

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-5205

(P2014-5205A)

(43) 公開日 平成26年1月16日(2014.1.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/06 (2006.01)</b>	C07K 7/06 ZNA	4B065
<b>A61K 38/00 (2006.01)</b>	A61K 37/02	4C076
<b>A61P 37/04 (2006.01)</b>	A61P 37/04	4C084
<b>A61K 9/127 (2006.01)</b>	A61K 9/127	4C085
<b>A61K 47/24 (2006.01)</b>	A61K 47/24	4H045
審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2010-231918 (P2010-231918)  
 (22) 出願日 平成22年10月14日 (2010.10.14)

(71) 出願人 504013775  
 学校法人 埼玉医科大学  
 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38  
 (71) 出願人 591222245  
 国立感染症研究所長  
 東京都新宿区戸山一丁目23番1号  
 (71) 出願人 000004341  
 日油株式会社  
 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号  
 (74) 代理人 100080791  
 弁理士 高島 一  
 (74) 代理人 100125070  
 弁理士 土井 京子  
 (74) 代理人 100136629  
 弁理士 鎌田 光宜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 エボラウイルスリポソームワクチン

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 エボラウイルス抗原に対する細胞傷害性Tリンパ球を効率よく誘導することができ、エボラウイルス感染及び該感染に起因する疾患に対する治療効果又は予防効果が期待できるペプチドやワクチンを提供する。

【解決手段】 特定の配列で表されるアミノ酸配列を含み、且つ9～11アミノ酸の長さを有する、HLA-A\*0201に拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るペプチド。該ペプチドが結合したリポソームであって、該リポソームが、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質、及びリポソームの安定化剤を含有し；且つ該リポソームの表面に該ペプチドが結合している、ペプチド結合リポソーム。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

配列番号 1 ~ 14 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、且つ 9 ~ 11 アミノ酸の長さを有する、HLA-A\*0201 に拘束された細胞傷害性 T リンパ球を誘導し得るペプチド。

## 【請求項 2】

請求項 1 記載のペプチドが結合したリポソームであって、  
該リポソームが、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質、及びリポソームの安定化剤を含有し；且つ  
該リポソームの表面に該ペプチドが結合している、  
ペプチド結合リポソーム。

10

## 【請求項 3】

リン脂質が、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基を有するリン脂質である、請求項 2 記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 4】

アシル基がオレオイル基である、請求項 2 記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 5】

リン脂質が、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、サクシンイミジル - ジアシルホスファチジルエタノールアミン、及びマレイミド - ジアシルホスファチジルエタノールアミンから選ばれる少なくとも 1 つである、請求項 2 記載のペプチド結合リポソーム。

20

## 【請求項 6】

リポソームの安定化剤がコレステロールである、請求項 2 記載のペプチド結合リポソーム。

## 【請求項 7】

ペプチドが、リポソームを構成するリン脂質膜に含まれる不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質に結合している、請求項 2 記載のペプチド結合リポソーム。

30

## 【請求項 8】

リポソームが以下の組成を有する、請求項 2 記載のペプチド結合リポソーム：  
(A) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 1 ~ 99.8 モル%；  
(B) リポソームの安定化剤 0.2 ~ 7.5 モル%。

## 【請求項 9】

リポソームが以下の組成を有する、請求項 2 記載のペプチド結合リポソーム：  
(I) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する酸性リン脂質 1 ~ 8.5 モル%；  
(II) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する中性リン脂質 0.01 ~ 8.0 モル%；  
(III) ペプチドが結合した、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 0.2 ~ 8.0 モル%；  
(IV) リポソームの安定化剤 0.2 ~ 7.5 モル%。

40

## 【請求項 10】

請求項 1 記載のペプチド又は請求項 2 記載のペプチド結合リポソームを含む、細胞傷害性 T リンパ球活性化剤。

## 【請求項 11】

更にアジュバントを含有することを特徴とする、請求項 10 記載の細胞傷害性 T リンパ

50

球活性化剤。

【請求項 1 2】

請求項 1 記載のペプチド又は請求項 2 記載のペプチド結合リボソームを含む、エボラウイルスワクチン。

【請求項 1 3】

更にアジュバントを含有することを特徴とする、請求項 1 2 記載のエボラウイルスワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、エボラウイルスワクチンとして有用なペプチド結合リボソーム、ペプチド、及びそれらの用途に関する。

