

(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2009-508517

(P2009-508517A)

(43) 公表日 平成21年3月5日(2009.3.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H O 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 64 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-531885 (P2008-531885)	(71) 出願人	308027813 コーエン, イルン, アール
(86) (22) 出願日	平成18年9月21日 (2006.9.21)		イスラエル国、76354 レホボト, ハンキン ストリート 11
(85) 翻訳文提出日	平成20年5月21日 (2008.5.21)	(71) 出願人	308027835
(86) 国際出願番号	PCT/IL2006/001112		キンタナ、フランシスコ、ハビエル
(87) 国際公開番号	W02007/034489		アルゼンチン共和国、1426 エイチ
(87) 国際公開日	平成19年3月29日 (2007.3.29)		キャピタル フェデラル、 テニエンテ
(31) 優先権主張番号	60/719, 342		ビー マティエンゾ 1831 1
(32) 優先日	平成17年9月22日 (2005.9.22)	(74) 代理人	100066692 弁理士 浅村 皓
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100072040 弁理士 浅村 肇
		(74) 代理人	100102897 弁理士 池田 幸弘
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 T細胞受容体定常ドメインの免疫原性断片及びそれに由来するペプチド

(57) 【要約】

本発明は、T細胞介在性炎症疾患、自己免疫疾患、及び移植片拒絶反応の治療において有効な、単離T細胞受容体定常ドメイン、及びそれに由来するペプチド、及びこれらをコードする組換え構築体を対象とする。治療及び予防用ワクチン組成物、並びにこれらのタンパク質及びペプチド、タンパク質及びペプチドをコードするDNAワクチン、及びそのT細胞ワクチンを使用する方法をさらに提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 少なくとも 1 つの薬剤として許容される担体、アジュバント、賦形剤又は希釈剤と、(b) (i i i) ヒト T 細胞受容体 (TCR) の鎖の定常ドメイン、及び (i v) TCR の鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチドからなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫原とを含む、ワクチン組成物。

【請求項 2】

免疫原がヒト TCR の鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチドである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

ペプチドが少なくとも 1 つの主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス II 結合モチーフを示す、請求項 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

鎖が TCR 鎖からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

ペプチドが配列番号 1 ~ 27 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

ペプチドが配列番号 1 ~ 12 及び 15 ~ 27 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 7】

鎖が TCR 鎖からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

ペプチドが配列番号 28 ~ 64 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する、請求項 7 に記載の組成物。

【請求項 9】

鎖が TCR 鎖からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

ペプチドが配列番号 65 ~ 92 及び 157 ~ 167 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する、請求項 9 に記載の組成物。

【請求項 11】

鎖が TCR 鎖からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 12】

ペプチドが配列番号 93 ~ 146 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記ペプチドが少なくとも 1 つの TCR の定常ドメインに由来する複数の免疫原性抗原決定基を含む融合ペプチドである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記ペプチドが配列番号 157 ~ 167 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記ペプチドが少なくとも 1 つの TCR の定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含む融合ペプチドであり、融合ペプチドが複数の MHC - II 結合モチーフを含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 16】

少なくとも 1 つの TCR の定常ドメインに由来する少なくとも 1 つのペプチド配列が、配列番号 1 ~ 146 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体及び誘導体の配列を含む、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

ペプチドが増大した抗エルゴタイプのT細胞活性によって測定されるTCR鎖の定常ドメインに対する免疫応答を誘導する、請求項1に記載の組成物。

【請求項18】

アジュバントが新陳代謝性脂質エマルジョンである、請求項1に記載の組成物。

【請求項19】

T細胞受容体(TCR)の鎖の定常ドメインに由来する融合ペプチドであって、

(i)少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数の免疫原性抗原決定基を含むペプチド、

(ii)少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数の免疫原性抗原決定基を含むペプチドであって、配列番号157~167のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(iii)少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含むペプチドであって、複数の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)-II結合モチーフを含むペプチド、

(iv)少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含むペプチドであって、複数のMHC-II結合モチーフを含み、少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する少なくとも1つのペプチド配列が配列番号1~146のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体及び誘導体の配列を含むペプチドからなる群から選択される融合ペプチド。

【請求項20】

配列番号1~146及び157~167のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する単離ペプチド。

【請求項21】

請求項19に記載のペプチドをコードする核酸配列。

【請求項22】

請求項20に記載のペプチドをコードする単離核酸配列。

【請求項23】

1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した請求項21に記載の核酸配列を含む組換え構築体。

【請求項24】

1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した請求項22に記載の核酸配列を含む組換え構築体。

【請求項25】

(a)少なくとも1つの薬剤として許容される担体と、(b)(i)ヒトT細胞受容体(TCR)の鎖の定常ドメイン、及び

(ii)TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド

からなる群から選択される少なくとも1つの免疫原をコードする単離核酸配列を含み、

核酸配列が1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した少なくとも1つの組換え構築体とを含む、DNAワクチン組成物。

【請求項26】

ペプチドがヒトTCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含む、請求項25に記載の組成物。

【請求項27】

ペプチドが少なくとも1つの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII結合モチーフを示す、請求項25に記載の組成物。

【請求項28】

鎖がTCR鎖、TCR鎖、TCR鎖及びTCR鎖からなる群から選択される、請求項25に記載の組成物。

【請求項29】

配列番号1~146及び157~167のいずれか1つで示されるアミノ酸及びその類

10

20

30

40

50

似体の配列を有する、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 30】

前記ペプチドが少なくとも 1 つの TCR の定常ドメインに由来する複数の免疫原性抗原決定基を含む融合ペプチドである、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 31】

前記ペプチドが配列番号 157 ~ 167 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を含む、請求項 30 に記載の組成物。

【請求項 32】

前記ペプチドが少なくとも 1 つの TCR の定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含む融合ペプチドであり、融合ペプチドが複数の MHC - II 結合モチーフを含む、請求項 25 に記載の組成物。

10

【請求項 33】

少なくとも 1 つの TCR の定常ドメインに由来する少なくとも 1 つのペプチド配列が、配列番号 1 ~ 146 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、及びその類似体の配列を含む、請求項 32 に記載の組成物。

【請求項 34】

ペプチドが増大した抗エルゴタイプの T 細胞活性によって測定される TCR 鎖の定常ドメインに対する免疫応答を誘導する、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 35】

前記担体が対象に核酸配列を送達する送達媒体を含む、請求項 25 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 36】

前記送達媒体がリポソーム、ミセル及び細胞からなる群から選択される、請求項 35 に記載の組成物。

【請求項 37】

前記組換え構築体が真核生物発現ベクターである、請求項 25 に記載の組成物。

【請求項 38】

ex vivo で活性化して主要組織適合遺伝子複合体 II の発現を誘導した抗原提示細胞及び T 細胞からなる群から選択される弱毒化活性細胞を活性成分として含み、細胞が
 (i) T 細胞受容体 (TCR) の鎖の定常ドメイン、及び
 (i i) TCR の鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド
 からなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫原に *ex vivo* で曝されている、医薬組成物。

30

【請求項 39】

ex vivo で細胞の第二集団の存在下において T 細胞の第一集団を培養することによって得られる T 細胞の集団を含み、第二集団が第一集団の細胞と組織適合性がある弱毒化活性細胞であり、前記第二集団の細胞が *ex vivo* で活性化して主要組織適合遺伝子複合体 II の発現を誘導した抗原提示細胞及び T 細胞からなる群から選択され、前記第二集団の前記細胞が

40

(i) T 細胞受容体 (TCR) の鎖の定常ドメイン、及び
 (i i) TCR の鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド
 からなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫原に *ex vivo* で曝されている、医薬組成物。

【請求項 40】

T 細胞介在性炎症疾患の進行を治療又は予防する方法であって、
 (i) ヒト T 細胞受容体 (TCR) の鎖の定常ドメイン、及び
 (i i) TCR の鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド
 からなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫原を活性成分として含むワクチン組成物を、その必要性のある対象に治療有効量投与することを含む方法。

【請求項 41】

50

ペプチドが少なくとも1つの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII結合モチーフを示す、請求項40に記載の方法。

【請求項42】

前記ペプチドが少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数の免疫原性抗原決定基を含む融合ペプチドである、請求項40に記載の方法。

【請求項43】

前記ペプチドが少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含む融合ペプチドであり、融合ペプチドが複数のMHC-II結合モチーフを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項44】

ペプチドが配列番号1~146及び157~167のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導體及び塩の配列を有するペプチドからなる群から選択される、請求項40に記載の方法。

【請求項45】

ペプチドが増大した抗エルゴタイプのT細胞活性によって測定されるTCR鎖の定常ドメインに対する免疫応答を誘導する、請求項40に記載の方法。

【請求項46】

前記T細胞介在性炎症疾患が自己免疫疾患である、請求項40に記載の方法。

【請求項47】

前記T細胞介在性炎症疾患が多発性硬化症、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、自己免疫性神経炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、I型糖尿病、シェーグレン病、甲状腺疾患、重症筋無力症、サルコイドーシス、自己免疫性ブドウ膜炎、炎症性腸疾患(クローン病及び潰瘍性大腸炎)、自己免疫性肝炎、移植片拒絶及びアレルギーからなる群から選択される、請求項40に記載の方法。

【請求項48】

前記対象がヒト及び非ヒト哺乳動物からなる群から選択される、請求項40に記載の方法。

【請求項49】

前記組成物を疾患症状の出現前に前記対象に投与する、請求項40に記載の方法。

【請求項50】

前記組成物を静脈内注射、筋肉内注射、エアロゾル、経口、経皮又は局所投与によって投与する、請求項40に記載の方法。

【請求項51】

T細胞介在性炎症疾患の進行を治療又は予防する方法であって、
 (i)ヒトT細胞受容体(TCR)の鎖の定常ドメイン、及び
 (ii)TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド
 からなる群から選択される少なくとも1つの免疫原をコードする単離核酸配列を含み、
 核酸配列が1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した少なくとも1つの組換え構築体を、その必要性のある対象に治療有効量投与することを含む方法。

【請求項52】

ペプチドが少なくとも1つの主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII結合モチーフを示す、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記ペプチドが少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数の免疫原性抗原決定基を含む融合ペプチドである、請求項51に記載の方法。

【請求項54】

前記ペプチドが少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含む融合ペプチドであり、融合ペプチドが複数のMHC-II結合モチーフを含む、請求項51に記載の方法。

【請求項55】

10

20

30

40

50

ペプチドが配列番号 1 ~ 146 及び 157 ~ 167 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導體及び塩の配列を有するペプチドからなる群から選択される、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 56】

ペプチドが増大した抗エルゴタイプの T 細胞活性によって測定される TCR 鎖の定常ドメインに対する免疫応答を誘導する、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 57】

前記 T 細胞介在性炎症疾患が自己免疫疾患である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 58】

前記前記 T 細胞介在性炎症疾患が多発性硬化症、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、自己免疫性神経炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、I 型糖尿病、シェーグレン病、甲状腺疾患、重症筋無力症、サルコイドーシス、自己免疫性ブドウ膜炎、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）、自己免疫性肝炎、移植片拒絶及びアレルギーからなる群から選択される、請求項 51 に記載の方法。

10

【請求項 59】

前記対象がヒト及び非ヒト哺乳動物からなる群から選択される、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 60】

前記構築体を疾患症状の出現前に前記対象に投与する、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 61】

前記構築体を静脈内注射、筋肉内注射、エアロゾル、経口、経皮又は局所投与によって投与する、請求項 51 に記載の方法。

20

【請求項 62】

前記構築体を少なくとも 1 つの薬剤として許容される担体、賦形剤又は希釈剤をさらに含む医薬組成物の形で前記対象に投与する、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 63】

必要性のある対象において抗エルゴタイプの T 細胞活性を増大させる方法であって、

(i) ヒト T 細胞受容体 (TCR) の鎖の定常ドメイン、及び

(i i) TCR の鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド

からなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫原を活性成分として含む医薬組成物を、その必要性のある対象に治療有効量投与することを含む方法。

30

【請求項 64】

必要性のある対象において抗エルゴタイプの T 細胞活性を増大させる方法であって、

(i) ヒト T 細胞受容体 (TCR) の鎖の定常ドメイン、及び

(i i) TCR の鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド

からなる群から選択される少なくとも 1 つの免疫原をコードする単離核酸配列を含み、

核酸配列が 1 つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した少なくとも 1 つの組換え構築体を、その必要性のある対象に治療有効量投与することを含む方法。

【請求項 65】

必要性のある対象において T 細胞介在性炎症疾患を治療又は予防する方法であって、請求項 38 に記載の医薬組成物を対象に投与することを含み、投与する細胞が前記対象と組織適合性がある方法。

40

【請求項 66】

必要性のある対象において T 細胞介在性炎症疾患を治療又は予防する方法であって、請求項 39 に記載の医薬組成物を対象に投与することを含み、投与する細胞が前記対象と組織適合性がある方法。

【請求項 67】

T 細胞介在性炎症疾患の進行を治療又は予防する方法であって、

a) 対象から又は対象と組織適合性があるドナーから細胞を入手するステップ、

b) (i) T 細胞受容体 (TCR) の鎖の定常ドメイン、及び (i i) TCR の鎖の定

50

常ドメインの免疫原性断片を含むペプチドからなる群から選択される少なくとも1つの免疫原をコードする単離核酸配列を含み、核酸配列が1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した組換え構築体を細胞に *in vitro* でトランスフェクトするステップ、及び

c) 治療有効数のトランスフェクト細胞を前記対象に導入するステップを含む方法。

【請求項68】

必要性のある対象中の免疫応答と関係がある状態を診断する方法であって、

a) 対象から抗体を含む生物サンプルを入手すること、

b) 抗原-抗体複合体が形成され得るような条件下で、配列番号1~146及び157~167のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有するペプチドを含む抗原プローブとサンプルを接触させること、

c) 前記抗体を含む生物サンプルと特異的に結合する抗原プローブの能力を測定することを含み、

前記能力が前記状態を示す方法。

【請求項69】

ステップc) が生物サンプル中で抗原プローブと特異的に結合する少なくとも1つのIgGイソ型の抗体の能力を測定することを含む、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

前記状態がT細胞介在性炎症疾患である、請求項68に記載の方法。

【請求項71】

配列番号1~146及び157~167のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する少なくとも1つのペプチド抗原、及び少なくとも1つのペプチド抗原が抗体を含む生物サンプルと特異的に結合するかどうか測定するための手段を含む、診断用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、T細胞介在性炎症疾患、自己免疫疾患、及び移植片拒絶反応の治療において有効な、T細胞受容体定常ドメインの免疫調節断片、及びそれに由来するペプチド、及びこれらをコードする組換え構築体を対象とする。治療及び予防用ワクチン組成物、並びにこれらのタンパク質及びペプチド、タンパク質及びペプチドをコードするDNAワクチン、及びそのT細胞ワクチンを含む方法をさらに提供する。

【背景技術】

【0002】

正常な免疫系は厳密に制御されているが、免疫応答の異常は珍しいことではない。いくつかの場合、免疫系は不適切に機能し、宿主の構成成分に、それが実際外来性であるかのように反応する。このような応答は自己免疫疾患をもたらし、その最中宿主の免疫系は宿主の自己組織を攻撃する。T細胞は、免疫系の主要制御物質として、このような自己免疫病に直接又は間接的に影響を与える。

【0003】

T細胞介在性炎症疾患は、不適切なT細胞応答が疾患の一部である任意の状態を指す。これはT細胞によって直接介在される疾患と、さらに不適切なT細胞応答が異常な抗体の生成に貢献する疾患の両方を含む。

【0004】

多くの疾患は、自己免疫のメカニズムが原因であると考えられる。これらの中で顕著なのは関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、I型糖尿病、重症筋無力症、尋常性天疱瘡である。自己免疫疾患は世界中で数百万人の個人に影響を与え、これらの疾患のコストは、実際の治療出費及び生産性の消失の点で年間数十億ドルと測定される。

【0005】

10

20

30

40

50

優勢な自己抗原を認識する末梢自己免疫T細胞の存在は、完全に健康状態である免疫系の1つの性質である。ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、HSP60及びインスリンなどの自己抗原の免疫優勢は、自己反応T細胞からなる細胞ネットワーク、及び自己免疫T細胞を認識しそれらに応答する制御T細胞のネットワークと関係がある。2つの主な制御T細胞は、抗イディオタイプT細胞及び抗エルゴタイプT細胞(ギリシア語 *ergon* は作業、活動を指す)である。

【0006】

抗イディオタイプT細胞は、病原性の内因性自己免疫T細胞上に存在する自己抗原受容体を認識するようである一方で、抗エルゴタイプT細胞は、それらのイディオタイプ特異性と無関係に活性状態の同系T細胞に応答するT細胞として定義される。抗エルゴタイプT細胞は、活性状態、エルゴトープの活性化T細胞の状態のマーカーを抗原として認識する。このようなエルゴトープの一例は、その発現がT細胞活性化中に活性状態のT細胞において上方制御されるIL-2受容体(CD25)の鎖である(Minamiら、1993; Taniguchi及びMinami、1993)。抗エルゴタイプT細胞は、休止状態ではそれらの標的T細胞に応答しないようである。

10

【0007】

抗エルゴタイプの制御T細胞と抗イディオタイプの制御T細胞の間の比較は、いくつかの共通の特徴を有するが、サイトカインプロファイルの違いも明らかにする。抗イディオタイプの制御T細胞はTh1サイトカインを分泌し(Cohen、2001; Kumarら、2001)、抗エルゴタイプの制御T細胞はIL-10、Th2サイトカインを主に分泌する。

20

【0008】

実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)は、多発性硬化症の実験モデルとして働く中枢神経系のT細胞介在性の自己免疫疾患である。EAEなどの自己免疫疾患は、疾患関連の自己抗原に特異的である、弱毒状態であるが、おそらく有毒である自己免疫性T細胞を投与すること、T細胞予防接種(TCV)と呼ばれる手順によって予防又は治療され得る。T細胞予防接種を使用して自己免疫疾患、移植片拒絶、又はアレルギーを治療することができるが、数年前に発見された。TCVの影響は、抗エルゴタイプT細胞の*in vivo*での活性化によって一部分は介在されると仮定された(Lohseら、1989)。

30

【0009】

抗エルゴタイプの制御は、様々な自己免疫疾患(Zhangら、1993)を治療し、移植片拒絶(Shapiraら、1993)及びアレルギー(Zhangら、1993)を予防するために現在使用されている手法である、首尾良いT細胞予防接種(Zhangら、1993; Van der Aaら、2003)には必要不可欠であると考えられている。したがって、抗エルゴタイプの制御を活性化することができる物質は、免疫炎症を調節することが望ましい場合、全状態に関して広い用途を有し得る。

【0010】

自己免疫疾患を治療するのに好ましい方法は、患者の免疫系を調節して患者の本来の防御機構を促進することを含む。患者の免疫応答を制御することを試みるために使用する伝統的な試薬及び方法は、望ましくない副作用ももたらし、限られた有効性を有する。例えば、自己免疫疾患を有する患者を治療するために使用する免疫抑制試薬(例えばシクロスポリンA、アザチオプリン、及びプレドニソン)は、患者の全体の免疫応答も抑制し、これによって感染の危険が増大する。さらに、癌を治療するために使用する免疫薬理試薬(例えばインターロイキン)は患者の血液循環中で持続せず、多用量以外は有効性がない。免疫制御の医学的重要性及び既存の免疫薬理試薬が不適切であることにより、免疫系の特定部分を制御するための試薬及び方法は、長年研究の主題となっている。

40

【0011】

患者中の免疫応答の刺激又は抑制は、広く様々な医学的疾患の有効な治療であり得る。Tリンパ球(T細胞)は、免疫応答と関係がある様々な異なる細胞型の1つである。T細胞の活性は、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)分子の状況でT細胞に提示される抗原

50

によって制御される。したがってT細胞受容体(TCR)は、MHC-抗原複合体と結合する。ひとたび抗原がMHCと複合体形成した後、MHC-抗原複合体はT細胞上の特異的TCRによって結合し、それによってそのT細胞の活性が変わる。

【0012】

KarinのWO01/57056は、個体の関節リウマチを治療する方法を開示する。この方法は、サイトカインの少なくとも一部分をコードする外因性ポリヌクレオチド由来のサイトカインの少なくとも1つの免疫学的に認識可能な部分を個体内で発現させるステップを含み、サイトカインの少なくとも一部分の発現レベルは、各サイトカイン及び/又は交差反応性のある内因性サイトカインの活性を中和又は改善して、それによって関節リウマチを治療するために働く、抗サイトカイン免疫グロブリンの形成を誘導するのに充分である。Karin及び同僚への米国特許第6,316,420号は、DNAサイトカインワクチン及び多発性硬化症に対する防御免疫のためのそれらの使用をさらに開示する。

10

【0013】

Naparsstek及び同僚のWO00/27870は、熱ショックタンパク質Hsp65及びHsp60由来の一連の関連ペプチド、それらの配列、抗体、及び自己免疫疾患及び/又は関節炎などの炎症障害に対する免疫を与えるためのワクチンとしての使用を開示する。Naparsstek及び同僚によって、これらのペプチドは、アジュバント誘導型関節炎に影響を受けやすいラット系統の保護と関係がある最短の配列又はエピトープを示すと考えられる。これらの配列はさらに、一般的な「保護型モチーフ」としてNaparsstek及び同僚が同定したものを開示する。

20

【0014】

WO03/096967の発明者及びその他は、T細胞介在性の炎症自己免疫疾患を治療するためのDNAワクチンを開示しており、このDNAワクチンは、哺乳動物の熱ショックタンパク質をコードする核酸配列を含む組換え構築体を含む。

【0015】

免疫関連疾患用の治療物質として特定のT細胞受容体由来のペプチドを使用する、いくつかの開示が存在する。例えば、米国特許第5,614,192号は、このようなT細胞介在性疾患に特徴的なT細胞受容体の第二の相補性決定領域の少なくとも一部分を含むアミノ酸配列を有する、T細胞介在性疾患の重度を低下させることができるペプチドを開示する。

30

【0016】

WO94/19470は、サプレッサーT細胞によって生成される予防又は治療有効量の可溶性T細胞受容体鎖を含む、自己免疫疾患を治療するための予防及び治療用組成物を開示する。特に、470出願は、KLH特異的サプレッサーT細胞から得られるTCR鎖の可変領域の可溶性断片を含む組成物を開示する。より詳細には、マウスIgGの定常領域と融合した、V14J281で示すマウスのTCR鎖の可変領域断片からなるキメラタンパク質の使用を開示する。

【0017】

WO97/43411は、免疫抑制効果を有するが、投与時でさえ自己に対する抗体のいかなる産生も実質的に引き起こさない、T細胞受容体の鎖の定常領域の一部又は全体を実質的に含むポリペプチドを開示する。この出願は、これらのポリペプチドをコードするDNA、及び活性成分としてこれらのポリペプチドを含む医薬組成物を開示する。

40

【0018】

JP11302299は、T細胞受容体の鎖の定常領域の一部又は全体を実質的に含むが、前述の鎖の他の領域は実質的に含まない、免疫抑制活性を有するポリペプチドを開示する。

