

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-509072

(P2008-509072A)

(43) 公表日 平成20年3月27日(2008.3.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z N A H	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 46 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-552310 (P2006-552310)
 (86) (22) 出願日 平成17年2月4日(2005.2.4)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年8月17日(2006.8.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/003754
 (87) 国際公開番号 W02005/076975
 (87) 国際公開日 平成17年8月25日(2005.8.25)
 (31) 優先権主張番号 60/542,371
 (32) 優先日 平成16年2月6日(2004.2.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

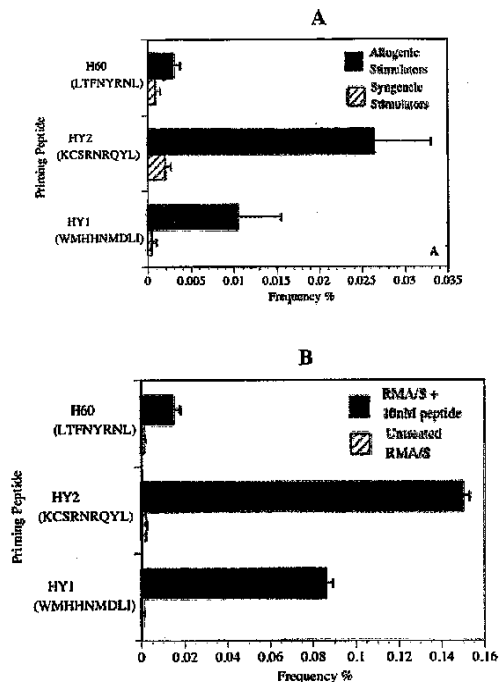
(71) 出願人 598091963
 マヨ ファウンデーション フォー メディカル エデュケーション アンド リサーチ
 アメリカ合衆国 55905 ミネソタ州, ロチェスター, ファースト ストリート サウス ウェスト 200
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (72) 発明者 ウェットスタイン、ピーター ジェイ.
 アメリカ合衆国 55902 ミネソタ州
 ロチェスター エイス アベニュー エスタブリユ 508

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良型ワクチン用のポリペプチド-アジュバント複合体

(57) 【要約】

免疫原性の強いポリペプチドを免疫原性の弱いポリペプチドに結合させることにより、C p Gアジュバントを沈殿かつ集中させて、in vivoにおける細胞傷害性T細胞(CTL)の応答のプライミングを増強し、よって前記免疫原性の弱いポリペプチドの免疫原性を増強することができる。従って、本明細書では二分型の免疫原性ポリペプチドを含む組成物が提供される。この二分型ポリペプチドは、CTL活性化アミノ酸配列に融合したC p G相互作用性アミノ酸配列を含みうるものであり、該CTL活性化アミノ酸配列はC p G相互作用性アミノ酸配列に対して不均一(ヘテロ)でもよい。C p G相互作用性アミノ酸配列および二分型の免疫原性ポリペプチドを特定および使用する方法も提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチドと C p G 分子とを含んでなる組成物であって、前記ポリペプチドは細胞傷害性 T 細胞を活性化するアミノ酸配列と C p G 相互作用性アミノ酸配列とを含んでなり、前記細胞傷害性 T 細胞を活性化するアミノ酸配列は前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列に対して不均一であり、前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列は少なくとも 1 つのシステイン残基を含み、前記 C p G 分子は少なくとも 1 つの硫黄原子を含むことを特徴とする組成物。

【請求項 2】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が少なくとも 1 つの正に荷電したアミノ酸をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。 10

【請求項 3】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が 15 個以下のアミノ酸残基からなる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が 10 個以下のアミノ酸残基からなる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 5】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が本質的に 6 アミノ酸残基で構成されている、請求項 1 に記載の組成物。 20

【請求項 6】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が B - X、X - B、または B - X - B 配列を含み、前記配列において B は正に荷電したアミノ酸残基であり X はアミノ酸残基であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が B - X - B - X - B 配列を含み、前記配列において B は正に荷電したアミノ酸残基であり X はアミノ酸残基であることを特徴とする、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 8】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が少なくとも 2 つのシステイン残基を含む、請求項 1 に記載の組成物。 30

【請求項 9】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が少なくとも 4 つの正に荷電したアミノ酸残基を含む、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 10】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列の少なくとも 1 つのシステイン残基のうち少なくとも 1 つが、正に荷電したアミノ酸残基に隣接している、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 11】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が配列番号 1 に記載の配列 (K C S R N R) を含む、請求項 10 に記載の組成物。 40

【請求項 12】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が配列番号 1 に記載の配列 (K C S R N R) で本質的に構成されている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記 C p G 相互作用性アミノ酸配列が配列番号 2 に記載の配列 (A C S A N A) で本質的に構成されている、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 14】

前記少なくとも 1 つの正に荷電したアミノ酸残基がアルギニンである、請求項 13 に記載の組成物。

【請求項 15】

前記少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基がリジンである、請求項13に記載の組成物。

【請求項16】

前記細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列は50個以下のアミノ酸残基からなる、請求項1に記載の組成物。

【請求項17】

前記細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列は25個以下のアミノ酸残基からなる、請求項1に記載の組成物。

【請求項18】

前記細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列は20個以下のアミノ酸残基からなる、請求項1に記載の組成物。

10

【請求項19】

前記細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列は10個以下のアミノ酸残基からなる、請求項1に記載の組成物。

【請求項20】

前記ポリペプチドは50アミノ酸残基未満の長さである、請求項1に記載の組成物。

【請求項21】

前記ポリペプチドは40アミノ酸残基未満の長さである、請求項1に記載の組成物。

【請求項22】

前記ポリペプチドは30アミノ酸残基未満の長さである、請求項1に記載の組成物。

20

【請求項23】

前記ポリペプチドは20アミノ酸残基未満の長さである、請求項1に記載の組成物。

【請求項24】

前記CpG分子はホスホロチオエート結合を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項25】

前記CpG分子はホスホロチオエート骨格を含む、請求項1に記載の組成物。

【請求項26】

免疫原性が増強された組成物を製造する方法であって、

(a)細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列とCpG相互作用性アミノ酸配列とを有するポリペプチドを得る工程であって、前記細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列は前記CpG相互作用性アミノ酸配列に対して不均一であり、前記CpG相互作用性アミノ酸配列は少なくとも1つのシステイン残基を含むことを特徴とする工程と、

30

(b)前記ポリペプチドを、硫黄原子を含むCpG分子と接触させて、前記組成物を形成する工程と

からなる方法。

【請求項27】

前記CpG相互作用性アミノ酸配列が少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸をさらに含む、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

沈殿物を含んでなる溶液であって、前記沈殿物はポリペプチドとCpG分子とを含んでなり、前記ポリペプチドは細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列とCpG相互作用性アミノ酸配列とを含み、前記細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列は前記CpG相互作用性アミノ酸配列に対して不均一であり、前記CpG相互作用性アミノ酸配列は少なくとも1つのシステイン残基と少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基とを含み、前記CpG分子は硫黄原子を含むことを特徴とする溶液。

40

【請求項29】

前記溶液は水溶液である、請求項28に記載の溶液。

【請求項30】

沈殿物を含んでなる溶液を製造する方法であって、

(a)細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列とCpG相互作用性アミノ酸配列と

50

を有するポリペプチドを得る工程であって、前記細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列は前記C p G相互作用性アミノ酸配列に対して不均一であり、前記C p G相互作用性アミノ酸配列は少なくとも1つのシステイン残基と少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基とを含むことを特徴とする工程と、

(b) 前記ポリペプチドを、硫黄原子を含むC p G分子と接触させる工程であって、溶液中で実施され、かつ前記ポリペプチドと前記C p G分子とが沈殿を形成する条件下で実施されることによって、前記沈殿物を含んでなる溶液が形成されることを特徴とする工程と

からなる方法。

【請求項31】

哺乳動物において細胞傷害性T細胞を活性化する方法であって、ポリペプチドとC p G分子とを含んでなる組成物を前記哺乳動物に投与することからなり、前記ポリペプチドは細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列とC p G相互作用性アミノ酸配列とを含み、前記細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列は前記C p G相互作用性アミノ酸配列に対して不均一であり、前記C p G相互作用性アミノ酸配列は少なくとも1つのシステイン残基を含み、前記C p G分子は硫黄原子を含むことを特徴とする方法。

【請求項32】

前記C p G相互作用性アミノ酸配列が少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸をさらに含む、請求項31に記載の方法。

【請求項33】

細胞傷害性T細胞を活性化するポリペプチドを特定する方法であって、

(a) 試験ポリペプチドをC p G分子と組み合わせて混合物を形成する工程と、

(b) 前記混合物を哺乳動物に投与する工程と、

(c) 前記哺乳動物から細胞傷害性T細胞を採取する工程と、

(d) 前記哺乳動物におけるCD8⁺細胞傷害性T細胞のレベルが、工程(b)の前の前記哺乳動物におけるCD8⁺細胞傷害性T細胞のレベルに比べて上昇しているかどうかを判定する工程であって、上昇が、前記試験ポリペプチドが細胞傷害性T細胞を活性化するポリペプチドであることを示すことを特徴とする工程と

からなる方法。

【請求項34】

前記細胞傷害性T細胞が前記哺乳動物の脾臓から採取されることを特徴とする、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

前記哺乳動物はマウスである、請求項33に記載の方法。

【請求項36】

C p G相互作用性アミノ酸配列を特定する方法であって、

(a) 試験アミノ酸配列をC p G分子と接触させる工程であって、溶液中で実施されることを特徴とする工程と、

(b) 前記試験アミノ酸配列と前記C p G分子とが沈殿物を形成するかどうかを判定する工程であって、沈殿物の形成が、前記試験アミノ酸配列がC p G相互作用性アミノ酸配列であることを示すことを特徴とする工程と

からなる方法。

【請求項37】

C p G相互作用性アミノ酸配列を特定する方法であって、

(a) ポリペプチド/C p G分子混合物を哺乳動物に投与する工程であって、前記ポリペプチドが細胞傷害性T細胞を活性化するアミノ酸配列と試験アミノ酸配列とを含むことを特徴とする工程と、

(b) 前記混合物が、前記哺乳動物の細胞傷害性T細胞を、対照のポリペプチド/C p G分子混合物を投与された対照の哺乳動物において生じる活性化レベルよりも高いレベルに活性化するかどうかを判定する工程であって、前記対照のポリペプチド/C p G分子混

10

20

30

40

50

合物のポリペプチドは前記試験アミノ酸配列を欠いており、前記高いレベルの細胞傷害性 T 細胞の活性化は前記試験アミノ酸配列が CpG 相互作用性アミノ酸配列であることを示すことを特徴とする工程と

からなる方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して免疫療法の分野に関し、より具体的には増強された免疫原性ポリペプチドに関する。

【背景技術】

10

【0002】

(関連出願)

本願は2004年2月6日に出願された米国仮特許出願第60/542,371号の優先権を主張する。

【0003】

(政府の支援)

本明細書に記載の研究は、少なくとも一部については、米国国立衛生研究所の助成番号 AI-16052 として米国政府より受けた基金を用いて実施されたものである。

【0004】

(背景)

20

腫瘍特異的な細胞傷害性 T 細胞 (CTL) は、腫瘍細胞特異的な細胞溶解に優れており一般の細胞への被害が少ないことから、免疫療法に関して主要な関心を集めてきた。そのような免疫療法の目的は、腫瘍特異的なポリペプチドに対して特異的な CTL の増殖の開始刺激を与えること (プライミング) である。

【0005】

主要組織適合性複合体 (MHC) にマッピングされる遺伝子にコードされているタンパク質は、細胞傷害性 T 細胞およびヘルパー T 細胞に対して短いポリペプチドを提示する。これらの短いポリペプチドは、特異的な T 細胞の活性化および増殖を刺激する。ワクチン投与により感染性因子や腫瘍から個体を保護するために、これらの免疫原性ポリペプチドを用いることが、これまでの主たる関心の対象となっていた。主に注目されてきたのは、MHC クラス I 分子が細胞傷害性 T 細胞 (CTL) に対して提示するポリペプチドであった。ヒトのがんの場合、通常これらのポリペプチドはサイトカインやアジュバントとともに油中エマルジョンとして注射される。重要なことは、使用されるポリペプチドが一般に MHC クラス I 分子に最適に結合する長さであることである。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、改良型ワクチン用のポリペプチド アジュバント複合体を提供することである。また本発明の目的は、増強された免疫原性ポリペプチドを提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、少なくとも部分的には、免疫原性の比較的弱いポリペプチドに結合した免疫原性の強い短いポリペプチドが、CpG アジュバントを補完して *in vivo* における細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の応答の開始刺激 (プライミング) を増強し、その結果免疫原性の比較的弱いポリペプチドの免疫原性を増強するという発見に基づいている。免疫原性の強いポリペプチド (本明細書では「CpG 相互作用性アミノ酸配列」と称する) は、少なくとも 1 つのシステイン (Cys) 残基と、任意選択で少なくとも 1 つの正に荷電したアミノ酸残基とを含みうる。さらに CpG 分子は、ホスホロチオエートジエステル結合に含まれるような少なくとも 1 つの硫黄原子を含みうる。従って、本発明は、CTL 活性

50

化アミノ酸配列に融合したC p G相互作用性アミノ酸配列を含む二分型 (b i p a r t i t e) 免疫原性ポリペプチドであって、該CTL活性化アミノ酸配列はC p G相互作用性アミノ酸配列に対して不均一 (ヘテロ) でもよいことを特徴とする免疫原性ポリペプチドを含む組成物に関する。また、例えば免疫原性を増強するために、C p G相互作用性アミノ酸配列および二分型免疫原性ポリペプチドを特定しこれを用いる方法も提供される。

【0008】

一態様では、ポリペプチドとC p G分子とを含む組成物が提供される。該ポリペプチドは、(1)細胞傷害性T細胞 (CTL) を活性化しうるアミノ酸配列 (本明細書では「CTL活性化配列」と称する)、および(2)CTL活性化配列に対して不均一であるC p G相互作用性アミノ酸配列を含みうる。C p G相互作用性アミノ酸配列は、少なくとも1つのシステイン残基と、任意選択で、少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基とを含むことができ、C p G分子は少なくとも1つの硫黄原子を含みうる。C p G相互作用性アミノ酸配列は15個以下 (例えば12、10、8、または6個) のアミノ酸残基を含むことが可能であり、かつ、B - XもしくはX - B配列またはB - X - B配列 (Bは正に荷電したアミノ酸残基、Xは任意のアミノ酸残基) を含みうる。B残基は、例えばアルギニンまたはリジンである。一実施形態では、C p G相互作用性アミノ酸配列は、B - X - B - X - B、B - X - X - B - X - B、B - X - X - B - X - X - Bなどであってよい。さらに、該アミノ酸配列は少なくとも1つのシステイン残基および少なくとも1つの (例えば2、3、4個またはそれ以上の) 正に荷電したアミノ酸残基を含みうる。例えば、正に荷電したアミノ酸残基がC y s残基に隣接していてもよい。一実施形態では、C p G相互作用性アミノ酸配列は配列K C S R N R (配列番号1) を含む。

10

20

【0009】

一実施形態では、C p G相互作用性ポリペプチドは、システイン残基を含み正に荷電したアミノ酸残基は含んでいなくてもよい。システイン残基はC p G分子との相互作用を促進して免疫原性の高い複合体を創出することができる。従ってC p G相互作用性アミノ酸配列は配列X C X (Cはシステイン、Xは任意のアミノ酸) を含みうる。例えば、一実施形態では、C p G相互作用性アミノ酸配列は配列A C S A N A (配列番号2) を含む。

【0010】

一実施形態では、CTL活性化アミノ酸配列は約50アミノ酸残基以下の長さであり (例えば、約25、20、15、10アミノ酸またはさらに少数のアミノ酸)、別の実施形態ではポリペプチド全体 (CTL活性化配列 + C p G相互作用性アミノ酸配列) が50アミノ酸残基以下 (例えば、約40、35、30、25、20アミノ酸またはさらに少数のアミノ酸) の長さである。

30

【0011】

一実施形態では、組成物のC p G分子はホスホリチオエート骨格を有する。

また本明細書では、免疫原性の高い組成物を製造する方法も提供される。例示的な1つの方法には、(a)CTL活性化配列とC p G相互作用性アミノ酸配列とを有するポリペプチドを得る工程と、(b)該ポリペプチドを、硫黄原子を含むC p G分子と接触させる工程とを含む。CTL活性化アミノ酸配列はC p G相互作用性アミノ酸配列に対して不均一でもよく、C p G相互作用性アミノ酸配列は少なくとも1つのシステイン残基と、任意選択で少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基とを含みうる。

40

【0012】

沈殿物を含む、水溶液などの溶液も提供される。本明細書で用いられるように、「沈殿物」とは肉眼または光学顕微鏡で見ることのできる固体物質である。溶液の沈殿物にはポリペプチドとC p G分子とが含まれ得る。上述のように、該ポリペプチドはCTL活性化配列とC p G相互作用性アミノ酸配列とを含みうる。C p G相互作用性アミノ酸配列は少なくとも1つのシステイン残基と、任意選択で少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基とを含むことが可能であり、C p G分子は硫黄原子を含みうる。

【0013】

50

本明細書において提供される方法には溶液を作成する方法も含まれる。そのような方法の1つは、CTL活性化配列とCpG相互作用性アミノ酸配列とを有するポリペプチドを得る工程と、該ポリペプチドを、少なくとも1つの硫黄原子を含むCpG分子と接触させる工程とを含む。接触工程は、水溶液などの溶液中や、ポリペプチドとCpG分子との沈殿物の形成に好適な条件の下で実施可能である。CTL活性化配列はCpG相互作用性アミノ酸配列に対して不均一であってもよく、CpG相互作用性アミノ酸配列は少なくとも1つのシステイン残基と、少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基とを含みうる。

【0014】

細胞傷害性T細胞を活性化する方法も提供される。例えば、哺乳動物において細胞傷害性T細胞を活性化する方法は、ポリペプチドとCpG分子とを有する組成物を哺乳動物に投与することを含む。上述のように、該ポリペプチドは、CTL活性化配列と、CTL活性化配列に対して不均一であるCpG相互作用性アミノ酸配列とを含みうる。CpG相互作用性アミノ酸配列は少なくとも1つのシステイン残基と、任意選択で少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基とを含むことが可能であり、CpG分子は少なくとも1つの硫黄原子を含みうる。