【背景技術】

【0002】

エボラウイルスは、フィロウイルス科のマイナス鎖 RNA ウイルスである。エボラウイルスはヒトを含む霊長類に重篤なエボラ出血熱を引き起こす。その致死率は極めて高く、時に 90% を超える。従って、研究を行う場合には、BSL4 の厳重な封じ込めが必要である。コウモリがエボラウイルスの自然宿主である可能性が報告されているが、不明な点も多い。エボラ出血熱は、1976 年にスーダン及びザイールで大流行し、その後、中央・西アフリカで散発的に流行している。当初はアフリカにおける地域病と考えられていたが、1989 年に米国のサル検疫室にて流行したことから、先進国におけるエボラウイルスの脅威が改めて認識されるに至った。近年においては、ペットのサルの輸入や、旅行者によるエボラウイルスの拡散、あるいはエボラウイルスを用いたバイオテロのリスクの増大が指摘されており、エボラ出血熱の効果的な予防又は治療法の開発が希求されているが、未だ効果的な予防又は治療法及びワクチンはない。

【0003】

エボラウイルスに対する免疫反応について様々な研究成果が報告されている。エボラウイルスに感染しながら死亡には至らなかったヒトにおいて、エボラウイルス抗原に対する CTL や抗体が存在することが報告されている（非特許文献 1）。マウスを用いた感染試験において、エボラウイルス抗原に対する中和抗体や CTL が有効であったことが報告されている（非特許文献 2 及び 3）。また、サルを用いた感染試験において、DNA ワクチンや組換えウイルスワクチンが細胞性免疫や液性免疫を誘導し、感染抑制に有効であったことが報告されている（非特許文献 4 ~ 7）。一方、エボラウイルス抗原に対する中和抗体は無効であったとの報告もあり（非特許文献 8）、ヒトにおいては、エボラウイルスに対する抗体（液性免疫）はあまり有効ではないが、CTL（細胞性免疫）は有効であろうと推測されている。

【0004】

一方、生体の免疫応答を増強するための方法として、リボソーム製剤を用いる方法が知られている。

【0005】

特許文献 1 には、抗原が結合したリボソームを用いた、病原体感染細胞又は癌細胞を殺傷するための CTL を効率よく特異的に増強することができ、感染症や癌の予防・治療に有用な T 細胞活性化剤の調製法が開示されている。

【0006】

また特許文献 2 には、鳥インフルエンザウイルスの、保存性の高い内部タンパク質配列中から、細胞傷害性 T リンパ球の調製に特に有効な抗原エピトープを見出したこと、該エピトープを含むペプチドを表面に結合したリボソームが、極めて強力に抗原特異的な細胞傷害性 T リンパ球を誘導し得ることが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 特開2008-37831号公報

【 特許文献 2 】 国際公開第2010/061924号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Nat. Immunol., 8: 1159, 2007

【 非特許文献 2 】 Science, 287: 1664, 2000

【 非特許文献 3 】 J Virol, 75: 2660, 2001

【 非特許文献 4 】 Nature, 408: 605, 2000

【 非特許文献 5 】 Nature, 424: 681, 2003

【 非特許文献 6 】 Nat Med, 11: 786, 2005

【 非特許文献 7 】 J Virol, 81: 6379, 2007

【 非特許文献 8 】 PLoS Pathogens, 3: e9, 2007

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

本発明が解決しようとする課題は、エボラウイルス抗原に対する細胞傷害性Tリンパ球を効率よく誘導することができ、エボラウイルス感染及び該感染に起因する疾患に対する治療効果又は予防効果が期待できるペプチドやワクチンを提供することである。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

本発明者らは、上記課題に鑑み、鋭意検討を行い、エボラウイルス抗原中に、細胞傷害性Tリンパ球の誘導に特に有効な抗原エピトープを探索した結果、幾つかの優れた抗原エピトープを見出した。更に、このエピトープを含むペプチドが結合したリポソームによりワクチン接種を行うと、極めて強力に抗原特異的な細胞傷害性Tリンパ球を誘導し、エボラウイルス感染や該感染に伴う疾患を治療又は予防し得ることを見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明は以下を提供するものである。