【0019】

コアペプチド(CP)で示すTCR鎖の膜貫通ドメインに由来する9アミノ酸のペプチドは、TCR分子と同時局在することによって、in vitro及びin vivo

50

でT細胞抗原に特異的な活性化を阻害し(Manoliosら、1997)、これによってTCR-CD3複合体の適切な構築を阻害する。

【0020】

本発明の発明者の数名への米国特許出願公開第2005/0260770号は、抗原アレイシステム及びその診断用途を開示する。この出願は、抗原プローブセットの各抗原プローブと特異的に結合する対象の免疫グロブリンの能力を測定することを含む、対象における免疫疾患又はその素因を診断する方法を提供する。抗原プローブセットは、細胞/組織の構造分子の少なくとも一部分、熱ショックタンパク質の少なくとも一部分、免疫系分子の少なくとも一部分、ホモポリマーポリペプチドの少なくとも一部分、ホルモンの少なくとも一部分、代謝酵素の少なくとも一部分、微生物抗原の少なくとも一部分、軟体動物抗原の少なくとも一部分、核酸の少なくとも一部分、植物抗原の少なくとも一部分、血漿分子の少なくとも一部分、及び組織抗原の少なくとも一部分からなる群から選択される複数の抗原プローブを含み、対象の免疫グロブリンの結合能力は免疫疾患又はその素因を示す。考えられる診断マーカーとして、770公開によって開示された多数の抗原プローブは特に、T細胞受容体に由来する、好ましくはラットT細胞受容体の鎖の定常ドメインに由来するペプチドである。

10

【0021】

従来技術の何処においても、自己免疫炎症疾患を治療するのに適した治療性を有する特異的ペプチドは、T細胞受容体ポリペプチドの定常ドメインに由来する可能性があることは開示又は示唆されていない。

20

【0022】

近年、発明者及び同僚(Mimranら、2004)は、活性化T細胞上の標的エルゴトープの1つはCD25分子であることを発見した。この公開の中で、エルゴトープCD25を用いたDNA予防接種はラットをアジュバント関節炎から保護し、アジュバント関節炎が誘導されたラットにおいて抗エルゴタイプの応答を増大させることが実証された。この増大した抗エルゴタイプのT細胞応答は、CD25-DNAワクチンを予防接種しなかったラットにおいて観察した応答と比較した、活性化A6T細胞クローンに対する高い増殖応答によって定義された。増大した抗エルゴタイプのT細胞応答は、IFNの分泌の低下及びIL-10の分泌の増大、又は言い換えるとTh1様表現型からTh2様表現型へのサイトカインの変化によって特徴付けられた。

30

【0023】

T細胞介在性炎症又は自己免疫性疾患を治療又は改善し、T細胞介在性の病状を改善する有効な手段に関する、長年感じられている必要性が存在する。通常、症状のみを治療することができ、一方で疾患は進行し続け、重度の衰弱又は死をもたらすことが多い。このような治療は、症状を単に低下させるのではなく、不適切なT細胞応答を理想的には制御しなければならない。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0024】

本発明は、例えば自己免疫性疾患及び移植片拒絶を含めたT細胞介在性の病状を予防及び治療するのに適したワクチン組成物を提供する。特に本発明は、T細胞介在性炎症疾患を予防又は治療する際に有効な、T細胞受容体の定常ドメイン及びそれに由来するペプチドを含む免疫原性組成物を提供する。本発明は、炎症疾患の治療において有用である、これらのタンパク質及びペプチド及びDNAワクチン及びT細胞ワクチンをコードする組換え構築体も提供する。いくつかの実施形態では、予防接種及び診断において有用である新規なペプチド抗原を提供する。

40

【0025】

本発明は、T細胞受容体(TCR)の定常ドメインを用いた免疫処置は、T細胞介在性の炎症自己免疫性疾患に対する防御をもたらすという予想外の発見に部分的に基づく。驚くことに、本発明によれば、T細胞受容体の鎖の定常ドメインのC1とC2両方の変異

50

体分子、並びにこれらのタンパク質をコードする組換え構築体は、T細胞介在性炎症疾患に対する防御免疫を誘導することが発見されている。関節リウマチの実験モデルとして働く、アジュバント関節炎(AA)、T細胞介在性の炎症自己免疫性疾患の動物疾患モデルに関して、本発明の原理を例示する。さらに、主要組織適合遺伝子複合体クラスII(MHC-II)結合モチーフを示すT細胞受容体の定常ドメインの領域に由来する合成ペプチドを使用して、同様の治療及び予防性も観察されている。

【0026】

第一の態様によれば本発明は、T細胞介在性の病状の進行を治療及び予防するのに有用な、TCRの鎖の定常ドメインに由来するペプチド抗原を含むワクチン組成物を対象とする。

10

【0027】

特に、(a)少なくとも1つの薬剤として許容される担体、アジュバント、賦形剤又は希釈剤と、(b)(i)ヒトTCRの鎖の単離定常ドメイン、及び(ii)TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチドからなる群から選択される少なくとも1つの免疫原とを含む、ワクチン組成物を提供する。

【0028】

本明細書で使用する用語「単離TCR定常ドメイン」及び「定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド」は、TCR鎖及びその断片の可変領域を欠くTCR鎖の断片を指すことは理解されるはずである。したがって、本発明の組成物は、TCR V D及びJ遺伝子セグメント又はそれらの特定部分によってコードされる配列を実質的に含まない。「定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド」は、完全長の定常ドメインを除く定常ドメインの一部に対応するアミノ酸配列を指す。

20

【0029】

免疫原は、ヒトT細胞受容体の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチドであることが好ましい。

【0030】

いくつかの実施形態によれば、ペプチドは少なくとも1つのMHCクラスII結合モチーフを含む。

【0031】

有利なことに、本発明のポリペプチド又はペプチドは、多数のMHC-II結合モチーフ、又は重複するMHC-II結合モチーフを含む。

30

【0032】

いくつかの実施形態によれば、本発明のポリペプチド又はペプチドは、少なくとも1つのTCR定常ドメインに由来する少なくとも1つのペプチド配列を含む。いくつかの好ましい実施形態によれば、本発明のポリペプチド又はペプチドは、少なくとも1つのTCR定常ドメインに由来する少なくとも1つのペプチド配列を含み、ポリペプチド又はペプチドは複数のMHC-II結合モチーフを含む。他の好ましい実施形態によれば、本発明のポリペプチド又はペプチドは、少なくとも1つのTCR定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含み、ポリペプチド又はペプチドは複数のMHC-II結合モチーフを含む。さらに他の好ましい実施形態によれば、本発明のポリペプチド又はペプチドは、複数のTCR定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含み、ポリペプチド又はペプチドは複数のMHC-II結合モチーフを含む。

40

【0033】

一実施形態によれば、本発明のペプチドはT細胞受容体の鎖の定常ドメインに由来してよく、鎖は鎖、鎖、鎖及び鎖からなる群から選択される。

【0034】

好ましい実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖、T細胞受容体の1鎖、T細胞受容体の2鎖、T細胞受容体の1鎖、T細胞受容体の2鎖、及びT細胞受容体の鎖からなる群から選択される。

【0035】

50

様々な実施形態で、本発明によって提供されるTCR定常ドメイン鎖に由来する特定のペプチド、少なくとも1つのMHCクラスIIの結合モチーフを含むペプチドは、本明細書の以下の表2～9中に表す。

【0036】

一実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖からなる群から選択される。特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号1～27のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有するペプチドからなる群から選択される。いくつかの他の特定の実施形態によれば、ペプチドは配列番号1～12及び15～27のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有するペプチドからなる群から選択される。

10

【0037】

他の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖からなる群から選択される。

【0038】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の1鎖であり、ペプチドは配列番号28～60のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有するペプチドからなる群から選択される。

【0039】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の2鎖であり、ペプチドは配列番号31～49、配列番号51～59、及び配列番号61～64のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有するペプチドからなる群から選択される。

20

【0040】

他の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖からなる群から選択される。

【0041】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号65～92のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有するペプチドからなる群から選択される。

【0042】

他の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖からなる群から選択される。

【0043】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号93～130のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する。

30

【0044】

他の特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号93～131のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する。

【0045】

他の特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号93～100、配列番号104～105、配列番号107～109、配列番号112～125、配列番号127～129、配列番号131～140のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する。

40

【0046】

他の特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号94～100、配列番号104～105、配列番号107～109、配列番号112～130、配列番号133～146のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する。

【0047】

必要なMHCクラスIIの結合モチーフを含むと確認したペプチドは、本明細書では9アミノ酸長として任意で表すことを記す。本発明に従い使用するペプチドは、それらが自

50

己免疫炎症疾患を抑制する目的の機能を保つ限りは、一端又は両端に延長、及び欠失又は切断を含み得ることは明らかに理解される。

【0048】

他の特定の実施形態では、TCR 鎖定常ドメインに由来し、配列番号157～167のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有する、新規な免疫原性ペプチドを提供する。

【0049】

いくつかの他の特定の実施形態では、TCR 定常領域の配列に由来する新規な融合ペプチドを提供する。本明細書で使用する用語「融合ペプチド」は、2つ以上のポリペプチド又はペプチド配列が直接的又は間接的、好ましくは直接的に、化学結合によって、好ましくはペプチド結合によって、本来存在しない組合せで互いに結合している、ポリペプチド又はペプチドを示す。

10

【0050】

好ましい実施形態では、少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数の免疫原性抗原決定基を含む融合ペプチドを提供する。様々な特定の実施形態では、それぞれの免疫原性抗原決定基が、TCRの定常ドメインのペプチド断片、又はその類似体若しくは誘導体を含む。

【0051】

他の特定の実施形態では、融合ペプチドは配列番号157～167のいずれか1つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、及び誘導体の配列を含む。

20

【0052】

他の好ましい実施形態では、少なくとも1つのT細胞受容体の定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含み、複数のMHC-I結合モチーフを含む融合ペプチドを提供する。様々な特定の実施形態では、少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来するそれぞれのペプチド配列は、前記TCRの定常ドメインのペプチド断片、又はその類似体若しくは誘導体を含む。いくつかの他の特定の実施形態では、少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する少なくとも1つのペプチド配列は、配列番号1～146のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含む。

【0053】

好ましい実施形態によればペプチドは、T細胞介在性炎症疾患を予防又は治療するのに有用である。特定の実施形態によればペプチドは、抗エルゴタイプのT細胞応答を誘導し、且つT細胞介在性炎症疾患の進行を阻害することができるエルゴトープである。一実施形態では、抗エルゴタイプのT細胞応答は、増殖応答アッセイ中で観察される活性状態の組織適合性T細胞の認識によって定義される。さらに他の実施形態では、それによってTh1様表現型からTh2様表現型への活性化T細胞の分化を誘導する、IFN 及びTNF からIL-10へのサイトカイン表現型の変化によって、抗エルゴタイプの応答を定義することができる。

30

【0054】

好ましい実施形態では、組成物はT細胞介在性炎症疾患を予防又は治療するのに有用である。特定の実施形態によれば組成物は、抗エルゴタイプのT細胞応答を誘導することによって、T細胞介在性炎症疾患を阻害又は治療する。

40

【0055】

本発明の組成物及び方法は、多発性硬化症、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、自己免疫性神経炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、I型糖尿病、シェーグレン病、甲状腺疾患、重症筋無力症、サルコイドーシス、自己免疫性ブドウ膜炎、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）、自己免疫性肝炎、アレルギー及び移植片拒絶だけには限られないが、これらを含めたT細胞介在性炎症疾患において有効である。

【0056】

様々な実施形態において、ワクチン組成物は、投与するペプチドの免疫原性を高めることができる少なくとも1つのアジュバントをさらに含む。特定の実施形態では、アジュバ

50

ントは新陳代謝性脂質エマルジョンである。

【0057】

本発明はさらに、前述のペプチドをコードする核酸を提供する。他の態様では、これらのペプチドをコードする核酸配列を含み、核酸配列が1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した組換え構築体を提供する。

【0058】

他の態様では本発明は、本明細書で詳述するように、TCR定常ドメイン及びそれに由来するペプチドをコードするDNAワクチン組成物を提供する。

【0059】

DNA予防接種は、体液性免疫応答と細胞性免疫応答の両方を生み出すために *in vivo* で抗原を発現させる新規な手段となる。本発明は、T細胞受容体又はその活性断片の鎖の定常ドメインをコードする単離核酸配列を含み、核酸配列が1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結しており、且つ適切な発現系中で、ヒト宿主中でコードされたペプチド又はその活性断片の *in vivo* 発現を可能にする、組換え構築体を含むDNAワクチンを提供する。

10

【0060】

より詳細には本発明は、(a)少なくとも1つの薬剤として許容される担体と、(b) (i) T細胞受容体(TCR)の鎖の定常ドメイン、及び (ii) TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチドからなる群から選択される少なくとも1つの免疫原をコードする単離核酸配列を含み、核酸配列が1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した少なくとも1つの組換え構築体とを含む、DNAワクチン組成物を提供する。

20

【0061】

いずれかの理論又は作用機構によって縛られることは望まずに、いくつかの実施形態において本発明は、T細胞受容体の鎖の定常ドメイン又は活性断片をコードする核酸分子を使用して、エルゴトープとしてコードされたタンパク質又はペプチドで抗エルゴタイプのT細胞応答を誘導する。

【0062】

いくつかの実施形態では、前記担体は、対象に核酸配列を送達する送達媒体を含む。特定の実施形態では、前記送達媒体はリポソーム、ミセル及び細胞からなる群から選択される。

30

【0063】

いくつかの他の特定の实施形態では、前記組換え構築体は真核生物発現ベクターである。

【0064】

他の態様では、本明細書で詳述するように、T細胞介在性炎症疾患の進行を治療又は予防する方法であって、本発明のワクチン組成物を、その必要性のある対象に治療有効量投与することを含む方法を提供する。

【0065】

特定の一実施形態では、前記T細胞介在性炎症疾患は自己免疫疾患である。他の特定の实施形態では、前記T細胞介在性炎症疾患は多発性硬化症、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、自己免疫性神経炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、I型糖尿病、シェーグレン病、甲状腺疾患、重症筋無力症、サルコイドーシス、自己免疫性ブドウ膜炎、炎症性腸疾患(クローン病及び潰瘍性大腸炎)、自己免疫性肝炎、移植片拒絶及びアレルギーからなる群から選択される。

40

【0066】

本発明の様々な実施形態において、前記対象はヒト及び非ヒト哺乳動物からなる群から選択される。

【0067】

本発明の組成物は、疾患症状の出現後に前記対象に投与することができ、又は他の実施

50

形態では、疾患症状の出現前に投与することができる。

【0068】

いくつかの他の特定の実施形態では、前記組成物を静脈内注射、筋肉内注射、エアロゾル、経口、経皮又は局所投与によって投与する。

【0069】

他の態様では、本明細書で詳述するように、必要性のある対象において抗エルゴタイプのT細胞活性を増大させる方法であって、本発明のワクチン組成物を、その必要性のある対象に治療有効量投与することを含む方法を提供する。一実施形態では、抗エルゴタイプのT細胞応答は、増殖応答アッセイ中で観察される活性状態のT細胞の認識によって定義される。

10

【0070】

他の態様では本発明は、T細胞介在性炎症疾患の進行を治療又は予防する方法であって、本明細書で詳述する本発明の少なくとも1つの免疫原をコードする単離核酸配列を含み、1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した少なくとも1つの組換え構築体を、その必要性のある対象に治療有効量投与することを含む方法を提供する。

【0071】

いくつかの実施形態では、前記構築体を、少なくとも1つの薬剤として許容される担体、賦形剤又は希釈剤をさらに含む医薬組成物の形で前記対象に投与する。

【0072】

特定の一実施形態では、前記T細胞介在性炎症疾患は自己免疫疾患である。他の特定の実施形態では、前記T細胞介在性炎症疾患は多発性硬化症、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、自己免疫性神経炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、I型糖尿病、シェーグレン病、甲状腺疾患、重症筋無力症、サルコイドーシス、自己免疫性ブドウ膜炎、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）、自己免疫性肝炎、移植片拒絶及びアレルギーからなる群から選択される。

20

【0073】

本発明の様々な実施形態において、前記対象はヒト及び非ヒト哺乳動物からなる群から選択される。

【0074】

本発明の組成物は、疾患症状の出現後に前記対象に投与することができ、又は他の実施形態では、疾患症状の出現前に投与することができる。

30

【0075】

いくつかの他の特定の実施形態では、前記組成物を静脈内注射、筋肉内注射、エアロゾル、経口、経皮又は局所投与によって投与する。

【0076】

理論によって縛られることは望まずに、様々な実施形態において、組成物の投与は前記個体中の抗エルゴタイプのT細胞応答を増大させ、前記個体中のT細胞介在性炎症疾患の進行を阻害する。一実施形態では、抗エルゴタイプのT細胞応答は、増殖応答アッセイ中で観察される活性状態のT細胞の認識によって定義される。

40

【0077】

本発明の他の態様は、必要性のある対象において抗エルゴタイプのT細胞活性を増大させる方法であって、本明細書で詳述する本発明の少なくとも1つの免疫原をコードする単離核酸配列を含み、核酸配列が1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した少なくとも1つの組換え構築体を、その必要性のある対象に治療有効量投与することを含む方法である。一実施形態では、抗エルゴタイプのT細胞応答は、増殖応答アッセイ中で観察される活性状態のT細胞の認識によって定義される。

【0078】

さらに他の態様では、本発明は、T細胞介在性炎症疾患の進行を治療又は予防する方法であって、

(a) 対象から又は対象と組織適合性があるドナーから細胞を入手するステップ、

50

(b) 本明細書で詳述する本発明の少なくとも1つの免疫原をコードする単離核酸配列を含み、核酸配列が1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した1つの組換え構築体を細胞に *in vitro* でトランスフェクトするステップ、及び

(c) 治療有効数のトランスフェクト細胞を前記対象に導入するステップを含む方法を提供する。

【0079】

他の態様では本発明は、本明細書で詳述する本発明の免疫原に曝したT細胞及び/又は他の抗原提示細胞を使用する、細胞ワクチン及びそれらの使用法を対象とする。

【0080】

他の態様では、*ex vivo* で活性化して主要組織適合遺伝子複合体IIの発現を誘導した抗原提示細胞及びT細胞からなる群から選択される弱毒化活性細胞を活性成分として含み、細胞が

(i) T細胞受容体(TCR)の鎖の定常ドメイン、及び

(ii) TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド

からなる群から選択される有効量の少なくとも1つの免疫原に *ex vivo* で曝されている、医薬組成物を提供する。

【0081】

他の態様では、*ex vivo* で細胞の第二集団の存在下においてT細胞の第一集団を培養することによって得られるT細胞の集団を含み、第二集団が第一集団の細胞と組織適合性がある弱毒化活性細胞であり、前記第二集団の細胞が *ex vivo* で活性化して主要組織適合遺伝子複合体IIの発現を誘導した抗原提示細胞及びT細胞からなる群から選択され、前記第二集団の前記細胞が

(i) T細胞受容体(TCR)の鎖の定常ドメイン、及び

(ii) TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド

からなる群から選択される少なくとも1つの免疫原に *ex vivo* で曝されている、医薬組成物を提供する。

【0082】

これらの細胞ワクチン組成物は、T細胞介在性炎症疾患の進行を治療又は予防する必要性のある対象に投与することができ、投与する細胞はその対象と組織適合性がある。

【0083】

一実施形態では、T細胞介在性炎症疾患を治療又は予防する方法であって、

(a) 第一の対象から又は前記対象と組織適合性があるドナーからT細胞を単離するステップ、

(b) *ex vivo* でT細胞を活性化して主要組織適合遺伝子複合体(MHC)IIの発現を誘導し、前記活性化細胞を免疫原に曝すステップ、及び

(c) 前記T細胞を弱毒化し、治療有効量の前記細胞を前記対象に導入し、それによって前記疾患の進行を治療又は予防するステップを含む方法を提供する。

【0084】

他の実施形態では、細胞を活性化した後、及び前記免疫原に前記細胞を曝す前に、弱毒化ステップを実施する。

【0085】

他の実施形態では方法は、

(a) 対象から又は前記対象と組織適合性があるドナーからT細胞の第一集団を単離すること、

(b) 組織適合性がある弱毒化活性T細胞又は抗原提示細胞及び免疫原の第二集団の存在下においてT細胞の第一集団を培養すること、及び

(c) 治療有効量の前記T細胞の第一集団を対象に導入し、それによって前記疾患の進行を治療又は予防することを含む。

【0086】

他の実施形態では、ステップ(b)は、前記免疫原に事前に曝した組織適合性がある弱

10

20

30

40

50

毒化活性 T 細胞又は抗原提示細胞の第二集団の存在下において、T 細胞の第一集団を培養することを含む。

【0087】

他の態様では、本明細書で詳述するように、本発明の新規なペプチドは、対象中のこれらのペプチドに対する免疫応答と関係がある状態の診断に使用することができる。

【0088】

一実施形態では、必要性のある対象中の免疫応答と関係がある状態を診断する方法であって、

- a) 対象から抗体を含む生物サンプルを入手すること、
- b) 抗原 - 抗体複合体が形成され得るような条件下で、配列番号 1 ~ 146 及び 157 ~ 167 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導體及び塩の配列を有するペプチドを含む抗原プローブとサンプルを接触させること、
- c) 前記抗体を含む生物サンプルと特異的に結合する抗原プローブの能力を測定することを含み、

前記能力が前記状態を示す方法を提供する。

【0089】

好ましい実施形態では、ステップ c) は、生物サンプル中で抗原プローブと特異的に結合する少なくとも 1 つの Ig G イソ型の抗体の能力を測定することを含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、前記状態は増大した T 細胞介在性の免疫応答と関係がある。他の実施形態では、前記状態は T 細胞介在性炎症疾患である。他の特定の実施形態では、前記状態は増大した抗エルゴタイプの T 細胞活性と関係がある。

【0091】

他の態様では、本発明は、配列番号 1 ~ 146 及び 157 ~ 167 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導體及び塩の配列を有するペプチド抗原、及びペプチド抗原が抗体を含む生物サンプルと特異的に結合するかどうか測定するための手段を含む、診断用キットを提供する。

【0092】

本発明のこれらの実施形態及び他の実施形態は、以下の図面、記載事項及び特許請求の範囲と共に明らかとなるはずである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0093】

本発明は、制御 T 細胞活性を調節するための新規な組成物及び方法に関する。T 細胞受容体 (TCR) の鎖の定常ドメイン、それに由来する活性ペプチド、又はこれらのタンパク質又はペプチドをコードする核酸分子を含むワクチン組成物は、T 細胞介在性炎症疾患を治療するのに有効な治療試薬であることが、ここで初めて示される。TCR 由来ポリペプチド又はペプチドを使用する T 細胞ワクチンの有効性も、初めて実証される。

【0094】

本発明は、1 T 細胞受容体変異体鎖と 2 T 細胞受容体変異体鎖の両方 (それぞれ C1 と C2) の定常ドメインは、T 細胞介在性の病状の治療において使用することができるという驚くべき発見に部分的に基づく。予想外に、C1 及び C2 ドメイン、及びそれに由来する特異的ペプチド、及びこれらをコードする組換え構築体を用いた予防接種は、アジュバント関節炎 (AA)、自己免疫疾患の動物モデルにおいて T 細胞介在性炎症を阻害することができることを発見した。これらのエピトープを対象とする T 細胞系は、ラットに養子免疫療法により転移させると AA を改善することを、予想外にさらに発見した。

【0095】

本発明によれば、T 細胞受容体の定常ドメインの主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス - II 結合領域 (Reizisら、1996; Singh 及び Raghava、2001) に由来するペプチドは、T 細胞介在性疾患の進行を治療又は予防するのに、有効な治療物質であることも発見されている。

10

20

30

40

50

【0096】

TCR定常ドメインペプチドの同定

一態様では本発明は、TCR鎖の定常ドメインに由来する免疫原性ペプチドを対象とする。

【0097】

用語「免疫原性の」又は「免疫原性」は、適切な形の投与及び哺乳動物への適切な経路によって、抗原特異的な細胞介在性及び/又は抗体の免疫応答を誘導するペプチドの能力を指す。言い換えると、本発明のペプチドの投与は、T細胞及び/又は前記ペプチド内に含まれる1つ又は複数の抗原決定基(エピトープ)を対象とする抗体の活性化を誘導する。したがって、本発明の免疫原性ペプチドは、TCR鎖の定常ドメインの1つ又は複数のエピトープに対する免疫応答を誘導することができることは理解されよう。この用語はさらに、一般に抗体による結合による認識を意味するペプチドの認識能力を指す、用語「抗原性の」又は「抗原性」を含む。

