩感受性基は1,2-ジヒドロキシ部分またはその機能的等価物を含む。過ヨウ素酸塩と1,2-ジヒドロキシ系と等価な代替系がある。そのような系は、1-アミノ-2-ヒドロキシ系および過ヨウ素酸塩開裂部位を有するポリオール、炭水化物、糖-アミノ酸複合体である。ジヒドロキシエチレンペプチドの等価体は

Suivit Thaisrivongs, Alfredo G. Tomasselli,

20

Joseph B. Moon, John Hui, Thomas J. McQuade, Steve R. Turner, Joseph W.

Strohbach, W. Jeffrey Howe, W. Gary Tarpley, Robert L. Heinrikson.

Inhibitors of the protease from human immunodeficiency virus: design and modelling of a compound containing a dihydroxyethylene isostere insert with

high binding affinity and effective antiviral activity. *Journal of Medicinal*

Chemistry 1991 vol. 34, pp. 2344-2356; Suivit Thaisrivongs, Steve R. Turner,

Joseph W. Strohbach, Ruth E. TenBrink, W. Gary Tarpley, Thomas J.

McQuade, Robert L. Heinrikson, Alfredo G. Tomasselli, Joseph B. Moon, John

O Hui, W. Jeffrey Howe. Inhibitors of the protease from human

30

immunodeficiency virus: synthesis, enzyme inhibition, and antiviral activity of

a series of compounds containing the dihydroxyethylene transition-state

isostere. *Journal of Medicinal Chemistry* 1993, vol. 36, pp. 941-952; および Iwao

Ojima, Hong Wang, Tao Wang and Edward W. Ng. New approaches to the

asymmetric synthesis of dipeptide isosteres via beta-lactam synthon method.

Tetrahedron Letters 1998 vol. 39, pp. 923-926.

40

に示されている。もう一つの過ヨウ素酸塩感受性化合物である4-アミノ-4-デオキシ-L-スレオニン酸(ジオール含有アミノ酸構成ブロック)の合成は

James A. Musich and Henry Rapoport. *Synthesis of Anthopleurine,*

the alarm pheromone from anthopleura elegantissima *Journal of the American*

Chemical Society 1978, vol. 100, pp. 4865-4872.

に示されている。

【0021】

50

本技術は、タンパク質的な性質のリガンド（多量体）と相互作用する多くの様々なタンパク質性分子に対して利用されうる。好ましい実施態様では、本発明の多量体タンパク質は、第1の構成員は該条件的反応基を含むペプチドを含み、そして第2の構成員はポリペプチドを含み、該第1および該第2の構成員は非共有結合性相互作用の領域を介して互いに結合する、少なくとも2の構成員を含む。好ましくは、該多量体タンパク質はペプチド結合性タンパク質、好ましくはペプチド提示性タンパク質、および結合したペプチドである。そのようなペプチド結合性タンパク質の好まれる例は、SH₂-SH₃ドメインを伴うタンパク質、シャペロンタンパク質、または主要組織適合複合体分子である。好まれるシャペロンタンパク質は熱ショックタンパク質である。熱ショックタンパク質の例は、HSP70、gp96、gp110およびカルレティキュリンである。抗原（ペプチド）が取り付けられた熱ショックタンパク質は、例えば、免疫システムを特異的に刺激するために用いられる。この特異的な刺激は、例えば、パピローマウイルスにより引き起こされる病気や癌（例としてParmiani et al, 2004参照）のような、さまざまな病気と戦うのに役立つ。好まれる多量体は、主要組織適合複合体（MHC）分子またはその機能的部分、誘導體および/または類似体である。MHCはT細胞により認識される。T細胞はヒト免疫システム中で重大な役割を果たし、そして数多くの戦略が、この天然の防御システムを強化するため、および病原体または悪性腫瘍に対する免疫を高めるために開発されてきた。T細胞は特異的なリガンドに結合したMHC分子を認識し、特異的なリガンドを結合したMHC分子を製造する方法は多大な価値を有する。加えて、MHC分子は一連の他の受容体にも認識されるため、リガンドに結合したMHC分子の製造についての追加の理論的根拠を提供する。加えて、MHC分子に結合する疾病関連リガンドの定義づけは、診断および治療のいずれの目的にも有用である。

10

20

30

40

50

【0022】

リガンド-MHC複合体の重要な用途は、リガンドに占有されたMHC分子の複合体が、特定のT細胞集団を同定および定量するため、および疾病の進行に関する有効な細胞性免疫の確立を評価するために、医療分野において非常に有用な手段である、という事実によって説明される。MHC複合体の非常に大きな潜在能力は、臨床試験および認可された治療行為の免疫測定にある。加えて、MHC複合体は、病原体または悪性腫瘍に対する細胞性免疫療法のための特異的なヒトT細胞を単離するため、または骨髄移植のための調整物から望まれないT細胞を除去するために、応用されうる。加えて、MHC複合体は、T細胞で媒介される疾病において、望まれない特定のT細胞集団を選択的に除去するために用いられうる。

【0023】

定義されたりガンドで占有されたMHC分子の効果的な応用に対する主要な障害は、現在の製造方法の効率の悪さである。MHC分子、特にMHCクラス1分子の安定性は、抗原が結合されていないときに低い。従って、MHC分子は主として、製造工程の間中ずっとリガンドが結合されているという工程で、生産される。この結合されたりガンドの選択のリガンドへの交換が用いられてきたが、この工程は、穏やかな条件下（すなわち中性のpH付近および生理的食塩水濃度）ではリガンドの解離が遅いため、効率が悪い。結合されたりガンドの解離は、MHC分子をより厳しい条件（例えば、酸性またはアルカリ性のpH）にさらすことにより促進されうるが、これはMHC分子の不安定化にもつながる。従って、組み換えMHC分子の産生方法として現在最も幅広く認められている技術は、各一つのリガンドについて、リガンドで占有されたMHC分子の一つのバッチの別々の生産である。これは、唯一つの適用に向けられた小さなバッチを与え、非常に時間のかかるおよび高価な生産過程である。

Bakker AH, Schumacher TN. MHC multimer technology: current status and future prospects. Curr Opin Immunol. 2005 Aug;17(4):428-33. Review.

【0024】

MHC分子は2つのクラス、MHCクラス1およびクラス2分子、に分けられる。MHC分子のいずれの種類もペプチドに結合することができ、かつT細胞にそれらを提示することができ

る。MHC分子に依存して、ペプチドが結合することに関与するドメインは様々な命名法を有する。MHCクラス1分子のアルファ1およびアルファ2ドメインにより例示されるように、特異的にペプチドに結合するために典型的に2つのドメインが必要とされる。これらのドメインはMHC分子の機能的部分と考えられる。すなわち、機能的部分は概して、MHC分子中でペプチドが結合することに関与する2つのドメインを含む。天然のMHC分子は概して、ペプチドが結合することに直接的に関与しないいくつかの他のドメインを含む。そのようなドメインは概して他の機能を有する。例えば、膜貫通ドメインまたは細胞質ドメインがある。加えて、そのようなドメインはペプチド結合性ドメインの折り畳まれたコンフォメーションの形成に役割を果たしうる。他のドメインは、ペプチド結合性ドメインのように、細胞外にありうる。全てのこれら他のドメインは一つの特徴を共有する。それらはペプチドの結合には直接関与しない。従って本発明では、それら他のドメインはMHC分子の一部に存在しうるか、または存在しなくてもよい（該部分がMHC分子中のペプチドの結合に関与するドメインの少なくとも2を含む限り）。好ましくは、該MHC分子は水溶性MHC分子であり、好ましくは

10

Garboczi DN, Hung DT, Wiley DC. HLA-A2-peptide complexes:

refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 15;89(8):3429-33.