[ 1 ] 配列番号 1 ~ 1 4 のいずれかで表されるアミノ酸配列を含み、且つ 9 ~ 1 1 アミノ酸の長さを有する、HLA - A \* 0 2 0 1 に拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るペプチド。

[ 2 ] [ 1 ] のペプチドが結合したリポソームであって、該リポソームが、不飽和結合を 1 個有する炭素数 1 4 ~ 2 4 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 1 4 ~ 2 4 の炭化水素基を有するリン脂質、及びリポソームの安定化剤を含有し；且つ

該リポソームの表面に該ペプチドが結合している、ペプチド結合リポソーム。

[ 3 ] リン脂質が、不飽和結合を 1 個有する炭素数 1 4 ~ 2 4 のアシル基を有するリン脂質である、[ 2 ] のペプチド結合リポソーム。

[ 4 ] アシル基がオレオイル基である、[ 2 ] のペプチド結合リポソーム。

[ 5 ] リン脂質が、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、サクシンイミジル - ジアシルホスファチジルエタノールアミン、及びマレイミド - ジアシルホスファチジルエタノールアミンから選ばれる少なくとも 1 つである、[ 2 ] のペプチド結合リポソーム。

[ 6 ] リポソームの安定化剤がコレステロールである、[ 2 ] のペプチド結合リポソーム。

[ 7 ] ペプチドが、リポソームを構成するリン脂質膜に含まれる不飽和結合を 1 個有する炭素数 1 4 ~ 2 4 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 1 4 ~ 2 4 の炭化水素基

10

20

30

40

50

を有するリン脂質に結合している、[ 2 ] のペプチド結合リポソーム。

[ 8 ] リポソームが以下の組成を有する、[ 2 ] のペプチド結合リポソーム：

( A ) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 1 ~ 99 . 8 モル%；

( B ) リポソームの安定化剤 0 . 2 ~ 75 モル%。

[ 9 ] リポソームが以下の組成を有する、[ 2 ] のペプチド結合リポソーム：

( I ) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する酸性リン脂質 1 ~ 85 モル%；

( I I ) 不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有する中性リン脂質 0 . 01 ~ 80 モル%；

( I I I ) ペプチドが結合した、不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 のアシル基又は不飽和結合を 1 個有する炭素数 14 ~ 24 の炭化水素基を有するリン脂質 0 . 2 ~ 80 モル%；

( I V ) リポソームの安定化剤 0 . 2 ~ 75 モル%。

[ 10 ] [ 1 ] のペプチド又は [ 2 ] のペプチド結合リポソームを含む、細胞傷害性 T リンパ球活性化剤。

[ 11 ] 更にアジュバントを含有することを特徴とする、[ 10 ] の細胞傷害性 T リンパ球活性化剤。

[ 12 ] [ 1 ] のペプチド又は [ 2 ] のペプチド結合リポソームを含む、エボラウイルスワクチン。

[ 13 ] 更にアジュバントを含有することを特徴とする、[ 12 ] のエボラウイルスワクチン。

【発明の効果】

【 0012 】

本発明のペプチド又はペプチド結合リポソームを用いれば、エボラウイルス抗原に対する細胞傷害性 T リンパ球を効率よく誘導することができ、エボラウイルス感染や該感染に起因する疾患に対する優れた治療又は予防効果が期待できる。

【図面の簡単な説明】

【 0013 】

【図 1】エボラウイルス抗原タンパク質に由来する種々のペプチドによる CD8<sup>+</sup> / IFN-<sup>+</sup> T 細胞の誘導。縦軸は IFN- 発現を、横軸は CD8 発現をそれぞれ示す。グラフ中の数値は、ゲートされた CD8<sup>+</sup> / IFN-<sup>+</sup> T 細胞のパーセンテージを示す。

【図 2】種々のペプチド結合リポソームによる CD8<sup>+</sup> / IFN-<sup>+</sup> T 細胞の誘導。( × 2 ) は 2 回免疫したことを示す。それ以外は全て 1 回免疫した。縦軸は IFN- 発現を、横軸は CD8 発現をそれぞれ示す。グラフ中の数値は、ゲートされた CD8<sup>+</sup> / IFN-<sup>+</sup> T 細胞のパーセンテージを示す。