10

【0098】

特定の一実施形態では、本発明のTCR定常ドメイン由来のペプチドは、対象に投与すると、それらが前記ペプチド内に含まれる1つ又は複数の抗原決定基に対するAbを誘導することを特徴とする。他の実施形態では、前記Abは少なくとも1つのTCR定常ドメインのエピトープと特異的に結合する。好ましい実施形態では、AbはIgGイソ型である。

【0099】

他の特定の実施形態では、本発明のTCR定常ドメイン由来のペプチドは、対象から単離した少なくとも1つのAbによって特異的に結合される1つ又は複数の抗原決定基を、それらが含むことを特徴とする。好ましい実施形態では、AbはIgGイソ型である。他の実施形態では、前記対象にTCR定常ドメイン由来のペプチドを投与する前に、前記Abを対象から単離する。他の特定の実施形態では、対象は増大したT細胞介在性免疫応答と関係がある状態に苦しむ。他の特定の実施形態では、前記状態はT細胞介在性炎症疾患である。

20

【0100】

他の特定の実施形態では、本発明のTCR定常ドメイン由来のペプチドは、増大したペプチド特異的T細胞活性により測定して、それらがTCR鎖の定常ドメインの1つ又は複数のエピトープに対する免疫応答を誘導することを特徴とする。他の特定の実施形態によれば、ペプチド特異的なT細胞活性は抗エルゴタイプのT細胞活性である。

30

【0101】

用語「抗エルゴタイプのT細胞応答」及び「抗エルゴタイプのT細胞活性」は、制御型抗エルゴタイプのT細胞の活性化を指す。様々な実施形態において、抗エルゴタイプのT細胞応答は、組織適合性(自己由来又は同系)活性化T細胞に対する高い増殖応答によって定義することができる。例えば、Mt176~190を認識するA2b、又はHSP60の残基436~460を認識するp277などの、様々な活性化T細胞クローンに対する増殖応答は、動物モデルを使用したとき測定することができる。又は、それによってTh1様表現型からTh2様表現型への組織適合性のある活性化T細胞の分化を誘導する、IFN及びTNFからIL-10へのサイトカイン表現型の変化によって、抗エルゴタイプの応答を定義することができる。

40

【0102】

したがって、本発明のいくつかの実施形態では、ヒト予防接種に適したTCR定常ドメイン由来のペプチドの同定を、以下の少なくとも1つによって場合によっては実施することができる：

a) ペプチドの抗原性の測定。非制限的な実施例によって、例えば抗原-アレイ技術を使用して、例えばT細胞介在性炎症疾患に苦しむ対象のIgG Abと結合するそれらの能力に関して、候補となるTCR定常ドメイン由来のペプチドをスクリーニングすることによって、これを場合によっては実施することができる。抗原-アレイに基づく方法を使

50

用するペプチドスクリーニングの非制限的な実施例は、本明細書では実施例 12 中に表す；

b) ペプチドの免疫原性の測定。非制限的な実施例によって、対象からリンパ球を得ること、候補となる TCR 定常ドメイン由来のペプチドを対象とする T 細胞系を産生すること、及び組織適合性のある活性化 T 細胞を増殖させる生成 T 細胞系の能力を測定することによって、これを場合によっては実施することができる。抗エルゴタイプの T 細胞系を使用するペプチドスクリーニングの非制限的な実施例は、本明細書では実施例 8 ~ 10 及び 13 中に表す。

【0103】

他の態様によれば、本発明は、T 細胞受容体の鎖の定常ドメインに由来する単離ペプチドを提供し、このペプチドは少なくとも 1 つの MHC クラス II (MHC - II) の結合モチーフを示す。

【0104】

したがって、いくつかの他の実施形態によれば、ヒト予防接種に適した TCR 定常ドメイン由来のペプチドの単離は、MHC - II 予測アルゴリズムを使用して実施することができる。T 細胞受容体の定常ドメイン中の HLA - DR 結合領域を予測するために ProPred アルゴリズムを使用するペプチドスクリーニングの非制限的な実施例は、本明細書では実施例 11 中に表す。

【0105】

様々な特定の実施形態では、本発明のペプチドは、TCR 鎖の定常ドメインの様々な部分に由来してよい。いくつかの特定の実施形態では、ペプチドは TCR 鎖の定常ドメインの細胞質領域に由来する。他の特定の実施形態では、本発明のペプチドは TCR 鎖の定常ドメインの細胞外領域に由来する。他の特定の実施形態では、本発明のペプチドは TCR 鎖の定常ドメインの膜貫通領域に由来する。

【0106】

コアペプチド (CP) で示す TCR 鎖の膜貫通ドメインに由来する 9 アミノ酸のペプチドは、TCR 分子と同時局在することによって *in vitro* 及び *in vivo* で T 細胞抗原に特異的な活性化を阻害し、これによって TCR - CD3 複合体の適切な構築を阻害することが報告された。本発明のペプチドは、アミノ酸配列 GLRILLKLV (配列番号 156) を有する CP で示すペプチドを明らかに含まないことは理解されよう。いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、TCR 鎖の定常ドメインの膜貫通領域以外の配列に由来する。

【0107】

いくつかの他の特定の実施形態では、本発明は TCR 定常ドメインに由来する融合ペプチドを提供し、前記融合ペプチドは少なくとも 1 つの T 細胞受容体の定常ドメインに由来する複数の免疫原性抗原決定基を含む。

【0108】

本明細書で使用する用語「融合ペプチド」は、2 つ以上のポリペプチド又はペプチド配列が直接的又は間接的、好ましくは直接的に、化学結合によって、好ましくはペプチド結合によって、本来存在しない組合せで互いに結合している、ポリペプチド又はペプチドを示す。

【0109】

いくつかの特定の実施形態では、前記融合ペプチドは配列番号 157 ~ 167 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸配列を有する。本発明による融合ペプチドの非制限的な実施例は、配列番号 165 によって示されるペプチドであり、これは TCR 定常ドメインに由来する 2 つの免疫原性抗原決定基を含み、免疫原性抗原決定基は配列番号 160 及び 162 によって示される。

【0110】

いくつかの実施形態によれば、本発明は、少なくとも 1 つの T 細胞受容体の定常ドメインに由来する少なくとも 1 つのペプチド配列を含む、組換え又は合成ポリペプチド又はペ

10

20

30

40

50

プチドを提供する。いくつかの好ましい実施形態によれば、本発明は、少なくとも1つのT細胞受容体の定常ドメインに由来する少なくとも1つのペプチド配列を含み、複数のMHC-I結合モチーフを含む、組換えポリペプチド又はペプチドを提供する。他の好ましい実施形態によれば、本発明は、少なくとも1つのT細胞受容体の定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含み、複数のMHC-I結合モチーフを含む、組換えポリペプチド又はペプチドを提供する。さらに他の好ましい実施形態によれば、本発明は、複数のT細胞受容体の定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含み、複数のMHC-I結合モチーフを含む、組換えポリペプチド又はペプチドを提供する。

【0111】

本発明のペプチドは、ヒトT細胞受容体の定常ドメインに由来することが最も好ましい。

10

【0112】

好ましい実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖、T細胞受容体の鎖、T細胞受容体の鎖、T細胞受容体の鎖、T細胞受容体の鎖及びT細胞受容体の鎖からなる群から選択される。ヒトTCR鎖の定常ドメインのアミノ酸配列は以下の表10中に表し、配列番号168~175によって示す。本発明がこれらの配列の本来の対立遺伝子変異体に由来するペプチドをさらに含むことは、理解されるはずである。

【0113】

一実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖からなる群から選択される。特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号1~27のいずれか1つで示される配列を有するペプチド、並びにその類似体、誘導体及び塩からなる群から選択される。いくつかの他の特定の実施形態によれば、ペプチドは配列番号1~12及び15~27のいずれか1つで示される配列を有するペプチド、並びにその類似体、誘導体及び塩からなる群から選択される。

20

【0114】

一実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖からなる群から選択される。

【0115】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号28~60のいずれか1つで示される配列を有するペプチド、並びにその類似体、誘導体及び塩からなる群から選択される。

30

【0116】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号31~49、配列番号51~59、及び配列番号61~64のいずれか1つで示される配列を有するペプチド、並びにその類似体、誘導体及び塩からなる群から選択される。

【0117】

一実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖及びT細胞受容体の鎖からなる群から選択される。

【0118】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり、ペプチドは配列番号65~92のいずれか1つで示される配列を有するペプチド、並びにその類似体、誘導体及び塩からなる群から選択される。

40

【0119】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり(アクセッション番号A26659)、ペプチドは配列番号93~130によって示されるペプチド、並びにその類似体、誘導体及び塩からなる群から選択される。

【0120】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり(アクセッション番号AAB63314)、ペプチドは配列番号93~131によって示されるペプチド、並びにその類似体、誘導体及び塩からなる群から選択される。

【0121】

50

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり（アクセッション番号A A B 6 3 3 1 2）、ペプチドは配列番号93～100、配列番号104～105、配列番号107～109、配列番号112～125、配列番号127～129、配列番号131～140によって示されるペプチドによって示されるペプチド、並びにその類似体、誘導体及び塩からなる群から選択される。

【0122】

特定の実施形態によれば、鎖はT細胞受容体の鎖であり（アクセッション番号A A B 6 3 3 1 3）、ペプチドは配列番号94～100、配列番号104～105、配列番号107～109、配列番号112～130、配列番号133～146のいずれか1つで示される配列を有するペプチド、並びにその類似体、誘導体及び塩からなる群から選択される。

10

【0123】

T細胞介在性の病状

一態様では本発明は、T細胞介在性炎症疾患を治療又は予防するための組成物及び方法を提供する。「T細胞介在性炎症疾患」は、不適切又は有害なT細胞応答が疾患又は障害の病因又は病状の構成要素である、任意の状態を指す。これはT細胞によって直接介在される疾患と状態の両方、さらに不適切なT細胞応答が異常な抗体の生成に貢献する疾患と状態（例えば、病原性IgG、IgA又はIgE抗体の生成と関係がある自己免疫性又はアレルギー性疾患）、並びに移植片拒絶を含む。

【0124】

様々な実施形態によれば、T細胞介在性炎症疾患には自己免疫性疾患、アレルギー性疾患、Th1介在性疾患及び他の炎症疾患があるが、これらだけには限られない。本発明の一実施形態では、本発明の組成物及び方法は、多発性硬化症、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、自己免疫性神経炎、全身性エリテマトーデス、乾癬、I型糖尿病、シェーグレン病、甲状腺疾患、重症筋無力症、サルコイドーシス、自己免疫性ブドウ膜炎、炎症性腸疾患（クローン病及び潰瘍性大腸炎）及び自己免疫性肝炎だけには限られないが、これらを含めたT細胞介在性の自己免疫性疾患を治療するのに有用である。特定の一実施形態では、自己免疫性疾患は関節リウマチである。他の特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法は、Th1関連炎症疾患、例えば、接触性皮膚炎などの皮膚の過敏症及び炎症をもたらすTh1介在性アレルギー応答を治療するのに有用である。他の特定の実施形態では、本発明の組成物及び方法は、Th2関連炎症疾患、ろうそう及びアレルギーを治療するのに有用である。他の実施形態では、本発明の組成物及び方法は、喘息（特にアレルギー性喘息）などの炎症又はアレルギー性疾患、過敏性肺疾患、過敏性肺炎、遅延型過敏症、腸管肺疾患（ILD）（例えば突発性肺線維症、又は関節リウマチ又は他の炎症疾患と関係があるILD）だけには限られないが、これらを含めた広範囲の炎症疾患及び状態を治療するのに有用である。他の実施形態では、T細胞介在性の病状は、同種異系移植片拒絶及び移植片対宿主疾患（GVHD）を含めた移植片拒絶である。同種異系移植片拒絶、例えば器官拒絶は、免疫応答を介した移植組織の宿主免疫細胞の破壊によって生じる。同様に、免疫応答はGVHDとも関係があるが、しかしながらこの場合、外来性の移植免疫細胞が宿主組織を破壊する。

20

30

40

【0125】

タンパク質及びペプチドに基づく組成物及び方法

本発明のポリペプチド及びペプチドは、固相（例えばBoc又はf-Moc化学法）及び溶液相合成法だけには限られないが、これらを含めた、当技術分野で知られている任意の組換え又は合成法を使用して単離又は合成することができる。例えば、Merrifield（1963）の固相ペプチド合成法によって、ペプチドを合成することができる。又は、当技術分野でよく知られている標準的な溶液法（例えばBodanszky、1984を参照）を使用して、又はペプチド合成に関する当技術分野で知られている任意の他の方法によって、本発明のペプチドを合成することができる。

【0126】

50

カルボキシアミドとして、還元型末端アルコールとして又は任意の薬剤として許容される塩として、例えばナトリウム、カリウム、リチウム又はカルシウム塩を含めた金属塩として、有機塩基との塩として、硫酸、塩酸又はリン酸を含めた鉱酸との塩として、又は有機酸、例えば酢酸又はマレイン酸との塩として、末端カルボキシアミドを有する本発明のペプチドを使用することができる。一般に、T細胞介在性疾患に関するペプチドの生物活性が保たれる限り、本発明のペプチドの任意の薬剤として許容される塩を使用することができる。

【0127】

機能誘導体は、前記ペプチドのアミノ酸側鎖及び/又はカルボキシル及び/又はアミノ部分に対する化学修飾からなる。このような誘導体分子は、例えば遊離アミノ基が誘導体化されてアミン塩酸塩、p-トルエンスルホニル基、カルボベンズオキシ基、t-ブチルオキシカルボニル基、クロロアセチル基又はホルミル基が形成されている分子を含む。遊離カルボキシル基を誘導体化して、塩、メチル及びエチルエステル又は他の型のエステル又はヒドラジドを形成することができる。遊離ヒドロキシル基を誘導体化して、O-アシル又はO-アルキル誘導体を形成することができる。ヒスチジンのイミダゾール窒素を誘導体化して、N-im-ベンジルヒスチジンを形成することができる。20の標準アミノ酸残基の1つ又は複数の天然に存在するアミノ酸誘導体を含むペプチドも、化学誘導体として含まれる。例えば、プロリンを4-ヒドロキシプロリンで置換することができ、リシンを5-ヒドロキシリシンで置換することができ、ヒスチジンを3-メチルヒスチジンで置換することができ、セリンをホモセリンで置換することができ、リシンをオルニチンで置換することができる。

10

20

【0128】

本明細書に記載するアミノ酸残基は、他に示さない限り「L」異性体形である。しかしながら、ペプチドが望ましい機能性を実質的に保持する限り、任意のL-アミノ酸残基を「D」異性体形の残基で置換することができる。

【0129】

これらの新しいペプチドの適切な類似体は、現在標準的であるペプチド合成法及び装置によって容易に合成することができることは、全当業者によって理解されよう。これらの類似体に関する制限は、それらがT細胞介在性疾患に関して本質的に同じ生物活性を有することである。全てのこのような類似体は、それらのアミノ酸配列に関しては新しいペプチドに本質的に基づくはずであるが、1つ又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されているはずである。アミノ酸残基が置換されているとき、想定されるこのような保存的置換は、ペプチドの構造又は生物活性を著しく変えない置換である。例えば、塩基性アミノ酸は他の塩基性アミノ酸で置換されるはずであり、酸性アミノ酸は酸性アミノ酸で、中性アミノ酸は中性アミノ酸で置換されるはずである。前に詳述した保存的置換を含む類似体以外に、非保存的アミノ酸置換を含むペプチド類似体。本発明のペプチド類似体は、増大した抗エルゴタイプのT細胞活性により測定して、それらがMHC-II分子と結合する能力を保持すること且つ/又はTCR鎖の定常ドメインに対する免疫応答を誘導する能力を保持することを特徴とする。

30

40

【0130】

本発明のペプチドの全長は、約6アミノ酸と35アミノ酸の間であることが好ましい。クラスIIのMHC分子は、おそらく7~9アミノ酸残基ほど短い最小長でペプチド12~15アミノ酸残基長と結合することは、当技術分野で充分定着している。したがって、本発明のTCR定常ドメイン断片は少なくとも約7~9アミノ酸長であり、MHC-II結合モチーフを含むことが好ましい。いくつかの実施形態では、例えばペプチドが複数のTCR定常ドメイン由来配列を含むとき、例えば50アミノ酸長までのより長いペプチド、並びに単離及び組換えによって生じたポリペプチドは、本発明の範囲内にある。しかしながら、いくつかの実施形態では、製造を容易にするためにより短いペプチドが好ましい。

【0131】

50

他の態様では本発明は、必要性のある対象にT細胞介在性の病状に対する予防接種をするのに有用な医薬組成物を提供する。

【0132】

一実施形態では、(a)少なくとも1つの薬剤として許容される担体、アジュバント、賦形剤又は希釈剤と、

(b)(i)TCRの鎖の定常ドメイン、

(ii)TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド、及び

(iii)その類似体、誘導体及び塩

からなる群から選択される少なくとも1つの免疫原とを含む、ワクチン組成物を提供する。

10

【0133】

他の実施形態によれば組成物は、(a)薬剤として許容される担体、アジュバント、賦形剤又は希釈剤と、(b)T細胞受容体の鎖の定常ドメイン、又はその類似体、誘導体、塩若しくはMHCクラスIIの結合モチーフを示す定常ドメインに由来するペプチドを含む医薬組成物である。

【0134】

本明細書で使用する用語「ワクチン」は、脊椎動物中で特異的な免疫応答を刺激するのに有用な組成物を示す。この用語は免疫療法ワクチン、即ち疾患を有すると既に診断されている宿主中のその疾患のさらなる進行を治療及び/又は予防するために投与するワクチンと、予防ワクチンの両方を明らかに含む。

20

【0135】

本発明の医薬組成物は、前記治療の必要性のある対象に治療有効量投与する。本発明によれば「治療有効量」は、患者に投与したときT細胞介在性の病状を阻害する、好ましくは根絶する、又は、他の実施形態では、その進行を予防する又は遅延させるのに十分な量である。本明細書に記載するように、「治療有効量」は、対象に投与したとき、投与する免疫原に対する対象の免疫応答の実質的な増大をもたらす量をさらに指す。

【0136】

いくつかの実施形態によれば、対象はヒト、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ及びブタからなる群から選択される。好ましい実施形態では、対象はヒトである。

【0137】

これらの実施形態に従い使用するための医薬組成物は、1つ又は複数の生理的に許容される担体又は賦形剤(賦形薬)を使用する従来の方法で配合することができる。担体は組成物の他の成分と適合性があり、そのレシピエントに有害でないという意味で「許容される」。ワクチン組成物は、生理食塩水又はグリセロール又はプロピレングリコールなどのエタノールポリオールなどの、薬剤として又は生理的に許容される賦形薬で、場合によっては投与することができる。

30

【0138】

T細胞受容体の任意の鎖の定常ドメインの全ての変異体分子が、医薬組成物に適している。

【0139】

医薬組成物は、固体、液体又は半固体の形で与える。固体調製物は、前述の要素を配合して粉末状組成物を与えることによって調製することができる。又は医薬組成物は、凍結乾燥調製物として与える。液体調製物は、水溶液、水性懸濁液、油性懸濁液又はマイクロカプセル組成物として与えることが好ましい。半固体組成物は、含水又は油性ゲル又は軟膏として与えることが好ましい。

40

【0140】

固体組成物は、例えば本発明のタンパク質又はペプチドの溶液と賦形剤を混合し、少量の水を徐々に加え、及びその混合物を混合することによって調製することができる。乾燥後、好ましくは真空中で、混合物を粉末状にする。液体組成物は、例えば水、バッファー溶液などの中に本発明のタンパク質又はペプチドを溶解、懸濁又は乳化させることによ

50

て調製することができる。油性懸濁液は、例えば油状成分、ゴマ油、オリーブ油、コーン油、ダイズ油、綿実油、ピーナツ油、ラノリン、ペトロラクタム、パラフィン、Isopar、シリコン油、6～30炭素原子の脂肪酸、又は対応するグリセロール又はアルコールエステル中などに、本発明のタンパク質又はペプチド又はタンパク質を懸濁又は乳化させることによって調製することができる。バッファーには例えばSorensenバッファー、Clark-Lubsバッファー、MacIlvaineバッファー、Michaelisバッファー、及びKoltzoffバッファーがある。

【0141】

組成物は、例えば経鼻投与用の含水ゲルとして調製することができる。含水ゲル成分は、バッファー、及び本発明のタンパク質又はペプチドを含む水溶液、及び安定状態のゲルを得るために加熱又は冷却した溶液中に溶かすか又は分散させる。

10

【0142】

本発明のタンパク質又はペプチドは、静脈内、筋肉内又は皮下投与によって投与することが好ましい。タンパク質又はペプチドは摂取される前に消化される可能性があるので、経口投与は有効であり得ない。当然ながら、この考察は、例えば環状ペプチドにすることによって、D-アミノ酸などの非天然アミノ酸を含めることによって、又は生物分解に対するタンパク質又はペプチドの耐性を高めるための他の修飾によって修飾されている、本発明のタンパク質又はペプチドにはあまり当てはまらない可能性がある。消化管中での分解は、例えばリポソームなどのマイクロカプセル中に本発明のタンパク質又はペプチドを閉じこめることによって、いくつかの組成物を使用することによって減らすことができる。本発明の医薬組成物は、他の粘膜に投与することもできる。したがって医薬組成物は、座薬、鼻腔スプレー又は舌下錠剤の形で与える。

20

【0143】

本発明のタンパク質又はペプチドの用量は、治療する状態、患者の年齢、体重、及び投与の経路に依存する可能性があり、主治医によって決定されるはずである。

【0144】

他の実施形態では、本発明のタンパク質又はペプチドは、そのパモン酸塩、タンニン酸塩、ステアリン酸塩又はパルミチン酸塩として本発明のタンパク質又はペプチドを取り込ませることによって、フロムポリ-1、4-コハク酸ブチレン、ポリ-2,3-コハク酸ブチレン、ポリ-1,4-フマル酸ブチレン、及びポリ-2,3-コハク酸ブチレンだけでは限られないが、これらを含めた生分解性ポリマーを含む医薬組成物中に与えることができる。このような組成物は、例えば米国特許第5,439,688号中に記載されている。

30

【0145】

他の実施形態では、本発明の組成物は脂質エマルジョンである。

【0146】

脂質エマルジョンは、例えばリン脂質などの乳化剤、乳化助剤、安定剤の約0.1～2.4w/wの脂肪又は油を加え、機械的に混合し、加熱及び/又は溶媒除去によって促進し、水及び等張剤を加え、及び場合によってはpH剤、等張剤を加えて調節することによって調製することができる。混合物は次いで均質化する。このような脂質エマルジョンは、酸性リン脂質、脂肪酸、胆汁酸、及びそれらの塩などの電荷調節物質を含むことが好ましい。酸性リン脂質には、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルイノシトール、及びホスファチジル酸がある。胆汁酸には、デオキシコール酸、及びタウロコール酸がある。このような医薬組成物の調製は、米国特許第5,733,877号中に記載されている。

40

【0147】

本発明による医薬組成物は、植物油又はそのエマルジョン、表面活性物質、例えばヘキサデシルアミン、オクタデシルアミノ酸エステル、オクタデシルアミン、リゾレシチン、ジメチルオクタデシル臭化アンモニウム、N,N-ジコクタデシル-N'-N'ビス(2-ヒドロキシエチル-プロパンジアミン)、メトキシヘキサデシルグリセロール、及びブ