10

【0015】

スクリーニング方法も提供される。そのようなスクリーニング方法の1つは、細胞傷害性T細胞を活性化するポリペプチドを特定する手段を含む。該方法は、(a)試験ポリペプチドをCpG分子と組み合わせて混合物を形成する工程と、(b)この混合物をマウスやラットなどの哺乳動物に投与する工程と、(c)哺乳動物から、例えば該動物の脾臓またはリンパ節などから細胞傷害性T細胞を採取する工程と、(d)該哺乳動物におけるCD8⁺細胞傷害性T細胞のレベルが工程(b)より前の該動物におけるCD8⁺細胞傷害性T細胞のレベルに比べて上昇しているかどうかを判定する工程とを含む。CD8⁺細胞傷害性T細胞のレベルの上昇は、その試験ポリペプチドが細胞傷害性T細胞を活性化しうることを示す。

20

【0016】

別のスクリーニング方法を使用してCpG相互作用性アミノ酸配列を特定することも可能である。そのような方法の1つによれば、試験アミノ酸配列をCpG分子と(例えば溶液中で)接触させ、試験アミノ酸配列およびCpG分子が沈殿物を形成しうるかどうかを判定する。沈殿物の形成は、その試験アミノ酸配列がCpG相互作用性アミノ酸配列であることを示す。判定工程は、例えば、溶液中の沈殿物の形成を見て確認するなどして直接視覚化することにより実施可能である。判定工程はまた、接触工程前後の溶液の吸光度を比較するなどして溶液の吸光度を測定することによっても実施可能である。CpG分子とともに沈殿物を形成するポリペプチドは、細胞傷害性T細胞の活性化能についてさらに試験可能な候補ポリペプチドである。しかしながら、CpG分子を沈殿させないポリペプチドでも、特にシステインを含む場合は、必ずしも細胞傷害性T細胞を活性化できないとは限らない。

30

【0017】

CpG相互作用性の候補アミノ酸配列を特定する方法も提供される。一実施形態では、該方法は、(a)ポリペプチド/CpG分子混合物を哺乳動物に投与する工程と、(b)該混合物が前記哺乳動物由来のCTLを、対照のポリペプチド/CpG分子混合物を投与された対照の哺乳動物における活性化レベルよりも高いレベルで活性化するかどうかを判定する工程とを含む。ポリペプチド/CpG分子混合物のポリペプチドは、CTL活性化配列と試験アミノ酸配列とを含みうるものであり、対照のポリペプチド/CpG分子混合物のポリペプチドは、試験アミノ酸配列を欠くことになる。CTL活性化のレベルが試験アミノ酸配列の存在下でより大きいと判定されることは、該配列がCpG相互作用性アミノ酸配列であるかもしれないことを示唆するものである。判定工程には、ELISAアッセイまたはELISPOTアッセイなどの免疫組織化学的技法も含まれ得る。

40

【0018】

本発明の1つの特徴は、CpG分子と、連続した約100アミノ酸の配列の中に約4つ

50

以上のシステイン（および約2つ以上のジスルフィド結合）を含むポリペプチドとを含んでなる組成物である。該ポリペプチドは、合成または天然の抗原性ポリペプチドなどの抗原性ポリペプチドであってよい。本明細書において使用されるように、「天然のポリペプチド」とは、哺乳動物（例えばヒト）などで *in vivo* で見出されるアミノ酸配列を含む。

【0019】

ポリペプチド（例えば CpG 相互作用性アミノ酸配列と CTL 活性化配列とを有するポリペプチド）および CpG 分子を、治療処方として、または治療用ワクチンとして一緒に送達することには多くの利点がある。これら2種の分子を1つの免疫治療用組成物に含めて送達することはワクチン接種を簡略化し、さらに各成分を分解から保護して細胞への該成分の輸送を容易にすることもできる。本明細書に記載のワクチンの製造は比較的簡単であるため、ワクチン開発に要する時間を数ヶ月または数週間または数日にまで低減することができる。また、ワクチン製造が比較的簡単であることにより、個々の腫瘍の種類または特定の病原性疾患について、適時に施用できるように特注設計とすることが容易にもなる。

10

【0020】

CpG 分子を複合体中に含めておくことにより、遊離型合成 CpG 分子を投与した場合によくみられる、有害な全身性の応答を抑制することもできる。理論に拘泥することは望むものではないが、本発明の複合体により、抗原と CpG とから構成される小ユニットの「遅延放出」がもたらされる可能性がある。

20

【0021】

別の利点としては、複合体化するという事象を用いて、遺伝子治療への応用など、小分子を細胞内へ送達するために標的化することも可能である。

多種多様なヒトのがんに対する有効なポリペプチド系ワクチンを開発することは、それらのがんにおいて特定のポリペプチドが選択的に発現するという利点を活かすために模索されてきた。これらの試みは原則として、エフェクター T 細胞に直接提示されるのに適した長さのポリペプチドの使用に重点が置かれていた。本明細書に記載のワクチンポリペプチドを含む本明細書の組成物は、本来の (professional) 抗原提示細胞 (APC) によるポリペプチドのエフェクター T 細胞への提示を制御する機構を考慮して、*in vivo* でのプライミング用に特に最適化することもできる。

30

【0022】

別途定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術用語および科学用語は本発明が属する技術分野の当業者が通常理解するのと同じ意味を有するものである。本明細書に記載されるのと同様または等価な方法および材料は、本発明の実施または試行において使用することが可能であり、有用な方法および材料については以降に記載されている。材料、方法、および実施例は単なる例示であり、限定を意図するものではない。本発明のその他の特徴および利点については、添付の図面および説明、ならびに特許請求の範囲から明らかになるであろう。本願全体を通して引用される全ての参考文献、係属中の特許文献および公開特許文献は、参照により本願に援用される。矛盾が生じる場合は、定義を含めた本明細書に従うものとする。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

本発明は、少なくとも部分的には、免疫原性の弱いポリペプチド（本明細書では「CTL 活性化」ポリペプチドと称する）に結合した免疫原性の強い短いポリペプチドが、CpG アジュバントを補完して *in vivo* における細胞傷害性 T 細胞 (CTL) の応答の開始刺激 (プライミング) を増強する、という発見に基づいている。免疫原性の強いポリペプチド（本明細書では CpG 相互作用性ポリペプチドと称する）は、少なくとも1つのシステイン (Cys) 残基と、任意選択で少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸残基を含む。さらに、CpG 分子は少なくとも1つの硫黄原子を含む。免疫原性の強い CpG 相互作用性ポリペプチドと CTL 活性化ポリペプチドとの融合により、本発明において特徴

50

付けられる二分型ポリペプチドが提供されうる。CTL活性化ポリペプチドのアミノ酸配列は、CpG相互作用性ポリペプチドのアミノ酸配列に対して不均一であってよい。得られる二分型の免疫原性ポリペプチドは「プライモトープ (p r i m o t o p e) 」とも呼ばれる。

【 0 0 2 4 】

二分型の免疫原性ポリペプチドのCTL活性化アミノ酸配列は、MHCクラスI分子に結合するポリペプチドであってよい。従って、本発明の二分型免疫原性ポリペプチドは開始刺激 (プライミング) 能力が増強されたCTL活性化ポリペプチド、またはプライミング能力が増強されたMHCクラスI結合性ポリペプチドとしても理解されうる。プライミング能力の増強は、MHCクラスI分子に結合する該ポリペプチドに融合された短いCpG相互作用性アミノ酸配列に由来する。この短いアミノ酸配列は少なくとも1つのCys残基と、任意選択で少なくとも1つの (例えば2、3個またはそれ以上の) 正に荷電したアミノ酸とを含む。CpG相互作用性アミノ酸配列の少なくとも1つの正に荷電したアミノ酸は、Arg、Lys、またはHisでありうる。CpG相互作用性アミノ酸配列の全長は約20アミノ酸長よりも短くてよい (例えば約15、12、10、8、または6アミノ酸長よりも短くてよい) 。

10

【 0 0 2 5 】

CpG相互作用性アミノ酸配列を、対象の抗原の免疫原性を増強するために該抗原に付加することが可能である。CpG相互作用性ポリペプチド (および同ポリペプチドが結合している抗原) のシステイン残基は、CpG分子と相互作用、例えば共有結合することができる。CpG分子は、細胞仲介性の強力な免疫応答を誘発する免疫系刺激剤である。これらのCpG分子は日常的にワクチン探索においてアジュバントとして使用され、使用時には遊離型で提供される (CpG分子は通常、本開示に記載されるような他のいかなる分子とも結合していない) 。しかしながら、CpG分子は全身投与すると有害なショック反応を誘発するため (このことは本開示が克服する課題の1つである) 、現在はヒトでの使用は承認されていない。アジュバントとして用いられるCpG分子の大部分は、該オリゴヌクレオチドの安定性を高め、かつヌクレアーゼ感受性を低減するためにホスホロチオエート骨格を用いて合成される。CpGオリゴヌクレオチドのホスホロチオエート骨格の硫黄基が存在すると、CpG相互作用性アミノ酸配列に含まれるシステインの硫黄基とのジスルフィド結合の形成が可能となる。CpG相互作用性アミノ酸配列とCpGオリゴヌクレオチドとの間のこのジスルフィド共有結合は、抗原の免疫原性の増強を促進する助けとなる。

20

30

【 0 0 2 6 】

いくつかのポリペプチド - CpG分子化合物の凝集により沈殿が形成されて抗原の免疫原性の増大が実証されうる。CpG相互作用性アミノ酸配列の、正に荷電したアミノ酸は、CpGオリゴヌクレオチドの負に荷電した骨格と相互作用して凝集物を形成することができる。生じた沈殿物は2つの機能を示しうる。すなわち、(1) 抗原提示細胞による凝集物 (抗原) の取り込み (抗原に対する免疫応答の第1段階) を増大させうること、ならびに (2) CpG分子を局在化させて全身への循環 (およびそれゆえの有害なショック) を防止すること、である。CpG相互作用性アミノ酸配列は正に荷電したアミノ酸について周期性を有していてもよい。1または複数のCpG分子がらせん形の性質を有するので、負の荷電はある一定の方向を向いている。CpG相互作用性アミノ酸配列について、正に荷電したアミノ酸を、CpG分子の負の荷電と最も結合しやすい構造に配置するには、スペーサーとして単一または複数のアミノ酸を使用することができる。一般的な配置は、B - XもしくはX - B、またはB - X - Bであってよく、ここでBは正に荷電したアミノ酸残基で、Xはアミノ酸残基である。B残基は、例えば、アルギニンまたはリジンまたはヒスチジンであってよい。一実施形態では、CpG相互作用性アミノ酸配列は、B - X - B - X - B、B - X - X - B - X - B、B - X - X - B - X - X - Bなどであってよい。

40

【 0 0 2 7 】

一部の場合においては、CpG相互作用性ポリペプチドはシステイン残基を含み、正に

50

荷電したアミノ酸残基は含んでいなくてもよい。システイン残基は、免疫原性が增強された複合体を創出するためのCpG分子との相互作用を促進しうる。従って、CpG相互作用性アミノ酸配列は、配列XCX（ここでCはシステインでXは任意のアミノ酸である）を含むことができる。

【0028】

免疫療法の開発は、化学療法および放射線療法を含む標準的な治療法に抵抗性のヒトの腫瘍に対する代替療法を提供しうる。腫瘍特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）は、腫瘍細胞特異的な細胞溶解に優れており一般の細胞への被害が少ないことから、免疫療法に関して主要な関心を集めてきた。そのような免疫療法の目的は、主要組織適合性複合体のクラスI遺伝子の産物により提示される腫瘍特異的なポリペプチドに対して特異的なCTLの増殖の開始刺激を与えること（プライミング）である。

10

【0029】

正に荷電した複数アミノ酸と少なくとも1つのシステイン残基とを含むクラスI結合性ポリペプチドは、CpG分子と複合体を形成して同分子を沈殿させる能力を示し、これらのアミノ酸が免疫原性の弱いポリペプチドに付加されると、免疫化のためにCpG分子と組み合わせたときの免疫原性が増大する。このような免疫原性の増大と同時にCpG分子による全身性の作用は低減され、このことから、共沈したポリペプチドとCpG分子とにより、免疫原性と半減期が増大しアジュバント仲介性の毒性は低減されたワクチン開発の基盤が提供されることが示唆される。2つの構成成分を同時に送達することから、ワクチン投与が簡便となり、各構成成分が分解から保護されることも期待される。これらのワクチンの製造は比較的簡単であることから、個々の腫瘍の種類について適時に投与するためのワクチンの特注設計が可能となりうる。

20

【0030】

二分型免疫原性ポリペプチド

本発明の二分型免疫原性ポリペプチドは、CpG相互作用性アミノ酸配列（例えば、CpG相互作用性アミノ酸の「尾部」）と、CpG相互作用性アミノ酸配列に対して不均一でありうるCTL活性化配列とから構成されうる。CpG相互作用性アミノ酸配列は、本発明の二分型免疫原性ポリペプチド中の任意の部位に配置可能であり、例えばN末端もしくはC末端またはその近傍にあってもよいし、該ポリペプチドの中ほどにあってもよい。CTL活性化配列はMHCクラスI結合性ポリペプチドであってよい。本発明の免疫原性ポリペプチドは、*in vivo*で、クラスI分子が結合したAPCによって効率よくプロセッシングかつ提示され、特異的CTLによって認識されうる最短のポリペプチドである。本発明の二分型免疫原性ポリペプチドの全長は約100アミノ酸長よりも短く、好ましくは約50アミノ酸長よりも短い（例えば、約40、35、30、25、20、もしくは15アミノ酸長である）とよい。

30

【0031】

完全にプロセッシングされたポリペプチドは、MHC分子に最適に結合してエフェクターT細胞により認識されるポリペプチドである。理論に拘泥することを望むものではないが、正に荷電したCpG相互作用性アミノ酸配列により、本発明の免疫原性ポリペプチドがAPCにより取り込まれるのを可能にする必須の特徴が付与される可能性がある。

40

【0032】

CpG相互作用性アミノ酸配列

CpG相互作用性アミノ酸配列は、局在化したAPCを活性化させるために、CpGモチーフと複合体を形成しCpGモチーフのアジュバント活性を集中させることができる。

【0033】

CpG相互作用性アミノ酸配列は、0、1、2、3またはそれ以上の正に荷電したアミノ酸を含むことができる。正に荷電したアミノ酸が過剰であると、短期的な筋書きとしてはT細胞の活性化および増殖を阻止しうるが、長期的には（例えば30、40、50、75、100または150日またはさらに長期にわたって）T細胞の活性化の刺激に有効となりうる。上記阻害は、CpGが濃縮され沈殿してポリペプチドとCpGのいずれをも不

50

活性な複合体の中に押さえ込んでしまうことに起因する可能性がある。C y s および正に荷電したアミノ酸はC p G相互作用性アミノ酸配列の中の任意の部位にあってよく、その他のアミノ酸は任意のアミノ酸であってよいが、好ましくは正に荷電したアミノ酸は配列全体にわたって規則的な間隔となっているとよい。例えば、正に荷電したアミノ酸が1つおき、2つおき、または3つおきのアミノ酸部位に配置されてもよい。正に荷電したアミノ酸残基の配置は完全に周期的である必要はない。例えば、C p G相互作用性アミノ酸配列は、本明細書に記載の任意のC p G相互作用性アミノ酸配列であってよい。C p G相互作用性アミノ酸配列は、例えば、K C S R N R または A C S A N A であってよい。

【0034】

理論に拘泥することは望むものではないが、C p G相互作用性アミノ酸配列のシステイン残基は、例えば、C p G相互作用性アミノ酸配列（および同様に該配列が結合しているC T L活性化アミノ酸配列）をC p G分子と相互作用（例えば共有結合）させることができる。

10

【0035】

C T L活性化アミノ酸配列

「C T L活性化」ポリペプチドは、C T L活性化アミノ酸配列として定義される。ポリペプチドは、マウスもしくはヒトなどの哺乳動物に投与されると活性化C T Lレベルの上昇をもたらす場合、C T L活性化ポリペプチドとして分類することができる。活性化C T Lのレベルは、E L I S AアッセイやE L I S P O Tアッセイなどを含むがそれらに限定はされない、当技術分野において周知の種々の方法により測定することができる。

20

【0036】

ジスルフィド結合に富むポリペプチド（I g Gなど）は、不均一なC p G相互作用性配列を必要としない場合もあり、その代わりにそれ自体が十分にC p G分子に結合して強力な免疫応答を誘発することができる。このような抗原性の高いポリペプチドは、連続した100個のアミノ酸あたり少なくとも4つのシステイン残基（例えば5、10、15、20、25または30個のシステイン）を有しうる。該ポリペプチドはジスルフィド結合も豊富でありうる。例えば、該ポリペプチドは本来の状態に折りたたまれたときに少なくとも2つのジスルフィド結合（例えば3、4、5、6、7、8、9、10または15個のジスルフィド結合）を含みうる。該抗原性ポリペプチドは、変性剤、例えば尿素、塩化グアニジン、チオシアン酸グアニジンG d m S C N、または熱およびメルカプトエタノールなどによって処理してジスルフィド結合を切断し、次いで変性ポリペプチドをC p G分子と混合して沈殿を形成させることができる。得られた混合物を、本明細書に記載のような免疫療法用製剤として使用することもできる。

30

【0037】

C p G分子

本明細書に記載のように、C p G分子は、少なくとも1つの非メチル化シトシン - グアニンジヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである。C p G分子は約15 ~ 25ヌクレオチド長で、好ましくは約18 ~ 20ヌクレオチド長であるとよい。該オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのC p GコンセンサスモチーフR R C p G Y Y（RはプリンでYはピリミジン）を含みうる。C p G分子は、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含む骨格を備えうるが、好ましくはC p G分子全体の骨格がホスホロチオエート結合で構成されているとよい。ホスホロチオエート骨格の側鎖は酸素の代わりに少なくとも1つまたは複数の硫黄原子を含み、そしてホスホロチオエート骨格によって、硫黄原子を含まないオリゴヌクレオチド骨格に比べて半減期が延び、活性レベルが上昇し、かつ活性の特異性の変化はごくわずかとなりうる（クレイグ（K r e i g）、Ann u . R e v . I m m u n o l . 第20巻、p . 709、2002年）。理論に拘泥することは望むものではないが、ホスホロチオエート骨格の硫黄原子は、免疫性の応答を増強しうるC p G相互作用性アミノ酸配列のC y s残基とともにジスルフィド結合を形成する可能性がある。

40

【0038】

任意のC p G分子、またはジスルフィド結合を介して結合するためのホスホロチオエー

50

ト結合を有する任意のDNA分子を、本明細書に記載の組成物および方法において用いることができる。例えば、マウスのTLRに特異的なCpG分子1826(5' TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT 3') (デービス(Davis)ら、J. Immunol. 第160巻、p. 870、1998年)を記載されるように使用することができる。例えばリングナウ(Lingnau)らの文献(Vaccine、第20巻、p. 3498-3508、2002年)に記載のCpG分子も参照されたい。