【図 3】種々のペプチド結合リポソームによるインビボにおける CTL 活性の誘導。免疫回数は 1 回である。縦軸は細胞数を、横軸は CFSE の発現をそれぞれ示す。グラフ中の数値は殺傷された M2 ゲート内の細胞のパーセンテージを示す。

【発明を実施するための形態】

【 0014 】

## 1. ペプチド

本発明は、HLA - A \* 0201 に拘束された細胞傷害性 T リンパ球を誘導し得るペプチドであって、

( 1 ) 配列番号 1 ~ 14 のいずれかで表されるアミノ酸配列、又は

( 2 ) 配列番号 1 ~ 14 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 又は 2 個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列

を含み、且つ 9 ~ 11 アミノ酸の長さを有する、ペプチド ( 本発明のペプチド ) を提供する。

【 0015 】

10

20

30

40

50

本発明は、エボラウイルス抗原タンパク質中に以下の優れたエピトープ配列（本発明のエピトープ配列）を見出したことに基づき完成されたものである：

- ・配列番号 1 ~ 14 のいずれかで表されるアミノ酸配列
- ・配列番号 1 ~ 14 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 又は 2 個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列（ここで、該アミノ酸配列からなるペプチドが H L A - A \* 0 2 0 1 に拘束された細胞傷害性 T リンパ球を誘導し得る）。

【 0 0 1 6 】

配列番号 1 ~ 14 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株のタンパク質である

N u c l e o p r o t e i n ( N P ) ( 配列番号 1 ~ 2 )、

v i r i o n s t r u c t u r a l p r o t e i n 4 0 ( V P 4 0 ) ( 配列番号 3 )、

G l y c o p r o t e i n ( G P ) ( 配列番号 4 ~ 7 )、

v i r i o n s t r u c t u r a l p r o t e i n 3 0 ( V P 3 0 ) ( 配列番号 8 ) 又は

R N A - d e p e n d e n t R N A p o l y m e r a s e ( L ) ( 配列番号 9 ~ 1 4 )

のアミノ酸配列中に含まれる連続する部分配列に相当する。

【 0 0 1 7 】

配列番号 1 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の N P のアミノ酸配列に含まれる第 5 6 番目のイソロイシンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( N P - 5 6 )。

配列番号 2 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の N P のアミノ酸配列に含まれる第 4 0 1 番目のアルギニンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( N P - 4 0 1 )。

配列番号 3 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の V P 4 0 のアミノ酸配列に含まれる第 7 3 番目のフェニルアラニンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( V P 4 0 - 7 3 )。

配列番号 4 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の G P のアミノ酸配列に含まれる第 2 5 番目のイソロイシンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( G P - 2 5 )。

配列番号 5 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の G P のアミノ酸配列に含まれる第 1 6 0 番目のフェニルアラニンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( G P - 1 6 0 )。

配列番号 6 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の G P のアミノ酸配列に含まれる第 2 5 2 番目のフェニルアラニンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( G P - 2 5 2 )。

配列番号 7 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の G P のアミノ酸配列に含まれる第 5 4 6 番目のグリシンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( G P - 5 4 6 )。

配列番号 8 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の V P 3 0 のアミノ酸配列に含まれる第 9 4 番目のセリンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( V P 3 0 - 9 4 )。

配列番号 9 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の L のアミノ酸配列に含まれる第 2 0 9 番目のアラニンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( L - 2 0 9 )。

配列番号 1 0 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の L のアミノ酸配列に含まれる第 2 9 3 番目のリジンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する ( L - 2 9 3 )。

配列番号 1 1 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の L のアミノ酸配

10

20

30

40

50

列に含まれる第 771 番目のアルギニンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する (L - 771)。

配列番号 12 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の L のアミノ酸配列に含まれる第 932 番目のグリシンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する (L - 932)。

配列番号 13 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の L のアミノ酸配列に含まれる第 1099 番目のアラニンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する (L - 1099)。

配列番号 14 で表されるアミノ酸配列は、エボラウイルスザイール株の L のアミノ酸配列に含まれる第 1955 番目のバリンから始まる連続する 9 アミノ酸長の部分配列に相当する (L - 1955)。