に示されているものである。

20

【0025】

好ましい実施態様では、該MHC分子はMHC複合体分子である。

【0026】

MHC分子の機能的誘導体は、天然物から導かれた分子ではなくて、MHC分子とのペプチド結合特性を種類の点で（必ずしも量の点でなく）共有している分子である。例えば、天然のMHC分子と比べて1以上のアミノ酸の違いを有するが、ペプチド結合機能を維持する、改変されたMHC分子は、本発明の文脈で機能的誘導体である。同様に、2以上のMHC分子からのペプチド結合性ドメイン（の部分）を含み、かつペプチドに結合しうる分子も、機能的誘導体とみなされる。概して許容される改変は、ペプチド結合性ドメイン中にないものである。許容される他の変異または改変は、MHC分子のペプチド結合性ドメインの可変ドメイン中にある。そのような改変は概して、該MHC分子（すなわち、該ペプチドが結合されている）の結合特異性を変える。そのため、そのような改変も、本発明のMHC分子の機能的誘導体とみなされる。

30

【0027】

いくつかの分子は、MHC分子のペプチド結合特性を共有するが、細胞中で異なる目的を果たすために進化してきた。そのような分子は本発明のMHC分子の機能的類似体とみなされる。（ポリ）ペプチド結合に関与するドメインは、MHC分子からのそのようなドメインと組み合わせられうる。MHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体は、通常はMHC分子に伴わない他の部分をさらに含む。そのような他の部分は、例えば、標識、タグ、会合および/または多量体化ドメイン、およびその他の要素を含む。

40

【0028】

本発明の技術は、MHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体に結合したリガンドを特異的に不安定化させるために用いられうる。MHC結合リガンドの不安定化は、その結果、厳しい条件へさらすことなく、リガンド不含のMHC分子の産生をもたらす。生じたリガンド不含のMHC分子は、その後、リガンド不含形で用いられうるか、または1または複数の選択のリガンドが取り付けられうる。

【0029】

このように、本発明の好まれる観点では、MHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体は、ペプチド抗原（リガンドとも云われる）を、該MHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体のペプチド結合性の溝に含む。好ましくは、

50

誘発性攻撃基または条件的反応基がペプチド抗原中に存在する。なぜならば、これはほかの点では改変されていないMHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体からのペプチド抗原の遊離を保証するからである。生じたりガンド不含のMHC分子はそのまま用いられうるか、あるいは、1以上の他のリガンドを取り付けられうる。この目的のために、本発明はさらに、本発明の多量体タンパク質を含む組成物を提供する。そのような組成物は、MHC分子上に取り付けられるべきリガンドを備えられる。従って、主要組織適合複合体(MHC)分子、またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体であって、ここで該構成員のうち少なくともひとつは該分子のペプチド結合性の溝の中のペプチド抗原であり、かつ該ペプチド抗原は該誘発性開裂基または条件的反応基を含むものが、さらに提供される。組成物は追加的ペプチドも含みうる。好ましい実施態様では、該追加的ペプチドは、該MHC分子のペプチド結合性の溝に結合することができる抗原性ペプチドであり、すなわち該MHC分子のためのリガンドである。ペプチドの攻撃基は誘発されることができ、それにより多量体からのペプチド断片の遊離を生じる。もし、追加的ペプチドも組成物中に存在しているならば、このペプチドは直ちに脱離断片に取って代わりうる。従って、生じたMHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体は追加的ペプチドを取り付けられる。このように、この組成物は新たに取り付けられたMHC分子(またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体)および脱離ペプチドの断片を含む。

【0030】

他の観点では、本発明は、活性化されると、一時的ペプチドをMHC分子に対する弱められた結合親和性を示す少なくとも2のより小さなペプチドへと開裂する誘発性開裂基または条件的反応基を有する該一時的ペプチドを含むMHC分子を製造することを含む、MHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または誘導体、あるいは追加的ペプチドを含むMHC分子複合体を製造する方法を提供する。該一時的ペプチドは、好ましくは、該MHC分子または該MHC分子の機能的な部分、誘導体および/または類似体のペプチド結合性の溝に存在する。該方法は好ましくはさらに、該開裂基または条件的反応基の活性化を含む。活性化の結果として、一時または脱離ペプチドはより小さなペプチド(またはアミノ酸)に切断され、それにより非共有結合性相互作用の領域中での非共有結合性相互作用の強度を減少させる。これは、MHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体からの脱離ペプチド(またはその断片)の容易な除去を可能とする。除去は厳しい条件を必要とせず、そのため分子の活性を阻害しないか、あるいは最小限度のみ阻害する。遊離MHC分子は、目的とするペプチドを備えられることができる。本発明の方法を用いると、脱離ペプチドを有する大量のMHC分子を作成することが可能である。この調整物は、その後、本発明の方法により、様々な異なるリガンド(抗原性ペプチド)を含むMHC分子を産生するために用いられうる。これは、目的の抗原性ペプチドとの交換を可能とする脱離ペプチドを開裂する開裂基の活性化(誘発)のみを必要とする。開裂基または条件的反応基の誘発、脱離ペプチド断片の解離、および目的ペプチドのMHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体への会合が1つの工程で行われうる。従って、本発明はさらに、該MHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体を該目的ペプチドとともに、開裂した一時的ペプチドを該MHC分子から効果的に除去する条件下で温置することをさらに含む、本発明の方法を提供する。さらに、該目的ペプチドの該MHC分子への結合を検出することをさらに含む、本発明の方法が提供される。この観点は例えば、診断の目的に有用である。結合は様々な方法で検出されうる、例えば、該MHC分子との関連で提示される該ペプチドに特異的なT細胞受容体または抗体を介して検出される。結合は好ましくは、該ペプチドに会合されている標識を検出することにより検出される。これは、例えば標識されたストレプトアビジンまたはその類似体を介して、後で視覚化されうるビオチンのような特異的結合分子で該ペプチドにタグ付けすることによりなされうる。好ましい実施態様では、該ペプチドは該標識を含む。このようにして、該MHC分子に結合したどんなペプチドでも直接的に検出されうる。好ましくは結合の検出は、好ましくはハイスループット設定で、スクリーニング目的のために行われる。好まれるスクリーニング目的は、該ペプチドの該MHC分子への結合に影響する化合物のスクリーニングである。例えば