50

ルロニックポリオール；ポリアミン、例えばピラン、デキストラン硫酸、ポリIC、カルボボル；ペプチド、例えばムラミルジペプチド、ジメチルグリシン、ツフシン；免疫刺激複合体；油性エマルジョン（米国特許第5,961,970号、米国特許第4,073,943号及び米国特許第4,168,308号によって開示されたエマルジョンなどの、サブミクロン範囲の油滴を有する水中油型エマルジョンだけには限られないが、これらを含む）；MPL（登録商標）などのリポ多糖及びミネラルゲルなどの他のアジュバントの場合によっては含み得る。本発明の抗原は、リポソーム、コキレート、ポリ-ラクチド、ポリ-グリコリド及びポリ-ラクチド-コ-グリコリドなどの生分解性ポリマー、又はISCOMS（免疫刺激複合体）中に取り込ませることもでき、補助活性成分を使用することもできる。Intralipid又はLipofundinなどの新陳代謝性脂質エマルジョンを、その全内容が参照として本明細書に組み込まれるWO97/02016中に開示された方法で、予防接種用の賦形薬として使用することもできる。これらの物質はTh1からTh2へのサイトカインの変化を引き起こすことが知られているので、このような脂質エマルジョンは本発明の目的に有利である。米国特許第5,961,970号中に開示されたように、これらの脂質エマルジョンは水中油型サブミクロンエマルジョンとして配合することができる。

10

【0148】

いずれもワクチン分野の当業者によく知られているように、本発明はタンパク質及びペプチド抗原は、アルブミン又は他の担体分子と結合させて免疫応答を調節又は増大することができる。

20

【0149】

他の態様では、本明細書で詳述するように、本発明はT細胞介在性炎症疾患を治療する方法を提供し、前記方法は本発明の免疫原を含む治療用組成物を必要性のある個体に投与することを含む。

【0150】

他の態様では、本明細書で詳述するように、本発明はT細胞介在性炎症疾患の進行を予防する方法を提供し、前記方法は本発明の免疫原を含む治療用組成物を必要性のある個体に投与することを含む。

【0151】

他の態様では、本明細書で詳述するように、本発明はT細胞介在性炎症疾患の進行を予防又は治療する方法を提供し、前記方法はT細胞受容体の鎖の定常ドメイン又はその活性断片を含む治療用組成物を必要性のある個体に投与することを含む。

30

【0152】

疾患を予防又は治療する方法は、前記疾患の予防接種法として記載することもできることは理解されよう。

【0153】

他の態様では、本明細書で詳述するように、必要性のある対象中で抗エルゴタイプのT細胞活性を増大させる方法を提供し、この方法は治療有効量の本発明のワクチン組成物を必要性のある対象に投与することを含む。

40

【0154】

他の態様では本発明は、ワクチンを調製するための、
 (i) T細胞受容体(TCR)の鎖の定常ドメイン、
 (ii) TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド、及び
 (iii) その類似体、誘導體及び塩
 からなる群から選択される免疫原の使用を対象とする。様々な実施形態において、必要性のある対象においてT細胞介在性炎症疾患を治療するため、T細胞介在性炎症疾患の進行を予防するため、且つ/又は抗エルゴタイプのT細胞活性を増大させるために、ワクチンは有用である。

【0155】

一実施形態では、ペプチド又はタンパク質は医学的有効量、少なくとも1回、好ましく

50

は診断直後に投与しなければならない。タンパク質又はペプチドは、最初の投与後さらに2回、好ましくは1ヶ月と6ヶ月で投与して、患者に追加抗原刺激を与えることもできる。

【0156】

いくつかの実施形態では、前記免疫原を疾患症状の出現前に対象に投与する。他の実施形態では、前記免疫原を疾患症状の出現後に対象に投与する。

【0157】

当技術分野でよく知られているプロトコルに従って、非経口、皮内、経皮（徐放性ポリマーの使用などによる）、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、経口及び鼻腔内投与経路だけには限らないが、これらを含めた様々な経路によって、ヒト又は動物にワクチンを投与することができる。本発明のワクチン組成物は、前記対象において免疫応答を誘導するのに適した用量で投与する。TCR定常ドメイン抗原の個々の用量は、治療する対象の年齢、体重及び医学的状態、並びに抗原の同一性及び投与法に依存するはずである。適切な用量は当業者により容易に決定されるはずである。ヒトの筋肉内、皮下及び経口予防接種に好ましい用量は約50 μ gと約100mgの間、好ましくは約200 μ gと約40mgの間、及びより好ましくは約500 μ gと約10mgの間である。本発明のワクチンに適合させるための伝統的な担体抗原を使用する確定用量範囲の調節又は操作は、充分当業者の能力の範囲内である。

【0158】

DNA予防接種及び関連法

本発明により、T細胞受容体の鎖の定常ドメイン、又はその活性断片又は相同体をコードするDNAワクチンを使用することによって、T細胞介在性炎症疾患を治療又は予防することができることをここで開示する。

【0159】

本発明は、T細胞受容体の鎖の定常ドメインをコードするヌクレオチドを含むDNAワクチンを用いた予防接種は、T細胞介在性炎症を阻害し、抗エルゴタイプのT細胞応答をもたらすことを初めて開示する。いずれかの理論又は作用機構によって縛られることは望まずに、これは、T細胞受容体の鎖の定常ドメインをコードする核酸による、T細胞介在性の自己免疫性疾患の予防又は改善は、自己免疫T細胞の増殖の抑制ではなく、応答性T細胞によって分泌されるサイトカインの変化と関係がある可能性があることを示唆する。

【0160】

細胞の免疫応答を生成するためのDNA予防接種の使用は、特に有利である。それは、おそらく毒性であるタンパク質を用いた動物の安全な治療を可能にする、有効な治療用組成物をもたらす。いずれかの理論又は作用機構によって縛られることは望まずに、T細胞受容体の鎖の定常ドメイン、又はその活性断片をコードする核酸分子の発現は、そのT細胞受容体の鎖の定常ドメイン又は活性断片の局所的生成をもたらし、これによってエルゴトープとしてコードされるタンパク質又は活性断片により抗エルゴタイプのT細胞応答を誘導する。本発明の治療用組成物は、T細胞受容体の鎖の定常ドメイン又はその活性断片の長期の発現をもたらすことができる。このような長期の発現は、疾患を治療するためのコードされるタンパク質又は活性断片の有効、ただし非毒性の投与の維持を可能にし、動物を治療するために必要とされる治療用組成物の投与の頻度を制限する。さらに、毒性が無い場合、本発明の治療用組成物は反復治療において使用することができる。

【0161】

本発明はさらに、組換え構築体の使用に関するものであり、前記組換え構築体はT細胞受容体の鎖の定常ドメイン又はその活性断片をコードする単離核酸配列を含み、抗エルゴタイプのT細胞応答を誘導する。このような応答は、例えば抗エルゴタイプのT細胞と自己免疫T細胞の間のバランスが乱れている、T細胞介在性の自己免疫性疾患において必要とされる。

【0162】

T細胞受容体の様々な鎖の定常ドメイン及びその活性断片をコードする単離核酸配列は

10

20

30

40

50

、DNA、RNA、又はDNA又はRNAいずれかの誘導体を含み得る。T細胞受容体の鎖の定常ドメインをコードする単離核酸配列は、全体（即ち、完全）遺伝子又はその一部のいずれかとして、その天然源から入手することができる。核酸分子は、組換えDNA技術（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅、クローニング）又は化学合成を使用して生成することもできる。核酸配列は、天然対立遺伝子変異体、及びその修飾が本発明のT細胞受容体の機能性定常ドメイン又はその活性断片をコードする核酸分子の能力に実質的に干渉しないような形式でヌクレオチドが挿入、欠失、置換、及び/又は転位している修飾核酸配列だけには限られないが、これらを含めた天然核酸配列及びその相同体を含む。

【0163】

核酸配列相同体は、当業者に知られているいくつかの方法を使用して生成することができる（例えば、Sambrookら、「分子クローニング：研究室用マニュアル（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）」、Cold Spring Harbor Labs Press、1989を参照）。例えば核酸配列は、部位特異的突然変異誘発などの古典的な突然変異誘発技法及び組換えDNA技法、突然変異を誘発するための核酸分子の化学処理、核酸断片の制限酵素による切断、核酸断片の連結、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅及び/又は核酸配列の選択した領域の突然変異誘発、オリゴヌクレオチド混合物の合成、及び核酸分子の混合物を「構築する」ための混合群の連結、及びこれらの組合せだけには限られないが、これらを含めた様々な技法を使用して修飾することができる。核酸分子相同体は、核酸によってコードされるタンパク質の機能をスクリーニングすることによって、修飾核酸の混合物から選択することができる。

【0164】

本発明の一実施形態は、T細胞受容体の鎖の定常ドメインの少なくとも一部分、又はT細胞受容体の鎖の定常ドメインの相同体をコードする単離核酸配列である。本明細書で使用する「T細胞受容体の鎖の定常ドメインの少なくとも一部分」は、抗エルゴタイプのT細胞応答を増大させることができるT細胞受容体の 又は 又は 又は 鎖の定常ドメインの部分を指す。好ましい一実施形態では、本発明の核酸配列は、T細胞受容体の鎖の定常ドメインの全コード領域をコードする。又は核酸配列は、MHC-II結合モチーフを示すT細胞受容体の鎖の定常ドメインに由来するペプチドをコードする。本明細書で使用

【0165】

特定の実施形態において本発明は、配列番号1～146及び157～167のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つのペプチドをコードする単離及び組換え核酸配列、核酸配列を含む組換え構築体、及びそれらのDNAワクチンを提供する。

【0166】

他の実施形態において本発明は、T細胞受容体（TCR）の鎖の定常ドメインに由来する融合ペプチドをコードする核酸配列を提供し、この融合ペプチドは少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数の免疫原性抗原決定基を含む。特定の実施形態では、ペプチドは配列番号157～167のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を含む。

【0167】

他の実施形態において本発明は、TCRの鎖の定常ドメインに由来する融合ペプチドをコードする核酸配列を提供し、この融合ペプチドは少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する複数のペプチド配列を含み、ペプチドは複数の主要組織適合遺伝子複合体（MHC）-II結合モチーフを含む。特定の実施形態では、少なくとも1つのTCRの定常ドメインに由来する少なくとも1つのペプチド配列は、配列番号1～146のいずれか1つで示されるアミノ酸、及びその類似体及び誘導体の配列を含む。

10

20

30

40

50

【0168】

ポリヌクレオチド又はオリゴヌクレオチド配列は、タンパク質又はペプチドの遺伝コードから容易に推測することができるが、しかしながら、コードの縮重を考慮に入れなければならない。例えば、非制限的に、配列番号183～193によって示されるオリゴヌクレオチド配列は、配列番号157～167の免疫原性ペプチドをコードする(表14参照)。しかしながら、本発明の核酸配列は遺伝コードの結果として縮重状態である配列も含み、これらの配列は当業者によって容易に決定することができる。ヒトTCR鎖の定常ドメインをコードする核酸配列は以下の実施例中に表し、配列番号176～182によって示す。これらの配列の本来の対立遺伝子の変異体に由来する核酸配列を、本発明がさらに含むことは理解されるはずである。

10

【0169】

本発明は、1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結して組換え分子を形成する、本発明の核酸配列を含む。語句「作動可能に連結した」は、宿主細胞へのトランスフェクト(即ち、形質転換、形質導入又はトランスフェクト)時に分子を発現させることができるような形式での、核酸配列と転写制御配列の連結を指す。転写制御配列は、転写の開始、延長、及び終了を制御する配列である。特に重要な転写制御配列は、プロモーター、エンハンサー、オペレーター及びリプレッサー配列などの転写の開始を制御する配列である。適切な転写制御配列は、本発明の少なくとも1つの組換え細胞において機能し得る任意の転写制御配列を含む。様々なこのような転写制御配列は当業者に知られている。好ましい転写制御配列には、動物、細菌、ぜん虫、昆虫細胞において、及び好ましくは動物細胞において機能する配列がある。より好ましい転写制御配列には、RSV制御配列、CMV制御配列、レトロウイルスLTR配列、SV-40制御配列及び -アクチン制御配列、並びに真核生物細胞中の遺伝子発現を制御することができる他の配列があるが、これらだけには限られない。他の適切な転写制御配列には、組織特異的プロモーター及びエンハンサー(例えば、T細胞特異的エンハンサー及びプロモーター)がある。本発明の転写制御配列は、本発明のT細胞受容体の鎖又はそれに由来する活性ペプチドをコードする遺伝子と本来結合している、本来存在する転写制御配列も含み得る。

20

【0170】

記載した好ましい実施形態中のさらに他の特徴によれば、組換え構築体は真核生物発現ベクターである。

30

【0171】

記載した特定の実施形態中のさらに他の特徴によれば、発現ベクターはpcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pCI、pBK-RSV、pBK-CMV、pTRES及びそれらの誘導體からなる群から選択される。

【0172】

本発明によれば、宿主細胞はin vivo(即ち、動物中)又はex vivo(即ち、動物の外側)でトランスフェクトすることができる。宿主細胞への核酸分子のトランスフェクションは、それによって核酸分子を細胞内に挿入することができる、任意の方法によって実施することができる。トランスフェクション技法にはトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、吸着、及びプロトプラスト融合があるが、これらだけには限られない。宿主細胞にin vivoでトランスフェクトするための好ましい方法には、リポフェクション及び吸着がある。

40

【0173】

組換えDNA技術を使用することにより、例えば宿主細胞内の核酸分子のコピー数、これらの核酸分子が転写される有効度、生成した転写産物が翻訳される有効度、及び翻訳後修飾される有効度を操作することによって、トランスフェクト核酸分子の発現を改善することができることは、当業者によって理解され得る。本発明の核酸分子の発現を増大させるのに有用な組換え技法には、高コピー数のプラスミドへの核酸分子の作動可能な連結、

50

1つ又は複数の宿主細胞染色体への核酸分子の組込み、プラスミドへのベクター安定化配列の付加、転写制御シグナル（例えば、プロモーター、オペレーター、エンハンサー）の置換又は修飾、翻訳制御シグナル（例えば、リボソーム結合部位、シャイン-ダルガルノ配列）の置換又は修飾、宿主細胞のコドン使用に対応させるための本発明の核酸分子の修飾、転写産物を不安定状態にする配列の欠失があるが、これらだけには限られない。本発明の発現される組換えタンパク質の活性は、このようなタンパク質をコードする核酸分子を断片化、修飾、又は誘導体化することによって改善することができる。

【0174】

本発明のさらに他の態様によれば、本発明のDNA予防接種法を実施するのに適した医薬組成物を提供する。この組成物は、T細胞受容体の鎖、それに由来する活性ペプチド又はその類似体をコードする単離核酸配列であって、1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した核酸配列を含む組換え構築体、及び薬剤として許容される担体を含む。

10

【0175】

一実施形態では、

(a) 少なくとも1つの薬剤として許容される担体と、(b) (i) T細胞受容体(TCR)の鎖の定常ドメイン、及び

(ii) TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド

からなる群から選択される少なくとも1つの免疫原をコードする単離核酸配列を含み、

核酸配列が1つ又は複数の転写制御配列と作動可能に連結した少なくとも1つの組換え構築体とを含む、DNAワクチン組成物を提供する。

20

【0176】

本発明の他の実施形態では、組成物は本明細書で前に記載したT細胞介在性炎症疾患を治療するのに有用である。

【0177】

本発明のDNAワクチン組成物は、前記治療を必要とする個体に投与する。記載した好ましい実施形態中のさらに他の特徴によれば、個体はヒト、イヌ、ネコ、ヒツジ、ウシ、ウマ及びブタからなる群から選択される。

【0178】

本発明の他の実施形態では、DNAワクチン組成物は、薬剤として許容される担体をさらに含む。DNAワクチンに関して「担体」は、適切な*in vivo*部位に本発明の核酸配列を送達するための賦形薬として適した任意の物質を指す。このように担体は、本発明の核酸分子を含む治療用組成物の、薬剤として許容される賦形薬として作用することができる。好ましい担体は、核酸分子が細胞に到着したときに、核酸分子が細胞に進入しその細胞によって発現され得る形で本発明の核酸分子を保つことができる。本発明のDNAワクチンの担体には、(1)細胞に核酸分子を運ぶが、特異的に標的化しない賦形薬又は配合物(本明細書では非標的化担体と呼ぶ)；及び(2)動物又は特定細胞中の特定部位に核酸分子を送達する賦形薬又は配合物(即ち、標的化担体)がある。非標的化担体の例には、水、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、血清含有溶液、ハंक溶液、他の水性の生理的に平衡状態の溶液、油、エステル及びグリコールがあるが、これらだけには限られない。水性担体は、例えば化学的安定性及び等張性を増大させることによってレシピエントの生理状態を見積もるのに必要とされる、適切な補助物質を含むことができる。

30

40

【0179】

適切な補助物質には、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、及びリン酸バッファー、トリスバッファー、及び重炭酸バッファーを生成するために使用する他の物質がある。補助物質は防腐剤、例えば、チメロサル、*m*-及び*o*-クレゾール、ホルマリン及びベンゾールアルコールも含むことができる。エアロゾル送達に好ましい補助物質には、動物に対して非毒性の界面活性物質、例えば約6~約22の炭素原子を含む脂肪酸のエステル又はエステルの一部分がある。エステルの例にはカプロン酸、オクタン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノー

50

ル酸、リノレン酸、オレステアリン酸、及びオレイン酸がある。他の担体は、例えば、皮膚を介してバイオリスティックガンと共に使用するための金属粒子（例えば、金粒子）を含むことができる。本発明の治療用組成物は、従来の方法によって滅菌することができる。

【0180】

標的化担体は、本明細書では「送達媒体」と呼ぶ。本発明の送達媒体は、本発明の治療用組成物を動物中の標的部位に送達することができる。「標的部位」は、そこに治療用組成物を送達することを望む動物中の部位を指す。例えば標的部位は、リポソーム又は他の送達媒体を使用する直接的注射又は送達によって標的化される炎症領域であってよい。送達媒体の例には、人造及び天然脂質含有送達媒体があるが、これらだけには限られない。天然脂質含有送達媒体には、細胞及び細胞膜がある。人造脂質含有送達媒体には、リポソーム及びミセルがある。本発明の送達媒体を修飾して動物中の特定部位を標的化することができ、これによってその部位で本発明の核酸分子を標的化及び利用することができる。適切な修飾には、送達媒体の脂質部分の化学式の処理及び/又は好ましい部位、例えば好ましくは細胞型に送達媒体を特異的に標的化することができる化合物を媒体に導入することができる。特に標的化は、媒体中の化合物と細胞の表面上の分子の相互作用によって、送達媒体を特定の細胞と結合させることを指す。適切な標的化合物には、特定部位で他の分子と選択的に（即ち特異的に）結合することができるリガンドがある。このようなリガンドの例には抗体、抗原、受容体及び受容体リガンドがある。例えば、癌細胞の表面上でみられる抗原に特異的な抗体を、リポソーム送達媒体の外側表面に導入して、癌細胞に送達媒体を標的化することができる。送達媒体の脂質部分の化学式を処理することによって、送達媒体の細胞外又は細胞内標的化を調節することができる。例えば、リポソームの脂質二重層の電荷を変える化学物質をリポソームの脂質式部分に加えて、特定の電荷特性を有する特定の細胞とリポソームを融合させることができる。

10

20

【0181】

本発明の好ましい送達媒体はリポソームである。リポソームは、動物中の好ましい部位に本発明の核酸配列を送達するのに十分な量の時間、動物中で安定状態に留まることができる。本発明のリポソームは、少なくとも約30分間、より好ましくは少なくとも約1時間及びさらにより好ましくは少なくとも約24時間、それが投与された動物中において安定状態であることが好ましい。

30

【0182】

本発明のリポソームは、本発明の核酸分子を動物中の特定又は選択部位に標的化することができる脂質組成物を含む。好ましくは、リポソームの脂質組成物は、動物の任意の器官、より好ましくは動物の肺、肝臓、脾臓、心臓脳、リンパ節及び皮膚、及びさらにより好ましくは動物の肺に標的化することができる。

【0183】

本発明のリポソームは、標的細胞の原形質膜と融合して核酸分子を細胞に送達することができる脂質組成物を含む。好ましくは、本発明のリポソームのトランスフェクション効率は、約 10^6 個の細胞に送達するリポソーム16ナノモル(nmol)当たりDNA約0.5マイクログラム(μg)、より好ましくは約 10^6 個の細胞に送達するリポソーム16nmol当たりDNA約1.0 μg 、及びさらにより好ましくは約 10^6 個の細胞に送達するリポソーム16nmol当たりDNA約2.0 μg である。

40

【0184】

本発明の好ましいリポソームは、約100ナノメートルと500ナノメートル(nm)の間、より好ましくは約150nmと450nmの間、及びさらにより好ましくは約200nmと400nmの間の直径である。

【0185】

本発明と共に使用するのに適したリポソームは、任意のリポソームを含む。本発明の好ましいリポソームは、例えば当業者に知られている遺伝子送達法において通常使用されるリポソームを含む。より好ましいリポソームは、ポリカチオン性脂質組成物を有するリポ

50

ソーム、及び/又はポリエチレングリコールと結合したコレステロール骨格を有するリポソームを含む。

【0186】

リポソームと本発明の核酸配列の複合体形成は、当技術分野で標準的な方法を使用して実施することができる。リポソームに加えるのに適切な本発明の核酸分子の濃度は、細胞が十分な量のT細胞受容体の鎖の定常ドメイン又はそれに由来する活性ペプチドを生成して望ましい形式でエフェクター細胞の免疫を制御することができるように、十分な量の核酸分子を細胞に送達するのに有効な濃度を含む。好ましくは、約0.1 µg ~ 約10 µgの本発明の核酸配列を約8 nmolのリポソームと組合せ、より好ましくは約0.5 µg ~ 約5 µgの核酸分子を約8 nmolのリポソームと組合せ、及びさらにより好ましくは約1.0 µgの核酸分子を約8 nmolのリポソームと組合せる。

10

【0187】

他の好ましい送達媒体は、組換えウイルス粒子ワクチンを含む。本発明の組換えウイルス粒子ワクチンは本発明の治療用組成物を含み、その中で組成物中に含まれる組換え分子はウイルスコート中にパッケージされており、DNAが細胞中に進入してDNAが細胞内で発現するのを可能にする。ウイルス、ポックスウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アリーナウイルス及びレトロウイルスに基づく粒子だけには限られないが、これらを含めたいくつかの組換えウイルス粒子を使用することができる。

【0188】

他の好ましい送達媒体は、組換え細胞ワクチンを含む。本発明の好ましい組換え細胞ワクチンは、同種異系（即ち、患者以外の供給源に由来するが、患者と組織適合性がある細胞）又は自己由来（即ち、患者から単離した細胞）細胞に、治療用組成物中に含まれる組換え分子をトランスフェクトし、照射し、例えば皮内、静脈内又は皮下注射によって患者に投与する、細胞ワクチンを含む。細胞ワクチンによって投与される治療用組成物は、担体を含まない本発明の組換え分子を含む。

20

【0189】

疾患を有する動物を治療するために、本発明のDNAワクチン組成物を、組成物が疾患から動物を治療することができるような有効な形式で動物に投与する。例えば組換え分子は、有効な形式で動物に投与したとき、動物を苦しめる疾患を軽減するのに十分な形式でエフェクター細胞の免疫を刺激することができる。本発明によれば、疾患の治療は、疾患の軽減及び/又は一次疾患の発生から生じる二次疾患の進行の予防を指す。有効な投与プロトコル（即ち、有効な形式でのDNAワクチン組成物の投与）は、疾患の治療をもたらす適切な用量パラメータ及び投与形式を含む。有効な用量パラメータ及び投与形式は、個々の疾患に関して当技術分野で標準的である方法を使用して決定することができる。このような方法は、例えば生存率、副作用（即ち毒性）の測定、及び疾患の進行又は退行を含む。特に、本発明の治療用組成物の用量パラメータ及び投与形式の有効性は、炎症疾患を治療するとき、応答率を評価することによって決定することができる。このような応答率は、部分的又は完全な軽減のいずれかに応答する患者の集団中の、治療される患者の割合を指す。