【0039】

免疫療法用製剤

本明細書に記載の組成物および方法を、がんなどの疾患または障害を治療または予防するために、ワクチン接種の形態で使用することができる。免疫療法用の例示的組成物は、二分型免疫原性ポリペプチドおよびCpG分子を不完全フロイントアジュバントなどの油中乳剤の状態を含む。任意選択で、免疫療法用組成物にMPL-AF(ジバルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)と混合したモノホスホリルリピドAアジュバント(MPL))を含めてもよい。

10

【0040】

本明細書に記載の免疫療法用組成物は、二分型免疫原性ポリペプチドの不均一な(ヘテロの)混合物を含みうる。例えば、該混合物は相異なるCTL活性化配列およびCpG相互作用性アミノ酸配列を有するポリペプチドを含んでもよいし、ある1種類のCTL活性化配列が種々の異なるCpG相互作用性アミノ酸配列に結合されてもよい。種々のCpG相互作用性アミノ酸配列を使用することによって、様々な安定性および様々なCTL活性化能を備えた二分型免疫原性ポリペプチドの集団が提供されうる。例えば、また理論に拘泥することを望むものではないが、数個または1つのシステイン残基を含む短いCpG相互作用性アミノ酸配列が、短い期間でCTLを活性化して即時的なプライミング作用を示す一方、多数のシステイン残基または多数の正に荷電したアミノ酸を含む長いCpG相互作用性アミノ酸配列は、長期のプライミング活性を示す可能性がある。

20

【0041】

本明細書で用いられるように、ワクチンとは、ウイルス感染、がんもしくはその他の障害からの保護、またはウイルス感染、がんもしくはその他の障害の治療を施す組成物である。ウイルス感染、がんもしくはその他の障害からの保護により、感染または腫瘍またはその他の障害が完全に予防されるか、あるいは、その後感染、腫瘍またはその他の障害を被った場合でも、感染や障害の重篤度または期間が低減されることになる。治療は、1つまたは複数の症状を軽減したり、重篤度または期間を低減したりすることになる。本明細書における目的に関しては、ワクチンは、本明細書に記載の二分型免疫原性ポリペプチドおよびCpG分子を投与することによってもたらされる。本明細書において用いられるように、特定の組成物の投与による特定の障害の症状の軽減を、恒久的であれ一時的であれ、該組成物の投与に起因または関連して永続的であれ一過性であれ、何らかの緩和と称する。

30

【0042】

本明細書に記載の免疫療法用組成物の投与によりランゲルハンス細胞および抗原提示細胞(APC)が活性化されるが、これらの細胞はそれぞれ抗原性ポリペプチドをCTLに提示することによってCTLを活性化することができる。本発明の免疫療法用組成物は、第2の治療剤または投薬計画とともに投与することもできる。例えば、免疫療法剤を、例えばがんに対する化学療法または放射線療法も受けている患者に投与することもできる。

40

【0043】

本明細書に記載の免疫療法用組成物は、滅菌水または緩衝液に含めるなど溶液として提供されてもよいし、組成物が凍結乾燥形態として包装されてもよい。該組成物を含むキットは、滅菌水もしくは緩衝液などの溶解剤、および/または目的の用途に応じて調製するべく溶液を希釈する、および/またはそれ以外には溶液の特性を調節するための試薬を含みうる。キットはまた情報提供資料を備えてもよい。情報提供資料には、本明細書に記載の方法および/または本明細書に記載の方法のための免疫療法用組成物の使用に関する説

50

明書、指示書、販売用資料またはその他の資料が挙げられる。

【0044】

キットの情報提供資料の形態に制限はない。多くの場合、情報提供資料は、印刷された文書、図面、および/または写真などの印刷物として提供される。指示書はラベルや印刷されたシートの形態であってもよい。しかしながら、情報提供資料は、点字、コンピュータで読み取り可能な資料、録画ビデオ、または録音などの他の形態で提供されてもよい。情報提供資料は、実際の住所、電子メールアドレス、ウェブサイト、または電話番号など、キットの使用者が免疫療法用組成物および/または本明細書に記載の方法における該組成物の使用について実質的な情報を得られる連絡先を含んでいてもよい。当然ながら、情報提供資料は形式を任意に組み合わせた状態で提供されてもよい。

10

【0045】

本発明の組成物は種々の適切な容器に入れて包装可能である。例えば、組成物を、ガラスまたはプラスチックなどの材料で構成されたボトル、バイアル、またはシリンジに入れてもよい。任意選択で、組成物を、アンプル、シリンジ、またはプリスターバックなどに入れて単回投与形態として包装してもよい。容器は気密性および/または耐水性としてもよいし、ワクチン用、またはCTL応答を刺激するため、あるいはがんを治療するためなどの用途をラベルしてもよい。

【0046】

有効用量

本明細書に記載の組成物は、複数回として様々な濃度で投与することができる。

20

本明細書に開示された組成物（例えば、免疫療法用組成物）の毒性および治療的有効性は、LD₅₀（集団のうち50%が死亡する用量）およびED₅₀（集団のうち50%において治療上有効な用量）を決定するための培養細胞または実験動物のいずれかを使用した標準的な薬学的手段を用いて測定可能である。毒性と治療的有効性との用量比が治療指数であり、比LD₅₀/ED₅₀として表すことができる。治療指数が大きいポリペプチドまたは他の化合物が好ましい。

【0047】

細胞培養アッセイおよびさらなる動物実験から得られたデータを用いてヒト用の用量範囲を決定することができる。そのような化合物の用量は、毒性をほとんどまたは全く伴わずにED₅₀を含む血中濃度範囲内にあることが好ましい。用量は、この範囲内で、使用した投与形態および投与経路に応じて変更可能である。本明細書に記載の方法において使用される全ての組成物に関して、治療的有効用量はまず細胞培養アッセイから推定することができる。細胞培養で測定したようにして、IC₅₀（すなわち、最大限の半分だけ症状の抑制（例えば腫瘍の治療および/またはCTL活性化）を達成する免疫原性ポリペプチドおよびCpG分子（遊離型および複合体型）の濃度）を含む循環血漿中の濃度範囲を達成するための用量を動物モデルで決定することができる。そのような情報を用いて、ヒトにおいて有用な用量をより正確に決定することが可能である。ワクチン投与形態における二分型免疫原性ポリペプチドおよびCpG分子の量は、ワクチンの被接種者において重大かつ有害な副作用を伴わずに免疫保護反応を誘導する量として選択される。そのような量は、標的（例えば腫瘍または全身用ワクチン接種処置）に応じて変更可能である。一般に、各用量は、二分型免疫原性ポリペプチドおよびCpG分子全体で約500 μg未満（例えば、約400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、20、10、5または1 μg未満）ずつを含むことになると予想される。用量は、任意選択で2つの構成成分を等モル比で含むこともできる。あるワクチンに最適の量は、被接種者におけるCTLの応答、抗体価、およびその他の反応を観察することを含む標準的な検討により確定することが可能である。

30

40

【0048】

最初のワクチン接種に続いて、被接種者は約4週間内に追加接種を受けてもよい。投与用製剤および投与経路は、治療しようとする特定の障害や治療を受ける特定の人によって調整可能である。例えば、その人が白血病などのがんである場合もあるし、胸部、大腸、

50

前立腺、膵臓または肺の腫瘍などの腫瘍を有している場合もある。

【0049】

一般に、免疫療法剤の投与は、毒性、炎症またはアレルギー反応などの望ましくない副作用を伴わずに予防および治療のいずれの目的も促進する。個別に必要とされることは様々であるが、製剤の有効量の最適な範囲の決定は当技術分野の範囲内にある。ヒトでの用量は動物実験から容易に外挿することができる(カトクス(Katocs)ら、「Remington's Pharmaceutical Sciences」第18版、ジェンナロ(Gennaro)編、米国ペンシルバニア州イーストン所在のマックパブリッシング社(Mack Publishing Co.)、1990年の第27章)。一般に、有効な量の製剤を提供するために必要な用量は、被投与者の年齢、健康状態、生理学的状態、体重、疾患または障害の種類および程度や、治療の頻度や、必要であれば併用する治療法の性質や、所望の効果の性質および範囲などのいくつかの要因に応じて変化することになる(ニース(Nies)ら、「Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics」第9版、ハードマン(Hardman)ら編、米国ニューヨーク州ニューヨーク所在のマグロウヒル社(McGraw-Hill)、1996年の第3章)。

10

【0050】

スクリーニング法

本明細書において様々なスクリーニング法も提供される。そのようなスクリーニング法の1つを用いて、細胞傷害性T細胞を活性化するポリペプチドを特定することができる。このCTL活性化ポリペプチドを、本明細書に記載の二分型免疫原性物質の製造に使用することができる。該方法は、例えば、試験ポリペプチドをCpG分子と組み合わせることと、該混合物をマウスまたはラットなどの哺乳動物に投与することと、該哺乳動物から細胞傷害性T細胞を採取することと、該哺乳動物における細胞傷害性T細胞(例えばCD8⁺CTL)のレベルが上昇したかどうか測定することとを含みうる。

20

【0051】

その他のスクリーニング方法には、二分型免疫原性ポリペプチド中に使用するためのものなどCpG相互作用性アミノ酸配列を特定するための手法が挙げられる。例えば、試験アミノ酸配列をCpG分子と接触させて、該混合物を沈殿形成について観察する。沈殿の形成は、その試験アミノ酸配列がCpG相互作用性アミノ酸配列であることを示唆する。本発明の方法はさらに、特定されたCpG相互作用性アミノ酸配列を含む二分型免疫原性ポリペプチドを投与することを含みうる。該ポリペプチドは、CpG分子を含む製剤中に含めて哺乳動物に投与することができる。このポリペプチド/CpG分子組成物が哺乳動物においてCTLを活性化しうるかどうかを判定することにより、試験対象のCpG相互作用性アミノ酸配列が*in vivo*で有効な免疫療法剤の一部として機能しうることを判定することができる。

30

【0052】

CTL活性化配列またはCpG相互作用性アミノ酸配列として特定された配列は、印刷物または機器で読み取り可能な形態に記録することができる。さらに、特定された配列を含むポリペプチドをさらにヒトにおいて試験し、免疫反応についてアッセイすることも可能である。

40

【0053】

本発明について以下の実施例によりさらに説明するが、実施例はさらに限定を加えるものとみなすべきではない。

【実施例1】

【0054】

免疫原性ポリペプチドはCpGを沈殿させ、CTLの活性化を増強する

本発明者らの研究室における初期の実験は、マウスにおいて非主要組織適合性抗原(MiHA)ポリペプチドに対するT細胞の応答を増大させるための方法に焦点を当てていた。過去10年にわたり、本発明者らはMiHAポリペプチドに特異的なCTLを作製する

50

マウスの能力が低下し続けることを観察してきた。このような低下は、マウス室における飼育手法が厳格さを増し、マウスの免疫系がホメオスタシスを維持する以外に何もする理由がなくなるまで病原体への曝露が低減されたことに起因する可能性がある。刺激の際にIFNを産生するCTLを定量するために第一次ELISPOTへと変更して以来、本発明者らは、バックグラウンドのスポットが本発明者らのマウスにおいては事実上存在しないことを見出した。このことは、バックグラウンド活性が依然存在しているヒトCTLを用いた第一次ELISPOTと直接の対比をなしている。これらの観察結果は、CTLの応答を有効に生じさせるために克服しなければならない免疫活性の全体的低下と一致している。

【0055】

問題点が病原体への曝露の制限にあるらしいことを見出されたので、本発明者らは、薬理学的方法、例えば抗体を介した同時刺激などの使用よりもむしろ、細菌アジュバントを用いてCTLのMiHAに対する応答を増大させることについて検討した。CTLの応答を増強する能力について報告のある、それぞれTLR-4およびTLR-9に結合するリポドAおよびCpG分子を使用することとした。リポドAは、MPL-AF（界面活性剤様のジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)と混合したMPLアジュバント(モノホスホリルリポドA)の形態でコリキサ・コーポレーション(Corixa Corporation)(米国ワシントン州シアトル所在)より供給された。使用したCpG分子は、マウスのTLR-9に特異的な1826オリゴヌクレオチド(TCCA TGAC GTTC CTGA CGTT)であり(デービス(Davis)ら、J. Immunol. 第160巻、p. 870、1998年);このCpGオリゴヌクレオチドは、マヨ・クリニック・モレキュラー・バイオロジー・コア(Mayo Clinic Molecular Biology Core)によりホスホロチオエート骨格を用いて合成された(別途指定のない限り、本発明者が用語CpGを用いるときはこの合成型を指している)。CpGで繰り返し処理されたマウスにおいて以前観察された強力な全身性の炎症を回避する努力の中で、本発明者らは単回の投与で使用するためにCpG、MPL、および抗原を混合した。10 μ gのMPL-AF+100 μ gのCpGをMiHA不適合の脾細胞または合成MiHAポリペプチド(100 μ g)のいずれかと混合して、尾の基部への皮下(s.c.)注射用に用いて予備的実験を実施した。

【0056】

IFNを分泌するMiHA特異的CTLの出現頻度を、第一次ELISPOTアッセイの使用により概算したが、同アッセイではMACS(登録商標)CD8⁺ネガティブ選択キット(米国カリフォルニア州オーバーン所在のミルテニーバイオテク(Miltenyi Biotec)を用いた他のリンパ球集団のネガティブ選択により富化されたCD8⁺の応答細胞を用いた。

【0057】

WMHHNMDLIペプチド(HY1)およびKCSRNRQYLペプチド(HY2)は、ネズミのY連鎖遺伝子にコードされるタンパク質由来のものであり、H2D^b分子によりCTLに提示される(キング(King)ら、Genomics 第24巻、p. 159-168、1994年;グリーンフィールド(Greenfield)ら、Nat. Genetics 第14巻、p. 474-478、1996年)。これら2種のペプチドおよびMPL-AFとCpGアジュバントとの組み合わせの混合物について、CTLの応答をプライミングする能力を試験した。上記2種のペプチドについては、in vivoでのプライミング効率について、免疫的に優勢なH60ペプチド(LTFNYRNL)(マラルカナン(Malarkannan)ら、J. Immunol. 第161巻、p. 3501-3509、1998年)とも比較した。B6のメスをs.c.でプライミングし、免疫化10日後に脾臓を採取した。CD8⁺CTLをネガティブ選択により富化し、IFNを分泌するCTLの出現頻度を概算するために、第一次ELISPOTアッセイにおいて(1)同系のメスの脾細胞、(2)同系のオスの脾細胞、(3)抗H60 CTLについて同種異系(BALB.B)の脾細胞、および(4)ペプチドでバルスしたRM

10

20

30

40

50

A/S細胞で刺激した。第一次ELISPOTアッセイは、100 μ gのポリペプチド+100 μ gのCpGおよび10 μ gのMPL-AFを用いて単回免疫されたネズミ由来のCD8+脾細胞の応答細胞を用いて実施した。RMA/S細胞は、濃度10nMのそれぞれの標的ポリペプチドでパルスした。応答細胞(responder)および抗原細胞(stimulator)を、抗IFN γ 捕捉抗体でコーティングしたELISPOTプレートで48時間培養し、その後ビオチン化した抗IFN γ 検出抗体を、次いでストレプトアビジンと結合したHRPおよびAEC基質を添加した。最初にウェルのデジタル画像を得ることにより(C.T.L.アナライザーズ社(C.T.L.Analyzers)、米国オハイオ州クリーブランド所在により実施)、スポットを計数し、次いでC.T.L.アナライザーズ社から入手したImmunospot(登録商標)ソフトウェアを用いてこれらの画像を分析した。応答細胞のCTLの出現頻度に基づくと、HY2ポリペプチドが最も効率良くCTLをプライミングし、H60ポリペプチドは最も効率が悪かった(図1Aおよび1B)。米国仮特許出願第60/542,371号も参照されたい。

10

20

30

40

50

【0058】

HY2ポリペプチドは、MPL+CpGと混合すると沈殿を形成するという点において他の試験ポリペプチド(HY1、H60その他数種)とは異なっていた。沈殿に必要なのはHY2およびCpGのみであった(MPLは必要なかった)。免疫原性の増大およびCpG分子との複合体形成を促進しうる特徴について、HY2のアミノ酸配列を調べた。一部はCpGを添加しても沈殿を生じない、一連のポリペプチドについて試験したところ、正に荷電したアミノ酸をこれらの沈殿を生じないポリペプチドに添加すると、CpGとともに沈殿を形成するようになることが見出された。

【0059】

本発明者らは、仮説として(1)沈殿の形成はHY2の正に荷電した残基とCpG分子の負の電荷との間のイオン結合による、(2)この沈殿形成によりCTLの刺激が増強される、とした。これらの仮説について検証するために、アミノ末端にKCSRNR配列およびRKKRRQ配列が付加された2つのHY1バリエーションを合成した。KCSRNR配列はHY2由来であり、RKKRRQ配列は活性型のHIV-TATポリペプチド(CpG相互作用性アミノ酸配列の長さを6アミノ酸に維持)(バイブス(Vives)ら、J.Biol.Chem.第272巻、p.16010、1997年)由来であった。2つの二分型ポリペプチドはCpGを沈殿させ(天然型HY1では沈殿しない)、第1の仮説が支持された。混合してCpG+MPLとともに注射したところ、KCSRNRアミノ酸配列と融合させたHY1ポリペプチドはHY1特異的CTLの出現頻度を著しく高めた(図2を参照)。

【0060】

RKKRRQを含むポリペプチドについても、トロイの構築物(ルー(Lu)ら、J.Immunol.第166巻、p.7063、2001年)に用いられた完全長の活性型HIV-TATポリペプチドにより、注射が困難な程度にまで強力にCpGが沈殿し、短期の機能アッセイではCpGの初期のアジュバント活性が阻害されることが観察された。正の電荷が多すぎるとT細胞の活性および増殖が阻害される可能性がある。このことは、ポリArg(60残基)によりCpGが急速に沈殿するという観察(リングナウ(Lingnau)ら、Vaccine第20巻、p.3498、2002年)と一致する；そのような沈殿物は組織内に堆積してin vivoで非常に長期間存在する可能性があり、その証拠として、該沈殿物は関連する免疫原性ポリペプチドとともに少なくとも372日間はプライミングを続けることができる(リングナウ(Lingnau)ら、Vaccine第20巻、p.3498、2002年)。免疫原性ポリペプチドおよびCpGを選択的かつ強力に沈殿させることができれば、長期間かつ恒久的なCTL応答を刺激する手段が提供される。