10

20

30

40

50

、被検のペプチドまたは小分子は、該ペプチドが該MHC分子に結合することと競合しうる。競合は、該ペプチドの減少された結合を検出することにより、検出されうる。該ペプチドが該MHC分子に結合することを検出する好ましい方法は、蛍光異方性によって測定される。このようにして、該結合がなされるサンプルの操作が減少されうる。サンプル操作の減少は、ハイスループット設定にとって望まれる特性である。該ペプチドの結合を検出する他の好まれる手段は、放射能の測定または、MHCコンフォメーション依存性の結合体、好ましくは抗体、またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体の結合を測定することである。他の好まれる手段は、該ペプチド、MHC分子の結合体に特異的なT細胞受容体の使用を含む。好まれる実施態様では、該ペプチドの該MHC分子への結合の阻害または増強が測定される。好ましい実施態様では、該方法は、被検または対照化合物の存在下で該目的ペプチドの結合を判定するために用いられる。

10

【0031】

本発明はさらに、本発明の方法により入手可能なMHC分子を提供する。さらに、本発明は、本発明によるMHC分子を含む組成物を提供し、ここで該組成物は、条件的反応基を含むペプチドを含むMHC分子複合体またはその誘導体、および追加的ペプチドを含むMHC分子複合体を含む。本発明の多量体はさらに、本発明の多量体からそれらを区別するために、MHC多量体の複合体として、またはMHCテトラマーと更に呼ばれるさらに大きな構造体中に組み込まれうる。そのような複合体は、T細胞受容体を運ぶ粒子または細胞に対して、単独MHC多量体よりも、より高い親和性を有する。そのため、そのような複合体はT細胞集団の分析において重要な手段である。従って、本発明はさらに、本発明の少なくとも2の多量体、または本発明の少なくとも2のMHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体、あるいはそれらの組み合わせを含む複合体を提供する。2、3、4および5のMHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体を含む複合体を作成するための手段および方法は、当技術分野では利用可能である。従って、本発明はさらに、2、3、4および5のMHC分子またはその機能的な部分、誘導体および/または類似体を含む複合体を提供する。好ましい実施態様では、該複合体は同じT細胞受容体特異性を有する複数のMHC分子を含む。しかしながら、この要求は必ずしもあるわけではない。本発明の方法を用いてMHC分子が様々なペプチドを備えられうる相対的な容易さを考慮すると、2またはそれ以上のT細胞受容体特異性を有する複合体は本発明の範囲内である。本発明はさらに、本発明による少なくとも2の多量体、本発明による組成物、または本発明のMHC分子または機能的な部分、誘導体および/または類似体を含む、固体表面を提供する。好ましい実施態様では、該固体表面は、本発明の複合体、好ましくは単一のペプチド、または同じ疾病または病原体に関連する複数のペプチドを含む複合体を備えられる。固体表面はビーズでありうる。固体表面はガラスまたは金属の表面でありうる。本表面は、本発明の多量体、組成物または複合体の被覆に先立って前処理を受けうる。そのような前処理は、Soenらにより示されている(PLoS biology; 2003: vol 1, page 429-438) ポリアクリルアミド膜被覆を含みうるが、それに限定されない。本発明はさらに、本発明の多量体、組成物または複合体を含むマイクロアレイを提供する。抗原性ペプチドに結合されたMHC分子複合体を含む(マイクロ)アレイを作成する手段および方法は、上述のSoenらにより記載されている。本発明の(マイクロ)アレイの産生に関する手引きとしては、該参考文献を参照されたい。

20

30

40

【0032】

驚くべきことに、本発明は、H5N1型株中に新規のインフルエンザA型核タンパク質T細胞エピトープを発見した。興味深いことに、該新規エピトープは、H5N1型株中およびその他多くのインフルエンザA型株中に発見された古典的なエピトープと比べて、実質的に大きな免疫原性を有している。さらに、該新規エピトープは過去数年のH5N1型株の間で共有されているが、より古いインフルエンザA型株からは区別され、このことは、それを、古典的なエピトープよりも現在および将来の診断および治療の目的のためにより適当なエピトープとする。本発明は該H5N1型株エピトープ配列を含むペプチドを提供する。従って、本発明は、アミノ酸配列AMDSNTLELを含む、単離されたおよび/または合成されたペプチドを

50

提供する。さらに、本発明は、ワクチン中で、アミノ酸配列AMDSNTLELを含む、単離されたおよび/または合成されたペプチドを使用する方法を提供する。インフルエンザに対するワクチンの調製のために、アミノ酸配列AMDSNTLELを含む、単離されたおよび/または合成されたペプチドを使用する方法も提供される。本発明のペプチドは、例えば該ペプチドおよび免疫増強剤を含むワクチンにおいて個人の免疫系に提供される。ひとつの実施態様では、本発明は、アミノ酸配列AMDSNTLELを含む単離されたおよび/または合成されたペプチド、および任意的に免疫増強剤および/または適当な添加剤を個人に与えることを含む、インフルエンザに対して該個人を免疫する方法を提供する。個人を免疫するという言葉は、本明細書では、個人が該ペプチドに対する免疫反応を生じることを意味する。本発明はさらに、アミノ酸配列AMDSNTLELを含むペプチドを含む融合タンパク質を提供する。本発明はさらに、該AMDSNTLELペプチドまたは該融合タンパク質をコードする核酸を提供する。

10

【0033】

ひとつの実施態様では、本発明は、アミノ酸配列AMDSNTLELを含む単離されたおよび/または合成されたペプチドを含む、本発明によるMHC分子を提供する。本発明のひとつの実施態様では、本発明による該MHC分子はエピトープ特異的T細胞の検出のためにある。該インフルエンザは好ましくはH5N1型株である。診断するインフルエンザウィルスは、好ましくはインフルエンザウィルスの現在の変異株である。ひとつの実施態様では、本発明は、インフルエンザを診断するための組成物の調製のために、本発明によるMHC分子を使用する方法を提供する。さらなる実施態様では、本発明は、本発明によるMHC分子を個人の血液サンプルに与えること、および該血液サンプル中の細胞に該MHC分子が結合することを分析することを含む、該個人におけるインフルエンザを診断するための方法を提供する。該血液サンプル中の該細胞は、好ましくはT細胞である。好ましい実施態様では、個人におけるインフルエンザを診断するための方法は、T細胞の反応を検出することを含む。

20

【0034】

実施例

方法：

MHC多量体およびMHC多量体の複合体（MHCテトラマー）の作成：

MHCクラス1複合体（MHC多量体）が、軽微な改変を施されて前述のとおり準備された（1）。HLA-A2.1-ペプチド多量体が以下の3つのペプチドを伴い産生された：インフルエンザA型マトリックス58-66（配列GILGFVFTL）および2のインフルエンザA型マトリックス58-66変異体GIL*FVFTLおよびGILGFVF*L（*は3-アミノ-3-(2-ニトロフェニル)プロピオン酸である）。MHCクラス1ペプチド多量体がその後精製され、BirAによりビオチン化され、精製され、そして16%グリセロール中に-20 で保存された。