30

【0190】

本発明によれば、適切な一回用量サイズは、適切な期間で一回又は複数回投与したときに疾患を有する動物を治療することができる用量である。用量は治療する疾患に応じて変わる可能性がある。直接的注射技法によって使用するのに適した用量の本発明の治療用組成物を当業者によって使用して、動物のサイズに基づいて全身投与に適した一回用量サイズを決定することができる。炎症疾患を治療するのに適した治療用組成物の一回用量は、細胞への組換え分子のトランスフェクション後に、T細胞介在性の炎症疾患を減らす、及び好ましくは除去するのに十分な量の本発明の免疫原をコードする配列である。本発明の免疫原をコードする組換え分子の好ましい一回用量は、標的細胞集団にトランスフェクトしたとき、トランスフェクト細胞当たり約250フェムトグラム（fg）~ 約1 µg、好ましくは約500 fg ~ 約500ピコグラム（pg）、及びより好ましくは約1 pg ~ 約

40

50

100 pgの「T細胞受容体の鎖の定常ドメイン又はそれに由来する活性ペプチド」の生成をもたらす量である。

【0191】

リポソームと複合体形成した本発明の免疫原をコードする組換え分子の好ましい一回用量は、リポソーム800 nmol当たり約100 µgの合計DNA~リポソーム16マイクロモル(µmol)当たり約2 mgの合計組換え分子、より好ましくはリポソーム1.2 µmol当たり約150 µg~リポソーム8 µmol当たり約1 mgの合計組換え分子、及びさらにより好ましくはリポソーム2 µmol当たり約200 µg~リポソーム3.2 µmol当たり約400 µgの合計組換え分子である。

【0192】

動物に投与するための非標的化担体中で本発明の免疫原をコードする組換え分子の好ましい一回用量は、体重1 kg当たり約12.5 µg~約20 mgの合計組換え分子、より好ましくは体重1 kg当たり約25 g~約10 mgの合計組換え分子、及びさらにより好ましくは体重1 kg当たり約125 µg~約2 mgの合計組換え分子である。

【0193】

動物に投与する用量数は、疾患の程度及び治療に対する個々の患者の応答性に依存することは、当業者に明らかであるはずである。したがって、適切な用量数が疾患の退行を引き起こすのに必要とされる任意の数を含むことは、本発明の範囲内にある。好ましいプロトコルは、約1年までの間の(前に記載したのと同様の)一回用量の月一回の投与である。非標的化担体中に本発明の免疫原をコードし又はリポソームと複合体形成した組換え分子を含む治療用組成物の好ましい用量数は、患者当たり約1~約10投与、好ましくは患者当たり約2~約8投与、及びさらにより好ましくは人間当たり約3~約5投与である。このような投与は、退行の兆候が現れるまで2週間毎に1度、次いで疾患が消失するまで月に1度与えることが好ましい。

【0194】

DNAワクチン組成物は、疾患を治療する動物中での治療用タンパク質に投与した本発明の組換え分子の発現を可能にする形式で動物に投与する。DNAワクチン組成物は、動物中の部位への組成物の局所投与、及び全身投与だけには限られないが、これらを含めた様々な方法で動物に投与することができる。

【0195】

局所投与によって送達するDNAワクチン組成物は、(a)非標的化担体中の本発明の組換え分子(例えば、例えばWolfら、1990、Science 247、1465~1468中で教示されたのと同様の「裸の」DNA分子として)及び(b)本発明の送達媒体と複合体形成した本発明の組換え分子を含む。局所投与に適した送達媒体はリポソームを含む。局所投与用の送達媒体は、媒体を特定部位に標的化するためのリガンドをさらに含むことができる。

【0196】

全身投与において有用なDNAワクチン組成物は、本発明の標的送達媒体と複合体形成した本発明の組換え分子を含む。全身投与によって使用するのに適した送達媒体は、媒体を特定部位に標的化するためのリガンドを含むリポソームを含む。器官、特に到達するのが困難な器官(例えば、心臓、脾臓、肺又は肝臓)が治療の標的部位であるとき、全身投与は特に有利である。

【0197】

全身投与の好ましい方法は、静脈内注射、エアロゾル、経口及び経皮(局所)送達を含む。静脈内注射は、当技術分野で標準的である方法を使用して実施することができる。エアロゾル送達も、当技術分野で標準的である方法を使用して実施することができる(例えば、その全容が参照として本明細書に組み込まれる、Striblingら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 189:11277~11281、1992を参照)。経口送達は、本発明のDNAワクチン組成物と、動物の消化管内での消化酵素による分解に耐えることができる担体を複合体形成させることによって、実施することができる

10

20

30

40

50

。このような担体の例には、当技術分野で知られているようなプラスチックカプセル又は錠剤がある。本発明の治療用組成物と皮膚を通過することができる親油性試薬（例えばDMSO）を混合することによって、局所送達を実施することができる。

【0198】

本発明のさらに他の実施形態は、動物中のT細胞活性を抑制するための方法であって、（a）T細胞受容体の鎖の定常ドメイン又はそれに由来する活性ペプチド又はその類似体をコードする裸の核酸分子と、（b）薬剤として許容される担体とを含む治療用組成物を有効量動物に投与することを含み、核酸分子が転写制御配列と作動可能に連結しており、治療用組成物が過剰なT細胞活性を含む動物中の部位を標的化する方法である。

【0199】

適切な実施形態、本発明の治療法において有用な、本発明の治療用組成物の一回用量サイズ、用量数及び投与形式は、本明細書に詳細に開示する。

【0200】

本発明のDNAワクチン組成物は、組成物が自己抗原（即ち、外来性抗原ではなく「自己」）によるT細胞の有害な刺激を抑制する点で、自己免疫疾患の治療にも有利である。DNAワクチン組成物中の本発明の免疫原をコードする組換え分子は、細胞へのトランスフェクション時に、自己免疫疾患と関係があるT細胞の有害な活性を低下させるT細胞受容体の鎖の定常ドメイン又はそれに由来する活性ペプチドを生成する。自己免疫疾患の治療において使用するのに好ましい治療用組成物は、本発明の免疫原をコードする組換え分子を含む。自己免疫疾患の治療において使用するのにより好ましい治療用組成物は、本発明の非標的化担体、好ましくは生理食塩水又はリン酸緩衝生理食塩水と組合せた、本発明の免疫原をコードする組換え分子を含む。

【0201】

本発明のこのような治療用組成物は、多発性硬化症、全身性エリテマトーデス、重症筋無力症、関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、乾癬、多発性関節炎、免疫介在性血管炎、免疫介在性糸球体腎炎、炎症性ニューロパシー及びサルコイドーシスだけには限られないが、これらを含めた自己免疫疾患を治療するのに特に有用である。

【0202】

自己免疫疾患を治療するために動物に投与するための、非標的化担体中で本発明の免疫原をコードする組換え分子の一回用量は、体重1キログラム（kg）当たり約12.5 μg ~ 約20 mgの合計組換え分子、より好ましくは体重1 kg当たり約25 μg ~ 約10 mgの合計組換え分子、及びさらにより好ましくは体重1 kg当たり約125 μg ~ 約2 mgの合計組換え分子である。

【0203】

自己免疫疾患を治療するために動物に投与するための、非標的化担体中で本発明の免疫原をコードする組換え分子の用量数は、6ヶ月毎に約1度、より好ましくは3ヶ月毎に約1度、及びさらにより好ましくは1ヶ月に約1度の一回注射である。

【0204】

本発明のDNAワクチン組成物を投与して自己免疫疾患を治療するための好ましい方法は、局所投与による方法、好ましくは直接注射である。直接注射技法は、自己免疫疾患の治療において特に重要である。DNAワクチン組成物は患者中の筋肉細胞に直接注射して、それによって本発明の組換え分子の長期発現（例えば、数週間~数ヶ月）をもたらすことが好ましい。「裸のDNA」の形の本発明の組換え分子は、患者中の筋肉細胞に直接注射によって投与することが好ましい。

【0205】

他の態様では本発明は、DNAワクチンを調製するための、

（i）T細胞受容体（TCR）の鎖の定常ドメイン、

（ii）TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド、及び

（iv）その類似体、誘導體及び塩

からなる群から選択される少なくとも1つの免疫原をコードする、単離核酸配列を含む組

10

20

30

40

50

換え構築体の使用を対象とする。様々な実施形態において、必要性のある対象においてT細胞介在性炎症疾患を治療するため、T細胞介在性炎症疾患の進行を予防するため、且つ/又は抗エルゴタイプのT細胞活性を増大させるために、DNAワクチンは有用である。

【0206】

T細胞ワクチン及び関連法

又は、T細胞予防接種を本発明に従い使用することができる。その目的のために本発明は、T細胞介在性炎症疾患を予防又は治療するための方法であって、(a)個体から細胞を入手するステップ、(b)T細胞受容体の鎖の定常ドメイン又はその活性断片に細胞を*in vitro*で曝すステップ、及び(c)曝露細胞を個体に再導入するステップを含む方法を提供する。理論によって縛られることは望まずに、多くの実施形態で、この方法は前記個体において抗エルゴタイプのT細胞応答を増大させ、それによって疾患を治療又は予防する。

10

【0207】

他の態様において本発明は、

(i) T細胞受容体(TCR)の鎖の定常ドメイン、

(ii) TCRの鎖の定常ドメインの免疫原性断片を含むペプチド、及び

(iii) その類似体、誘導體及び塩

からなる群から選択される少なくとも1つの免疫原に*ex vivo*で曝した弱毒化活性T細胞を含む、医薬組成物を提供する。

【0208】

この態様によれば、このようなT細胞ワクチン(TCV)は、同種異系(即ち、患者以外の供給源に由来するが、患者と組織適合性がある細胞)又は自己由来(即ち、患者から単離した細胞)細胞を*in vitro*で活性化してMHC-IIの発現を誘導し、治療用組成物中に含まれるTCR定常ドメイン又はそれに由来する免疫原に曝し、弱毒化し、例えば皮内、静脈内又は皮下注射によって患者に投与する、細胞ワクチンを含むことが好ましい。一実施形態では、患者はヒトである。

20

【0209】

T細胞を活性化することができる適切な抗原非特異的物質は当技術分野で知られており、マイトジェン、例えば、コンカナバリンA、フィトヘマグルチニン、及びヤマゴボウマイトジェンがあるが、これらだけには限られない。他の活性化物質は、CD3細胞表面分子に対する抗体、CD2細胞表面分子に対する抗体、CD28細胞表面分子に対する抗体、及びCD2又はCD28の天然リガンドだけには限られないが、これらを含めたT細胞表面構造に対する抗体である。他の活性化物質には、ホルボールミリスチン酸アセテートなどのホルボールエステル、又はホルボールエステルとイオノマイシンなどのカルシウムイオノフォアの組合せがある。T細胞受容体の鎖に対する抗体も、T細胞活性化物質として考えられる。このような物質による活性化によって、T細胞はMHC-IIだけには限られないが、これを含めた様々な表面マーカーを上方制御し、本明細書で開示するMHC-IIの文脈でTCR定常ドメインのエピトープを発現することができる。

30

【0210】

本発明のTリンパ球活性化ステップは、T細胞増殖因子又は刺激因子、例えばIL-1、IL-2又はIL-4などを活性化中の一時期又は全体で培養培地に加えることを含む可能性があるか、又は含まない可能性がある。

40

【0211】

Tリンパ球を弱毒化するための治療は、当技術分野でよく知られている方法による、線又はX線照射、マイトマイシンCを用いた治療だけには限られないが、これらを含むことができ、本発明によって使用することもできる(Ben-Nunら、1987、Holoshitzら、1983)。特定の一実施形態では、線照射(2000~10000 rads)に曝すことによって細胞を弱毒化する。

【0212】

他の態様では本発明は、その必要性のある対象においてT細胞介在性の病状を治療又は

50

予防する方法であって、(a)対象から又は前記対象と組織適合性があるドナーからT細胞を単離すること、(b) *ex vivo*でT細胞を活性化して主要組織適合遺伝子複合体(MHC)IIの発現を誘導すること、(c)前記活性化細胞を本発明の免疫原に曝すこと、(d)前記T細胞を弱毒化すること、及び(e)前記対象中で抗エルゴタイプの応答を誘導するのに十分な量、対象中に前記細胞を導入することを含む方法を提供する。

【0213】

対象中に導入する細胞の有効量は、動物モデル試験バイオアッセイ又はシステムから推定することができる。弱毒化TCR定常ドメイン由来ペプチド充填T細胞の適切な量は、投与当たり $10^6 \sim 10^8$ 個の細胞であることが好ましい。

【0214】

他の実施形態では、他の適切な弱毒化抗原提示細胞(APC)を本発明のペプチドに曝し、対象に投与することができる。このようなAPCは、免疫系の特異的エフェクター細胞によって認識され得る形式で、抗原-MHCクラスII複合体の形で本発明のペプチドを提示することができ、これによって提示される抗原に対する有効な細胞の免疫応答を誘導することができる。適切な細胞集団は例えば末梢血単核細胞、及びそこから精製するAPC、例えば、マクロファージ、B細胞及び樹状細胞であってよい。

【0215】

他の態様では本発明は、T細胞ワクチン組成物、及びTCR定常ドメイン由来ペプチドに特異的な抗エルゴタイプ細胞の養子免疫伝達を使用する方法を提供する。

【0216】

抗原特異的細胞系の生成は当業者の能力の範囲内にあり、治療用TCVの開発に現在適用されている(例えば、Achironら、2004を参照)。TCVの養子免疫伝達に適した本発明の免疫原に特異的な抗エルゴタイプ細胞を生成するために、前に記載したように、TCR定常ドメイン由来ペプチド充填弱毒化活性化T細胞、又は他の専門APCの第二集団の存在下でのインキュベーションによって、T細胞の第一集団を活性化する。このような弱毒化T細胞又はAPCは、第一T細胞集団とのインキュベーション前にTCR定常ドメイン由来ペプチドと共にインキュベートすることができ、又は代替的に、TCR定常ドメイン由来ペプチドの存在下で第一T細胞集団と共にインキュベートすることができる。第一集団中に存在するTCR定常ドメイン由来ペプチドに特異的な抗エルゴタイプT細胞は、第二集団のMHC-II分子上に存在するTCR定常ドメインのエピトープを認識する。したがって、使用する2つの細胞集団は互いに組織型が適合しており(組織適合性があり)、且つ前記治療を必要とする対象と組織適合性があることは理解されよう。この活性化ステップは少なくとも1回繰り返して(及び典型的には2~3回実施する)、生成する望ましいペプチド特異的抗エルゴタイプT細胞のT細胞集団を増大させることが有利である。方法は、例えばIL-2の存在下で培養することによって、生成するペプチド特異的な抗エルゴタイプ増大T細胞集団を広げる1つ又は複数のステップを、場合によってはさらに含むことができる。生成したT細胞集団は、前記対象中で抗エルゴタイプの応答を誘導するのに十分な量、次いで前記対象に投与する。TCR定常ドメイン由来ペプチドに特異的な抗エルゴタイプ増大T細胞の適切な量は、投与当たり $10^7 \sim 3 \times 10^7$ 個の細胞であることが好ましい。

【0217】

診断用組成物及び方法

他の実施形態では、本発明の新規なペプチドは、これらのペプチドに対する免疫応答と関係がある状態を診断するのに有用である。したがって本発明は、本発明のペプチドを含む抗原プローブと特異的に結合する対象の免疫グロブリンの能力を測定することによって実施される診断法であって、そのような能力がその状態を示す診断法、並びにこれらの方法中で有用な組成物及びキットを提供する。

【0218】

一実施形態では、必要性のある対象中の免疫応答と関係がある状態を診断する方法であって、

10

20

30

40

50

- d) 対象から抗体を含む生物サンプルを入手すること、
- e) 抗原 - 抗体複合体が形成され得るような条件下で、配列番号 1 ~ 146 及び 157 ~ 167 のいずれか 1 つで示されるアミノ酸、並びにその類似体、誘導体及び塩の配列を有するペプチドを含む抗原プローブとサンプルを接触させること、
- f) 対象から入手した少なくとも 1 つの抗体の、抗原プローブと特異的に結合する能力を測定することを含み、
その能力が状態を示す方法を提供する。

【0219】

他の実施形態では、抗原プローブと特異的に結合する抗体の能力の検出は、特異的な抗原 - 抗体の複合体形成を定量化することによって実施することができる。本明細書で使用
10
する用語「特異的に結合する」は、抗体と抗原プローブの結合が無関係な分子の存在によって拮抗的に阻害されないことを意味する。

【0220】

いくつかの実施形態では、前記状態は増大した T 細胞介在性の応答と関係がある。いくつかの特定の
実施形態では、前記状態は増大した T 細胞活性と関係がある。様々な実施形態において、増大した T 細胞介在性の免疫応答は有害な免疫応答である可能性があり、又は他の実施形態では、防御免疫応答である可能性がある。他の実施形態では、前記状態は T 細胞介在性炎症疾患である。他の特定の
20
実施形態では、前記状態は増大した抗エルゴタイプの T 細胞活性と関係がある。

【0221】

本発明の方法は、対象から単離した IgG イソ型の抗体と特異的に結合する、本発明のペプチドの能力を測定することによって実施することが好ましい。
20

【0222】

対象から適切な抗体を含む生物サンプルを入手するための方法は、充分当業者の能力の範囲内にある。典型的には適切なサンプルは、全血及びそれに由来する生成物、例えば、
血漿及び血清を含む。他の実施形態では、他の抗体を含むサンプル、例えば尿及び唾液サンプルを使用することができる。ヒト血清サンプルの入手に関する非制限的な実施例は、以下の実施例 12 中に表す。

【0223】

いくつかの実施形態では、本発明によって調製したペプチド及びペプチド組成物は、それらを酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA)、酵素イムノドットアッセイ、間接血球凝集反応アッセイ (例えば PHA 試験)、抗体 - ペプチド - 抗体サンドウィッチアッセイ、ペプチド - 抗体 - ペプチドサンドウィッチアッセイ、又は他のよく知られているイムノアッセイにおいて試験試薬として使用することによって、T 細胞介在性の病状を診断するために使用することができる。本発明によれば、対象ペプチドと共に任意の適切なイムノアッセイを使用することができる。このような技法は当業者によく知られており、多くの標準的な免疫学のマニュアル及びテキスト中に記載されてきている。特定の
30
一実施形態では、イムノアッセイは、本発明のペプチド組成物でコーティングした固相を使用する ELISA である。例えばこのようなキットは、固相に固定した本発明のペプチド、及び検出する抗体の非可変領域を認識することができるタグ抗体、タグ抗ヒト Fab などを含む
40
ことができる。キットは、キットを使用するための教示書、及びキットの材料を保持するための容器も含むことができる。任意の従来のタグ又は標識、例えば、放射性同位体、酵素、発色団又は蛍光物質を使用することができる。典型的な放射性同位体は、ヨウ素 - 125 又はイオウ - 35 である。この目的の典型的な酵素には、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ホースラディッシュガラクトシダーゼ及びアルカリホスファターゼがある。

【0224】

いくつかの実施形態では、抗原プローブは、少なくとも 1 つの本発明のペプチドを含む複数の抗原プローブを含む。

【0225】

いくつかの好ましい実施形態では、抗原プローブと特異的に結合する抗体の能力の測定
50

は、抗原プローブアレイに基づく方法を使用して実施する。好ましくは、アレイを適切に希釈した対象の血清と共にインキュベートして、血清中に含まれる抗体と固定状態の抗原プローブの間の特異的な結合を可能にし、アレイから非結合血清を洗浄除去し、洗浄したアレイは望ましいイソ型の抗体の検出可能な標識結合リガンドと共にインキュベートして、アレイから非結合標識を洗浄除去し、及びそれぞれの抗原プローブと結合した標識のレベルを測定する。本発明の抗原プローブなどの抗原と特異的に結合する対象の抗体の能力を測定する、アレイに基づく方法を実施するための十分なガイダンスは、以下の実施例項及び当技術分野の文献中に与えられる。肺癌の診断において抗原アレイに基づく方法を使用する非制限的な実施例は、本明細書の以下の実施例 1 2 中に与える。

【0226】

本発明の方法に適したアレイを調製するための、様々な方法が開発されてきている。現況技術の方法は、平面状の支持体、典型的には顕微鏡スライドなどのガラス支持体の表面上の密接に位置する特定のアドレス可能な場所に、抗原プローブを含む別個の溶液を施用又は「スポットする」ためのロボット装置の使用を含み、適切な熱及び/又は化学処理によって後に処理して、抗原プローブと支持体の表面を結合させる。適切な支持体は、シリコン、ニトロセルロース、紙、セルロース支持体なども含み得る。

【0227】

好ましくは、アレイの特定のアドレス可能な場所と結合した、それぞれの抗原プローブ、又は本発明の抗原プローブの別個の部分集合は、少なくとも2箇所、より好ましくは少なくとも3箇所のアレイの別個の特定のアドレス可能な場所と独立して結合して、統計上

【0228】

確かなデータの生成を可能にする。本発明の抗原プローブ以外に、アレイは対照抗原プローブを有利に含むことができる。このような対照抗原プローブは、標準化対照プローブを含むことができる。標準化対照プローブから得られるシグナルは、結合条件、標識強度、「読み取り」有効度、及び所与の結合抗体 - プローブリガンド相互作用のシグナルの変化を引き起こす可能性がある他の要因の変化の対照をもたらす。例えば、抗原プローブアレイの全ての他の抗原プローブから読み取られる蛍光強度などのシグナルを、標準化対照プローブからのシグナル（例えば、蛍光強度）で割って、それによって測定値を標準化する。標準化対照プローブは様々なアドレス可能な場所、抗原プローブアレイと結合させて、抗体 - リガンドプローブの有効度の位置による変化を制御することができる。標準化対照プローブは、アレイの隅又は端に位置して周辺効果を制御し、及びアレイの中央に位置することが好ましい。

【0229】

標識抗体リガンドは、任意の様々な適切な型の抗体リガンドであってよい。抗体リガンドは、使用する対象の抗体のFc部分と特異的に結合することができる抗体であることが好ましい。例えば、対象の抗体がIgGイソ型である場合、抗体リガンドは、対象のIgG抗体のFc領域と特異的に結合することができる抗体であることが好ましい。

【0230】

対象の抗体のリガンドは、任意の様々な型の検出可能な標識と結合させることができる。標識は蛍光物質であることが好ましく、Cy3であることが最も好ましい。又は、蛍光物質はCy5、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコエリスリン(PE)、ローダミン、テキサスレッドなどを含めた任意の様々な蛍光物質であってよい。特定のイソ型の抗体に特異的な適切な蛍光物質結合抗体は、市販の供給業者から広範囲で入手可能であり、抗体産生の方法は充分確立されている。

【0231】

対象の抗体は、用途及び目的に応じて、任意の様々な方法におけるその抗原プローブの結合能力の分析のために単離することができる。対象の抗体は適切且つ好都合に血清又はその希釈物の形であってよいが、抗原プローブと特異的に結合するそれらの能力を試験する前に、抗体に任意の望ましい程度の精製を施すことができる。本発明の方法は、対象の完全抗体、又は抗体の可変領域を含む対象の抗体断片を使用して実施することができる。

10

20

30

40

50

【0232】

本発明をここで一般的に記載しているが、本発明は以下の実施例を参照することによってさらに容易に理解されるはずであり、実施例は例示によって与え、本発明を制限するとは考えない。