#### 【0018】

(2) における置換の態様は、該アミノ酸配列からなるペプチドが H L A - A \* 0 2 0 1 に拘束された細胞傷害性 T リンパ球を誘導し得る限り特に限定されないが、ザイール株とは異なるエボラウイルス株 (型・亜型) (例、スーダン株、レストン株、コートジボアール株、ブンディブギョ株) の同一抗原における対応するエピトープ配列中に生じた既知のアミノ酸変異を反映したものが好適な態様として挙げられる。

#### 【0019】

本発明のエピトープ配列からなるペプチド (本発明のエピトープペプチド) は、以下の優れた特性を有する：

(A) 本発明のエピトープペプチドは、世界的に最もポピュラーなヒト主要組織適合性抗原 (H L A) の型である H L A - A \* 0 2 0 1 への結合性に優れており、H L A - A \* 0 2 0 1 上に安定に提示される。

(B) 本発明のエピトープペプチドは、上記 (A) の特性を有するため、H L A - A \* 0 2 0 1 に拘束された細胞傷害性 T リンパ球を強力に誘導することができる。「抗原が H L A に拘束された細胞傷害性 T リンパ球を誘導する」とは、特定の H L A (例えば H L A - A \* 0 2 0 1) を発現している哺乳動物 (例えばヒト、トランスジェニックマウス等) を抗原で免疫した場合に、該哺乳動物の生体内において、当該 H L A に拘束され、且つ当該抗原を特異的に認識する細胞傷害性 T リンパ球の数及び / 又は活性 (例えば I F N - 産生や細胞傷害活性) が上昇することを意味する。上述のように、H L A - A \* 0 2 0 1 は世界的に最もポピュラーな H L A であることから、本発明のエピトープペプチドは、人種差に関わらず、世界中の多くのヒト (特に、H L A - A \* 0 2 0 1 を発現するヒト) の細胞傷害性 T リンパ球を誘導し、細胞性免疫を活性化することができる。

#### 【0020】

本発明のペプチドは、上記本発明のエピトープペプチド自体であるか、或いは細胞 (好ましくはヒト樹状細胞) 内でプロテアソーム等の作用により切断され、上記本発明のエピトープペプチドを生じ得る。従って、本発明のペプチドは、本発明のエピトープペプチドと実質的に同一の優れた特性を有し、下記に記したような本発明の細胞傷害性 T リンパ球活性化剤及びエボラウイルスワクチンの製造に供した場合、エボラウイルスが感染した細胞の殺傷やエボラウイルスの感染防御に優れた効果を発揮することが期待できる。

#### 【0021】

本発明のペプチドの長さは、特に限定されないが通常 9 ~ 11 アミノ酸、好ましくは 9 ~ 10 アミノ酸、より好ましくは 9 アミノ酸である。該ペプチドの長さが 10 アミノ酸以上である場合には、該ペプチドは、本発明のエピトープ配列の N 末端側及び / 又は C 末端側に付加配列を有する。付加配列の長さやアミノ酸配列は、該ペプチドの上記特性を損なわない限り特に限定されない。例えば、該付加配列は、各エピトープ配列が由来するエボラウイルスザイール株のタンパク質のアミノ酸配列において、当該エピトープ配列に隣接して実際に存在するアミノ酸配列であり得る。例えば、本発明のペプチドが配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を含む場合、該ペプチドに含まれ得る付加配列はエボラウイルスザイール株の N u c l e o p r o t e i n ( N P ) のアミノ酸配列中に含まれる、配列番号

10

20

30

40

50

1 からなる部分アミノ酸配列に隣接して実際に存在するアミノ酸配列であり得る。また該ペプチドが、細胞内で主要組織適合抗原複合体 (MHC) 上に提示される際に、MHCの個人差 (多型性) による提示抗原の選別を克服できるような残基なども、付加配列として好ましい。

#### 【0022】

本発明のペプチドは、例えば、液相合成又は固相ペプチド合成等の公知のペプチド合成技術によって調製できる。或いは、該ペプチドを発現し得る発現ベクターを導入した形質変換体 (大腸菌等) を培養し、その培養物からアフィニティカラム等の周知の精製技術により該ペプチドを単離することにより、該ペプチドを製造することができる。該ペプチドを発現し得る発現ベクターは、周知の遺伝子工学的技術を用いて、該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを適切な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより構築することができる。