30

【0035】

紫外線誘発のペプチド遊離およびペプチド交換：

MHC多量体または、表示されている場合には、野生型インフルエンザA型マトリックス58-66エピトープあるいはこのエピトープのG4*またはT8*変異体を含むMHC多量体のテトラマー複合体が、MHCクラス1結合性ペプチドの存在下または非存在下において20 mM Tris-HCl、pH 7.0/150mM NaCl/ 0.5 mM ジチオトレイトール（DTT）中で、紫外線（CAMAG、366 nm）に1時間さらされた。その後、複合体はペプチド不含MHCクラス1複合体の解離を誘導するために、15-45分間37 にさらされた（2）。サンプルは、その後、MHCの解離を判定するためにゲルろ過クロマトグラフィーにより分析され、またはMHC多量体の4量体の複合体（MHCテトラマー）を産生するためにフィコエリトリン標識されたストレプトアビジンとともに温置された。MHCテトラマーはゲルろ過クロマトグラフィーにより精製され、その後の使用まで16%グリセロール中で-20 で保存された。

40

【0036】

MHCテトラマーの染色：

融解された末梢血単核球（PBMC）サンプルおよびCTLクローンが5分間、PE標識をされたMHCテトラマーとともに37 で温置され、FITC標識をされた抗CD8抗体が添加され、そ

50

して温置が15分間室温で引き続き行われた。FACS分析に先立って、細胞は、死細胞をゲートで除去することができるようにヨウ化プロピジウムで染色された。サンプルは、FACS caliburおよびCellQuestソフトウェア (Becton Dickinson) を用いてフローサイトメトリーにより分析された。前方および側方散乱パラメーターがリンパ球集団を定義付けるため用いられた。

【0037】

結果：

望むときに解離するペプチド-MHC複合体の形成。

その結合ペプチドが望むときに遊離されうるMHC多量体の産生の可能性を試験するために、野生型インフルエンザA型マトリックス58-66エピトープ、あるいは紫外線感受性 - アミノ酸3によりアミノ酸4または8のいずれかが置換された本エピトープの2つの変異体を有する、HLA-A2.1多量体を作成した(図1)。MHCクラス1多量体形成は3つのペプチド全てにとって効率がよく、そして形成された多量体はゲルろ過クロマトグラフィーにより精製された。生じたペプチド-MHC多量体が解離を誘発されうるかどうかを評価するために、該3種の多量体が、紫外線にさらされ、残りのペプチド不含MHCクラス1分子の解離を誘発するために37℃で温置され、その後ゲルろ過クロマトグラフィーにより分析された。母体となったインフルエンザA型エピトープを含むペプチド-MHC複合体は紫外線暴露に対してまったく非感受性であったのに対し(図2A上のパネル)、G4* (データは示されていない) またはT8*エピトープ(図2A下のパネル)のいずれかを含むMHCクラス1多量体の暴露は、回収されたMHC複合体の量に実質的な減少をもたらす。さらに、残存物質の溶出時間が出発物質の溶出時間よりも若干長かったことから示唆されるように、残存物質は、少なくとも部分的に、ペプチド-MHCクラス1多量体よりもむしろ遊離MHCクラス1重鎖から成るようである。

【0038】

HLA A2.1結合性ペプチドの添加によるMHCクラス1解離の保護。

MHCクラス1結合性リガンドの添加が、紫外線暴露後の紫外線感受性MHC複合体の解離を防ぐことができるかどうかを評価するために、同じ反応が、2つの異なるHLAA2.1結合性ペプチド(HY311-319; MART126-35(A2L変異体))のうちの1つ、あるいはHLA A3-結合性ペプチドGP100(614-622)のいずれかの存在下で行われた。母体となったインフルエンザA型エピトープを含むMHCクラス1分子に、3つのペプチドのうちのいずれか添加をすることは、多量体が紫外線に暴露されたかどうかに関わらず、MHCクラス1多量体の回収に影響せず、これはこの母体MHC多量体が両方の状況下で安定であるという知見(データは示さない)と一致する。重要なことに、HLA-A2.1と相互作用することが予想されないHLA A3-結合性ペプチドの添加は、紫外線感受性G4* (示されていない) またはT8*ペプチドを含むMHC多量体の回収の実質的な増大をもたらさないが(図2B)、いずれかのHLA A2.1結合性ペプチドの添加は回収量の相当な増加をもたらす(図2B)。これらのデータは、G4*またはT8*を含むMHC多量体を紫外線にさらすことで産生されるペプチド不含MHC分子は、既知のHLA-A2.1リガンドと効果的に結合しうるが、対照ペプチドとは結合しえない、という知見と一致する。

【0039】

紫外線感受性MHC多量体から産生されるMHC多量体の機能的なテトラマー複合体。

HLA-A2.1リガンドの添加により保護された紫外線感受性MHCクラス1多量体がこれらのリガンドに結合したかどうかを直接的に立証するために、MART126-35(A2L変異体)、インフルエンザA型マトリックス58-66、HY(SMCY)311-319またはCMVpp65 495-503ペプチドのいずれかの存在下で産生されたMHC多量体が精製され、MHC多量体のテトラマー複合体に変えられた。生じたMHCテトラマーはその後、MART1特異的T細胞クローン(図3)またはCMV pp65 495-503およびインフルエンザA型マトリックス58-66に特異的なCD8+T細胞を有する供血者からの末梢血単核球(図4)を染めるために用いられた。試験された全ての場合において、ペプチド交換後に産生されたMHCテトラマーは、従来のMHCテトラマーと比較して同等の感受性および特異性で抗原特異的T細胞を結合する。これらの実験は、ペプチ

ド交換により産生されたMHC多量体は、通常のペプチド-MHC多量体と構造的に区別することができず、pMHC-TCR相互作用（この場合、オリゴマー化に続く）を探查するのに用いられうることの公式の証拠を提供する。

【0040】

紫外線感受性MHCテトラマーから産生される機能的MHCテトラマー

MHCクラス1多量体の紫外線感受性4量体複合体においてもペプチド交換がなされうるかを立証するために、T8*を含むMHC多量体が4量体複合体に転化され、その後CMV pp65 495-503、MART1 26-35 (A2L変異体)、またはHY (SMCY) 311-319ペプチドのいずれかの存在下で紫外線にさらされた。生じた4量体MHC複合体はその後、CMV陽性の供血者の末梢血単核球を染色するために、追加精製をすることなく用いられた。注目すべきことに、CMV pp65 495-503エピトープの存在下でT8*を含むMHCテトラマーの紫外線暴露により産生されたMHCテトラマーは、通常のCMV pp65 495-503特異的MHCテトラマーと同じ頻度および同様の強度で、CMV特異的T細胞を検出する（図5）。この結合の特異性は、MART1 26-35 (A2L変異体)またはHY (SMCY) 311-319ペプチドのいずれかとの並行反応で調整されたMHCテトラマーは、この供血者のCD8+リンパ球への測定可能な結合を示さない、という事実により強調される。