【実施例】

【0233】

本明細書で使用する用語「p C1」及び「p C2」は、T細胞受容体の定常ドメイン(TCR-C)の鎖のC1及びC2変異体分子のコード配列を指す。本明細書で使用する用語「組換えC1」又は「r C1」及び「組換えC2」又は「r C2」は、T細胞受容体の定常ドメイン(TCR-C)の鎖の組換えC1及びC2変異体分子を指す。C1/2ペプチドは、T細胞受容体の定常ドメイン(TCR-C)の鎖のC1又はC2変異体分子に由来するペプチドである。

10

【0234】

動物

メスのルイスラットを飼育し、Weizmann Institute of Scienceの動物飼育センター内で無病原体条件下に保った。1~2ヶ月齢のラットを、予防接種実験に使用した。実験は動物福祉協会の監督及びガイドラインの下で実施した。

【0235】

抗原及びアジュバント

ペプチドは以前に記載されたのと同様に合成した(Quintanaら、2002)。使用したHSP65Mt176~190ペプチドは、EESNTFGLQLELTEG(配列番号155)であった。

20

C1及びC2ペプチド：表1参照。

【0236】

精製組換えHSP65は、Prof. Ruurd van der Zee(Institute of Infectious Diseases and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine、ユトレヒト、オランダ)によって気前よく与えられた。

【0237】

C1及びC2ラット分子の鎖を、標準的な分子生物学の技法を使用する細菌発現用に、pcDNA3からpQE-80Lプラスミド(Qiagen)のBamHI/HindIII部位にサブクローニングした。C1及びC2組換えタンパク質(r C1及びr p C2)が発現され、製造者の教示書に従い精製した。

30

【0238】

M. tuberculosis系統H37Ra及び不完全フロインドアジュバンド(IFA)はDifco(デトロイト、MI、USA)から購入した。ツベルクリン精製タンパク質誘導体(PPD)は、Statens Serum Institut(コペンハーゲン、デンマーク)によって与えられた。オバアルブミン(OVA)及びコンカナバリンA(ConA)は、Sigma(レホボット、イスラエル)から購入した。

【0239】

DNAプラスミド及び予防接種

p C1及びp C2ベクターを、以下の方法で作製した。tcr遺伝子の鎖のC1又はC2領域を、酵素BamHI(オリゴヌクレオチド5')又はHindIII(オリゴヌクレオチド3')の制限部位を含む特異的オリゴヌクレオチドを使用して、ルイスラットのリンパ節細胞から調製したcDNAからPCRによって増幅させた。次いでアンプリコンを、標準的な分子生物学の技法を使用して、pcDNA3又はpQEベクター(In vitro gen、NV、Leek、オランダ)にクローニングした。プラスミドをシーケンシングして、cDNAが正しく挿入されin vitroで転写されたこと確認し、プラスミドが機能的であったか調べた。

40

【0240】

50

以前に記載されたのと同様に (Quintanaら、2002)、プラスミドDNAは大規模に調製し、カルジオトキシン (Sigma、レボット、イスラエル) を用いた予備処理後に注射した。簡単に言うと、150 μ g の pcDNA3、pC1又はpC2を三回 (AA誘導に対して第-40日、-26日、-12日) 大腿四頭筋に、ラットに予防接種した。エンドトキシンのレベルをLimulus Amoebocyte溶解物によって調べ、常にin vivoでの使用に関する許容レベル未満 (0.02 EU未満/DNA 1 μ g) であったことが分かった。DNAの最後の注射後12日でAAが誘導された。空ベクターpcDNA3は、DNA予防接種対照として使用した。

【0241】

AA誘導及び評価

ラット当たり1mgの熱殺菌したMt系統H37Ra (Difco) を使用して、記載されたのと同様に (Quintanaら、2002) AAを誘導した。各実験群及び対照群は少なくとも8匹のラットを含んでいた。AA誘導の日は第0日として示し、疾患の重症度は各動物中の全4本の肢を直接観察することによって評価した。0と4の間の相対値を関節の炎症、発赤及び変形の程度に基づいて各肢に割り当て、したがって、個々の動物に関して考えられる最大値は16であった (Quintanaら、2002)。平均AA値 (\pm SEM) を各実験群に関して示す。キャリパーを用いて後肢の直径を測定することによって関節炎も定量化した。測定値はAA誘導の日及び26日後 (AAのピーク) に得た。結果は各群中の全動物に関する2つの値の間の差の平均 \pm SEMとして表す。疾患を記録した人間は、群の同一性は知らなかった。実験は少なくとも3回繰り返し、同様の結果を得た。

【0242】

T細胞増殖

他に言及しない限り、以前に記載されたのと同様に (Quintanaら、2002)、T細胞増殖アッセイは、疾患がそのピークであるAAの誘導後第26日で実施した。簡単に言うと、膝窩及び鼠径リンパ節細胞 (LNC) を、抗原を含むか又は含まないウエル当たり 2×10^5 個の細胞で、200 μ lの丸底マイクロタイターウエル (Costar Corp.、ケンブリッジ、USA) 中において四つ一組で培養した。T細胞マイトジェンコンカナバリンA (ConA) は、T細胞増殖の陽性対照として使用した。培養物は5%CO₂の加湿雰囲気中で37°Cにおいて96時間インキュベートした。T細胞の応答は、最後の18時間ウエルに加えた [メチル-³H] -チミジン (Amersham、Buckinghamshire、UK; 1 μ Ci/ウエル) の取り込みによって検出した。刺激指数 (SI) は、抗原又はマイトジェン含有ウエルと培地のみで培養した対照ウエルの平均c.p.mの比として計算した。T細胞増殖実験の結果はSI \pm SEMとして示し、SI<2であったT細胞の応答は有意でないと考えた。

【0243】

エルゴタイプの刺激用に、ルイスラットの2クローン、ペプチドMt176~190に特異的なルイスラットのA2T細胞クローン、及びペプチドHSP60の残基436~460に特異的なp277クローンを使用した。

【0244】

ペプチド又は組換えタンパク質を用いた予防接種

メスのルイスラットに、一回用量の100 μ gのIFAに乳化させたペプチド又は組換えタンパク質を腹腔内に免疫処置した。

【0245】

細胞の養子免疫伝達

ペプチド予防接種後第7日、又はペプチド予防接種後にAAが誘導された26日後のいずれかに、ペプチドを予防接種したラットから脾細胞を調製した。脾細胞 (1ml当たり 10^7 個の細胞) を、5%CO₂の加湿雰囲気中で37°Cにおいて48時間2.5 μ g/mlのConAを用いて活性化させた。細胞は滅菌PBSで洗浄し、非投薬ラットに静脈内注射した (ラット当たり 5×10^7 個の細胞)。脾細胞の移動後3日で、AAを誘導し

10

20

30

40

50

た。

【0246】

(実施例1：C1又はC2を用いたDNA予防接種は、アジュバント関節炎から保護する)

本発明者及び同僚は、IL-2受容体(CD25)の鎖を用いたDNA予防接種は、AAの進行を阻害したことを以前に実証している(Mimranら、2004)。我々はここで、ラットT細胞受容体(TCR)の定常ドメインの鎖のC1及びC2変異体分子を、DNA予防接種試験に適したpCDNA3ベクターにクローニングしている。このようにして、我々はpC1及びpC2の予防接種用構築体を作製した。ルイスラットにpC1、pC2又は対照としてpcDNA3を予防接種し、AAを誘導した。図1Aは、pC1又はpC2を用いた予防接種は、pcDNA3対照を予防接種したラットと比較して関節炎を有意に($p < 0.001$)阻害したことを示す。pC1又はpC2を用いた予防接種の防御効果は、足首の隆起の有意な低下においても反映された(図1B)。

10

【0247】

(実施例2：pC1又はpC2予防接種によってAAから保護したラットの免疫応答)

pC1又はpC2を用いたDNA予防接種によるAAの阻害と関係がある免疫応答を試験するために、我々はAAの誘導後第26日で免疫処置したラットのT細胞応答を分析した。我々はAAと関係があることが知られているマイコバクテリア抗原の集合体、HSP65、PPD及びMt176~190を用いて、*in vitro*で脱水リンパ節細胞(LNC)を刺激した。Mt176~190ペプチドは、AAを転移させることができる(van Edenら、1985)HSP65特異的T細胞クローンによって認識される、van Edenらによって記載されたHSP65の180~188エピトープを含む。我々は、ルイスラットのMHCクラスII分子と結合すると予想される、組換えC1及び組換えC2、又はC1/2ペプチドを対象とする免疫応答も試験した(表1参照)。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)は、対照抗原として含めた。いずれの実験群もGSTに対して有意な応答を示さず、いずれの実験群もコンカナバリンA(ConA)に対するそれらの応答は異ならなかった(図2B)。それにもかかわらず、pC1又はpC2構築体を用いたDNA予防接種によるAAの阻害は、マイコバクテリア抗原の集合体(PPD、HSP65及びMt176~190、図2A~B)に対するT細胞増殖応答の上方制御と関係があった。T細胞増殖のこの増大は、関節炎を阻害した他の免疫治療と関係があることも分かった(Mimranら、2004; Quintanaら、2002; Quintanaら、2003 Hogervorstら、1991)。さらに図2Cは、pC1予防接種が、配列番号149のペプチド(MED12)を対象とする有意な応答を誘導したことを示す。

20

30

【表 1】

表1：ラットのC1及びC2配列

A. ラットのTCR β 鎖変異体の定常ドメインC1T細胞受容体 β 鎖 (*gi:1332388*; 配列番号:153)

1 dlkvtppkv slfepseaei adkqkatlvc largffpdhv elswvwngke imngvstdpq
 61 aykesnnty clssrlrvsa pfwhnprnhf rcqvqfygit eednwsedsp kpvtqnisae
 121 awgradcrit sasyqqgvls atilyeilg klyav/vstl vvmtnvkrks s

10

C2T細胞受容体 β 鎖 (*gi:1332389*; 配列番号:154)

1 dlkvtppkv slfepseaei tdkqkatlvc largffpdhv elswvwngke imngvstdpq
 61 aykesnnty clssrlrvsa pfwhnprnhf rcqvqfygit eednwsedsp kpvtqnisae
 121 awgradcgit sasyhqgvls atilyeilg katlyav/vs alvlmamvkk kns

B. Reizisらによって記載された結合モチーフに基づいて、MHCクラスII結合物質として
同定したN12、MED12及びC2Cペプチド

20

N12 (C1) 5 vtppkvslfepseaeia 21

C1 vtppkv <u>slfepseaeia</u>	配列番号: 147
C2 vtppkv <u>slfepseaeit</u>	配列番号: 148

MED12 (C1) 108 dspkpvtqnisaeawgr 124

C1 dspkpvt <u>qnisaeawgr</u>	配列番号: 149
C2 dspkpvt <u>qnisaeawgr</u>	配列番号: 150

C2C(C2) 157 vlvs alvlmamvkk kns 173

C1 <u>vlvstlyvmtnvkrkss</u>	配列番号: 151
C2 <u>vlvsalvlmamvkkkns</u>	配列番号: 152

30

【0248】

(実施例3: p C1又はp C2を用いたDNA予防接種は、抗エルゴタイプの応答を活性化させる)

p C1又はp C2を用いた予防接種が抗エルゴタイプのT細胞を誘導したことを実証するために、我々は予防接種後に休止状態又は活性状態T細胞を対象とする増殖応答を試験した。図3は、p C1又はp C2予防接種ラットから単離したLNCは、強い抗エルゴタイプの応答を有することを示す。図3A中、A-A2bは活性状態A2bT細胞クローンを示し、一方R-A2bは休止状態A2bT細胞クローンを示す。図3B中、A-p277は活性状態p277T細胞クローンを示し、一方R-p277は休止状態p277T細胞クローンを示す。したがって、C1又はC2エルゴトープ抗原決定基は、休止状態T細胞ではなく活性状態T細胞における内因性TCRのプロセッシングによって作製する。

40

【0249】

(実施例4: 組換えC1、C2、又はC1/2ペプチドを用いた予防接種はAAを阻害する)

我々は組換えC1(r C1)又はC2(r C2)、又はC1/2由来ペプチドを用いた予防接種の免疫効果を試験した(表1)。メスのルイスラットを、一回腹腔内用量の

50

I F A に溶かした 1 0 0 μ g のタンパク質又はペプチドで免疫処置し、7日後に A A を誘導した。図 4 は、r C 1、r C 2 (図 4 A)、又は C 1 / 2 ペプチド N 1 2 (配列番号 1 4 7)、M E D 1 2 (配列番号 1 4 9) 又は C 2 C (配列番号 1 5 2) のいずれか (図 4 B) を予防接種したラットにおいて疾患の重度が有意に低下したことを示す。したがって、r C 1、r C 2 又は C 1 / 2 ペプチドを用いた予防接種によって、A A を特異的に阻害することができる。

【 0 2 5 0 】

(実施例 5 : 予防接種したラットにおける免疫応答)

C 1 / 2 ペプチド及び A A の標的抗原に対する免疫応答に対する C 1 / 2 予防接種の影響を試験するために、我々は r C 1 又は r C 2 をラットに予防接種し、次いで A A を誘導した。第 2 6 日に、我々は脱水リンパ節を除去し、ペプチド N 1 2 (配列番号 1 4 7)、M E D 1 2 (配列番号 1 4 9) 又は C 2 C (配列番号 1 5 2)、又はマイコバクテリア抗原に対する T 細胞増殖応答を測定した。図 5 A は、完全 r C 1 又は r C 2 を用いた予防接種は T C R - C ペプチドに対する増殖応答を誘導し、対照ペプチド M t 3 に対する応答はなかったことを示す。したがって、C 1 / 2 ペプチドは免疫優勢である。さらに、p C 1 又は p C 2 を用いた D N A 予防接種 (図 2 参照) のような、r C 1 又は r C 2 を使用する予防接種は、マイコバクテリア抗原に対する増殖応答をさらに上方制御し (図 5 B)、これは関節炎の阻害と関係がある (M i m r a n ら、2 0 0 4 ; Q u i n t a n a ら、2 0 0 2 ; Q u i n t a n a ら、2 0 0 3 ; H o g e r v o r s t ら、1 9 9 1)。

【 0 2 5 1 】

(実施例 6 : C 1 / 2 ペプチドは免疫原性である)

C 1 / 2 ペプチド、N 1 2、M E D 1 2 又は C 2 C を予防接種したラットにおける T 細胞応答の試験は、3つのペプチドが免疫原性であったことを明らかにし、免疫処置ラットにおいて各ペプチドに対する有意な T 細胞応答を検出することができた (図 6 B)。さらに、ペプチド免疫処置ラットから得た L N C は、P P D に対する増大した増殖応答を示した。C 2 C 予防接種ラット由来の L N C も、m t 1 8 0 及び H S P 6 5 に対する増大した増殖応答を示した (図 6 A)。いずれの実験群も O V A に対して有意な応答を示さず、いずれの実験群も C o n A に対するそれらの応答は異ならなかった。

【 0 2 5 2 】

(実施例 7 : 予防接種誘導型制御の養子免疫伝達)

D N A ワクチン又は組換えタンパク質のいずれかとして、C 1 又は C 2 を用いた予防接種によって誘導される A A の阻害が、活性状態 T 細胞によって養子免疫伝達され得るかどうかが調べるために、我々は p C 1、p C 2 (図 7)、r C 1 又は r C 2 (図 8) をラットに予防接種し、A A を誘導し、A A の誘導後第 2 6 日で養子免疫伝達用の脾細胞を得た。脾細胞は C o n A を用いて i n v i t r o で活性化させ、非投薬ラットに移し、ラットは M t で 3 日後に攻撃し、A A の進行が続いた。C 1 又は C 2 を用いた予防接種による A A の阻害は、疾患の重度 (図 7 A 及び 8 A) 及び足首の隆起 (図 7 B 及び 8 B) によって反映されたように、活性状態 T 細胞によって養子免疫伝達することができた。

【 0 2 5 3 】

(実施例 8 : C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系)

C 1 又は C 2 を用いた予防接種によって誘導される防御と関係がある C 1 / 2 抗原決定基の特異性をさらに試験するために、我々は R e i z i s らによって記載された結合モチーフに基づいて M H C クラス I I 結合物質として同定された N 1 2、M E D 1 2 及び C 2 C ペプチドに対して T 細胞系を産生した。

【 0 2 5 4 】

メスのルイスラットを、一回腹腔内用量の I F A に溶かした 1 0 0 μ g のペプチドで免疫処置し、7日後に A A を誘導した。第 2 6 日に、M o r らによって記載されたのと同様に、L N C を調製し、特異的 T 細胞系をペプチド N 1 2、M E D 1 2 又は C 2 C による反復刺激によって作製した。図 9 は、3 サイクルの刺激後、我々がペプチド特異的な系 : N

10

20

30

40

50

12 - 特異的 (図 9 A)、MED 12 - 特異的 (図 9 B) 及び C 2 C - 特異的 (図 9 C) を得たことを示す。それぞれの系がそれに対して産生したペプチドと反応し、他の C 1 / 2 由来ペプチドと交差反応性を示さなかった。さらに、MED 12 に対して産生した系のみが r C 1 又は r C 2 を与えた APC によって活性化することができ、MED 12 中に含まれるエピトープは完全長分子のプロセッシング後に作製され得ることが示唆された。

【 0 2 5 5 】

(実施例 9 : C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系は A A を阻害する)

C 1 / 2 抗原決定基と反応性がある T 細胞系は A A の阻害を伝達することができたかどうか調べるために、我々は A A の誘導に対して第 - 3 日、4 日及び 11 日に活性状態細胞 (1.5×10^5 個の細胞 / ラット) を腹腔内伝達した。対照として、我々はモルモットのミエリン塩基性タンパク質 (B P 1 0) に対して産生した T 細胞系を使用した。図 1 0 は、疾患の重度 (図 1 0 A) 及び足首の隆起 (図 1 0 B) によって反映されたように、C 1 / 2 抗原決定基 (N 1 2、MED 1 2 又は C 2 C) に特異的な T 細胞系のレシピエントは、対照系 B P 1 0 のレシピエントより有意に軽度の疾患を示したことを示す。

10

【 0 2 5 6 】

(実施例 1 0 : C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系は活性状態 T 細胞に増殖する)

我々は、活性状態又は休止状態 T 細胞系との同時インキュベーションによって誘導される、C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系の増殖応答を試験した。図 1 1 A は、N 1 2、MED 1 2 及び C 2 C 系は活性状態 A 2 b T 細胞とのインキュベーションによって増殖することを示す。阻害抗体の存在下で行った実験は、活性状態 T 細胞に対する増殖応答は、MHC クラス II、CD 2 8 及び CD 8 6 の相互作用によって介在されたことを示した (図 1 1 B)。したがって、C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系は抗エルゴタイプである。

20

【 0 2 5 7 】

さらに我々は、関節炎又は非投薬ラットから単離した活性状態 LNC を対象とする増殖応答を追跡した。C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系は、Con A ($2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$) を用いて事前に活性状態にした LNC による活性化によって増殖した (図 1 2)。この増殖は CD 2 8 及び OX 6 を対象とする特異的な抗体によって阻害され得る。

【 0 2 5 8 】

(実施例 1 1 : H L A - D R 結合部位を同定するための ProPred アルゴリズムを使用した、T 細胞受容体の定常ドメイン中の H L A - D R 結合領域の場所)

Singh、H. 及び Raghava (2 0 0 1) の ProPred アルゴリズムを使用して、T 細胞受容体の定常ドメイン中の H L A - D R 結合領域に関する検索を実施した。より詳細には、以下の特異的な鎖を検索した： (アクセス番号 gi : 1 3 3 5 3 3 5)、 - 1 (アクセス番号 gi : 3 3 8 8 3 1)、 - 2 (アクセス番号 gi : 8 8 7 6 0)、 (アクセス番号 gi : 1 0 7 8 3 5)、 (アクセス番号 A 2 6 6 5 9、A A B 6 3 3 1 4、A A B 6 3 3 1 2、及び A A B 6 3 3 1 3)。以下の MHC - II 対立遺伝子を分析において考慮した：

30

【化 1】

DRB1_0101, DRB1_0102,
DRB1_0301, DRB1_0305, DRB1_0306, DRB1_0307, DRB1_0308, DRB1_0309,
DRB1_0311, DRB1_0401, DRB1_0402, DRB1_0404, DRB1_0405, DRB1_0408,
DRB1_0410, DRB1_0421, DRB1_0423, DRB1_0426, DRB1_0701, DRB1_0703,
DRB1_0801, DRB1_0802, DRB1_0804, DRB1_0806, DRB1_0813, DRB1_0817,
DRB1_1101, DRB1_1102, DRB1_1104, DRB1_1106, DRB1_1107, DRB1_1114, 10
DRB1_1120, DRB1_1121, DRB1_1128, DRB1_1301, DRB1_1302, DRB1_1304,
DRB1_1305, DRB1_1307, DRB1_1311, DRB1_1321, DRB1_1322, DRB1_1323,
DRB1_1327, DRB1_1328, DRB1_1501, DRB1_1502, DRB1_1506, DRB5_0101, 及び
DRB5_0105.