【0061】

二分型ポリペプチドのCTLプライミング能力を試験するために、B6のメスを、CpGアジュバントとHY1、KCSRNR-HY1、RKKRRQ-HY1、およびHY2

との混合物を用いてプライミングした。10日後に脾臓を採取してCD8⁺CTLを富化し、抗原細胞としてペプチドでパルスしたRMA/S細胞を用いてIFNの第一次ELISPOTアッセイを実施した(図2)。図1Aおよび1Bに示した結果と一致して、試験した全てのペプチド濃度についてHY2はHY1よりも高頻度でCTLをプライミングした。HY1標的ペプチドにKCSRNRの尾部を連結した結果、HY2について得られた結果に匹敵するHY1特異的なCTL出現頻度が得られた。RKKRRQの尾部では、HY1とKCSRNR-HY1との比較に対して中間レベルのプライミング効率まで上昇した。HY2、KCSRNR-HY1、およびRKKRRQ-HY1ペプチドはいずれもCpGオリゴヌクレオチドを沈殿させた。KCSRNR-HY1におけるプライミング効率の上昇から、正に荷電した残基を3つ有しているこの6アミノ酸配列を付加することにより、HY1特異的なプライミングが高まったことが示唆された。しかしながら、正に荷電した残基を5つ備えたRKKRRQ-HY1ペプチドでは中間的な効率であったことから、正に荷電したアミノ酸の数の増大とさらなるプライミングの増強とは関連がないことが示唆された。

【実施例2】

【0062】

システイン残基は免疫原性の増大に重要である

HY1二分型ポリペプチドのCpG相互作用性アミノ酸配列KCSRNRのArg/Lys残基の役割を調べるために、3つの正に荷電した残基をAla残基で置換した。この改変型の二分型ポリペプチドをそれぞれCpGと混合してメスのB6マウスをプライミングした。10日目に脾細胞を採取して、第一次および第二次のIFN ELISPOTアッセイのためにCD8⁺CTLを富化した。先述の実験において、KCSRNR-HY1によるプライミングでは、第一次ELISPOTアッセイにおいて、完全にプロセシングされたHY1ペプチドでプライミングした場合よりも高いHY1特異的なCTL出現頻度が得られた(図3Aおよび3B)。この順位は、同系のオス(図3A)およびHY1でパルスした同系メス脾細胞の抗原細胞(図3B)のいずれにおいても観察された。驚いたことに、Arg/Lys残基を全てAlaに置換したACSAANA-HY1ポリペプチドについて、CpGを沈殿させる能力が失われたにもかかわらずプライミング効力は失われなかった。実際に、ポリペプチドでパルスしたメスの細胞の刺激により、KCSRNR-HY1でプライミングしたマウスよりもACSAANA-HY1でプライミングしたマウスからより高い出現頻度でHY1特異的CTLが得られた(図3B)。第一次MLCにおいて同系オスの脾細胞を用いた刺激によって増殖させたCTLの第二次ELISPOTアッセイで確認結果を得た(図4)。応答細胞CTLがKCSRNR-HY1およびACSAANA-HY1でプライミングしたマウス由来である場合、同系オスの脾細胞およびペプチドでパルスした脾細胞の刺激により、同程度のHY1特異的CTL出現頻度が得られた。

【0063】

合成CpGオリゴヌクレオチドは一般にin vivoでのヌクレアーゼ感受性を低減するためにホスホロチオエート結合で合成される(Steinら、Nucleic Acids Res. 第16巻、p. 3209-3221、1988年)。in vivoでのプライミングの促進におけるCysの傑出した役割に関する1つの説明は、Cysを含むHY1プライモトープと合成CpGオリゴヌクレオチドとの間のジスルフィド結合の形成である。KCSRNR-HY1およびACSAANA-HY1プライモトープを用いたin vivoでのプライミングにおけるCysの重要性は、Ala置換を加えることにより確認された。KASRNR-HY1プライモトープ(Cys>Ala)は、第一次および第二次のELISPOTいずれにおいても検証されたように事実上プライミング能を示さなかった(図3Aおよび3B、ならびに図4)。しかしながら、KASRNR-HY1ポリペプチドは視認できる程度にCpGを沈殿させる能力を依然として維持していた。AASANA-HY1ポリペプチドはin vivoでのプライミング能を失っている点でKASRNR-HY1と同じであった。これらの結果は、おそらくは合成CpGオリゴヌクレオチドのホスホロチオエート結合とのジスルフィド結合の形成を介する、最適

10

20

30

40

50

なHY1特異的プライミングには、1つのCys残基が必要であるという仮説を支持するものであった。本発明者らは、該ペプチドにCysを追加すると複数のCpG分子と架橋できるため免疫原性が增大するという可能性について調べた。アミノ末端およびカルボキシ末端に1つずつCys残基を備えたHY1ポリペプチド、ACSAANA-HY1-ANASCAを合成した。このポリペプチドをCpGと組み合わせてB6のメスをプライミングし、第一次および第二次ELISPOTアッセイでHY1特異的CTLの出現頻度を概算した。第一次ELISPOTアッセイにおける同系オスの抗原細胞に应答したHY1特異的CTLの出現頻度から、ACSAANA-HY1ポリペプチドによるプライミングに比べて顕著なプライミング効率の増大が認められた(図3A)。さらに、Cys残基を備えた尾部、ACSAANA、KCSRNR、および二重のACSAANA尾部を有する3種いずれのポリペプチドでプライミングしたマウス由来のCD8⁺CTLの第二次ELISPOTアッセイにおいても、同程度のHY1特異的CTL出現頻度が認められた(図4)。

【実施例3】

【0064】

プライミング効率の増大は濃度依存的である

ACSAANA-HY1によるプライミング効率の増大が、二分型ポリペプチドおよびCpGの用量を低減しても観察可能であるかどうかについて調べた。B6のメスを、CpG+HY1およびACSAANA-HY1の混合物を用いて、これら2種の構成成分それぞれについて100、40、および10μgの用量としてプライミングした。10日後に脾臓を採取してCD8⁺CTLを富化し、同系のオスおよびメスの脾細胞の抗原細胞を用いて第一次および第二次ELISPOTアッセイを実施したが、同系メスの脾細胞については未処理のものとHY1でパルス処理したものとを使用した。第一次ELISPOTアッセイにおいて(図5Aおよび5B)、プライミング効率は、同系オスの抗原細胞(図5A)および10nMのHY1ペプチドでパルスしたメスの抗原細胞(図5B)で試験した場合、40μg用量のACSAANA-HY1ペプチドでは維持されていたが、完全にプロセッシングされたHY1ペプチドでは維持されていなかった。10μgではACSAANA-HY1またはHY1のいずれを用いた第一次ELISPOTにおいてもプライミングは検出できなかった。同系オスの抗原細胞およびHY1でパルスした同系メスの抗原細胞を用いた第二次ELISPOTアッセイにおいても同程度の結果が認められた。すなわち、HY1でパルスした抗原細胞の場合、いずれの用量のACSAANA-HY1でプライミングされたCTLの出現頻度も、対応する用量のHY1でプライミングされたCTLの出現頻度より顕著に高かった。

【実施例4】

【0065】

二分型ポリペプチドによるプライミング効率は時間とともに変化する

本発明者らはHY1プライモトープの尾部にArg/Lys残基が存在するとCpGの沈殿が促進されることを観察したが、他の研究者らは、ポリArgがCpGオリゴヌクレオチドを沈殿させ、該オリゴヌクレオチドが長期にわたり注射部位に堆積した状態になりCTLのプライミング期間の延長を伴うことを観察している(リングナウ(Lingnau)ら、Vaccine 第20巻、p.3498-3508、2002年)。このような長期の堆積は、KCSRNR-HY1においても生じると考えられ、したがってKCSRNR-HY1は、CpGオリゴヌクレオチドを沈殿させないが強力にCTLの初期应答をプライミングするACSAANA-HY1よりも長い期間プライミングすることになるであろうとの仮説が立てられた。B6のメスを、CpGとKCSRNR-HY1またはACSAANA-HY1とでプライミングし、脾臓および流入領域リンパ節を15、29、50日目に採取して、ペプチドでパルスした同系メスの抗原細胞を用いて第一次ELISPOTアッセイを行った(図6Aおよび6B)。これらの結果から、ACSAANA-HY1は、HY1ペプチド10nM(図6A)および1μM(図6B)でパルスした抗原細胞では、15日目に採取された脾臓および流入領域リンパ節のいずれにおいても最も良くCTLをプライミングすることが示された。しかしながら、この差異は29日目には消失し、K

10

20

30

40

50

C S R N R - H Y 1 および A C S A N A - H Y 1 のプライミングによりリンパ節および脾臓のいずれにおいても同様の H Y 1 特異的 C T L の出現頻度であった。この K C S R N R - H Y 1 および A C S A N A - H Y 1 の間の、同程度のプライミングレベルを伴う類似性は、50日目まで持続した。50日目の試験では、脾臓よりも流入領域リンパ節において高い H Y 1 特異的 C T L の出現頻度への変化がみられ、このことからこの時点までの注射部位における2種のポリペプチドの保持状態には A C S A N A - H Y 1 および K C S R N R - H Y 1 の間で一貫した差異がないことが示唆された。

【実施例5】

【0066】

免疫原性ポリペプチドによる免疫原性の増大に M P L - A F は必要ではない

10

C p G を効率よく沈殿させることのできる M i H A ポリペプチドについて、M P L - A F を使用しなくてもよいかどうかを調べた。K C S R N R - H Y 1 免疫原性ポリペプチド + C p G (本発明者らが用いる標準的濃度) を用いて、M P L - A F を使用または未使用としてメスの B 6 マウスをプライミングした。I F N 分泌 C T L についての E L I S P O T アッセイの結果から、プライミング用混合物に M P L - A F を含めても H Y 1 特異的 C T L の刺激の効率は増大せず、K C S R N R - H Y 1 を用いたプライミングには C p G で十分であることが実証された(図7)。実際、M P L - A F を除外すると K C S R N R - H Y 1 および C p G のみを用いたプライミングの効率は増大したようである。

【実施例6】

【0067】

20

免疫原性ポリペプチドはメラノーマポリペプチドの免疫原性を増大させた

K C S R N R アミノ酸配列の付加により H Y 1 および H 6 0 以外のポリペプチドの免疫原性を増大させることができるかどうかを調べるため、K C S R N R アミノ酸配列を含む一連の H L A - A 2 結合ポリペプチドを合成した。該ポリペプチド群には、メラニン細胞およびメラノーマ細胞で特異的に発現されるチロシナーゼ g p 1 0 0 およびメラニンタンパク質由来の5つのポリペプチドが含まれる。これらのタンパク質はマウスおよびヒトで正常に発現されるので、C T L をプライミングするためにはトランスを打破しなければならない。本発明者らはまた、マウスおよびヒトにとって外来タンパク質である免疫優勢のインフルエンザポリペプチド(G I L G F V F T L) も含めた。これらの二分型ポリペプチドはいずれも C p G を沈殿させたが、原型のポリペプチドはいずれも C p G を沈殿せなかつた。レシピエントのマウスは、B 6 をバックグラウンドとして選択された H L A - A 2 トランスジェニックマウスとした(リ(Le)ら、J. Immunol. 第142巻、p. 1366、1989年)。これらのマウスでは細胞表面上に H 2 D b 分子に匹敵する密度で H L A - A 2 分子が発現されたが、H L A - A 2 拘束性のインフルエンザ特異的 C T L の出現頻度は、H 2 D b 拘束性のインフルエンザ特異的 C T L の出現頻度に比べて著しく低かった(リ(Le)ら、J. Immunol. 第142巻、p. 1366、1989年)。さらに、H L A - A 2 拘束性の C T L の免疫原性ポリペプチドに対する応答はこれらのトランスジェニック体では低いことが示されており(エンゲルハート(Engelhardt)ら、J. Immunol. 第146巻、p. 1226、1991年)、これはおそらくはマウスの b 2 M および C D 8 に対する H L A - A 2 分子の結合の低下によると思われる。ジャクソン・ラボラトリー(Jackson Laboratory)から入手したこれらのマウスは、H L A - A 2 拘束性のポリペプチドに対する応答性が低下していた。H L A - A 2 トランスジェニック体を、100 μ g の C p G と(1) 100 μ g の原型ポリペプチドおよび(2) C p G : ペプチド比が等モルとなる量の K C S R N R 含有ポリペプチドとの混合物で s. c. によりプライミングした。免疫10日後に脾臓を採取し、C D 8 + C T L を C D 8 + ネガティブ選択キット(米国カリフォルニア州オーバーン所在のミルテニーバイオテック(Miltenyi Biotech)で精製して第一次 I F N E L I S P O T アッセイに使用した。抗原細胞(Stimulator)には、濃度を漸増させた原型メラノーマポリペプチドでパルスした T 2 細胞を含めた。パルスしていない T 2 細胞は I F N 産生を刺激しなかつた。このアッセイの結果から、K C S R

30

40

50

NR アミノ酸配列の付加により、インフルエンザポリペプチドならびに2種のメラノーマ特異的ポリペプチド、メラノA由来のAAGIGILT Vおよびgp100由来のKTWGQYWQVについてのプライミングが増大されることが実証された(図8)。KCSRNR含有ポリペプチドの応答はそれぞれの原型ポリペプチドの応答より6~10倍高かった。従って、プライミング技法を全く変更せずに、CTLの応答に劣るレシピエントのマウスについて、HLA-A2により提示されたポリペプチドに対する応答を高めることができた。

【実施例7】

【0068】

免疫原性の二分型HY1ポリペプチドはCpGを沈殿させた

沈殿物中にCpGが存在することを確認するために、HY1および一連の免疫原性二分型HY1ポリペプチドを100 μ gのCpGとモル比がおよそ7:1となるように混合した。室温で15分間インキュベートした後、混合物を1000 \times gで15秒間遠心分離した。遠心分離後に、上清の希釈物の光学密度(260/280nm)を測定してCpGの沈殿率を概算した(図9)。これらの結果から、KCSRNR-HY1ポリペプチドおよびKASRNR-HY1ポリペプチドが溶液中のほぼ全てのCpGを沈殿させ、天然のHY1ポリペプチドは~30%のCpGを沈殿させたことが確認された。これらの結果は、CpGの沈殿には正に荷電したアミノ酸が重要であるという仮説を支持し、かつ、上記濃度の二分型ポリペプチドおよびCpGが実際に遊離CpGを沈殿CpGへと完全に変換させることを示している。

【0069】

CpGをHY1尾部付きポリペプチドと混合した場合に生じる沈殿についてさらに調べるために、ポリペプチド尾部のArg/LysおよびCys残基の役割について調べる実験を計画した。KASRNR、ACSAANA、およびAASANAの各尾部を含むHY1二分型ポリペプチドを分析に用いた。CpGオリゴヌクレオチド(6nmol)とHY1二分型ポリペプチド(20nmol)とを、3連として室温で15分間混合した。沈殿物を10,000gでペレット化し、上清を1/100に希釈して260nmで分光分析した。図10に示すように、KASRNR-HY1は可溶性CpGの約90%を沈殿させ、ACSAANA-HY1およびAASANA-HY1はCpG濃度に顕著な作用を示さなかった。これらの結果は、最初に観察された粒子状の沈殿が、極性の高い核酸とプライモトープ尾部の荷電したArg/Lysアミノ酸との間の相互作用によるものであるという議論を支持している。

【0070】

ペプチド+CpGの混合物中に存在する遊離ペプチドを、逆相HPLCで定量したが、この分析方法ではCpGオリゴヌクレオチドおよび結合した可能性のあるペプチドを検出するのは不可能であった。2種類のCpGオリゴヌクレオチドをこれらの実験に用いた。すなわち、(1)ホスホジエステル結合を有する天然型CpGおよび(2)ヌクレオチドの4番目と5番目の間に1つのホスホロチオエート結合を有するCpG(S1-CpG)である。S1-CpGを使用することにより、多数の結合が形成されて複雑化する可能性を排除した。AASANA-HY1とS1-CpGとの混合物ではRP-HPLCにより単一ピークとしてペプチドが検出された(図11A)。同様に、ACSAANA-HY1と天然型CpGとの混合物ではACSAANA-HY1のシグナルが検出可能であった(図11B)が、ACSAANA-HY1とS1-CpGとの混合物では検出できなかった(図11C)。ACSAANA-HY1と天然型CpGの試料における2組のピークは、モノマーおよびダイマーを表すものと推定された。これらの結果から、1個のCys残基によりACSAANA-HY1二分型ポリペプチドのS1-CpGへの結合は促進されるが天然型CpGへの結合は促進されないことが示唆された。この結合がCysを含むペプチドとS1-CpGとの間のジスルフィド結合の形成によるものとするれば、このペプチド:CpG混合物の還元およびこれら構成成分のいずれかのアルキル化により結合が除かれるはずである。ACSAANA-HY1とS1-CpGとを混合し、RP-HPLCで直接分析するか

10

20

30

40

50

、あるいは50 mMジチオスレイトールで還元してから分析した。図11Dに示すように、ジチオスレイトールで還元することによりACSAANA-HY1プライモトープが放出され、未処理のS1-CpGとの混合物の場合(図11F)には見られないACSAANA-HY1プライモトープの検出が認められた。この還元条件では、モノマーのペプチドについて予想される単一ピークの溶出が認められた(図11D)。さらに、ヨードアセトアミドでS1-CpGをアルキル化してからACSAANA-HY1と混合した結果、モノマーおよびダイマーのACSAANA-HY1プライモトープと推定される検出で示されるように、結合がなくなった(図11E)。これらの結果は、硫黄を含むCpGオリゴヌクレオチドとCysを含むポリペプチドとが、アルキル化やジチオスレイトールによる還元で防止可能なジスルフィド結合を形成しようという強力な証拠を成すものである。

10

【実施例8】

【0071】

免疫原性ポリペプチドおよびCpGによりランゲルハンス細胞によるポリペプチドの吸収効率が上昇した

本明細書に記載の方法は、二分型で免疫原性のクラスI結合ポリペプチドによるCpGの直接的な沈殿をもたらすものである。両分子が直接沈殿することから、両者が*in vivo*において沈殿および堆積の際に存在するであろうことが確実である。該沈殿物を取り込む抗原提示細胞(APC)も、CpGを受け取って活性化し、クラスI結合ポリペプチドを受け取ってCTLに提示しCTLによって認識される。APCによる沈殿物の取り込みを試験するために、KCSRNR-HY1およびHY1ポリペプチドを、アミン反応色素のAlexa(R)488を用いて製造業者のプロトコール(米国オレゴン州ユージーン所在のモレキュラー・プローブス(Molecular Probes))に従って染色した。CpG分子は、T4ポリヌクレオチドキナーゼを利用する5' End Tag Nucleic Acid Labeling System(商品名:米国カリフォルニア州バーリングゲイム所在のベクター・ラボラトリー(Vector Laboratories))を用いてTexas Red(登録商標)マレイミドで染色した。B10マウスの耳にAlexa488-ポリペプチド(耳1つあたり10µg)とTexas Red-CpG(耳1つあたり10µg)との混合物を注射した。耳に注射したのは、(A)KCSRNR-HY1+CpG、または(B)HY1+CpGとした。12時間目に耳を採取したが、この時点ではCpGの局所注射によりランゲルハンス細胞(LC)が活性化されていることが示されている(ヤコブ(Jakob)ら、J. Immunol. 第161巻、p. 3042、1998年)。耳を分割し、Versene(商品名)中0.25%のトリプシンで穏やかに処理してLCを抽出した。LC集団を、FITC(Alexa488)およびTRITC(red)用のトリプルパスフィルタを用いてオリンパスBX51型蛍光顕微鏡で観察した。