10

#### 【0023】

### 2. ペプチド結合リポソーム

本発明は、上記本発明のペプチドが結合したリポソームであって、該リポソームが、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有するリン脂質、及びリポソームの安定化剤を含有し；且つ

該リポソームの表面に上記本発明のペプチドが結合している、

ペプチド結合リポソーム (本発明のペプチド結合リポソーム) を提供する。

20

#### 【0024】

本発明の課題の一つは、エボラウイルス感染細胞 (好ましくは、エボラウイルス感染により本発明のペプチドをHLA-A\*0201上に提示した細胞) を殺傷するための細胞傷害性Tリンパ細胞 (CD8<sup>+</sup>T細胞、CTL) を効率よく特異的に増強することである。この観点から、本発明のペプチド結合リポソームに用いられる本発明のペプチドは、好ましくは、配列番号1、2、3、5、6、8、9、10、11、13又は14で表されるアミノ酸配列を含むものである。

#### 【0025】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜は、両親媒性界面活性剤であるリン脂質が、極性基を水相側に向けて界面を形成し、疎水基が界面の反対側に向く構造を有する。ここで、リポソームとは閉鎖空間を有するリン脂質二重膜のことを指す。

30

#### 【0026】

本発明のペプチド結合リポソームに含まれるペプチドは、それが有する官能基を介してリポソームの表面に結合することができる。リポソーム表面への結合に用いられる該ペプチド中の官能基としては、アミノ基、チオール基、カルボキシル基、水酸基、ジスルフィド基又はメチレン鎖を有する炭化水素基 (アルキル基等) からなる疎水基等が挙げられる。これらの内、アミノ基、チオール基、カルボキシル基、水酸基及びジスルフィド基は共有結合により、アミノ基及びカルボキシル基はイオン結合により、疎水基は疎水基同士で疎水結合により、該ペプチドをリポソームの表面に結合することができる。該ペプチドは、好ましくはアミノ基、カルボキシル基又はチオール基を介してリポソームの表面に結合する。

40

#### 【0027】

本発明のペプチド結合リポソームに含まれるペプチドが有する官能基を介して、該ペプチドが安定にリポソームに結合するため、リポソームを構成するリン脂質膜は、アミノ基、サクシンイミド基、マレイミド基、チオール基、カルボキシル基、水酸基、ジスルフィド基、メチレン鎖を有する炭化水素基 (アルキル基等) からなる疎水基等の官能基を有することが望ましい。リポソームを構成するリン脂質膜が有する官能基は、好ましくは、アミノ基、サクシンイミド基又はマレイミド基である。該ペプチドのリポソームへの結合に関与する、該ペプチドの有する官能基とリポソームを構成するリン脂質膜が有する官能基

50



の組み合わせは、本発明の効果に影響しない範囲において自由に選択することができるが、好ましい組み合わせとしては、それぞれ、アミノ基とアルデヒド基、アミノ基とアミノ基、アミノ基とサクシンイミド基、チオール基とマレイミド基等が挙げられる。イオン結合及び疎水結合は、リポソームへのペプチドの結合手順が簡便であり、ペプチド結合リポソームの調製容易性の点から好ましく、また、共有結合は、リポソーム表面のペプチドの結合安定性の点又はペプチド結合リポソームを実用する際の保存安定性の点から好ましい。本発明のペプチド結合リポソームは、その構成成分であるリポソームの表面に細胞傷害性Tリンパ球活性化効果を有するペプチドが結合していることを1つの特徴としている。従って、実用段階で、例えば注射行為によって生体内に投与された後にも、該ペプチドがリポソームの表面に安定に結合していることが、本発明の効果をより高める点で好ましい。このような観点から、該ペプチドとリポソームとの結合としては、共有結合が好ましい。

#### 【0028】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜は、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質、及びリポソームの安定化剤を含有してなる。

#### 【0029】

不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有するリン脂質における、該アシル基の炭素数は、好ましくは16～22であり、更に好ましくは18～22であり、最も好ましくは18である。該アシル基としては、具体的には、パルミトオレオイル基、オレオイル基、エルコイル基等が挙げられ、最も好ましくはオレオイル基である。