これらの結果は、予想 M H C - I I 結合ペプチドを表す表 2 ~ 9 中に表す。表 2 ~ 9 中に表す全てのペプチドは、いずれも正確に 9 アミノ酸長であることを記す。本発明に従い使用するペプチドは、それらが自己免疫性炎症疾患を抑制する目的の機能を保つ限り、延長又は切断のいずれかを含む可能性があることは明らかに理解されよう。 20

【表 2】

表 2 : α 鎖に関する MHC - I I 結合ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
1	Phe-Lys-Ser-Asn-Ser-Ala-Val-Ala-Trp
2	Val-Ala-Trp-Ser-Asn-Lys-Ser-Asp-Phe
3	Tyr-Ile-Thr-Asp-Lys-Thr-Val-Leu-Asp
4	Tyr-Gln-Leu-Arg-Asp-Ser-Lys-Ser-Ser
5	Phe-Asp-Ser-Gln-Thr-Asn-Val-Ser-Gln
6	Val-Tyr-Gln-Leu-Arg-Asp-Ser-Lys-Ser
7	Val-Leu-Asp-Met-Arg-Ser-Met-Asp-Phe
8	Val-Tyr-Ile-Thr-Asp-Lys-Thr-Val-Leu
9	Ile-Thr-Asp-Lys-Thr-Val-Leu-Asp-Met
10	Val-Cys-Leu-Phe-Thr-Asp-Phe-Asp-Ser
11	Met-Arg-Ser-Met-Asp-Phe-Lys-Ser-Asn
12	Phe-Gln-Asn-Leu-Ser-Val-Ile-Gly-Phe
13	Phe-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Lys-Val-Ala
14	Ile-Leu-Leu-Leu-Lys-Val-Ala-Gly-Phe
15	Leu-Leu-Lys-Val-Ala-Gly-Phe-Asn-Leu
16	Phe-Asn-Leu-Leu-Met-Thr-Leu-Arg-Leu
17	Val-Lys-Leu-Val-Glu-Lys-Ser-Phe-Glu
18	Leu-Leu-Met-Thr-Leu-Arg-Leu-Trp-Ser
19	Phe-Asn-Asn-Ser-Ile-Ile-Pro-Glu-Asp
20	Phe-Glu-Thr-Asp-Thr-Asn-Leu-Asn-Phe
21	Ile-Ile-Pro-Glu-Asp-Thr-Phe-Phe-Pro
22	Ile-Gly-Phe-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu-Lys
23	Val-Ile-Gly-Phe-Arg-Ile-Leu-Leu-Leu
24	Leu-Lys-Val-Ala-Gly-Phe-Asn-Leu-Leu
25	Leu-Leu-Leu-Lys-Val-Ala-Gly-Phe-Asn
26	Leu-Met-Thr-Leu-Arg-Leu-Trp-Ser-Ser
27	Val-Ala-Gly-Phe-Asn-Leu-Leu-Met-Thr

10

20

30

【表 3】

表 3 : β 鎖変異体分子 1 に関する MHC - I I 結合ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
28	Leu-Asn-Lys-Val-Phe-Pro-Pro-Glu-Va
29	Leu-Val-Cys-Leu-Ala-Thr-Gly-Phe-Phe
30	Phe-Phe-Pro-Asp-His-Val-Glu-Leu-Ser
31	Trp-Trp-Val-Asn-Gly-Lys-Glu-Val-His
32	Trp-Val-Asn-Gly-Lys-Glu-Val-His-Ser
33	Phe-Glu-Pro-Ser-Glu-Ala-Glu-Ile-Ser
34	Val-Ala-Val-Phe-Glu-Pro-Ser-Glu-Ala
35	Val-Asn-Gly-Lys-Glu-Val-His-Ser-Gly
36	Val-Ser-Thr-Asp-Pro-Gln-Pro-Leu-Lys
37	Ile-Val-Ser-Ala-Glu-Ala-Trp-Gly-Arg
38	Leu-Arg-Val-Ser-Ala-Thr-Phe-Trp-Gln
39	Tyr-Cys-Leu-Ser-Ser-Arg-Leu-Arg-Val
40	Phe-Arg-Cys-Gln-Val-Gln-Phe-Tyr-Gly
41	Tyr-Gly-Leu-Ser-Glu-Asn-Asp-Glu-Trp
42	Val-Thr-Gln-Ile-Val-Ser-Ala-Glu-Ala
43	Val-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-Ser-Glu-Asn
44	Leu-Ser-Ser-Arg-Leu-Arg-Val-Ser-Ala
45	Trp-Gln-Asn-Pro-Arg-Asn-His-Phe-Arg
46	Tyr-Glu-Ile-Leu-Leu-Gly-Lys-Ala-Thr
47	Tyr-Ala-Val-Leu-Val-Ser-Ala-Leu-Val
48	Leu-Val-Ser-Ala-Leu-Val-Leu-Met-Ala
49	Leu-Val-Leu-Met-Ala-Met-Val-Lys-Arg
50	Val-Ser-Tyr-Gln-Gln-Gly-Val-Leu-Ser
51	Val-Leu-Val-Ser-Ala-Leu-Val-Leu-Met
52	Val-Leu-Met-Ala-Met-Val-Lys-Arg-Lys
53	Ile-Leu-Tyr-Glu-Ile-Leu-Leu-Gly-Lys
54	Leu-Leu-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu-Tyr-Ala
55	Leu-Tyr-Ala-Val-Leu-Val-Ser-Ala-Leu
56	Val-Leu-Ser-Ala-Thr-Ile-Leu-Tyr-Glu
57	Leu-Ser-Ala-Thr-Ile-Leu-Tyr-Glu-Ile
58	Leu-Met-Ala-Met-Val-Lys-Arg-Lys-Asp
59	Val-Ser-Ala-Leu-Val-Leu-Met-Ala-Met
60	Met-Ala-Met-Val-Lys-Arg-Lys-Asp-Phe

10

20

30

40

【表 4】

表 4 : β 鎖変異体分子 2 に関する MHC - I I 結合ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
31	Trp-Trp-Val-Asn-Gly-Lys-Glu-Val-His
32	Trp-Val-Asn-Gly-Lys-Glu-Val-His-Ser
33	Phe-Glu-Pro-Ser-Glu-Ala-Glu-Ile-Ser
34	Val-Ala-Val-Phe-Glu-Pro-Ser-Glu-Ala
35	Val-Asn-Gly-Lys-Glu-Val-His-Ser-Gly
36	Val-Ser-Thr-Asp-Pro-Gln-Pro-Leu-Lys
37	Ile-Val-Ser-Ala-Glu-Ala-Trp-Gly-Arg
38	Leu-Arg-Val-Ser-Ala-Thr-Phe-Trp-Gln
39	Tyr-Cys-Leu-Ser-Ser-Arg-Leu-Arg-Val
40	Phe-Arg-Cys-Gln-Val-Gln-Phe-Tyr-Gly
41	Tyr-Gly-Leu-Ser-Glu-Asn-Asp-Glu-Trp
42	Val-Thr-Gln-Ile-Val-Ser-Ala-Glu-Ala
43	Val-Gln-Phe-Tyr-Gly-Leu-Ser-Glu-Asn
44	Leu-Ser-Ser-Arg-Leu-Arg-Val-Ser-Ala
45	Trp-Gln-Asn-Pro-Arg-Asn-His-Phe-Arg
46	Tyr-Glu-Ile-Leu-Leu-Gly-Lys-Ala-Thr
47	Tyr-Ala-Val-Leu-Val-Ser-Ala-Leu-Val
48	Leu-Val-Ser-Ala-Leu-Val-Leu-Met-Ala
49	Leu-Val-Leu-Met-Ala-Met-Val-Lys-Arg
51	Val-Leu-Val-Ser-Ala-Leu-Val-Leu-Met
52	Val-Leu-Met-Ala-Met-Val-Lys-Arg-Lys
53	Ile-Leu-Tyr-Glu-Ile-Leu-Leu-Gly-Lys
54	Leu-Leu-Gly-Lys-Ala-Thr-Leu-Tyr-Ala
55	Leu-Tyr-Ala-Val-Leu-Val-Ser-Ala-Leu
56	Val-Leu-Ser-Ala-Thr-Ile-Leu-Tyr-Glu
57	Leu-Ser-Ala-Thr-Ile-Leu-Tyr-Glu-Ile
58	Leu-Met-Ala-Met-Val-Lys-Arg-Lys-Asp
59	Val-Ser-Ala-Leu-Val-Leu-Met-Ala-Met
61	Leu-Lys-Asn-Val-Phe-Pro-Pro-Glu-Val
62	Leu-Val-Cys-Leu-Ala-Thr-Gly-Phe-Tyr
63	Phe-Tyr-Pro-Asp-His-Val-Glu-Leu-Ser
64	Met-Ala-Met-Val-Lys-Arg-Lys-Asp-Ser

10

20

30

【表5】

表5： δ 鎖に関するMHC-II結合ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
65	Phe-Val-Met-Lys-Asn-Gly-Thr-Asn-Val
66	Ile-Asn-Leu-Val-Ser-Ser-Lys-Lys-Ile
67	Ile-Arg-Ile-Asn-Leu-Val-Ser-Ser-Lys
68	Leu-Val-Ser-Ser-Lys-Lys-Ile-Thr-Glu
69	Ile-Val-Ile-Ser-Pro-Ser-Gly-Lys-Tyr
70	Tyr-Pro-Lys-Asp-Ile-Arg-Ile-Asn-Leu
71	Val-Met-Lys-Asn-Gly-Thr-Asn-Val-Ala
72	Val-Lys-Leu-Gly-Lys-Tyr-Glu-Asp-Ser
73	Met-Lys-Asn-Gly-Thr-Asn-Val-Ala-Cys
74	Val-Phe-Val-Met-Lys-Asn-Gly-Thr-Asn
75	Phe-Tyr-Pro-Lys-Asp-Ile-Arg-Ile-Asn
76	Tyr-Asn-Ala-Val-Lys-Leu-Gly-Lys-Tyr
77	Val-Gln-His-Asp-Asn-Lys-Thr-Val-His
78	Val-Lys-Thr-Asp-Ser-Thr-Asp-His-Val
79	Val-Asn-Met-Met-Ser-Leu-Thr-Val-Leu
80	Met-Met-Ser-Leu-Thr-Val-Leu-Gly-Leu
81	Leu-Arg-Met-Leu-Phe-Ala-Lys-Thr-Val
82	Met-Leu-Phe-Ala-Lys-Thr-Val-Ala-Val
83	Val-Asn-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Lys-Leu
84	Ile-Val-His-Thr-Glu-Lys-Val-Asn-Met
85	Phe-Leu-Leu-Thr-Ala-Lys-Leu-Phe-Phe
86	Val-His-Thr-Glu-Lys-Val-Asn-Met-Met
87	Phe-Ala-Lys-Thr-Val-Ala-Val-Asn-Phe
88	Leu-Leu-Thr-Ala-Lys-Leu-Phe-Phe-Leu
89	Leu-Phe-Ala-Lys-Thr-Val-Ala-Val-Asn
90	Leu-Gly-Leu-Arg-Met-Leu-Phe-Ala-Lys
91	Val-Leu-Gly-Leu-Arg-Met-Leu-Phe-Ala
92	Val-Ala-Val-Asn-Phe-Leu-Leu-Thr-Ala

10

20

30

【表 6】

表6： γ 鎖変異体分子に関するMHC-II結合ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
93	Phe-Phe-Pro-Asp-Val-Ile-Lys-Ile-His
94	Ile-Lys-Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys-Lys
95	Phe-Leu-Pro-Ser-Ile-Ala-Glu-Thr-Lys
96	Leu-Gln-Lys-Ala-Gly-Thr-Tyr-Leu-Cys
97	Trp-Gln-Glu-Lys-Lys-Ser-Asn-Thr-Ile
98	Val-Ser-Pro-Lys-Pro-Thr-Ile-Phe-Leu
99	Leu-Cys-Leu-Leu-Glu-Lys-Phe-Phe-Pro
100	Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys-Lys-Ser-Asn
101	Val-Ile-Lys-Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys
102	Ile-Lys-Thr-Asp-Val-Ile-Thr-Met-Asp
103	Ile-Thr-Met-Asp-Pro-Lys-Asp-Asn-Cys
104	Ile-Val-Arg-His-Glu-Asn-Asn-Lys-Asn
105	Val-Arg-His-Glu-Asn-Asn-Lys-Asn-Gly
106	Phe-Pro-Pro-Ile-Lys-Thr-Asp-Val-Ile
107	Met-Lys-Thr-Asn-Asp-Thr-Tyr-Met-Lys
108	Tyr-Met-Lys-Phe-Ser-Trp-Leu-Thr-Val
109	Val-Ile-Thr-Met-Asp-Pro-Lys-Asp-Asn
110	Phe-Ser-Trp-Leu-Thr-Val-Pro-Glu-Lys
111	Trp-Leu-Thr-Val-Pro-Glu-Lys-Ser-Leu
112	Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val
113	Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr
114	Val-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys
115	Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu
116	Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu-Leu
117	Leu-Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser
118	Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala
119	Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser
120	Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val
121	Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe
122	Tyr-Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys
123	Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe-Ala
124	Val-Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys
125	Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala-Tyr
126	Leu-Leu-Arg-Arg-Thr-Ala-Phe-Cys-Cys
127	Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala-Tyr-Tyr-Met
128	Tyr-Tyr-Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu
129	Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile
130	Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu-Leu-Arg-Arg

10

20

30

40

【表 7】

表7： γ 鎖変異体分子に関するMHC-II結合ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
93	Phe-Phe-Pro-Asp-Val-Ile-Lys-Ile-His
94	Ile-Lys-Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys-Lys
95	Phe-Leu-Pro-Ser-Ile-Ala-Glu-Thr-Lys
96	Leu-Gln-Lys-Ala-Gly-Thr-Tyr-Leu-Cys
97	Trp-Gln-Glu-Lys-Lys-Ser-Asn-Thr-Ile
98	Val-Ser-Pro-Lys-Pro-Thr-Ile-Phe-Leu
99	Leu-Cys-Leu-Leu-Glu-Lys-Phe-Phe-Pro
100	Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys-Lys-Ser-Asn
101	Val-Ile-Lys-Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys
102	Ile-Lys-Thr-Asp-Val-Ile-Thr-Met-Asp
103	Ile-Thr-Met-Asp-Pro-Lys-Asp-Asn-Cys
104	Ile-Val-Arg-His-Glu-Asn-Asn-Lys-Asn
105	Val-Arg-His-Glu-Asn-Asn-Lys-Asn-Gly
106	Phe-Pro-Pro-Ile-Lys-Thr-Asp-Val-Ile
107	Met-Lys-Thr-Asn-Asp-Thr-Tyr-Met-Lys
108	Tyr-Met-Lys-Phe-Ser-Trp-Leu-Thr-Val
109	Val-Ile-Thr-Met-Asp-Pro-Lys-Asp-Asn
110	Phe-Ser-Trp-Leu-Thr-Val-Pro-Glu-Lys
111	Trp-Leu-Thr-Val-Pro-Glu-Lys-Ser-Leu
112	Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val
113	Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr
114	Val-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys
115	Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu
116	Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu-Leu
117	Leu-Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser
118	Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala
119	Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser
120	Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val
121	Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe
122	Tyr-Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys
123	Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe-Ala
124	Val-Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys
125	Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala-Tyr
126	Leu-Leu-Arg-Arg-Thr-Ala-Phe-Cys-Cys
127	Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala-Tyr-Tyr-Met
128	Tyr-Tyr-Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu
129	Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile
130	Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu-Leu-Arg-Arg
131	Phe-Phe-Pro-Asp-Val-Ser-Pro-Lys-Pro

10

20

30

40

【表 8】

表8： γ 鎖変異体分子に関するMHC-II結合ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
93	Phe-Phe-Pro-Asp-Val-Ile-Lys-Ile-His
94	Ile-Lys-Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys-Lys
95	Phe-Leu-Pro-Ser-Ile-Ala-Glu-Thr-Lys
96	Leu-Gln-Lys-Ala-Gly-Thr-Tyr-Leu-Cys
97	Trp-Gln-Glu-Lys-Lys-Ser-Asn-Thr-Ile
98	Val-Ser-Pro-Lys-Pro-Thr-Ile-Phe-Leu
99	Leu-Cys-Leu-Leu-Glu-Lys-Phe-Phe-Pro
100	Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys-Lys-Ser-Asn
104	Ile-Val-Arg-His-Glu-Asn-Asn-Lys-Asn
105	Val-Arg-His-Glu-Asn-Asn-Lys-Asn-Gly
106	Phe-Pro-Pro-Ile-Lys-Thr-Asp-Val-Ile
107	Met-Lys-Thr-Asn-Asp-Thr-Tyr-Met-Lys
108	Tyr-Met-Lys-Phe-Ser-Trp-Leu-Thr-Val
109	Val-Ile-Thr-Met-Asp-Pro-Lys-Asp-Asn
112	Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val
113	Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr
114	Val-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys
115	Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu
116	Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu-Leu
117	Leu-Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser
118	Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala
119	Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser
120	Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val
121	Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe
122	Tyr-Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys
123	Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe-Ala
124	Val-Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys
125	Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala-Tyr
127	Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala-Tyr-Tyr-Met
128	Tyr-Tyr-Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu
129	Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile
131	Phe-Phe-Pro-Asp-Val-Ser-Pro-Lys-Pro
132	Ile-Lys-Ile-His-Trp-Gln-Lys-Gln-Leu
133	Phe-Phe-Pro-Asp-Ile-Ile-Lys-Ile-His
134	Ile-Ile-Lys-Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys
135	Ile-Lys-Thr-Asp-Val-Thr-Thr-Val-Asp
136	Phe-Ser-Trp-Leu-Thr-Val-Pro-Glu-Glu
137	Ile-Thr-Met-Asp-Pro-Lys-Asp-Asn-Trp
138	Tyr-Ser-Lys-Asp-Ala-Asn-Asp-Val-Ile
139	Leu-Leu-Gly-Arg-Thr-Ala-Phe-Cys-Cys
140	Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu-Leu-Gly-Arg

10

20

30

40

【表 9】

表9： γ 鎖変異体分子に関するMHC-II結合ペプチド

配列番号	アミノ酸配列
94	Ile-Lys-Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys-Lys
95	Phe-Leu-Pro-Ser-Ile-Ala-Glu-Thr-Lys
96	Leu-Gln-Lys-Ala-Gly-Thr-Tyr-Leu-Cys
97	Trp-Gln-Glu-Lys-Lys-Ser-Asn-Thr-Ile
98	Val-Ser-Pro-Lys-Pro-Thr-Ile-Phe-Leu
99	Leu-Cys-Leu-Leu-Glu-Lys-Phe-Phe-Pro
100	Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys-Lys-Ser-Asn
104	Ile-Val-Arg-His-Glu-Asn-Asn-Lys-Asn
105	Val-Arg-His-Glu-Asn-Asn-Lys-Asn-Gly
107	Met-Lys-Thr-Asn-Asp-Thr-Tyr-Met-Lys
108	Tyr-Met-Lys-Phe-Ser-Trp-Leu-Thr-Val
109	Val-Ile-Thr-Met-Asp-Pro-Lys-Asp-Asn
112	Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val
113	Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr
114	Val-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys
115	Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu
116	Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu-Leu
117	Leu-Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser
118	Leu-Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala
119	Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser
120	Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val
121	Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe
122	Tyr-Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys
123	Leu-Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe-Ala
124	Val-Tyr-Phe-Ala-Ile-Ile-Thr-Cys-Cys
125	Leu-Gln-Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala-Tyr
126	Leu-Leu-Arg-Arg-Thr-Ala-Phe-Cys-Cys
127	Leu-Thr-Asn-Thr-Ser-Ala-Tyr-Tyr-Met
128	Tyr-Tyr-Met-Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu
129	Leu-Lys-Ser-Val-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile
130	Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu-Leu-Arg-Arg
133	Phe-Phe-Pro-Asp-Ile-Ile-Lys-Ile-His
134	Ile-Ile-Lys-Ile-His-Trp-Gln-Glu-Lys
135	Ile-Lys-Thr-Asp-Val-Thr-Thr-Val-Asp
136	Phe-Ser-Trp-Leu-Thr-Val-Pro-Glu-Glu
137	Ile-Thr-Met-Asp-Pro-Lys-Asp-Asn-Trp
138	Tyr-Ser-Lys-Asp-Ala-Asn-Asp-Val-Ile
139	Leu-Leu-Gly-Arg-Thr-Ala-Phe-Cys-Cys
140	Ile-Ile-Thr-Cys-Cys-Leu-Leu-Gly-Arg
141	Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Gly-Val
142	Leu-Leu-Lys-Ser-Gly-Val-Tyr-Phe-Ala
143	Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Gly-Val-Tyr
144	Tyr-Leu-Leu-Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Gly
145	Leu-Leu-Leu-Lys-Ser-Gly-Val-Tyr-Phe
146	Leu-Lys-Ser-Gly-Val-Tyr-Phe-Ala-Ile

10

20

30

40

50

【表 10】

表10—TCR定常ドメインの鎖

A. TCR α 鎖の定常ドメイン - *gi:1335335*, 配列番号 :168:

dinqndpavy qlrdskssdk svclftdfds qtnvsqskds dvyitdktvl dmrsmdfksn savawsnskds
facanafnns iipedtffps pesscdvklv eksfetdtnl nfqnlsvigf rilllkvagf nllmtlrlws s

コード配列 - *gi: 36915*, 配列番号 :176.

B. TCR β 1鎖の定常ドメイン - *gi:338831*, 配列番号 :169:

dlnkvfppev avfepseaei shtqkatlvc latgffpdhv elswvwngke vhsqvstdpq plkeqpald
sryclssrlr vsatfwqnp nhfrcqvqfy glsendewtq drakpvtqiv saeawgradc gftsvsyqqg vlsatilyei
llgkatlyav lvsalvlmam vkrkdf

コード配列 - *gi: 338830*, 配列番号 :177.

10

C. TCR β 2鎖の定常ドメイン (*gi:88760*, 配列番号 :170):

edlknvfppe vavfepseae ishtqkatlv clatgfypdh velswwvngk evhsgvstdp qplkeqpald
dsryclssrl rvsatfwqnp nhfrcqvqf yglsendewt qdrakpvtqi vsaeawgrad cgftsesyqq gvlsatilye
illgkatlya vlvsalvlma mvkrkdsrg

コード配列 - *gi:338832*, 配列番号 :178.

20

D. TCR δ 鎖の定常ドメイン - *gi:107835*, 配列番号 :171:

sqphtkpsvf vmkngtnvac lvkefypkdi rinlvsskki tefdpaivis psgkynavkl gkyedsnsvt
csvghdnktv hstdfevktd stdhvkpket entkqpsksc hkpkaiivhte kvnmmsltvl glrmlfaktv
avnfltakl ffl

コード配列 - *gi: 339030*, 配列番号 :179.

E. TCR γ 1鎖の定常ドメイン - *A26659*, 配列番号 :172:

dkqldadvsp kptiflpsia etklqkagty lcllekffpd vikihwqekk sntilgsqeg ntmkntdym
kfswltppek sldkehrniv rhennkngvd qeiifpikt dvitmdpkn cskdandtl lqltntsayy mylllllksv
vyfaiitccl lrtafcng eks

30

F. TCR γ 鎖の定常ドメイン - *AAB63314*, 配列番号 :173:

vspkptiflp siaetklqka gtylcllekf fpdvikihwq ekksntilgs qegntmkntd tymkfswltp eksldkehr
civrhennkn gvdqeiifp iktdivitmdp kdncskdand tlllqltnts ayymylllll ksvvyfaiit ccllrtafc
cngeks

コード配列 - *gi:2072752*, 配列番号 :180.