10

【0041】

MHC交換技術の他の観点

紫外線交換技術が、標識を搭載するリガンドが結合することを受容できるMHC分子の産生に用いられた。MHC交換反応は、テトラメチルローダミン染料により標識されたペプチドリガンドの存在下で行われた。図6に示されているように、これらの反応のその後の分析は、この技術が、標識されたリガンド（この場合は蛍光ペプチド）の結合を許すために用いられうることを明らかにする。その結果、MHC交換技術は、そのような結合を増強または妨害しうる化合物（例えば、ペプチドおよび他の小さな分子）を選抜することにも用いられうる。そのような選抜の原理は、ここでは蛍光異方性を用いて例示され、図7に概説されている。

20

【0042】

既知のMHC結合性ペプチドの改変は、化学的な開裂に感受性のあるリガンドの産生を可能とし、ジオール含有構成ブロックがその中に入れられたインフルエンザA型マトリックス58-66ペプチドの変異体が製造された。そのような改変されたリガンドの例が図8に与えられている。そのような改変されたリガンドを過ヨウ素酸塩に曝露することは、図9に例示されているように、これらのリガンドの開裂をもたらす。

30

【0043】

考察：

本データは、選択のペプチドにより占有されたMHC複合体の産生のための新規な方法を示す。そのような複合体の産生における主な制限は、ペプチド不含MHC分子の不安定性であった。その結果、組み換えMHC分子の産生のために現在幅広く認められている技術は、それぞれ一つのリガンドについてのリガンドに占有されたMHC分子の一バッチの別々の製造である。これは、非常な時間の消費と費用のかかる生産過程という結果になり、たった1つの適用のために向けられた小さなバッチを与えることになる。ここで、我々は、MHC複合体それ自身の安定性には直接的に影響しない条件への曝露による、それまで結合していたリガンドの選択的な遊離により、選択のリガンドによって占有されたMHC分子が産生されうることを示す。本一連の実験では、MHCに結合したリガンドの解離は、光感受性のペプチド変異体の使用によりなされた。しかしながら、そのような解離は、他の定義された条件に感受性のあるペプチド変異体の使用により、同様によくなされうることは明らかである。特に、化学的な開裂に感受性のペプチド変異体を用いたペプチドMHC複合体の開裂が、この点において有益であると判る。加えて、化学的または光誘発的な改変を通じた、MHCに対する結合リガンドの減少された親和性を誘導することにより、ペプチド開裂なしでも解離がなされうる。さらに、ここではMHCクラス1分子について、リガンド交換のアプローチが開発されたが、このアプローチはリガンドに占有されたMHCクラス2分子または

40

50

非古典的MHC分子（CD1およびQa 1分子により例示される）を調整するためにも、同様に有効である。

【0044】

化学的または光誘発的ペプチド放出により産生された組み換えMHC分子は、臨床的または前臨床的な研究で現在使用されているMHC分子の膨大なコレクションを産生するためにかなり用いられるだろう。加えて、単純な交換を通じて所望のリガンドによって占有されたMHCリガンドを産生する能力は、抗原特異的T細胞の選択的な除去または濃縮に用いられる、GMP品質のMHC分子を生産するための取り組みを非常に容易にする。最後に、予備成形されたMHC複合体上でペプチド交換を行う能力は、ペプチド抗原の大きなコレクションによって占有されたMHC複合体のマイクロアレイを産生するための実行可能な戦略を形成する。そのようなMHCマイクロアレイは、抗原特異的T細胞レパトリーの大量分析の有効な手段となりうる（3）。

【0045】

[参考文献]

1. Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 274: 94-96 (1996).

2. Schumacher, T.N.M., Heemels, M-T, Neefjes, J.J., Kast, W.M., Melief, C.J.M. and Ploegh, H.L. Direct binding of peptide to empty MHC class I molecules on intact cells and in vitro. *Cell* 62; 563-567 (1990).

3. Soen Y, Chen DS, Kraft DL, Davis MM, Brown PO. Detection and Characterization of Cellular Immune Responses Using Peptide-MHC Microarrays. *PLoS Biol.* 1:E65:pp 429-438 (2003).

4. Parmiani G, Testori A, Maio M, Castelli C, Rivoltini L, Pilla L, Belli F, Mazzaferro V, Coppa J, Patuzzo R, Sertoli M.R., Hoos A, Srivastava P.K. and Santinami M. Heat shock proteins and their use as anticancer vaccines. *Clinical Cancer Research*, 10; 8142-8146 (2004).

【0046】

図面の説明

図 1

光開裂法：1A) 1の構造、改変されていないインフルエンザA型58-66エピトープ。1B) 光開裂反応。1C) 3の構造、T8*改変光開裂性インフルエンザA型58-66エピトープ。

【0047】

図 2

紫外線誘発ペプチド交換の生化学的分析。2A) 紫外線感受性リガンドを含むMHC多量体は紫外線曝露に感受性である。2B) 紫外線にさらされた紫外線感受性MHC多量体はMHC結合性ペプチドの添加により安定化されうる。

【0048】

図 3

紫外線感受性MHC多量体から産生されたMHCテトラマーは抗原特異的CTLクローンを染色

する。紫外線感受性MHC多量体が、表示されたペプチドの存在下で紫外線にさらされ、MHC多量体のテトラマー複合体に転化された。このように産生された、HY(SMCY)311-319ペプチド（左下のパネル）またはMART126-35（A2L変異体）ペプチド（右下のパネル）のいずれかを含むテトラマーが、MART126-35特異的CTLクローンを染色するために用いられた。対照として、同じクローンが同じエピトープを含む古典的MHCクラス1テトラマーを用いて染色された（上のパネル）。

【0049】

図4

紫外線感受性MHC多量体から産生されたMHCテトラマーは、抗原特異的末梢血T細胞を染色する。紫外線感受性MHC多量体は表示されたペプチドの存在下で紫外線にさらされ、MHCテトラマーに転化された。このように産生された、CMV pp65 495-503ペプチド（左下のパネル）またはインフルエンザA型マトリックス58-66ペプチド（右下のパネル）のいずれかを含むテトラマーが、CMV pp65 495-504およびインフルエンザA型マトリックス58-66に特異的なCD8+T細胞を有する供血者からの末梢血単核球を染色するために用いられた。対照として、同じPBMCが、同じエピトープを含む古典的MHCクラス1テトラマーを用いて染色された。

10

【0050】

図5

紫外線感受性MHCテトラマーから産生されたMHCテトラマーは抗原特異的末梢血T細胞を染色する。紫外線感受性MHCテトラマーが表示されたペプチドの存在下で紫外線にさらされ、追加精製されていない抗原特異的T細胞を染色するために使用された。CMV pp65 495-503ペプチド（左から2番目のパネル）、あるいはMART126-35（A2L変異体）またはHY(SMCY)311-319ペプチド（2つの右側のパネル）のいずれかを含むMHCテトラマーが、CMV pp65 495-503 CD8+T細胞を有する供血者からの末梢血単核球を染色するために用いられた。対照として、同じPBMCが、CMV pp65 495-503ペプチドを含む古典的MHCクラス1テトラマーを用いて染色された（左側のパネル）。