20

30

【0072】

細胞像から、HY1+CpGを注射した耳ではLCが12時間以内にHY1ポリペプチドおよびCpG分子の両方を吸収するが、これらの分子はLC内の別個のコンパートメント内に集中することが明らかとなった。KCSRNR-HY1+CpGを注射した耳では、該ポリペプチドおよびオリゴヌクレオチドは共に一部のLCの全体にわたって分散した。その他のLCは限られたコンパートメント内に集中したCpGならびに細胞表面上に分散したポリペプチドを示した。従って、CpGおよびKCSRNR-HY1の沈殿物が共にLCによって取り込まれた後、ポリペプチドが(HY1に比べて)効率よくかつ迅速に細胞表面に移送される可能性がある。

40

【0073】

尾部付きHY1ペプチド内のArg/Lys残基およびCys残基の、クラスI結合ペプチドをCTLに提示することができるランゲルハンス細胞(LC)の*in vivo*における遊走に対する作用についても調べた。LCなどの樹状細胞(DC)のCpGによる活性化にはTLR9の発現が必要であり、活性化の結果サイトカインおよび共刺激分子の発現、ならびに流入領域リンパ節への遊走が増大する。LCの遊走に対する二分型ポリペ

50

プチドの効果を調べるため、B6マウスのメス(一群当たり3匹)の後肢足蹠に、Alexa488を結合させたHY1、KCSRNR-HY1、ACSAANA-HY1と混合したTexas Red染色したCpGを注射した。24時間後に流入領域膝窩リンパ節を採取してリンパ球様細胞を分離し、二重に染色された細胞の出現頻度を蛍光顕微鏡で概算した。結果を図12に示すが、同図には、尾部KCSRNRおよびACSAANAを付加することにより、二重に染色される細胞の出現頻度が、HY1ペプチド+CpGで刺激した場合の出現頻度に比べておよそ2.5倍高くなったことが示されている。

【実施例9】

【0074】

二分型ポリペプチドによりCpGのマクロファージへの取り込み効率が上昇した

RAW-264マクロファージによるCpGの取り込み機構に対する二分型ポリペプチドの作用についても調べた。CpGの末端をTexas Redで標識し、次の二分型ポリペプチド、すなわちAASANA-HY1、ACSAANA-HY1、KASRNR-HY1、およびKCSRNR-HY1と混合した。Texas Red-CpGをプライモトープと混合し(5 μ g+5 μ g)、混合物を増殖培地で希釈して、LSM510型レーザー走査共焦点顕微鏡(独国オベルコッヘン(Oberkochen)所在のCarl Zeiss社(Carl Zeiss, Inc.))に搭載されたPOC-R細胞培養システム(独国スタイヒ(Staiig)所在のラコン(Lacon)社)のカバースリップ上のRAW細胞に加えた。POC-Rチャンバを37 $^{\circ}$ に加熱し、加湿システムで5%CO₂/空気混合物を送達した。試料を543nmのHeNeレーザーで励起し、63x/1.2N.A.のC-アポクロマト水浸対物レンズで観察した。エアリユニット(airy unit)が1になるようにピンホールを設定して560-615nmのバンドパスフィルタでエビ蛍光を集光した。取り込みは5秒間隔でデータを取得して5分間測定した。微分干渉コントラスト(DIC)画像を透過光検出器で集めた。512x512の画像を解像度8ビットで集め、データを、Windows(R)XPのPCでLSM画像ブラウザ(LSM Image Browser)(Carl Zeiss)を利用し、かつMacintosh(R)コンピュータでImageJ(米国立精神健康研究所(National Institute of Mental Health))を用いて分析した。

【0075】

二分型ポリペプチドはCpGの取り込みに対する作用が明確に異なっていた。AASANA-HY1+CpGで観察された取り込みが最も遅く、CpGは取り込まれて細胞全体に分布した。CpGの取り込みが最も速かったのはKASRNR-HY1によるものであった。KASRNR+CpGを添加すると、細胞は即座に膨潤して気泡を形成した後にCpGを取り込み、取り込みは5分間の観察時間中、継続的に増大した。ACSAANA-HY1およびKCSRNR-HY1と混合したCpGを用いて処理した結果、CpGの取り込みはAASANA-HY1よりも速く、細胞内の個別の位置に集中した。このような集中的取り込みに続いて顕著な細胞の運動が認められたが、これは上記のCysを含むプライモトープ+CpGの場合にのみ認められた。KCSRNR-HY1にCysが追加されることにより、正に荷電したこのプライモトープの急速かつ明らかに有害な作用が減弱されたことは明らかであった。重要なことは、Cysを含むプライモトープについて観察されたCpGの集中的取り込みは、CTL増殖の増大を促進する能力と関連していたことである。

【実施例10】

【0076】

既知抗原は免疫原性ポリペプチドの特徴を有している

HY2ポリペプチドすなわちKCSRNRQYLは、CTLによって認識され、H2Db分子への結合を制御し、CpGへの結合を仲介し(Cys)、CpGを沈殿させる(ArgおよびLys)アミノ酸を含んでいる。これらの特徴が組み合わさって、CpGとともに投与した場合のHY2の免疫原性が比較的高くなっている可能性がある。さらに、二分型のHY1その他のポリペプチドに最初の6アミノ酸(KCSRNR)を使用すること

10

20

30

40

50

により、C p Gと組み合わせた場合の免疫原性が增大する。これらの観察結果から、種々の免疫原性ポリペプチドを含むタンパク質のアミノ酸配列を調べ、認識ポリペプチドのみならずC p Gに結合可能なC y sおよび正に荷電した残基を備えた隣接配列をも含む「天然型免疫原性ポリペプチド」の存在を探索した。既知の腫瘍抗原、ウイルス抗原、非主要組織適合性抗原について先に調べたところ、クラスI結合ポリペプチドではA r g残基およびL y s残基のうち少なくともいずれか一方が複数隣接しているという顕著な傾向が明らかとなった。表1は、そのような関連について、腫瘍関連タンパク質3種およびウイルスにコードされたタンパク質1種の一部において例示している（クラスI結合ポリペプチドは太字で示されている）。

【0077】

【表1】

10

表1. 既知抗原にArg残基およびLys残基のうち少なくともいずれか1つを隣接させる

遺伝子	配列
HER-2/neu	IVSAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQOKIRKYTMRRLLQETELV*
メランA	AAGIGILTVILGVLLLIGCWYCRRRNGYR
PSA-1	FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGK
アデノウイルス3 (E3)	LIVIGILLSVILYFIFCRQIPNVHRNSKRR

20

*太字で示した残基はクラスI結合ポリペプチドである。Arg、Cys、およびLys残基には下線を付してある。

30

A r gは、選択的かつわずかしかタンパク質には用いられていない（ダイア（Dyer）ら、J. Biol. Education、第5巻、p. 15、1971年；キング（King）およびジュークス（Jukes）、Science、第164巻、p. 788、1969年）。このことは、クラスI結合ポリペプチドの隣接領域におけるA r gの存在が偶発的なものではないであろうことを示している。観察対象とした正に荷電したアミノ酸領域は、該ポリペプチド自体の一部であるか、あるいは該ポリペプチドから最大40アミノ酸離れて位置する傾向にあるかのいずれかである。本発明者らは、免疫原性ポリペプチドを備えた上記の正に荷電した領域と、機能がA r g残基の機能に依存する遺伝子との間に明らかな関連を認めた。A r g残基に機能上依存しているタンパク質、例えば核膜を横切ってDNAおよび疎水性ABC輸送体ファミリーの輸送体に結合しなければならないDNA結合タンパク質は、特に抗原供給源として示されるものである。既知抗原を継続的に分析することにより、正に荷電したアミノ酸領域との繋がりを共有するクラスI内に複数の免疫原性ポリペプチドが見出されることがさらに判明した。従って、1つの比較的大きな領域の膜輸送体は、複数のエピトープを同時に与える可能性を有している。

40

【0078】

（その他の実施形態）

本発明のいくつかの実施形態について述べてきた。しかしながら、本発明の思想および範囲から逸脱することなく種々の変更形態が可能であることは理解されよう。従って、その他の実施形態は特許請求の範囲の範囲内にある。

50

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1A】3種の非主要H抗原ペプチドH60、HY1、HY2に特異的なIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。抗原細胞(stimulator)には同系および異系の脾細胞を含めた。

【図1B】3種の非主要H抗原ペプチドH60、HY1、HY2に特異的なIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。抗原細胞にはそれぞれの標的ペプチド10nMでパルスしたRMA/S細胞を含めた。

【図2】CpGと混合した異なる濃度の記載の抗原ポリペプチド(HY2、HY1、KCSRNR-HY1、およびRKKRRQ-HY1)に应答したIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。

【図3A】IFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。HY1および記載のHY1ポリペプチドと混合したCpGを用いてマウスをプライミングした。CD8+CTLを、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、同系のオスおよびメスの脾細胞の抗原細胞と混合した。

【図3B】IFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。HY1および記載のHY1ポリペプチドと混合したCpGを用いてメスのB6マウスをプライミングした。Cysを含むアミノ末端部およびカルボキシ末端部(尾部)を備えたポリペプチドを含めた。CD8+CTLを、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、未処理または1μMのHY1ペプチドでパルスしたB6メスの脾細胞と混合した。

【図4】図3Bに記載のB6メスの应答細胞(responder)由来の脾細胞を、第一次MLCにおいてB6オスの抗原細胞(stimulator cell)で再刺激した場合のIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CD8+CTLを、第二次IFN ELISPOTアッセイにおいて、B6オスの脾細胞、未処理のB6メスの脾細胞、および1μMのHY1ペプチドでパルスしたB6メスの脾細胞と混合した。

【図5A】第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて検出されたIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CpG+漸減量のペプチド(各成分を100、40、10μg)を用いてメスのB6マウスをプライミングし、10日後に脾細胞を採取してCD8+CTLを富化した。CTLを、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、B6のオスおよびメスの抗原細胞と混合した。

【図5B】第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて検出されたIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CpG+漸減量のペプチド(各成分を100、40、10μg)を用いてメスのB6マウスをプライミングし、10日後に脾細胞を採取してCD8+CTLを富化した。CTLを、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、未処理または10nMのHY1ペプチドでパルスしたB6メスの抗原細胞と混合した。

【図6A】第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて検出されたIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CpG+KCSRNR-HY1およびACSAANA-HY1を用いてメスのB6マウスをプライミングし、15日目(15d)、29日目(29d)、50日目(50d)に脾臓および流入領域リンパ節を採取した。CD8+CTLを富化し、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、未処理のB6メスの脾細胞または10nMのペプチドでパルスしたB6メスの抗原細胞と混合した。塗りつぶした棒グラフおよび白抜き棒グラフはそれぞれ流入領域リンパ節および脾臓に対応する。未処理のB6メスの抗原細胞に应答するCTLの出現頻度を差し引いて、グラフに示した特異的な出現頻度を求めてある。

【図6B】第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて検出されたIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CpG+KCSRNR-HY1およびACSAANA-HY1を用いてメスのB6マウスをプライミングし、15日目(15d)、29日目(29d)、50日目(50d)に脾臓および流入領域リンパ節を採取した。CD8+CTLを富化し、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、未処理のB6メスの脾細胞または1μMのHY1ペプチドでパルスしたB6メスの細胞と混合した。塗りつぶした棒グ

10

20

30

40

50

ラフおよび白抜きの棒グラフはそれぞれ流入領域リンパ節および脾臓に対応する。未処理のB6メスの抗原細胞に应答するCTLの出現頻度を差し引いて、グラフに示した特異的な出現頻度を求めている。

【図7】第一次ELISPOTアッセイ結果の例を示す図。KCSRNR-HY1とCpGとを組み合わせたプライミングからMPL-AFアジュバントを除くことにより、プライミング効率が增大したように見える。図に示したウェルには、应答細胞として 2.5×10^5 個のCD8⁺CTLと、HY1ポリペプチドでパルスしたRMA-S抗原細胞が含まれている。グラフは、ポリペプチド刺激に应答して活性化されたCD8⁺T細胞の出現頻度を示している。

【図8】第一次ELISPOTアッセイ結果の例を示す図。CpG相互作用性アミノ酸配列KCSRNRを、2種のメラノーマのCTL活性化ポリペプチド(AAGIGILTV(メラノA)およびKTWQYWQV(gp100))および免疫優勢のインフルエンザポリペプチド(GILGFVFT)に連結した結果、それぞれの天然型ポリペプチドに比べて、CpG+MPL-AFと混合したときのHLA-A2トランスジェニック体のプライミングが増大した。図に示したウェルには、应答細胞として 3×10^5 個のCD8⁺CTLと、ポリペプチドでパルスしたT2抗原細胞が含まれている。グラフは、ポリペプチド刺激に应答して活性化されたCD8⁺T細胞の出現頻度を示している。

【図9】吸光度のデータを示すグラフ。沈殿が形成されると吸光度は低下する。データは、HY1のCpG相互作用性アミノ酸配列内の正に荷電した残基が、*in vivo*プライミングにおいて用いられた濃度のCpGのほぼ完全な沈殿を仲介することを示している。

【図10】HY1-尾部付き二分型ポリペプチドを含む溶液からCpGを沈殿させた後の上清について吸光度の値を示すグラフ。沈殿物を上清から除き、次いで1/100に希釈して260nmで分光分析を実施した。

【図11】RP-HPLCトレースを示す図。(A)混合物AASANA-HY1+S1-CpGのRP-HPLCトレース。S1-CpGはホスホロチオエート基を1つ含んでいる。0.1%トリフルオロ酢酸中75分間の0-95%アセトニトリル勾配を用いたRP-HPLCにより混合物を分離した。(B)混合物ACSAANA-HY1+天然型CpGのRP-HPLCトレース。図10Aに記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。(C)混合物ACSAANA-HY1+S1-CpG(図10A参照)のRP-HPLCトレース。図10Aに記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。(D)混合物ACSAANA-HY1+S1-CpG(図10A参照)のRP-HPLCトレース。該混合物はRP-HPLCで分離する直前に0.05MのDTTで還元された。図10Aに記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。(E)混合物ACSAANA-HY1+S1-CpG(図10A参照)のRP-HPLCトレース。S1-CpGは混合前に10mMのヨードアセトアミドでアルキル化済みである。図10Aに記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。(F)混合物ACSAANA-HY1+S1-CpG(図10A参照)のRP-HPLCトレース。図10Aに記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。

【図12】二重染色されたランゲルハンス細胞の割合(%)を示すグラフ。メスのB6マウス(一群あたり3匹)を麻酔し、Texas Redを結合させたCpGと、Alexa488を結合させてあるHY1、KCSRNR-HY1、ACSAANA-HY1ペプチドとを足跡に注射した。注射したマウスを24時間後に屠殺し、膝窩リンパ節を切除した。二重に染色された細胞の出現頻度を蛍光顕微鏡で概算した。