G. TCR γ 鎖の定常ドメイン (*AAB63312*, 配列番号 :174):

kqldadvspk ptiflpsiae tklqkagtyl cllekffpd ikihwqekks ntilgsqegn tmkntdymk fswltpes
ldkehrniv rhennkngidq eiifpiktd vtvdpkdsy skdandvttv dpkynyskda ndvitmdpkd
nwskdandtl llqltntsay ymylllllks vvyfaiitcc lgrtafcng eks

40

コード配列 - *gi:2072750*, 配列番号 :181:

H. TCR γ 鎖の定常ドメイン - *AAB63313*, 配列番号 :175:

kqldadvspk ptiflpsiae tklqkagtyl cllekffpd ikihwqekks ntilgsqegn tmkntdymk fswltpes
ldkehrniv rhennkngidq eiifpiktd vtvdpkdsy skdandvttv dpkynyskda ndvitmdpkd
tsaymylll llksgvyfai itccllrta fcngeks

コード配列 (*gi:2072751*, 配列番号 :182):

50

(実施例 12 : 抗原アレイ技術を使用した、免疫原性 TCR 定常ドメインペプチドのスクリーニング)

ヒト T 細胞受容体の 鎖定常領域に由来するペプチド (アクセッション番号 : A A B 6 3 3 1 4 ; 配列番号 1 7 3) の抗原性を、以下に詳述する抗原アレイ技術を使用してアッセイした。

【0260】

血清サンプル : 血液サンプルは 12 の健康な成体から、及び治療前に肺癌であると新たに診断された 9 の成体からランダムな入手によって得た。全てのサンプルは、インフォームドコンセント及び Helsinki committee of the Sheba Medical Center、Tel Hashomer、イスラエルの承認によって回収した。血液サンプルは室温で凝固させた。遠心分離後、血清を回収し - 20 で保存した。

10

【0261】

抗原マイクロアレイ : PBS に希釈した抗原を、 $1 \mu\text{g} / \mu\text{l}$ の濃度で 384 ウエルプレート中に置いた。我々は 0.2 mm 径 (BioRobotics、ケンブリッジ、U.K.) の中実スポッティングピンを有するロボット MicroGrid アレイヤーを使用して、ArrayIt SuperEpoxi マイクロアレイ支持体スライド (TeleChem、Sunnyvale、CA) 上に抗原をスポットした。抗原は 4 連でスポットし、マイクロアレイは 1% ウシ血清アルブミンを用いて 37 において 1 時間ブロッキングし、試験血清をブロッキングバッファーに希釈した 1 : 5 希釈液と共に 4 において一晩カバースライド下でインキュベートした。各抗原スポットとの結合のシグナル強度の定量範囲は 0.01 ~ 65,000 であり、この検出範囲によって試験サンプルをあまり希釈せず信頼できるデータを記録することができた。次いでアレイを洗浄し、1 : 500 に希釈した検出抗体と共に 37 において 1 時間インキュベートした。2 つの検出抗体 : Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA から購入したヤギ抗ヒト IgG Cy3 結合抗体及びヤギ抗ヒト IgM Cy5 結合抗体を使用した。アレイを再度洗浄し、回転乾燥させ、ScanArray 4000 X スキャナー (GSI Luminomics、Billerica、MA) でスキャンした。結果は TIFF ファイルとして記録した。レーザーによるイメージ入手及び定量化は、記載されたのと同様に実施した (Quintanaら、2004)。

20

30

【0262】

データプレプロセッシング及びバックグラウンドフィルタリング : 抗原の反応性を、マイクロアレイ上でのその抗原との結合の 4 連の平均強度によって定義した。我々は以下の方法で陽性抗体を同定した : 有意な抗体結合の最小レベルを確定するために、我々は、各マイクロアレイスライド上で抗原の代わりにリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) と共にインキュベートした、32 スポットの平均反応性レベルを計算した。PBS スポットの平均強度及び 2 回の標準偏差として定義した PBS 対照の上限を超える強度をそれが示したとき、陽性としてシグナルを記録した。PBS バックグラウンドを超えるシグナル強度は、陽性抗体結合と考えた。

40

【0263】

表 11 中に表す配列番号 157 ~ 163 で示されるアミノ酸配列を有するペプチド抗原を、タンパク質の 7 つの異なる部分から (開始位置及び終了 aa 位置参照)、免疫原性配列を予想するためのアルゴリズム (<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>) を使用して同定した。配列番号 158、161 及び 164 ~ 167 で示されるアミノ酸配列を有するペプチドを合成し、分析用に使用した。試験したペプチド (表 12) は以下の通りであった :

- a) 配列番号 164 - 配列番号 157 と 159 のタンデムの組合せ ;
- b) 配列番号 158 ;
- c) 配列番号 165 - 配列番号 160 と 162 のタンデムの組合せ ;
- d) 配列番号 161 ;

50

e) 配列番号166と167は、配列番号163の2つの部分的に重複する20量体である。

【表11】

表11—(アルゴリズムによって) 予想した免疫原性配列

配列番号	開始位置	配列	終了位置	長さ(aa)
157	4	KPTIFLPS	11	8
158	19	KAGTYLCLLEKFFPDVIKI	37	19
159	66	SWLTVPE	72	7
160	77	KEHRCIV	83	7
161	93	DQEIIFPPIKT	103	11
162	120	DTLLLQL	126	7
163	131	AYMYLLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAFCCN	162	32

10

【表12】

表12—合成したペプチド

配列番号	ペプチドに由来する(配列番号)	配列	長さ(aa)
158	158	KAGTYLCLLEKFFPDVIKI	19
161	161	DQEIIFPPIKT	11
164	157+159	KPTIFLPSSWLVPE	15
165	160+162	KEHRCIVDTLLLQL	14
166	163	AYMYLLLLLKSVVYFAIT	20
167		VVYFAITCCLLRRTAFCCN	20

20

30

【0264】

肺癌を有する患者及び健康な対照から得た血清中のIgG及びIgMの存在を、前に詳述したのと同様に抗原マイクロアレイを使用して測定した。表13中に表す結果は、12の対照対象及び9の肺癌対象の平均反応性を表す。

【0265】

結果：肺癌対象由来の免疫グロブリンは、配列番号164で示されるアミノ酸配列を有するペプチド以外の全てと反応した。配列番号164によって示されるペプチド以外の全てと反応性があったIgG抗体は肺癌対象の血清中で見られ、ヒト中でIgG抗体を誘導するこれらのペプチドの能力が示された。対照対象由来の抗体は、配列番号158によって示されるペプチドのみに応答した。したがって、いくつかの特定の実施形態によれば、本発明の免疫原性ペプチド及びプローブは、配列番号157～167のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有するペプチド、好ましくは配列番号161及び165～167のいずれか1つで示されるアミノ酸配列を有するペプチドを非制限的に含む。

40

1、R o c h e) を用いて増殖させる。

【 0 2 6 8 】

参考文献

Cohen, I. R. 2001. *Vaccine* 20:706.

Kumar ら, 2001. *Int Immunol* 13:835.

Hogervorst ら, 1991. *Infect Immun* 59:2029.

Lohse ら, 1989. *Science* 244:820.

Mimran ら, 2004. *J Clin Invest* 113:924. 10

Minami ら, 1993. *Annu Rev Immunol* 11:245.

Mor ら, 1996. *J Immunol* 157:4855.

Quintana ら, 2002. *J Immunol* 169:3422.

Quintana ら, 2003. *J Immunol* 171:3533

Reizis ら, 1996. *Int Immunol* 8:1825.

Shapira ら, 1993. *J Clin Invest* 91:388.

Singh, H. 及び Raghava, G. P. S. 2001. *Bioinformatics* 17: 1236-7 20

Taniguchi, T., 及び Y. Minami. 1993. *Cell* 73:5.

Van der Aa ら, 2003. *Clin Exp Immunol* 131:155

van Eden ら, 1985. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5117.

Zhang ら, 1993. *Science* 261:1451.

Manolios ら, 1997. *Nat Med* 3: 84-88.

Ben-Nun ら, 1987. *Nature* 292:60.

Holoshitz ら, 1983. *Science* 219:56.

Achiron ら, 2004. *Clin. Immunol*:113 155-160. 30

Sambrook ら, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press.

Wolff ら, 1990. *Science* 247, 1465-1468

Stribling ら, 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 189:11277-11281.

Quintana ら, 2004. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14615-14621.

【 0 2 6 9 】

生成する T 細胞系が抗エルゴタイプであることを確認するために、自己由来の活性状態 T 細胞への増殖を測定する。この目的のために、自己由来の T 細胞を F i c o l l 1 勾配で単離し、洗浄し、ペトリ皿上でインキュベートする (2 時間、37 °C、7.5% CO₂、加湿雰囲気)。非接着細胞を次いで回収し、ナイロンウールカラム (N o v a m e d、エルサレム、イスラエル) 上でインキュベートする (1 時間、37 °C、7.5% CO₂、加湿雰囲気)。非結合細胞は、広範囲の洗浄によってカラムから溶出させる。生成する T 細胞は抗 C D 3 m A b プレコーティング 24 ウェルプレート (0.5 μ g / m l ; 非組織培養等級プレート) 上で活性化させ、照射する (5000 r a d s)。他の実験では、自己由来の活性状態 T 細胞は、M a c s カラム (M i l t e n y i) を使用する精製、抗 C D 3 及び抗 C D 2 8 A b を用いた活性化、及び照射によって得る。照射した活性状態の自己由来 T 細胞の存在下での、T C R 定常ドメインのペプチドに特異的な T 細胞系の増殖を、 40 50

前に記載したのと同様に次いで測定する。

【0270】

特定の実施形態の前述の記載事項は、本発明の一般的性質を完全に明らかにするはずなので、他者は本発明の知識を適用することによって、過度の実験なしで一般概念から逸脱せずに、このような特定の実施形態を様々な用途に容易に改変及び／又は適合することができ、及び、したがって、このような適合及び改変は、開示した実施形態の均等物の意味及び範囲の範疇に含まれるはずであり、そのように考える。本明細書で使用する語句又は用語は、制限ではなく記載の目的であることは理解されよう。様々な開示した機能を実施するための手段、物質及びステップは、本発明から逸脱せずに様々な代替形をとることができる。

10

【0271】

本発明を詳細に記載してきたが、当業者は多くの変形及び改変を作製することができることを理解しているはずである。したがって本発明は、詳細に記載した実施形態を制限するものとして解釈すべきでなく、本発明の範囲、精神及び概念は、特許請求の範囲を参照することによって、さらに容易に理解されるはずである。

【図面の簡単な説明】

【0272】

【図1】 p C 1 及び p C 2 を用いた予防接種による A A の阻害を示す図である。図1中では、p C 1 は p C 1 を示し、且つ p C 2 は p C 2 を示すことを記す。

【図2】 D N A 予防接種後の T 細胞応答を示す図である。図2中では、p C 1 は p C 1 を示し、且つ p C 2 は p C 2 を示すことを記す。

20

【図3】 D N A 予防接種後の抗エルゴタイプの応答を示す図である。図3中では、p C 1 は p C 1 を示し、且つ p C 2 は p C 2 を示すことを記す。

【図4】 組換え C 1、C 2 又は C 1 / 2 由来ペプチドを用いた予防接種による A A の阻害を示す図である。図4中では、r C 1 は r C 1 を示し、且つ r C 2 は r C 2 を示すことを記す。

【図5】 r C 1 又は r C 2 を用いた予防接種後の C 1 / 2 ペプチドに対する T 細胞応答を示す図である。図5中では、r C 1 は r C 1 を示し、r C 2 は r C 2 を示し、且つ M t 1 8 0 は M t 1 7 6 ~ 1 9 0 を示すことを記す。

【図6】 r C 1 又は r C 2 を用いた予防接種後の T 細胞応答を示す図である。図6中では、M t 1 8 0 は M t 1 7 6 ~ 1 9 0 を示すことを記す。

30

【図7】 p C 1 又は p C 2 予防接種率からの C o n A 活性化脾細胞の転移による A A の阻害を示す図である。図7中では、p C 1 は p C 1 を示し、且つ p C 2 は p C 2 を示すことを記す。

【図8】 r C 1 又は r C 2 予防接種率からの C o n A 活性化脾細胞の転移による A A の阻害を示す図である。図8中では、r C 1 は r C 1 を示し、且つ r C 2 は r C 2 を示すことを記す。

【図9】 C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系の増殖応答を示す図である。図9の図1中では、M E D 1 2 及び C 2 C は 1 0 μ g / m l の濃度であることを記す。図9中では、r C 1 は r C 1 を示し、且つ r C 2 は r C 2 を示すことを記す。

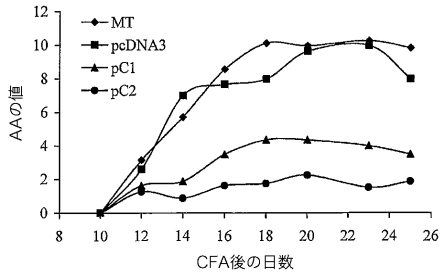
40

【図10】 C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系の転移による A A の阻害を示す図である。

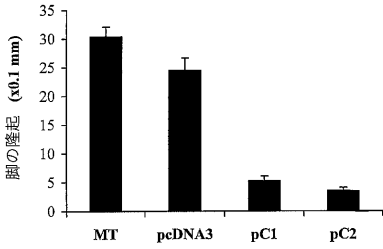
【図11】 C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系の抗エルゴタイプの応答を示す図である。

【図12】 C 1 / 2 抗原決定基に対する T 細胞系の増殖応答を示す図である。

【 図 1 】



A



B

【 図 2 A 】

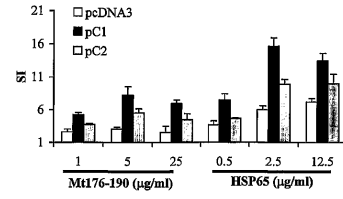


Figure 2A

【 図 2 B 】

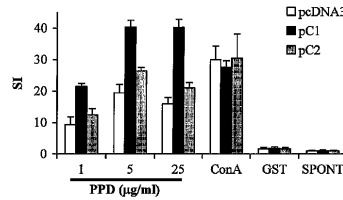


Figure 2B

【 図 2 C 】

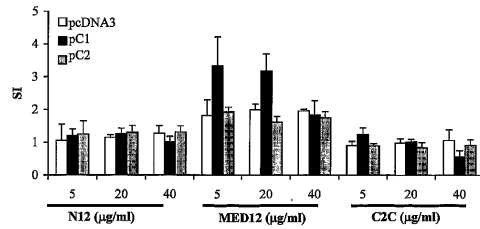
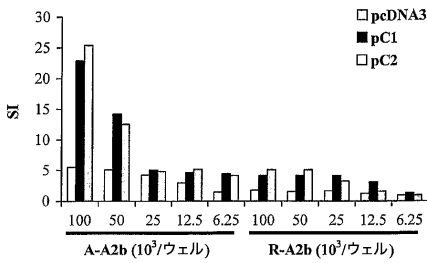
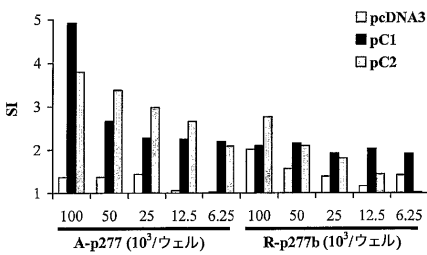


Figure 2C

【 図 3 】

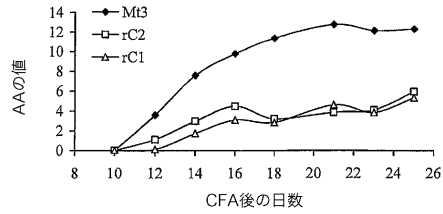


A

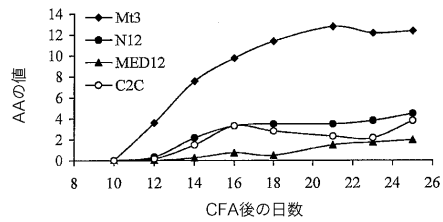


B

【 図 4 】



A



B

【 図 5 A 】

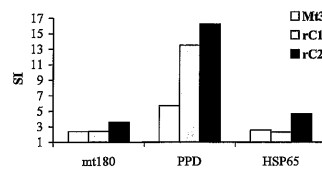


Figure 5A

【 図 5 B 】

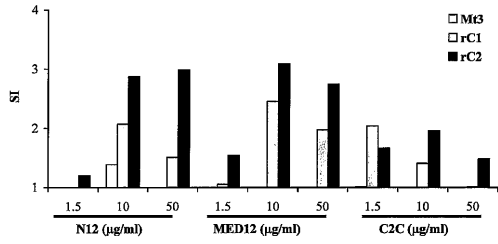


Figure 5B

【 図 6 B 】

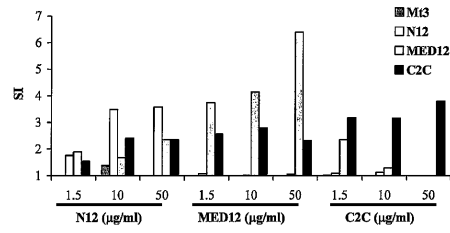


Figure 6B

【 図 6 A 】

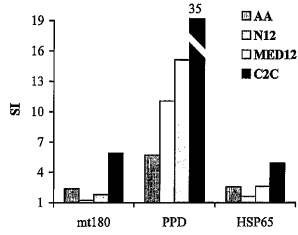
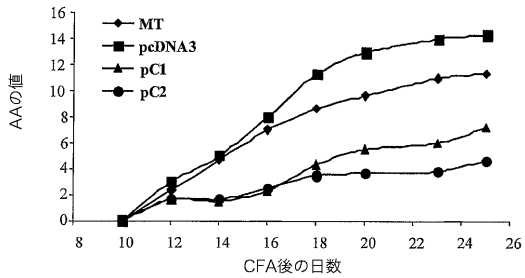
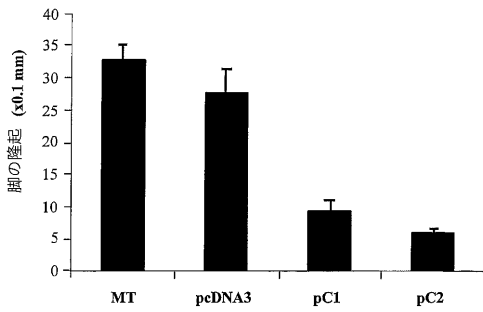


Figure 6A

【 図 7 】

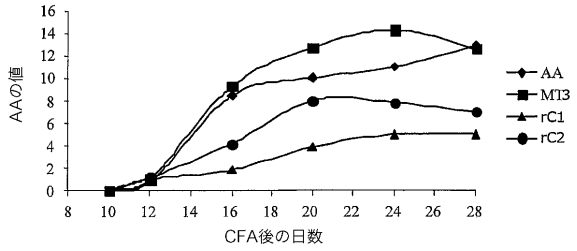


A

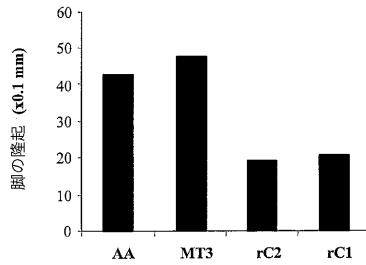


B

【 図 8 】



A



B

【 図 9 A 】

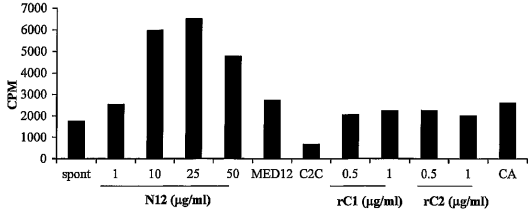


Figure 9A

【 図 9 B 】

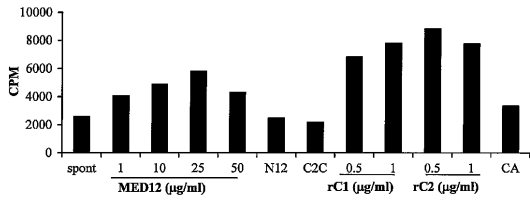


Figure 9B

【 図 9 C 】

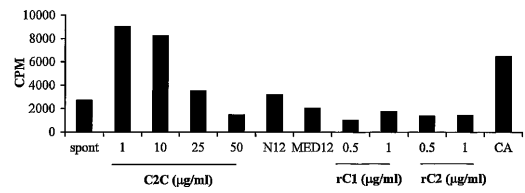
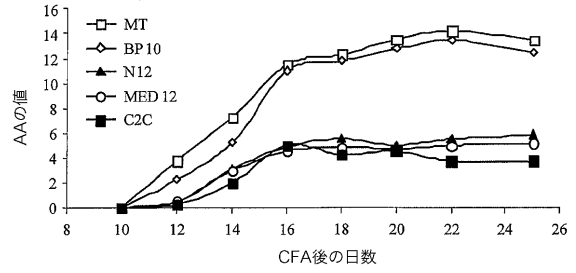
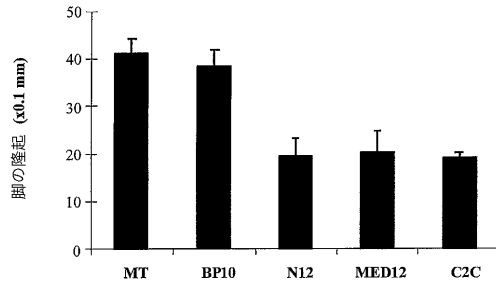


Figure 9C

【 図 1 0 】

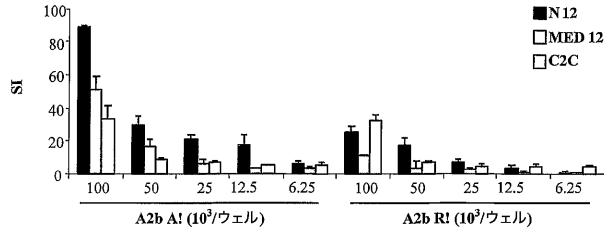


A

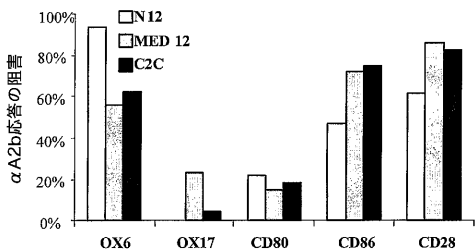


B

【 図 1 1 】

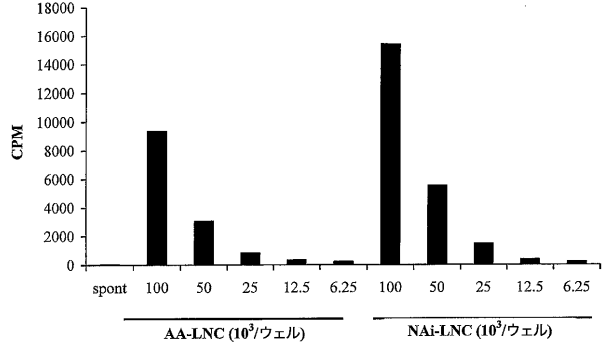


A



B

【 図 1 2 】



【配列表】

2009508517000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IL06/01112
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 39/00(2006.01),31/713(2006.01) USPC: 424/184.1 514/44 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) U.S. : 424/184.1 514/44 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 practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95/16462 (GREEN et al) 22 June 1995 (22.06.95), entire document.	1-4, 13, 15, 17, 19, 21-24, 40-43, 45-50, 63
A	BISSONNETTE et al., J Immunol. 1991 May 1;146(9):2898-907, entire document.	
A	ISHII et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Jul 9;93(14):7207-12, entire document.	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 24 September 2007 (24.09.2007)		Date of mailing of the international search report 16 OCT 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer: <i>Maria Wilson</i> Zachary Skelding Telephone No. 571-272-4300

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10	
A 6 1 P	21/04 (2006.01)	A 6 1 P	21/04	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	A 6 1 P	1/04	
A 6 1 P	1/16 (2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	N
C 0 7 K	14/725 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		C 0 7 K	14/725	

(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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100088926

弁理士 長沼 暉夫

(72)発明者 コーエン、イルン、アール .

イスラエル国、レホボト、ハンキン ストリート 1 1

(72)発明者 キンタナ、フランシスコ、ハビエル

アルゼンチン共和国、エイチ キャピタル フェデラル、 テニエンテ ビー マティエンゾ 1 8 3 1 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA31 CA02 CA07 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04
GA11 HA03 HA17
4B065 AA01X AA57X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA45
CA46
4C085 AA03 AA38 BB11 FF20 GG02 GG03 GG08 GG10
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA15 BA41 CA40 DA50 EA31 EA50
FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009508517A5	公开(公告)日	2009-11-12
申请号	JP2008531885	申请日	2006-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	科恩伊尔下来厄尔 金塔纳旧金山哈维尔		
申请(专利权)人(译)	科恩, 伊伦, 伯爵 金塔纳, 旧金山哈维尔		
[标]发明人	コーエンイルンアール キンタナフランシスコハビエル		
发明人	コーエン、イルン、アール。 キンタナ、フランシスコ、ハビエル		
IPC分类号	C12N15/09 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61K39/00 A61P37/04 A61P29/00 A61P17/06 A61P3/10 A61P21/04 A61P25/28 A61P1/04 A61P1/16 A61P37/06 A61P37/08 G01N33/53 C07K14/725		
CPC分类号	A61K39/0008 A61K2039/53 A61P1/04 A61P1/16 A61P17/06 A61P21/04 A61P25/28 A61P29/00 G01N33/6854 G01N2333/7051 G01N2800/102 A61K2039/645 G01N33/564		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A A61K39/00.H A61P37/04 A61P29/00.101 A61P17/06 A61P3/10 A61P21/04 A61P25/28 A61P1/04 A61P1/16 A61P37/06 A61P37 /08 G01N33/53.N G01N33/53.D C07K14/725		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA31 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024 /DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA17 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA45 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/FF20 4C085/GG02 4C085 /GG03 4C085/GG08 4C085/GG10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA31 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	池田幸		
优先权	60/719342 2005-09-22 US		
其他公开文献	JP2009508517A		

摘要(译)

本发明中, T细胞介导的炎性疾病, 有效的自身免疫性疾病的治疗, 以及移植排斥, 分离的T细胞受体恒定结构域, 和重组构建体编码的肽, 以及它们的衍生从中对做一头大象。用于治疗 and 预防目的的疫苗组合物, 编码这些蛋白质和肽的DNA疫苗, 蛋白质和肽, 以及使用T细胞疫苗的方法。