20

【0051】

図6

照射前の光解離性ペプチド/HLA A2.1複合体のゲルろ過のグラフ（1）、救助なしでの照射後（2）、C*がテトラメチルローダミン染料により標識されているペプチドFLPSDC*F PSVの存在下での照射後（3）。左パネル）230 nmでの紫外線検出、右パネル）蛍光検出（励起530 nm、発光550 nm）。

30

【0052】

図7

蛍光異方性スクリーン。ペプチド不含MHC分子が暫時のリガンドの開裂により産生される。蛍光エピトープの結合が、蛍光異方性の測定または蛍光検出により観察された。この方法により、そのような結合を妨害または容易にするペプチド性または非ペプチド性リガンドが同定されうる。

【0053】

図8

ジオールに基づく化学的開裂可能な暫時のペプチドおよび対応する開裂産物。ジオールを含む部分が四角で囲まれている。

40

【0054】

図9

NaIO₄によるMHC結合性ペプチドの開裂。ジオール含有構成ブロックを位置8（上）または4（示されていない）に有するHLA-A2.1結合性M1ペプチドのペプチド変異体が、化学的な合成により製造された。ペプチドはその後、1 mM NaIO₄への1時間の曝露の前（下）または後（上）に、LC-MSにより分析された。

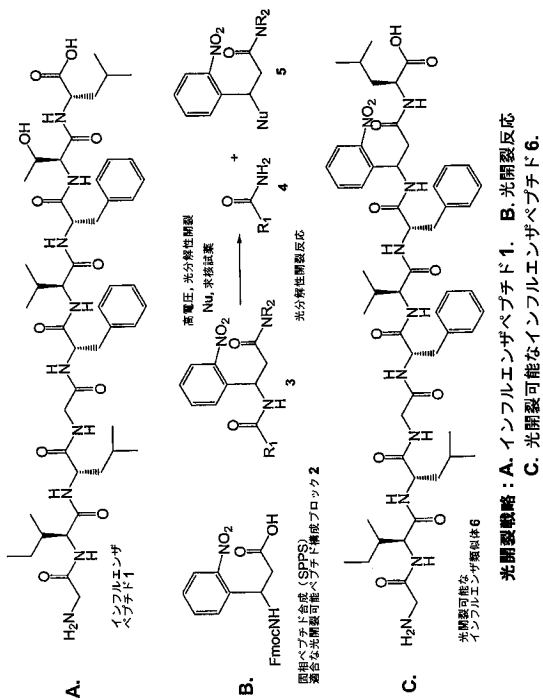
【図面の簡単な説明】

【0055】

50

- 【図 1 A】光開裂反応を示した図である。
- 【図 1 B】酸化性過ヨウ素酸塩で媒介される開裂反応を示した図である。
- 【図 2 A】ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出物の吸光度を示すグラフである。
- 【図 2 B】ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出物の吸光度を示すグラフである。
- 【図 3】フローサイトメトリーの結果を示す図である。
- 【図 4】フローサイトメトリーの結果を示す図である。
- 【図 5】フローサイトメトリーの結果を示す図である。
- 【図 6】ゲルろ過クロマトグラフィーの溶出物の吸光度を示すグラフである。
- 【図 7】蛍光異方性選抜の方法を示す図である。
- 【図 8】リガンドおよびその開裂反応を示す図である。
- 【図 9】ペプチドを LC - MS により分析した結果を示す図である。