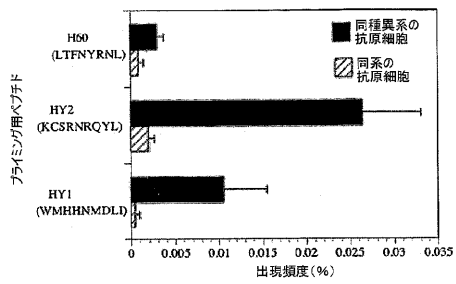
10

20

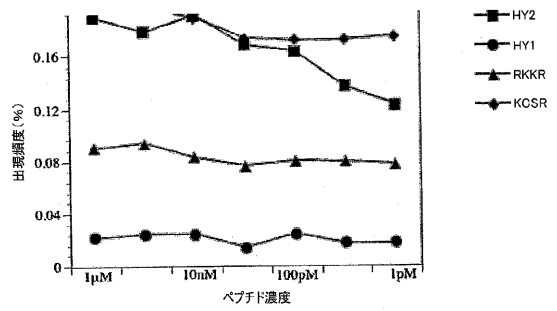
30

40

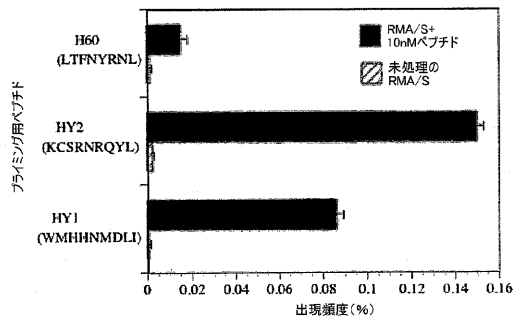
【 図 1 A 】



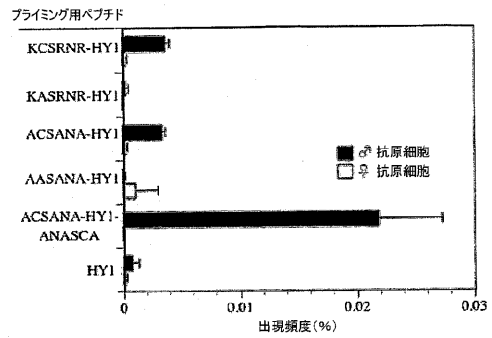
【 図 2 】



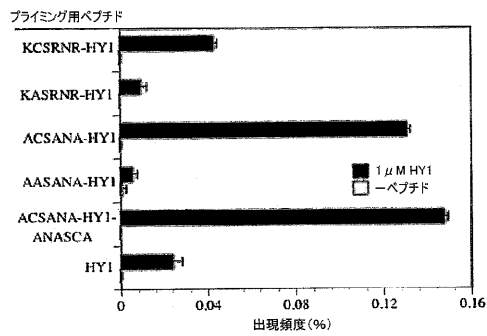
【 図 1 B 】



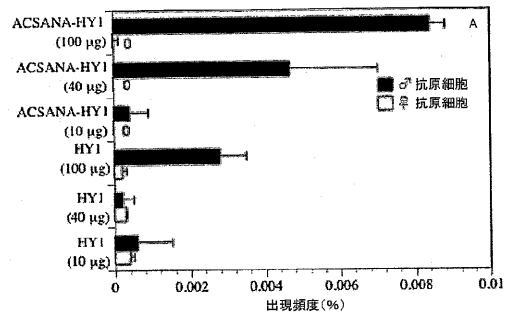
【 図 3 A 】



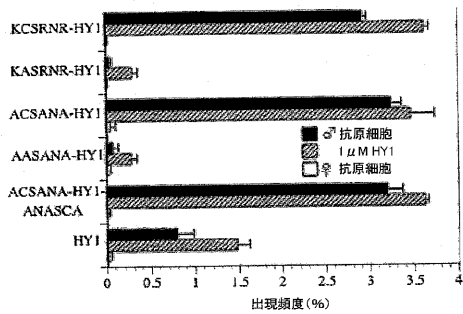
【 図 3 B 】



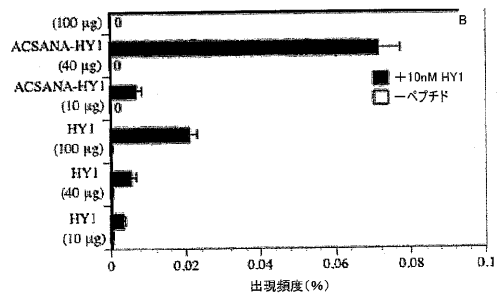
【 図 5 A 】



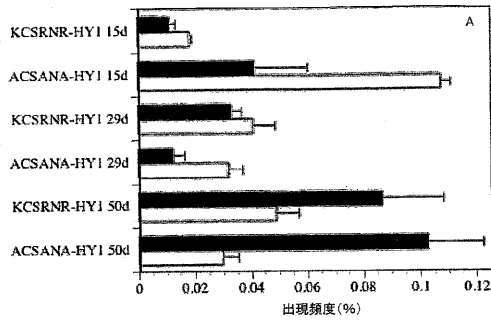
【 図 4 】



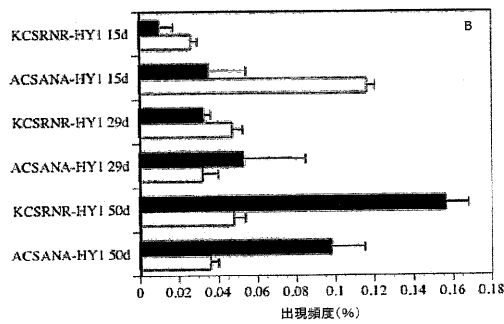
【 図 5 B 】



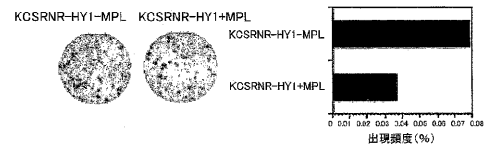
【 図 6 A 】



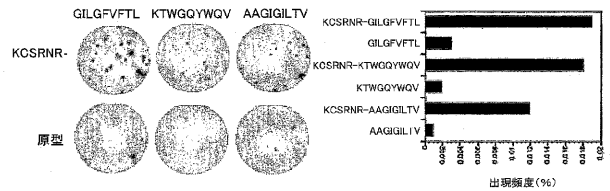
【 図 6 B 】



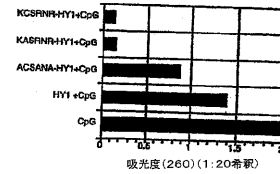
【 図 7 】



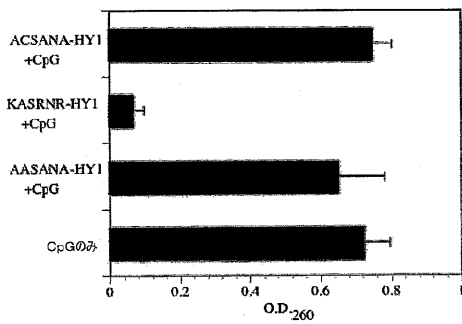
【 図 8 】



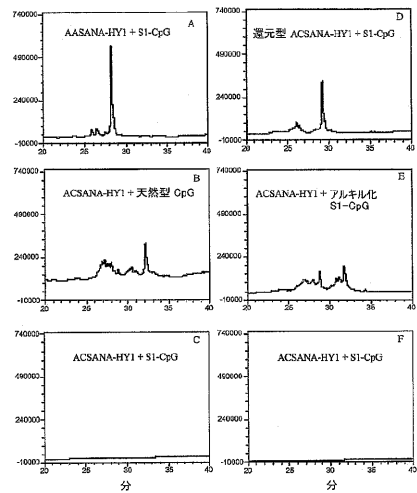
【 図 9 】



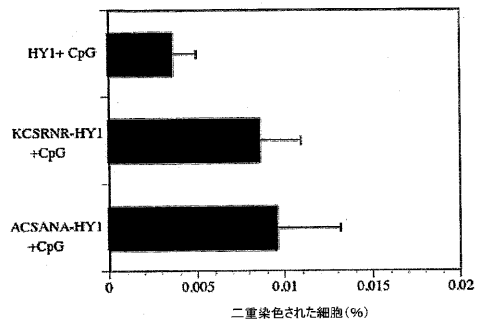
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 1 2 】



【 配列表 】

2008509072000001.app

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成18年10月6日 (2006.10.6)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 0 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 0 2 】

(関連出願)

本願は2004年2月6日に出願された米国仮特許出願第60/542,371号の優先権を主張する2005年2月4日に出願された国際特許出願第PCT/US2005/003754号の国内移行段階である。

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 3 3

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 0 3 3 】

CpG相互作用性アミノ酸配列は、0、1、2、3またはそれ以上の正に荷電したアミノ酸を含むことができる。正に荷電したアミノ酸が過剰であると、短期的な筋書きとしてはT細胞の活性化および増殖を阻止しうるが、長期的には(例えば30、40、50、75、100または150日またはさらに長期にわたって)T細胞の活性化の刺激に有効となりうる。上記阻害は、CpGが濃縮され沈殿してポリペプチドとCpGのいずれをも不

活性な複合体の中に押さえ込んでしまうことに起因する可能性がある。Cysおよび正に荷電したアミノ酸はCpG相互作用性アミノ酸配列の中の任意の部位にあってよく、その他のアミノ酸は任意のアミノ酸であってよいが、好ましくは正に荷電したアミノ酸は配列全体にわたって規則的な間隔となっているとよい。例えば、正に荷電したアミノ酸が1つおき、2つおき、または3つおきのアミノ酸部位に配置されてもよい。正に荷電したアミノ酸残基の配置は完全に周期的である必要はない。例えば、CpG相互作用性アミノ酸配列は、本明細書に記載の任意のCpG相互作用性アミノ酸配列であってよい。CpG相互作用性アミノ酸配列は、例えば、KCSRNR (配列番号1)またはACSAANA (配列番号2)であってよい。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0037】

CpG分子

本明細書に記載のように、CpG分子は、少なくとも1つの非メチル化シトシン-グアニンジヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドである。CpG分子は約15~25ヌクレオチド長で、好ましくは約18~20ヌクレオチド長であるとよい。該オリゴヌクレオチドは少なくとも1つのCpGコンセンサスモチーフRRCPGYY (配列番号8) (RはプリンでYはピリミジン)を含みうる。CpG分子は、少なくとも1つのホスホロチオエート結合を含む骨格を備えうるが、好ましくはCpG分子全体の骨格がホスホロチオエート結合で構成されているとよい。ホスホロチオエート骨格の側鎖は酸素の代わりに少なくとも1つまたは複数の硫黄原子を含み、そしてホスホロチオエート骨格によって、硫黄原子を含まないオリゴヌクレオチド骨格に比べて半減期が延び、活性レベルが上昇し、かつ活性の特異性の変化はごくわずかとなりうる(クレイグ(Kreig)、Annu. Rev. Immunol. 第20巻、p. 709、2002年)。理論に拘泥することは望むものではないが、ホスホロチオエート骨格の硫黄原子は、免疫性の応答を増強しうるCpG相互作用性アミノ酸配列のCys残基とともにジスルフィド結合を形成する可能性がある。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0038】

任意のCpG分子、またはジスルフィド結合を介して結合するためのホスホロチオエート結合を有する任意のDNA分子を、本明細書に記載の組成物および方法において用いることができる。例えば、マウスのTLRに特異的なCpG分子1826 (5' TCCATGACGTTCTGACGTT3' (配列番号16)) (デービス(Davis)ら、J. Immunol. 第160巻、p. 870、1998年)を記載されるように使用することができる。例えばリングナウ(Lingnau)らの文献(Vaccine、第20巻、p. 3498-3508、2002年)に記載のCpG分子も参照されたい。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0055

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0055】

問題点が病原体への曝露の制限にあるらしいことが見出されたので、本発明者らは、薬理学的方法、例えば抗体を介した同時刺激などの使用よりもむしろ、細菌アジュバントを用いてCTLのMiHAに対する応答を増大させることについて検討した。CTLの応答を増強する能力について報告のある、それぞれTLR-4およびTLR-9に結合するリポドAおよびCpG分子を使用することとした。リポドAは、MPL-AF（界面活性剤様のジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）と混合したMPLアジュバント（モノホスホリルリポドA））の形態でコリキサ・コーポレイション（Corixa Corporation）（米国ワシントン州シアトル所在）より供給された。使用したCpG分子は、マウスのTLR-9に特異的な1826オリゴヌクレオチド（TCCA TGA C GTTC CTGA CGTT（配列番号16））であり（デービス（Davis）ら、J. Immunol. 第160巻、p. 870、1998年）；このCpGオリゴヌクレオチドは、マヨ・クリニック・モレキュラー・バイオロジー・コア（Mayo Clinic Molecular Biology Core）によりホスホロチオエート骨格を用いて合成された（別途指定のない限り、本発明者が用語CpGを用いるときはこの合成型を指している）。CpGで繰り返し処理されたマウスにおいて以前観察された強力な全身性の炎症を回避する努力の中で、本発明者らは単回の投与で使用するためにCpG、MPL、および抗原を混合した。10 μ gのMPL-AF + 100 μ gのCpGをMiHA不適合の脾細胞または合成MiHAポリペプチド（100 μ g）のいずれかと混合して、尾の基部への皮下（s.c.）注射用に用いて予備的実験を実施した。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

WMHHNMDLIペプチド（HY1）（配列番号9）およびKCSRNRQYLペプチド（HY2）（配列番号10）は、ネズミのY連鎖遺伝子にコードされるタンパク質由来のものであり、H2D^b分子によりCTLに提示される（キング（King）ら、Genomics 第24巻、p. 159 - 168、1994年；グリーンフィールド（Greenfield）ら、Nat. Genetics 第14巻、p. 474 - 478、1996年）。これら2種のペプチドおよびMPL-AFとCpGアジュバントとの組み合わせの混合物について、CTLの応答をプライミングする能力を試験した。上記2種のペプチドについては、in vivoでのプライミング効率について、免疫的に優勢なH60ペプチド（LTFNYRNL（配列番号19））（マラルカナン（Malarkannan）ら、J. Immunol. 第161巻、p. 3501 - 3509、1998年）とも比較した。B6のメスをs.c.でプライミングし、免疫化10日後に脾臓を採取した。CD8⁺CTLをネガティブ選択により富化し、IFN γ を分泌するCTLの出現頻度を概算するために、第一次ELISPOTアッセイにおいて（1）同系のメスの脾細胞、（2）同系のオスの脾細胞、（3）抗H60 CTLについて同種異系（BALB.B）の脾細胞、および（4）ペプチドでパルスしたRMA/S細胞で刺激した。第一次ELISPOTアッセイは、100 μ gのポリペプチド + 100 μ gのCpGおよび10 μ gのMPL-AFを用いて単回免疫されたネズミ由来のCD8⁺脾細胞の応答細胞を用いて実施した。RMA/S細胞は、濃度10nMのそれぞれの標的ポリペプチドでパルスした。応答細胞（responder）および抗原細胞（stimulator）を、抗IFN γ 捕捉抗体でコーティングしたELISPOTプレートで48時間培養し、その後ビオチン化した抗IFN γ 検出抗体を、次いでストレプトアビジンと結合したHRPおよびAEC基質を添加した。最初にウェルのデジタル画像を得ることにより（C.T.L.アナライザーズ社（C.T.L. Analyzers）、米国オハイオ州クリーブランド所在により実施）、スポットを計数し、次いでC.T.L.アナライザーズ社から入手したImmunospot（登録商標）ソフトウェアを用いてこれらの画像を分析した。応答細胞

のCTLの出現頻度に基づくと、HY2ポリペプチドが最も効率良くCTLをプライミングし、H60ポリペプチドは最も効率が悪かった(図1Aおよび1B)。米国仮特許出願第60/542,371号も参照されたい。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0059

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0059】

本発明者らは、仮説として(1)沈殿の形成はHY2の正に荷電した残基とCpG分子の負の電荷との間のイオン結合による、(2)この沈殿形成によりCTLの刺激が増強される、とした。これらの仮説について検証するために、アミノ末端にKCSRNR配列(配列番号1)およびRKKRRQ配列(配列番号3)が付加された2つのHY1バリエーションを合成した。KCSRNR配列(配列番号1)はHY2由来であり、RKKRRQ配列(配列番号3)は活性型のHIV-TATポリペプチド(CpG相互作用性アミノ酸配列の長さを6アミノ酸に維持)(パイブス(Vives)ら、J. Biol. Chem. 第272巻、p. 16010、1997年)由来であった。2つの二分型ポリペプチドはCpGを沈殿させ(天然型HY1では沈殿しない)、第1の仮説が支持された。混合してCpG+MPLとともに注射したところ、KCSRNR(配列番号1)アミノ酸配列と融合させたHY1ポリペプチドはHY1特異的CTLの出現頻度を著しく高めた(図2を参照)。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0060】

RKKRRQ(配列番号3)を含むポリペプチドについても、トロイの構築物(ルー(Lu)ら、J. Immunol. 第166巻、p. 7063、2001年)に用いられた完全長の活性型HIV-TATポリペプチドにより、注射が困難な程度にまで強力でCpGが沈殿し、短期の機能アッセイではCpGの初期のアジュバント活性が阻害されることが観察された。正の電荷が多すぎるとT細胞の活性および増殖が阻害される可能性がある。このことは、ポリArg(60残基)によりCpGが急速に沈殿するという観察(リングナウ(Lingnau)ら、Vaccine 第20巻、p. 3498、2002年)と一致する；そのような沈殿物は組織内に堆積してin vivoで非常に長期間存在する可能性があり、その証拠として、該沈殿物は関連する免疫原性ポリペプチドとともに少なくとも372日間はプライミングを続けることができる(リングナウ(Lingnau)ら、Vaccine 第20巻、p. 3498、2002年)。免疫原性ポリペプチドおよびCpGを選択的かつ強力で沈殿させることができれば、長期間かつ恒久的なCTL応答を刺激する手段が提供される。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0061

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0061】

二分型ポリペプチドのCTLプライミング能力を試験するために、B6のメスを、CpGアジュバントとHY1、KCSRNR-HY1(配列番号20)、RKKRRQ-HY1(配列番号21)、およびHY2との混合物を用いてプライミングした。10日後に脾臓を採取してCD8⁺CTLを富化し、抗原細胞としてペプチドでバルスしたRMA/S

細胞を用いてIFN の第一次ELISPOTアッセイを実施した(図2)。図1Aおよび1Bに示した結果と一致して、試験した全てのペプチド濃度についてHY2はHY1よりも高頻度でCTLをプライミングした。HY1標的ペプチドにKCSRNRの尾部を連結した結果、HY2について得られた結果に匹敵するHY1特異的なCTL出現頻度が得られた。RKKRRQの尾部(配列番号3)では、HY1とKCSRNR-HY1(配列番号20)との比較に対して中間レベルのプライミング効率まで上昇した。HY2、KCSRNR-HY1(配列番号20)、およびRKKRRQ-HY1(配列番号21)ペプチドはいずれもCpGオリゴヌクレオチドを沈殿させた。KCSRNR-HY1(配列番号20)におけるプライミング効率の上昇から、正に荷電した残基を3つ有しているこの6アミノ酸配列を付加することにより、HY1特異的なプライミングが高まったことが示唆された。しかしながら、正に荷電した残基を5つ備えたRKKRRQ-HY1ペプチド(配列番号21)では中間的な効率であったことから、正に荷電したアミノ酸の数の増大とさらなるプライミングの増強とは関連がないことが示唆された。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0062

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0062】

システイン残基は免疫原性の増大に重要である

HY1二分型ポリペプチドのCpG相互作用性アミノ酸配列KCSRNR(配列番号1)のArg/Lys残基の役割を調べるために、3つの正に荷電した残基をAla残基で置換した。この改変型の二分型ポリペプチドをそれぞれCpGと混合してメスのB6マウスをプライミングした。10日目に脾細胞を採取して、第一次および第二次のIFN ELISPOTアッセイのためにCD8⁺CTLを富化した。先述の実験において、KCSRNR-HY1(配列番号20)によるプライミングでは、第一次ELISPOTアッセイにおいて、完全にプロセシングされたHY1ペプチドでプライミングした場合よりも高いHY1特異的なCTL出現頻度が得られた(図3Aおよび3B)。この順位は、同系のオス(図3A)およびHY1でパルスした同系メス脾細胞の抗原細胞(図3B)のいずれにおいても観察された。驚いたことに、Arg/Lys残基を全てAlaに置換したACSAANA-HY1(配列番号23)ポリペプチドについて、CpGを沈殿させる能力が失われたにもかかわらずプライミング効力は失われなかった。実際に、ポリペプチドでパルスしたメスの細胞の刺激により、KCSRNR-HY1(配列番号20)でプライミングしたマウスよりもACSAANA-HY1(配列番号23)でプライミングしたマウスからより高い出現頻度でHY1特異的CTLが得られた(図3B)。第一次MLCにおいて同系オスの脾細胞を用いた刺激によって増殖させたCTLの第二次ELISPOTアッセイで確認結果を得た(図4)。応答細胞CTLがKCSRNR-HY1(配列番号20)およびACSAANA-HY1(配列番号23)でプライミングしたマウス由来である場合、同系オスの脾細胞およびペプチドでパルスした脾細胞の刺激により、同程度のHY1特異的CTL出現頻度が得られた。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0063