#### 【0030】

不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質における、該炭化水素基の炭素数は、好ましくは16～22であり、更に好ましくは18～22であり、最も好ましくは18である。該炭化水素基としては、具体的には、テトラデセニル基、ヘキサデセニル基、オクタデセニル基、C20モノエン基、C22モノエン基、C24モノエン基等が挙げられる。

#### 【0031】

リン脂質が有するグリセリン残基の1-位、及び2-位に結合する不飽和のアシル基又は不飽和炭化水素基は、同一でも異なってもよい。工業的な生産性の観点から、1-位及び2-位の基が同一であることが好ましい。

#### 【0032】

リン脂質としては、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有するリン脂質が好ましく用いられる。

#### 【0033】

本発明の課題の一つは、エボラウイルス感染細胞（好ましくは、エボラウイルス感染により本発明のペプチドをHLA-A\*0201上に提示した細胞）を殺傷するための細胞傷害性Tリンパ細胞（CD8<sup>+</sup>T細胞、CTL）を効率よく特異的に増強することである。実用上十分なレベルにCTL活性を増強させる点から、リン脂質は不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有することが好ましい。アシル基の炭素数が13未満であると、リポソームの安定性が悪くなったり、またCTL活性増強効果が不十分になる場合がある。また、アシル基の炭素数が24を超えると、リポソームの安定性が悪くなる場合がある。

#### 【0034】

不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質としては、酸性リン脂質、中性リン脂質、ペプチドを結合することのできる官能基を有する反応性リン脂質等の種類が挙げられる。これらは、種々の要求に応じて、その種類、割合を適宜選択することができる。

#### 【0035】

酸性リン脂質としては、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

10

20

30

40

50

ァチジン酸、ホスファチジルイノシトール等を用いることができる。CTL活性を実用上十分なレベルに増強する点、及び工業的な供給性、医薬品として用いるための品質等の点から、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基を有するジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、及びジアシルホスファチジルイノシトールが好ましく用いられる。酸性リン脂質は、リポソームの表面にアニオン性電離基を与えるので、リポソーム表面にマイナスのゼータ電位を付与する。このためリポソームは、電荷的な反発力を得、水性溶媒中で安定な製剤として存在できる。このように、酸性リン脂質は、本発明のペプチド結合リポソームが水性溶媒中にある際のリポソームの安定性を確保する点で重要である。

#### 【0036】

中性リン脂質としては、例えば、ホスファチジルコリン等を用いることができる。本発明で用いることができる中性リン脂質は、本発明が課題として取り組むCTL活性増強を達成する範囲において、その種類・量を適宜選択して用いることができる。中性リン脂質は、酸性リン脂質及び本発明のペプチドを結合したリン脂質に比べ、リポソームを安定化する機能が強く、膜の安定性を向上させ得る。かかる観点から、本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜は、中性リン脂質を含有することが好ましい。CTL活性増強効果を達成するために用いる酸性リン脂質、ペプチド結合のための反応性リン脂質及びリポソームの安定化剤の含有量を確保した上で、中性リン脂質の使用量を決定できる。

#### 【0037】

本発明のペプチド結合リポソームにおいては、本発明のペプチドがリポソームを構成するリン脂質膜に含まれる不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有するリン脂質に結合することにより、リポソームの表面に結合する。

#### 【0038】

このペプチド結合のためのリン脂質として、本発明のペプチドが結合することのできる官能基を有する反応性リン脂質が用いられる。不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有する反応性リン脂質は、種々の要求に応じて、その種類、割合が適宜選択される。前記リン脂質と同様に、反応性リン脂質においても、リン脂質に含まれる不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基の炭素数が24を超えるか、14未満である場合は好ましくない。

#### 【0039】

反応性リン脂質としては、ホスファチジルエタノールアミン又はその末端変性体が挙げられる。また、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトール及びこれらの末端変性体も反応性リン脂質として用いることができる。工業的な入手性、本発明のペプチドとの結合工程の簡便性、収率等の点から、ホスファチジルエタノールアミン又はその末端変性体が好ましく用いられる。ホスファチジルエタノールアミンはその末端に本発明のペプチドを結合することのできるアミノ基を有する。更に、CTL活性を実用上十分なレベルに増強する点、リポソームでの安定性、及び工業的な供給性、医薬品として用いるための品質等の点から、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基を有するジアシルホスファチジルエタノールアミン又はその末端変性体が最も好ましく用いられる。