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】

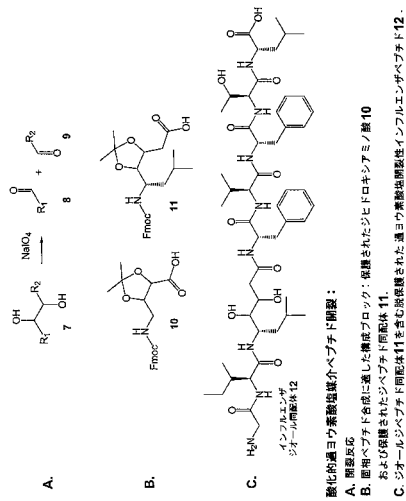


図 1A

図 1B

【 図 2 A 】

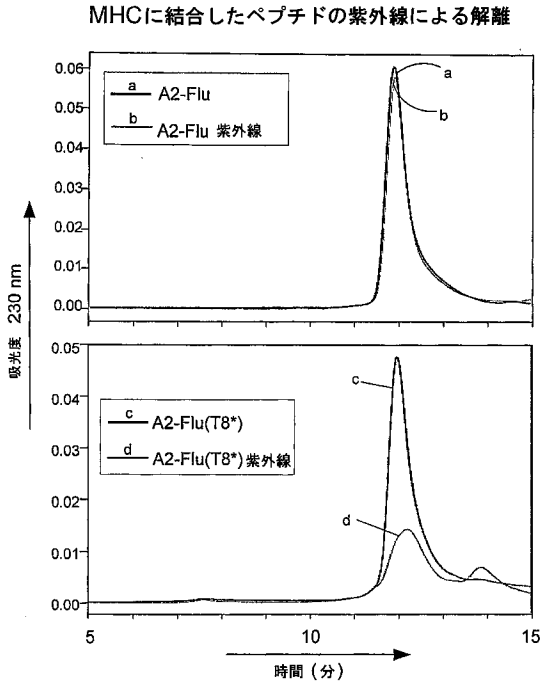


図 2A

【 図 2 B 】

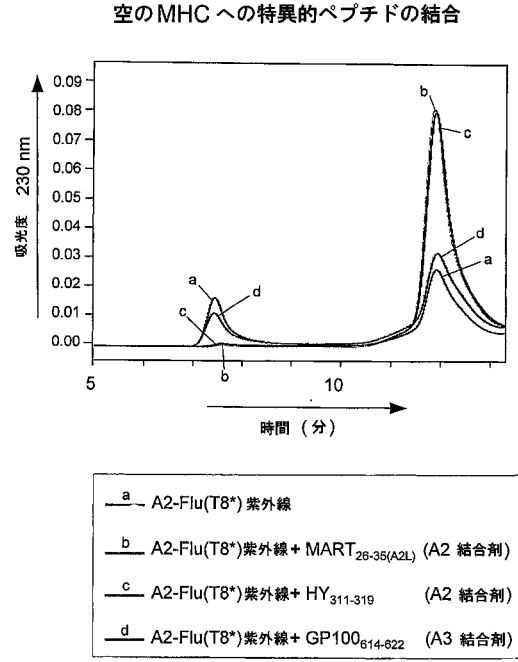


図 . 2B

【 図 3 】

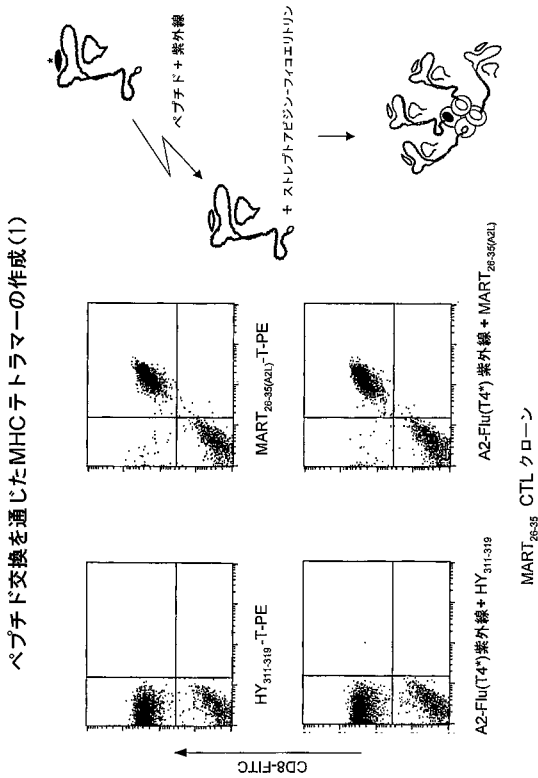


図 . 3

【 図 4 】

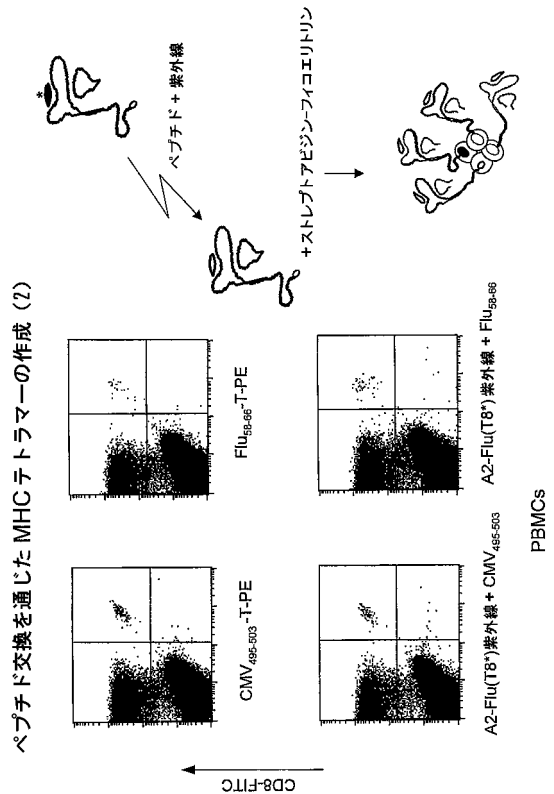


図 . 4

【 図 5 】

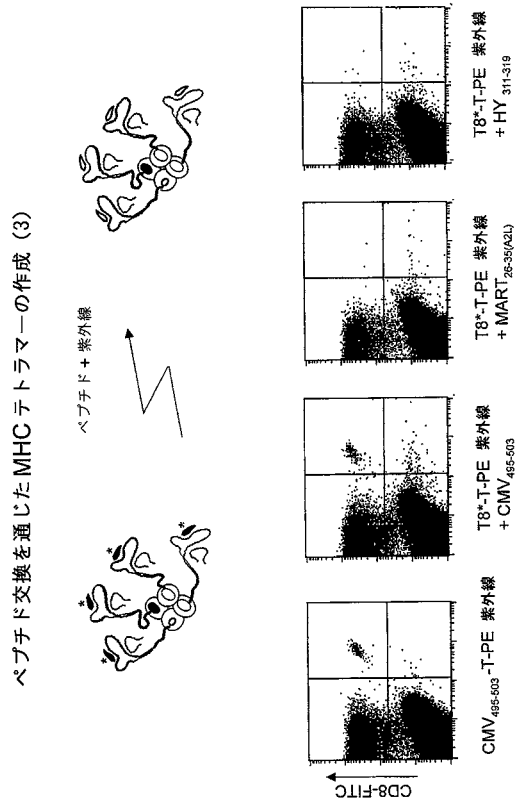


図 . 5

【 図 6 】

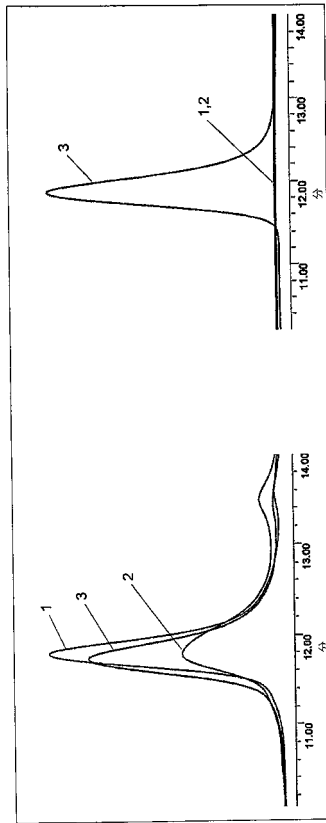


図 . 6

【 図 7 】

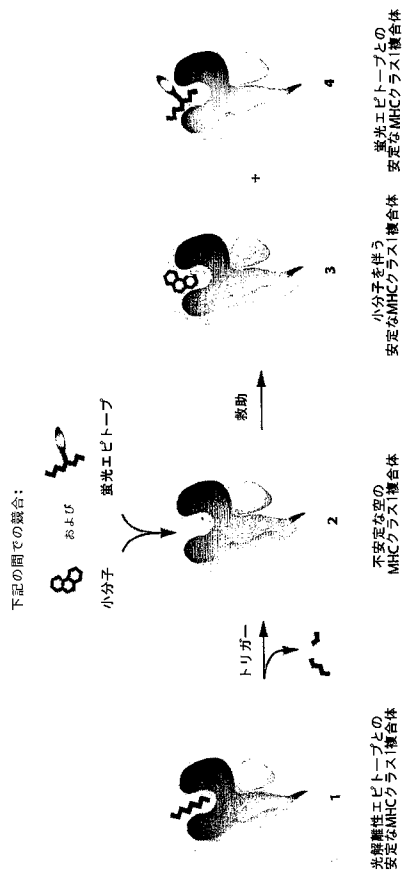


図 . 7

【 図 8 】

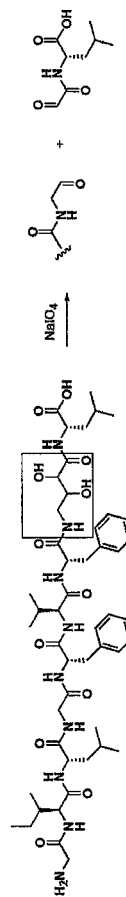


図 8

【 図 9 】

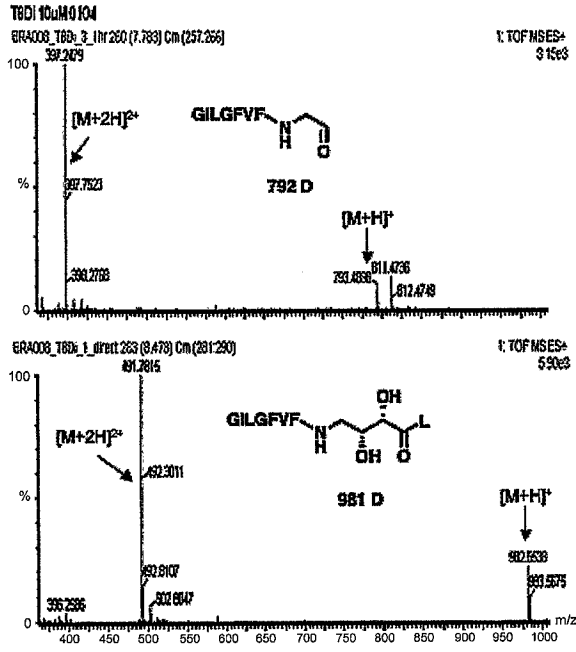


図 9

【 配 列 表 】

2008528484000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/NL2006/000038
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 C07K19/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, SCISEARCH, CHEM ABS Data, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	THE 2005 MIDWINTER CONFERENCE OF IMMUNOLOGISTS AT ASILOMAR, 22.01.2005-25.01.2005, [Online] 2005, XP002320522 Retrieved from the Internet: URL: http://www.midwconfimmunol.org/element/filemgr_repository/Schumacher.pdf [retrieved on 2005-03-03] the whole document	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 9 March 2006		Date of mailing of the international search report 26.07.06
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Bayer, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/NL2006/000038

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>PENG L ET AL: "Synthesis and characterization of photolabile choline precursors as reversible inhibitors of cholinesterase: Release of choline in the microsecond time range" JOURNAL OF ORGANIC CHEMISTRY 1996 UNITED STATES, vol. 61, no. 1, 1996, pages 185-191, XP002320523 ISSN: 0022-3263 the whole document, especially page 188 right-hand column third paragraph</p>	1,3,4,7, 18
X	<p>WO 03/016512 A (MAX-DELBRUECK-CENTRUM FUER MOLEKULARE MEDIZIN; FALK, KIRSTEN; ROETZSCH) 27 February 2003 (2003-02-27) page 2, line 16 - page 3, line 16 page 5, line 23 - line 30 page 9, line 26 - page 10, line 4</p>	1,2, 6-18, 20-24
A	<p>WO 2004/007528 A (DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC; WUCHERPFENNING, KAI, W; SETH, NILUF) 22 January 2004 (2004-01-22) the whole document, especially page 15 line 31 - page 17 line 21</p>	1-24
A	<p>SCHUMACHER T N M ET AL: "DIRECT BINDING OF PEPTIDE TO EMPTY MHC CLASS I MOLECULES ON INTACT CELLS AND IN-VITRO" CELL, vol. 62, no. 3, 1990, pages 563-568, XP007900183 ISSN: 0092-8674 the whole document</p>	20-24