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0063】

合成CpGオリゴヌクレオチドは一般に*in vivo*でのヌクレアーゼ感受性を低減するためにホスホロチオエート結合で合成される(スタイン(Stein)ら、Nucleic Acids Res. 第16巻、p. 3209-3221、1988年)。*in vivo*でのプライミングの促進におけるCysの傑出した役割に関する1つの説明は、Cy

sを含むHY1プライモトープと合成CpGオリゴヌクレオチドとの間のジスルフィド結合の形成である。KCSRNR-HY1(配列番号20)およびACSAANA-HY1(配列番号23)プライモトープを用いたin vivoでのプライミングにおけるCysの重要性は、Ala置換を加えることにより確認された。KASRNR-HY1プライモトープ(Cys>Ala)は、第一次および第二次のELISPOTいずれにおいても検証されたように事実上プライミング能を示さなかった(図3Aおよび3B、ならびに図4)。しかしながら、KASRNR-HY1(配列番号22)ポリペプチドは視認できる程度にCpGを沈殿させる能力を依然として維持していた。AASANA-HY1(配列番号24)ポリペプチドはin vivoでのプライミング能を失っている点でKASRNR-HY1と同じであった。これらの結果は、おそらくは合成CpGオリゴヌクレオチドのホスホロチオエート結合とのジスルフィド結合の形成を介する、最適なHY1特異的プライミングには、1つのCys残基が必要であるという仮説を支持するものであった。本発明者らは、該ペプチドにCysを追加すると複数のCpG分子と架橋できるため免疫原性が増大するという可能性について調べた。アミノ末端およびカルボキシ末端に1つずつCys残基を備えたHY1ポリペプチド、ACSAANA-HY1-ANASCA(配列番号18)を合成した。このポリペプチドをCpGと組み合わせてB6のメスをプライミングし、第一次および第二次ELISPOTアッセイでHY1特異的CTLの出現頻度を概算した。第一次ELISPOTアッセイにおける同系オスの抗原細胞に応答したHY1特異的CTLの出現頻度から、ACSAANA-HY1(配列番号23)ポリペプチドによるプライミングに比べて顕著なプライミング効率の増大が認められた(図3A)。さらに、Cys残基を備えた尾部、ACSAANA(配列番号2)、KCSRNR(配列番号1)、および二重のACSAANA(配列番号2)の尾部を有する3種いずれのポリペプチドでプライミングしたマウス由来のCD8⁺CTLの第二次ELISPOTアッセイにおいても、同程度のHY1特異的CTL出現頻度が認められた(図4)。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0064

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0064】

プライミング効率の増大は濃度依存的である

ACSAANA-HY1(配列番号23)によるプライミング効率の増大が、二分型ポリペプチドおよびCpGの用量を低減しても観察可能であるかどうかについて調べた。B6のメスを、CpG+HY1およびACSAANA-HY1(配列番号23)の混合物を用いて、これら2種の構成成分それぞれについて100、40、および10 μ gの用量としてプライミングした。10日後に脾臓を採取してCD8⁺CTLを富化し、同系のオスおよびメスの脾細胞の抗原細胞を用いて第一次および第二次ELISPOTアッセイを実施したが、同系メスの脾細胞については未処理のものとHY1でパルス処理したものとを使用した。第一次ELISPOTアッセイにおいて(図5Aおよび5B)、プライミング効率は、同系オスの抗原細胞(図5A)および10nMのHY1ペプチドでパルスしたメスの抗原細胞(図5B)で試験した場合、40 μ g用量のACSAANA-HY1(配列番号23)ペプチドでは維持されていたが、完全にプロセシングされたHY1ペプチドでは維持されていなかった。10 μ gではACSAANA-HY1(配列番号23)またはHY1のいずれを用いた第一次ELISPOTにおいてもプライミングは検出できなかった。同系オスの抗原細胞およびHY1でパルスした同系メスの抗原細胞を用いた第二次ELISPOTアッセイにおいても同程度の結果が認められた。すなわち、HY1でパルスした抗原細胞の場合、いずれの用量のACSAANA-HY1(配列番号23)でプライミングされたCTLの出現頻度も、対応する用量のHY1でプライミングされたCTLの出現頻度より顕著に高かった。

【手続補正13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0065

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0065】

二分型ポリペプチドによるプライミング効率は時間とともに変化する

本発明者らはHY1プライモトープの尾部にArg/Lys残基が存在するとCpGの沈殿が促進されることを観察したが、他の研究者らは、ポリArgがCpGオリゴヌクレオチドを沈殿させ、該オリゴヌクレオチドが長期にわたり注射部位に堆積した状態になりCTLのプライミング期間の延長を伴うことを観察している（リングナウ（Lingnau）ら、Vaccine 第20巻、p.3498-3508、2002年）。このような長期の堆積は、KCSRNR-HY1（配列番号20）においても生じると考えられ、したがってKCSRNR-HY1は、CpGオリゴヌクレオチドを沈殿させないが強力にCTLの初期応答をプライミングするACSAANA-HY1（配列番号23）よりも長い期間プライミングすることになるであろうとの仮説が立てられた。B6のメスを、CpGとKCSRNR-HY1（配列番号20）またはACSAANA-HY1（配列番号23）とでプライミングし、脾臓および流入領域リンパ節を15、29、50日目に採取して、ペプチドでパルスした同系メスの抗原細胞を用いて第一次ELISPOTアッセイを行った（図6Aおよび6B）。これらの結果から、ACSAANA-HY1（配列番号23）は、HY1ペプチド10nM（図6A）および1μM（図6B）でパルスした抗原細胞では、15日目に採取された脾臓および流入領域リンパ節のいずれにおいても最も良くCTLをプライミングすることが示された。しかしながら、この差異は29日目には消失し、KCSRNR-HY1（配列番号20）およびACSAANA-HY1（配列番号23）のプライミングによりリンパ節および脾臓のいずれにおいても同様のHY1特異的CTLの出現頻度であった。このKCSRNR-HY1（配列番号20）およびACSAANA-HY1（配列番号23）の間の、同程度のプライミングレベルを伴う類似性は、50日目まで持続した。50日目の試験では、脾臓よりも流入領域リンパ節において高いHY1特異的CTLの出現頻度への変化がみられ、このことからこの時点までの注射部位における2種のポリペプチドの保持状態にはACSAANA-HY1（配列番号23）およびKCSRNR-HY1（配列番号20）の間で一貫した差異がないことが示唆された。

【手続補正14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0066

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0066】

免疫原性ポリペプチドによる免疫原性の増大にMPL-AFは必要ではない

CpGを効率よく沈殿させることのできるMiHAポリペプチドについて、MPL-AFを使用しなくてもよいかどうかを調べた。KCSRNR-HY1免疫原性ポリペプチド+CpG（本発明者らが用いる標準的濃度）を用いて、MPL-AFを使用または未使用としてメスのB6マウスをプライミングした。IFN分泌CTLについてのELISPOTアッセイの結果から、プライミング用混合物にMPL-AFを含めてもHY1特異的CTLの刺激の効率は増大せず、KCSRNR-HY1（配列番号20）を用いたプライミングにはCpGで十分であることが実証された（図7）。実際、MPL-AFを除外するとKCSRNR-HY1（配列番号20）およびCpGのみを用いたプライミングの効率は増大したようである。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0067

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0067】

免疫原性ポリペプチドはメラノーマポリペプチドの免疫原性を増大させた

KCSRNR (配列番号1) アミノ酸配列の付加によりHY1およびH60以外のポリペプチドの免疫原性を増大させることができるかどうかを調べるため、KCSRNR (配列番号1) アミノ酸配列を含む一連のHLA-A2結合ポリペプチドを合成した。該ポリペプチド群には、メラニン細胞およびメラノーマ細胞で特異的に発現されるチロシナーゼgp100およびメランAタンパク質由来の5つのポリペプチドが含まれる。これらのタンパク質はマウスおよびヒトで正常に発現されるので、CTLをプライミングするためにはトランスを打破しなければならない。本発明者らはまた、マウスおよびヒトにとって外来タンパク質である免疫優勢のインフルエンザポリペプチド(GILGFVFTL (配列番号17))も含めた。これらの二分型ポリペプチドはいずれもCpGを沈殿させたが、原型のポリペプチドはいずれもCpGを沈殿させなかった。レシピエントのマウスは、B6をバックグラウンドとして選択されたHLA-A2トランスジェニックマウスとした(リ(Le)ら、J. Immunol. 第142巻、p. 1366、1989年)。これらのマウスでは細胞表面上にH2Db分子に匹敵する密度でHLA-A2分子が発現されたが、HLA-A2拘束性のインフルエンザ特異的CTLの出現頻度は、H2Db拘束性のインフルエンザ特異的CTLの出現頻度比べて著しく低かった(リ(Le)ら、J. Immunol. 第142巻、p. 1366、1989年)。さらに、HLA-A2拘束性のCTLの免疫原性ポリペプチドに対する応答はこれらのトランスジェニック体では低いことが示されており(エンゲルハート(Engelhard)ら、J. Immunol. 第146巻、p. 1226、1991年)、これはおそらくはマウスのb2MおよびCD8に対するHLA-A2分子の結合の低下によると思われる。ジャクソン・ラボラトリー(Jackson Laboratory)から入手したこれらのマウスは、HLA-A2拘束性のポリペプチドに対する応答性が低下していた。HLA-A2トランスジェニック体を、100μgのCpGと(1)100μgの原型ポリペプチドおよび(2)CpG:ペプチド比が等モルとなる量のKCSRNR (配列番号1)含有ポリペプチドとの混合物でs.c.によりプライミングした。免疫10日後に脾臓を採取し、CD8⁺CTLをCD8⁺ネガティブ選択キット(米国カリフォルニア州オーバーン所在のミルテニーバイオテック(Miltenyi Biotec)で精製して第一次IFN ELISPOTアッセイに使用した。抗原細胞(Stimulator)には、濃度を漸増させた原型メラノーマポリペプチドでパルスしたT2細胞を含めた。パルスしていないT2細胞はIFN産生を刺激しなかった。このアッセイの結果から、KCSRNR (配列番号1)アミノ酸配列の付加により、インフルエンザポリペプチドならびに2種のメラノーマ特異的ポリペプチド、メランA由来のAAGIGILT V (配列番号4)およびgp100由来のKTWGQYWQV (配列番号5)についてのプライミングが増大されることが実証された(図8)。KCSRNR (配列番号1)含有ポリペプチドの応答はそれぞれの原型ポリペプチドの応答より6~10倍高かった。従って、プライミング技法を全く変更せずに、CTLの応答に劣るレシピエントのマウスについて、HLA-A2により提示されたポリペプチドに対する応答を高めることができた。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0068】

免疫原性の二分型HY1ポリペプチドはCpGを沈殿させた

沈殿物中にCpGが存在することを確認するために、HY1および一連の免疫原性二分型HY1ポリペプチドを100μgのCpGとモル比がおよそ7:1となるように混合した。室温で15分間インキュベートした後、混合物を1000×gで15秒間遠心分離し

た。遠心分離後に、上清の希釈物の光学密度(260/280nm)を測定してCpGの沈殿率を概算した(図9)。これらの結果から、KCSRNR-HY1(配列番号20)ポリペプチドおよびKASRNR-HY1(配列番号22)ポリペプチドが溶液中のほぼ全てのCpGを沈殿させ、天然のHY1ポリペプチドは~30%のCpGを沈殿させたことが確認された。これらの結果は、CpGの沈殿には正に荷電したアミノ酸が重要であるという仮説を支持し、かつ、上記濃度の二分型ポリペプチドおよびCpGが実際に遊離CpGを沈殿CpGへと完全に変換させることを示している。

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0069

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0069】

CpGをHY1尾部付きポリペプチドと混合した場合に生じる沈殿についてさらに調べるために、ポリペプチド尾部のArg/LysおよびCys残基の役割について調べる実験を計画した。KASRNR(配列番号11)、ACSAANA(配列番号2)、およびAASANA(配列番号7)の各尾部を含むHY1二分型ポリペプチドを分析に用いた。CpGオリゴヌクレオチド(6nmol)とHY1二分型ポリペプチド(20nmol)とを、3連として室温で15分間混合した。沈殿物を10,000gでペレット化し、上清を1/100に希釈して260nmで分光分析した。図10に示すように、KASRNR-HY1(配列番号22)は可溶性CpGの約90%を沈殿させ、ACSAANA-HY1(配列番号23)およびAASANA-HY1(配列番号24)はCpG濃度に顕著な作用を示さなかった。これらの結果は、最初に観察された粒子状の沈殿が、極性の高い核酸とプライモトープ尾部の荷電したArg/Lysアミノ酸との間の相互作用によるものであるという議論を支持している。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0070】

ペプチド+CpGの混合物中に存在する遊離ペプチドを、逆相HPLCで定量したが、この分析方法ではCpGオリゴヌクレオチドおよび結合した可能性のあるペプチドを検出するのは不可能であった。2種類のCpGオリゴヌクレオチドをこれらの実験に用いた。すなわち、(1)ホスホジエステル結合を有する天然型CpGおよび(2)ヌクレオチドの4番目と5番目の間に1つのホスホロチオエート結合を有するCpG(S1-CpG)である。S1-CpGを使用することにより、多数の結合が形成されて複雑化する可能性を排除した。AASANA-HY1(配列番号24)とS1-CpGとの混合物ではRP-HPLCにより単一ピークとしてペプチドが検出された(図11A)。同様に、ACSAANA-HY1(配列番号23)と天然型CpGとの混合物ではACSAANA-HY1のシグナルが検出可能であった(図11B)が、ACSAANA-HY1(配列番号23)とS1-CpGとの混合物では検出できなかった(図11C)。ACSAANA-HY1(配列番号23)と天然型CpGの試料における2組のピークは、モノマーおよびダイマーを表すものと推定された。これらの結果から、1個のCys残基によりACSAANA-HY1(配列番号23)二分型ポリペプチドのS1-CpGへの結合は促進されるが天然型CpGへの結合は促進されないことが示唆された。この結合がCysを含むペプチドとS1-CpGとの間のジスルフィド結合の形成によるものとするれば、このペプチド:CpG混合物の還元およびこれら構成成分のいずれかのアルキル化により結合が除かれるはずである。ACSAANA-HY1(配列番号23)とS1-CpGとを混合し、RP-HPLCで直接分析するか、あるいは50mMジチオスレイトールで還元してから分析した。図1

1 Dに示すように、ジチオスレイトールで還元することによりACSANA-HY1(配列番号23)プライモトープが放出され、未処理のS1-CpGとの混合物の場合(図11F)には見られないACSANA-HY1プライモトープの検出が認められた。この還元条件では、モノマーのペプチドについて予想される単一ピークの溶出が認められた(図11D)。さらに、ヨードアセトアミドでS1-CpGをアルキル化してからACSANA-HY1(配列番号23)と混合した結果、モノマーおよびダイマーのACSANA-HY1(配列番号23)プライモトープと推定される検出で示されるように、結合がなくなった(図11E)。これらの結果は、硫黄を含むCpGオリゴヌクレオチドとCysを含むポリペプチドとが、アルキル化やジチオスレイトールによる還元で防止可能なジスルフィド結合を形成するという強力な証拠を成すものである。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0071

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0071】

免疫原性ポリペプチドおよびCpGによりランゲルハンス細胞によるポリペプチドの吸収効率が上昇した

本明細書に記載の方法は、二分型で免疫原性のクラスI結合ポリペプチドによるCpGの直接的な沈殿をもたらすものである。両分子が直接沈殿することから、両者が*in vivo*において沈殿および堆積の際に存在するであろうことが確実である。該沈殿物を取り込む抗原提示細胞(APC)も、CpGを受け取って活性化し、クラスI結合ポリペプチドを受け取ってCTLに提示しCTLによって認識される。APCによる沈殿物の取り込みを試験するために、KCSRNR-HY1(配列番号20)およびHY1ポリペプチドを、アミン反応色素のAlexa(R)488を用いて製造業者のプロトコール(米国オレゴン州ユージーン所在のモレキュラー・プローブス(Molecular Probes))に従って染色した。CpG分子は、T4ポリヌクレオチドキナーゼを利用する5' End Tag Nucleic Acid Labeling System(商品名:米国カリフォルニア州バーリングゲイム所在のベクター・ラボラトリー(Vector Laboratories))を用いてTexas Red(登録商標)マレイミドで染色した。B10マウスの耳にAlexa488-ポリペプチド(耳1つあたり10 μ g)とTexas Red-CpG(耳1つあたり10 μ g)との混合物を注射した。耳に注射したのは、(A)KCSRNR-HY1(配列番号20)+CpG、または(B)HY1+CpGとした。12時間目に耳を採取したが、この時点ではCpGの局所注射によりランゲルハンス細胞(LC)が活性化されていることが示されている(ヤコブ(Jakob)ら、J. Immunol. 第161巻、p. 3042、1998年)。耳を分割し、Versene(商品名)中0.25%のトリプシンで穏やかに処理してLCを抽出した。LC集団を、FITC(Alexa488)およびTRITC(red)用のトリプルパスフィルタを用いてオリンパスBX51型蛍光顕微鏡で観察した。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0072

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0072】

細胞像から、HY1+CpGを注射した耳ではLCが12時間以内にHY1ポリペプチドおよびCpG分子の両方を吸収するが、これらの分子はLC内の別個のコンパートメント内に集中するようであることが明らかとなった。KCSRNR-HY1(配列番号20)+CpGを注射した耳では、該ポリペプチドおよびオリゴヌクレオチドは共に一部のLCの全体にわたって分散した。その他のLCは限られたコンパートメント内に集中したC

pGならびに細胞表面上に分散したポリペプチドを示した。従って、CpGおよびKCSRNR - HY 1 (配列番号20)の沈殿物が共にLCによって取り込まれた後、ポリペプチドが(HY 1に比べて)効率よくかつ迅速に細胞表面に移送される可能性がある。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0073

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0073】

尾部付きHY 1ペプチド内のArg/Lys残基およびCys残基の、クラスI結合ペプチドをCTLに提示することができるランゲルハンス細胞(LC)の*in vivo*における遊走に対する作用についても調べた。LCなどの樹状細胞(DC)のCpGによる活性化にはTLR9の発現が必要であり、活性化の結果サイトカインおよび共刺激分子の発現、ならびに流入領域リンパ節への遊走が増大する。LCの遊走に対する二分型ポリペプチドの効果を調べるため、B6マウスのメス(一群当たり3匹)の後肢足蹠に、Alexa488を結合させたHY 1、KCSRNR - HY 1 (配列番号20)、ACSAANA - HY 1 (配列番号23)と混合したTexas Red染色したCpGを注射した。24時間後に流入領域膝窩リンパ節を採取してリンパ球様細胞を分離し、二重に染色された細胞の出現頻度を蛍光顕微鏡で概算した。結果を図12に示すが、同図には、尾部KCSRNR (配列番号1)およびACSAANA (配列番号2)を付加することにより、二重に染色される細胞の出現頻度が、HY 1ペプチド+CpGで刺激した場合の出現頻度に比べておよそ2.5倍高くなったことが示されている。