T	<p>TOEBES MIREILLE ET AL: "Design and use of conditional MHC class I ligands." NATURE MEDICINE. FEB 2006, vol. 12, no. 2, February 2006 (2006-02), pages 246-251, XP007900182 ISSN: 1078-8956</p>	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/NL2006/000038

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-24

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/NL2006/000038

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-24

A multimeric protein as specified in claim 1 and uses thereof.

2. claims: 25-31

Various uses of a peptide comprising amino acid sequence AMSNTLTL.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/NL2006/000038

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03016512 A	27-02-2003	DE 10293615 D2	01-07-2004
WO 2004007528 A	22-01-2004	AU 2003273219 A1	02-02-2004
		CA 2492200 A1	22-01-2004
		EP 1578775 A2	28-09-2005

 フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 オバー, フィブ

オランダ国, 1 0 6 6 ピーエル アムステルダム, ベルラールストラート 1 5 7

(72)発明者 シューマッカー, アントニウス ニコラス マリア

オランダ国, 2 0 2 4 ディーエル ハールレム, ファン ネスストラート 5 7

Fターム(参考) 4C085 AA03 BA55 BB11 CC21 CC32 DD16 EE01 EE07

4H045 AA10 AA30 BA10 BA15 BA40 CA40 EA29 FA15 FA20

专利名称(译)	破坏分子间非共价结合相互作用的手段和方法		
公开(公告)号	JP2008528484A	公开(公告)日	2008-07-31
申请号	JP2007552078	申请日	2006-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	HET纳德尔兰兹康凯尔研究所 斯蒂芬锡咚酒店德蓝梓夹培训		
申请(专利权)人(译)	HET纳德尔兰兹Kankeru研究所 Sutefutin Sankuin德蓝梓夹培训		
[标]发明人	オーバーフィブ シューマッカーアントニウスニコラースマリア		
发明人	オーバー,フィブ シューマッカー,アントニウス ニコラース マリア		
IPC分类号	C07K14/74 C07K7/06 A61K39/00 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/005 A61K39/145 C07K14/70539 C12N7/00 C12N2760/16122 C12N2760/16134 G01N33/56977 G01N2333/70539		
FI分类号	C07K14/74.ZNA C07K7/06 A61K39/00.H G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/BA55 4C085/BB11 4C085/CC21 4C085/CC32 4C085/DD16 4C085/EE01 4C085/EE07 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA40 4H045/CA40 4H045/EA29 4H045/FA15 4H045/FA20		
代理人(译)	松井光夫		
优先权	2005075196 2005-01-25 EP		
其他公开文献	JP4979593B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及多聚蛋白质分子，其包含至少两个通过非共价相互作用区域彼此结合的成员，其中所述成员中的第一个包含条件反应性基团，其在被活化时切割所述第一成员内的共价键。共价键的裂解导致至少两个成员经由所述非共价相互作用区域彼此结合的结合强度降低。结合强度的降低可导致在温和条件下成员分离。

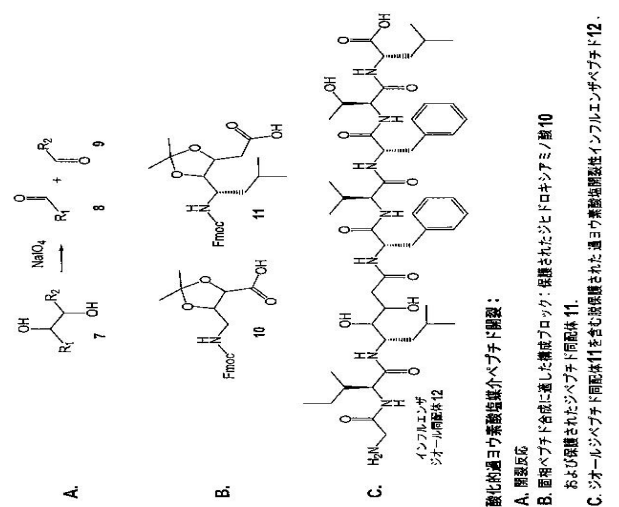


図1は、本発明の反応スキームを示している。

A. 反応物

B. 反応物と生成物に示した構造ブロックは、保護されたシロキサン/ミ/酸10

および保護されたシオール同配体 11.

C. シオール同配体12は、保護されたシロキサン/ミ/酸10とシオール同配体11を含む。