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0074

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0074】

二分型ポリペプチドによりCpGのマクロファージへの取り込み効率が上昇した

RAW-264マクロファージによるCpGの取り込み機構に対する二分型ポリペプチドの作用についても調べた。CpGの末端をTexas Redで標識し、次の二分型ポリペプチド、すなわちAASANA - HY 1 (配列番号24)、ACSAANA - HY 1 (配列番号23)、KASRNR - HY 1 (配列番号22)、およびKCSRNR - HY 1 (配列番号20)と混合した。Texas Red - CpGをプライモトープと混合し(5 μ g + 5 μ g)、混合物を増殖培地で希釈して、LSM510型レーザー走査共焦点顕微鏡(独国オベルコッヘン(Oberkochen)所在のCarl Zeiss, Inc.)に搭載されたPOC-R細胞培養システム(独国スタイヒ(Staiig)所在のラコン(Lacon)社)のカバースリップ上のRAW細胞に加えた。POC-Rチャンバを37 $^{\circ}$ Cに加熱し、加湿システムで5%CO₂/空気混合物を送達した。試料を543nmのHeNeレーザーで励起し、63x/1.2N.A.のC-アポクロマト水浸対物レンズで観察した。エアリユニット(airy unit)が1になるようにピンホールを設定して560-615nmのバンドパスフィルタでエビ蛍光を集光した。取り込みは5秒間隔でデータを取得して5分間測定した。微分干渉コントラスト(DIC)画像を透過光検出器で集めた。512x512の画像を解像度8ビットで集め、データを、Windows(R)XPのPCでLSM画像ブラウザ(LSM Image Browser)(Carl Zeiss)を利用し、かつMacintosh(R)コンピュータでImageJ(米国立精神健康研究所(National Institute of Mental Health))を用いて分析した。

【手続補正23】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0075】

二分型ポリペプチドはCpGの取り込みに対する作用が明確に異なっていた。AASANA-HY1(配列番号24)+CpGで観察された取り込みが最も遅く、CpGは取り込まれて細胞全体に分布した。CpGの取り込みが最も速かったのはKASRNR-HY1(配列番号22)によるものであった。KASRNR(配列番号11)+CpGを添加すると、細胞は即座に膨潤して気泡を形成した後にCpGを取り込み、取り込みは5分間の観察時間中、継続的に増大した。ACSAANA-HY1(配列番号23)およびKCSRNR-HY1(配列番号20)と混合したCpGを用いて処理した結果、CpGの取り込みはAASANA-HY1(配列番号24)よりも速く、細胞内の個別の位置に集中した。このような集中的取り込みに続いて顕著な細胞の運動が認められたが、これは上記のCysを含むプライモトープ+CpGの場合にのみ認められた。KCSRNR-HY1(配列番号20)にCysが追加されることにより、正に荷電したこのプライモトープの急速かつ明らかに有害な作用が減弱されたことは明らかであった。重要なことは、Cysを含むプライモトープについて観察されたCpGの集中的取り込みは、CTL増殖の増大を促進する能力と関連していたことである。

【手続補正24】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0076

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0076】

既知抗原は免疫原性ポリペプチドの特徴を有している

HY2ポリペプチドすなわちKCSRNRQYL(配列番号10)は、CTLによって認識され、H2Db分子への結合を制御し、CpGへの結合を仲介し(Cys)、CpGを沈殿させる(ArgおよびLys)アミノ酸を含んでいる。これらの特徴が組み合わさって、CpGとともに投与した場合のHY2の免疫原性が比較的高くなっている可能性がある。さらに、二分型のHY1その他のポリペプチドに最初の6アミノ酸(KCSRNR)(配列番号1)を使用することにより、CpGと組み合わせた場合の免疫原性が増大する。これらの観察結果から、種々の免疫原性ポリペプチドを含むタンパク質のアミノ酸配列を調べ、認識ポリペプチドのみならずCpGに結合可能なCysおよび正に荷電した残基を備えた隣接配列をも含む「天然型免疫原性ポリペプチド」の存在を探索した。既知の腫瘍抗原、ウイルス抗原、非主要組織適合性抗原について先に調べたところ、クラスI結合ポリペプチドではArg残基およびLys残基のうち少なくともいずれか一方が複数隣接しているという顕著な傾向が明らかとなった。表1は、そのような関連について、腫瘍関連タンパク質3種およびウイルスにコードされたタンパク質1種の一部分において例示している(クラスI結合ポリペプチドは太字で示されている)。

【手続補正25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0077

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0077】

【表 1】

表 1. 既知抗原に Arg 残基および Lys 残基のうち少なくともいずれか 1 つを隣接させる

遺伝子	配列
HER-2/ncu	<u>IVSAVVGILLVVVLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELV</u> [*] (配列番号 12)
メラノ A	<u>AAGIGILTVILGVLLLGICWYCRRRNGYR</u> (配列番号 13)
PSA-1	<u>FLTPKKLQCVDLHVISNDVCAQVHPQKVTKFMLCAGRWTGGK</u> (配列番号 14)
アデノウイルス 3 (E3)	<u>LIVIGILILSVILYFIFCRQIPNVHRNSKRR</u> (配列番号 15)

*太字で示した残基はクラス I 結合ポリペプチドである。Arg、Cys、および Lys 残基には下線を付してある。

Arg は、選択的かつわずかしかタンパク質には用いられていない (ダイア (Dyer) ら、J. Biol. Education、第 5 巻、p. 15、1971 年; キング (King) および ジュクス (Jukes)、Science、第 164 巻、p. 788、1969 年)。このことは、クラス I 結合ポリペプチドの隣接領域における Arg の存在が偶発的なものではないであろうことを示している。観察対象とした正に荷電したアミノ酸領域は、該ポリペプチド自体の一部であるか、あるいは該ポリペプチドから最大 40 アミノ酸離れて位置する傾向にあるかのいずれかである。本発明者らは、免疫原性ポリペプチドを備えた上記の正に荷電した領域と、機能が Arg 残基の機能に依存する遺伝子との間に明らかな関連を認めた。Arg 残基に機能上依存しているタンパク質、例えば核膜を横切って DNA および疎水性 ABC 輸送体ファミリーの輸送体に結合しなければならない DNA 結合タンパク質は、特に抗原供給源として示されるものである。既知抗原を継続的に分析することにより、正に荷電したアミノ酸領域との繋がりを共有するクラス I 内に複数の免疫原性ポリペプチドが見出されることがさらに判明した。従って、1 つの比較的大きな領域の膜輸送体は、複数のエピトープを同時に与える可能性を有している。

【手続補正 26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0079

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0079】

【図 1A】3 種の非主要 H 抗原ペプチド H60 (配列番号 19)、HY1 (配列番号 9)、HY2 (配列番号 10) に特異的な IFN 分泌 CTL の出現頻度を示すグラフ。抗原細胞 (stimulator) には同系および異系の脾細胞を含めた。

【図 1B】3 種の非主要 H 抗原ペプチド H60 (配列番号 19)、HY1 (配列番号 9)、HY2 (配列番号 10) に特異的な IFN 分泌 CTL の出現頻度を示すグラフ。抗原細胞にはそれぞれの標的ペプチド 10 nM でパルスした RMA/S 細胞を含めた。

【図 2】CpG と混合した異なる濃度の記載の抗原ポリペプチド (HY2、HY1、KCSRNH-HY1 (配列番号 20)、および RKKRRQ-HY1 (配列番号 21)) に応答した IFN 分泌 CTL の出現頻度を示すグラフ。

【図 3A】IFN 分泌 CTL の出現頻度を示すグラフ。HY1 および記載の HY1 ポリペプチド (それぞれ配列番号 20、22、23、24 および 18) と混合した CpG を用いてマウスをプライミングした。CD8+ CTL を、第一次 IFN ELISPOT アッセイにおいて、同系のオスおよびメスの脾細胞の抗原細胞と混合した。

【図3B】IFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。HY1および記載のHY1ポリペプチド（それぞれ配列番号20、22、23、24および18）と混合したCpGを用いてメスのB6マウスをプライミングした。Cysを含むアミノ末端部およびカルボキシ末端部（尾部）を備えたポリペプチドを含めた。CD8⁺CTLを、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、未処理または1μMのHY1ペプチドでパルスしたB6メスの脾細胞と混合した。

【図4】図3Bに記載のB6メスの応答細胞（responder）由来の脾細胞を、第一次MLCにおいてB6オスの抗原細胞（stimulator cell）で再刺激した場合のIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CD8⁺CTLを、第二次IFN ELISPOTアッセイにおいて、B6オスの脾細胞、未処理のB6メスの脾細胞、および1μMのHY1ペプチドでパルスしたB6メスの脾細胞と混合した。

【図5A】第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて検出されたIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CpG+漸減量のペプチド（各成分を100、40、10μg）を用いてメスのB6マウスをプライミングし、10日後に脾細胞を採取してCD8⁺CTLを富化した。CTLを、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、B6のオスおよびメスの抗原細胞と混合した。

【図5B】第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて検出されたIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CpG+漸減量のペプチド（各成分を100、40、10μg）を用いてメスのB6マウスをプライミングし、10日後に脾細胞を採取してCD8⁺CTLを富化した。CTLを、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、未処理または10nMのHY1ペプチドでパルスしたB6メスの抗原細胞と混合した。

【図6A】第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて検出されたIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CpG+KCSRNR-HY1（配列番号20）およびACSANA-HY1（配列番号23）を用いてメスのB6マウスをプライミングし、15日目（15d）、29日目（29d）、50日目（50d）に脾臓および流入領域リンパ節を採取した。CD8⁺CTLを富化し、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、未処理のB6メスの脾細胞または10nMのペプチドでパルスしたB6メスの抗原細胞と混合した。塗りつぶした棒グラフおよび白抜き棒グラフはそれぞれ流入領域リンパ節および脾臓に対応する。未処理のB6メスの抗原細胞に応答するCTLの出現頻度を差し引いて、グラフに示した特異的な出現頻度を求めている。

【図6B】第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて検出されたIFN 分泌CTLの出現頻度を示すグラフ。CpG+KCSRNR-HY1（配列番号20）およびACSANA-HY1（配列番号23）を用いてメスのB6マウスをプライミングし、15日目（15d）、29日目（29d）、50日目（50d）に脾臓および流入領域リンパ節を採取した。CD8⁺CTLを富化し、第一次IFN ELISPOTアッセイにおいて、未処理のB6メスの脾細胞または1μMのHY1ペプチドでパルスしたB6メスの細胞と混合した。塗りつぶした棒グラフおよび白抜き棒グラフはそれぞれ流入領域リンパ節および脾臓に対応する。未処理のB6メスの抗原細胞に応答するCTLの出現頻度を差し引いて、グラフに示した特異的な出現頻度を求めている。

【図7】第一次ELISPOTアッセイ結果の例を示す図。KCSRNR-HY1（配列番号20）とCpGとを組み合わせたプライミングからMPL-AFアジュバントを除くことにより、プライミング効率が增大したように見える。図に示したウェルには、応答細胞として 2.5×10^5 個のCD8⁺CTLと、HY1ポリペプチドでパルスしたRMA-S抗原細胞が含まれている。グラフは、ポリペプチド刺激に応答して活性化されたCD8⁺T細胞の出現頻度を示している。

【図8】第一次ELISPOTアッセイ結果の例を示す図。CpG相互作用性アミノ酸配列KCSRNR（配列番号1）を、2種のメラノーマのCTL活性化ポリペプチド（AAGIGILTV（配列番号4）（メラノA）およびKTWQYWQV（配列番号5）（gp100））および免疫優勢のインフルエンザポリペプチド（GILGFVFT（配列番号6））に連結した結果、それぞれの天然型ポリペプチドに比べて、CpG+MPL-A

Fと混合したときのHLA-A2トランスジェニック体のプライミングが増大した。図に示したウェルには、応答細胞として 3×10^5 個のCD8⁺CTLと、ポリペプチドでパルスしたT2抗原細胞が含まれている。グラフは、ポリペプチド刺激に応答して活性化されたCD8⁺T細胞の出現頻度を示している。

【図9】吸光度のデータを示すグラフ。沈殿が形成されると吸光度は低下する。データは、HY1のCpG相互作用性アミノ酸配列内の正に荷電した残基が、*in vivo*プライミングにおいて用いられた濃度のCpGのほぼ完全な沈殿を仲介することを示している。

【図10】HY1-尾部付き二分型ポリペプチドを含む溶液からCpGを沈殿させた後の上清について吸光度の値を示すグラフ。沈殿物を上清から除き、次いで1/100に希釈して260nmで分光分析を実施した。

【図11】RP-HPLCトレースを示す図。(A)混合物AASANA-HY1(配列番号24)+S1-CpGのRP-HPLCトレース。S1-CpGはホスホロチオエート基を1つ含んでいる。0.1%トリフルオロ酢酸中75分間の0-95%アセトニトリル勾配を用いたRP-HPLCにより混合物を分離した。(B)混合物ACSAANA-HY1(配列番号23)+天然型CpGのRP-HPLCトレース。(A)に記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。(C)混合物ACSAANA-HY1+S1-CpG(図10A参照)のRP-HPLCトレース。(A)に記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。(D)混合物ACSAANA-HY1(配列番号23)+S1-CpG(図10A参照)のRP-HPLCトレース。該混合物はRP-HPLCで分離する直前に0.05MのDTTで還元された。(A)に記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。(E)混合物ACSAANA-HY1(配列番号23)+S1-CpG(図10A参照)のRP-HPLCトレース。S1-CpGは混合前に10mMのヨードアセトアミドでアルキル化済みである。(A)に記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。(F)混合物ACSAANA-HY1(配列番号23)+S1-CpG(図10A参照)のRP-HPLCトレース。(A)に記載したようにしてRP-HPLCにより混合物を分離した。

【図12】二重染色されたランゲルハンス細胞の割合(%)を示すグラフ。メスのB6マウス(一群あたり3匹)を麻酔し、Texas Redを結合させたCpGと、Alexa488を結合させてあるHY1、KCSRNR-HY1(配列番号20)、ACSAANA-HY1(配列番号23)ペプチドとを足蹠に注射した。注射したマウスを24時間後に屠殺し、膝窩リンパ節を切除した。二重に染色された細胞の出現頻度を蛍光顕微鏡で概算した。

【手続補正27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

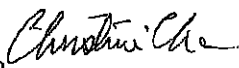
【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2008509072000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International appli PCT/US05/03754
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : A61K 39/00, 39/385, 45/00, 47/00; C12Q 1/68 US CL : 424/185.1, 193.1, 278.1; 435/6 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. : 424/185.1, 193.1, 278.1; 435/6 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) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A — X	SCHIRMBECK et al. Antigenic Epitopes Fused to Cationic Peptide Bound to Oligonucleotides Facilitate Toll-Like Receptor 9-Dependent, but CD4+ T Cell Help-Independent, Priming of CD8+ T Cells. The Journal of Immunology. 2003, Vol. 171, pages 5198-5207, see entire reference.	1-6, 8-10, 16-32, 36 33-35, 37
<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 "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 07 July 2005 (07.07.2005)		Date of mailing of the international search report 26 AUG 2005
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. (703) 305-3230		Authorized officer Marianne DiBrino, Ph.D. Telephone No. 571-272-1600 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/03754

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST 2.2.2, STN (EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, CAPLUS, SCISEARCH, PROMT, BIOBUSINESS)
search terms: inventors' names, CpG, class I, adjuvant, costimic, fusion, epitope

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/037.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.: 7 and 11-15
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 7 and 11-13 recite sequence. Claims 14 and 15 depend upon claim 13. No CRF and paper copy of the sequence listing were furnished.
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53		D
C 0 7 K 7/06	(2006.01)	C 0 7 K 7/06		

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

(72)発明者 ストラウスボーチ、マイク
 アメリカ合衆国 5 5 9 0 1 ミネソタ州 ロチェスター エイス ストリート エヌ . ダブリュ
 . 4 4 0 4

(72)発明者 ハーディン、ヘザー
 アメリカ合衆国 5 5 9 0 6 ミネソタ州 ロチェスター エイティーンズ アベニュー エヌイ
 - 7 2 4

(72)発明者 ボーソン、ナンシー
 アメリカ合衆国 5 5 9 0 6 ミネソタ州 ロチェスター フィフティーンズ アベニュー エヌ
 イー 4 1 5

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BB11 CC32 DD86 EE06 FF14 FF17 GG01
 4H045 AA30 BA14 BA15 CA40 DA86 EA31 FA71

专利名称(译)	用于改进疫苗的多肽 - 佐剂复合物		
公开(公告)号	JP2008509072A	公开(公告)日	2008-03-27
申请号	JP2006552310	申请日	2005-02-04
[标]申请(专利权)人(译)	梅约医学教育与研究基金会		
申请(专利权)人(译)	梅奥基金会的医学教育和研究		
[标]发明人	ウェットスタインピータージェイ ストラウスポーチマイク ハーディンヘザー ポーソナンシー		
发明人	ウェットスタイン、ピーター ジェイ. ストラウスポーチ、マイク ハーディン、ヘザー ポーソン、ナンシー		
IPC分类号	A61K39/39 A61K39/00 A61P37/04 A61P31/12 A61P35/00 G01N33/53 C07K7/06 A61K39/385 A61K45/00 A61K47/00 C12Q1/68		
CPC分类号	A61K39/0011 A61K2039/55561 A61K2039/55572 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/04		
FI分类号	A61K39/39 A61K39/00.ZNA.H A61P37/04 A61P31/12 A61P35/00 G01N33/53.D C07K7/06		
F-TERM分类号	4C085/AA03 4C085/AA38 4C085/BB11 4C085/CC32 4C085/DD86 4C085/EE06 4C085/FF14 4C085/FF17 4C085/GG01 4H045/AA30 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA31 4H045/FA71		
代理人(译)	昂达诚		
优先权	60/542371 2004-02-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过将强免疫原性多肽与弱免疫原性多肽结合来沉淀和浓缩CpG佐剂，以增强体内细胞毒性T细胞 (CTL) 反应的引发，从而可以增强弱免疫原性多肽的免疫原性。因此，本文提供了包含双峰免疫原性多肽的组合物。二等分的多肽，其可以包括耦合到CTL活化氨基酸序列CpG的相互作用的氨基酸序列中，CTL激活氨基酸序列异质相对于CpG的相互作用的氨基酸序列的 (杂) 但好。还提供了鉴定和使用CpG相互作用氨基酸序列和双功能免疫原性多肽的方法。