#### 【0040】

ジアシルホスファチジルエタノールアミンは、例えば、ジアシルホスファチジルコリンを原料に、ホスホリパーゼDを用いてコリンとエタノールアミンを塩基交換反応させることで得ることができる。具体的には、ジアシルホスファチジルコリンを溶解したクロロホルム溶液と、ホスホリパーゼD及びエタノールアミンを溶解した水を適宜比率において混合し粗反応物を得ることができる。粗反応物を、クロロホルム/メタノール/水系溶媒を用いてシリカゲルカラムで精製し目的のジアシルホスファチジルエタノールアミンを得ることができる。当業者であれば、溶媒組成比等のカラム精製条件を適宜選択して実施する

10

20

30

40

50

ことが可能である。

【0041】

末端変性体としては、ジアシルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基に2価反応性化合物の一方の末端を結合させたジアシルホスファチジルエタノールアミン末端変性体が挙げられる。2価反応性化合物としては、ジアシルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基と反応することができるアルデヒド基又はコハク酸イミド基を少なくとも片方の末端に有する化合物が利用できる。アルデヒド基を有する2価反応性化合物として、グリオキサル、グルタルアルデヒド、サクシンジアルデヒド、テレフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましくは、グルタルアルデヒドが挙げられる。コハク酸イミド基を有する2価反応性化合物として、ジチオビス(サクシンイミジルプロピオネート)、エチレングリコール-ビス(サクシンイミジルサクシネート)、ジサクシンイミジルサクシネート、ジサクシンイミジルスベレート、又はジサクシンイミジルグルタレートが等挙げられる。

10

【0042】

また、一方の末端にサクシンイミド基、他方の片末端にマレイミド基を有する2価反応性化合物として、N-サクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、スルホサクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、N-サクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)アセテート、N-サクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)プロピオネート、サクシンイミジル-4-(N-マレイミドエチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホサクシンイミジル-4-(N-マレイミドエチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-( -マレイミドブチリルオキシ)サクシンイミド、N-( -マレイミドカプロイルオキシ)サクシンイミド等が挙げられる。このような2価反応性化合物を用いると、官能基としてマレイミド基を有するジアシルホスファチジルエタノールアミン末端変性体を得られる。以上のような2価反応性化合物の一方の末端の官能基をジアシルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基に結合し、ジアシルホスファチジルエタノールアミン末端変性体を得ることができる。

20

【0043】

リポソームの表面にペプチドを結合する方法としては、例えば、上記の反応性リン脂質を含有するリポソームを調製し、次にペプチドを加えてリポソームの反応性リン脂質にペプチドを結合する方法を挙げることができる。また、予めペプチドを反応性リン脂質に結合しておき、次に、得られたペプチドが結合した反応性リン脂質を、反応性リン脂質以外のリン脂質及びリポソームの安定化剤と混合することによっても、ペプチドを表面に結合したリポソームを得ることができる。反応性リン脂質へのペプチドの結合方法は、当該技術分野において周知である。

30

【0044】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜は、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有するリン脂質を少なくとも1種、例えば2種以上、好ましくは3種以上含有する。

【0045】

例えば、本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜は、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジルグリセロール、ジアシルホスファチジン酸、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、サクシンイミジル-ジアシルホスファチジルエタノールアミン、及びマレイミド-ジアシルホスファチジルエタノールアミンから選ばれる少なくとも1種、例えば2種以上、好ましくは3種以上の、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有するリン脂質を含有する。

40

【0046】

また、本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜は、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数

50

14～24の炭化水素基を有する酸性リン脂質、  
 不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数  
 14～24の炭化水素基を有する中性リン脂質、及び  
 不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数  
 14～24の炭化水素基を有する反応性リン脂質  
 を、それぞれ、少なくとも1種含有することが好ましい。

【0047】

本発明において、リポソームの安定化剤としては、ステロール類やトコフェロール類を用いることができる。前記のステロール類としては、一般にステロール類として知られるものであればよく、例えば、コレステロール、シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール、ブラシカステロール等が挙げられ、入手性等の点から、特に好ましくは、コレステロールが用いられる。前記のトコフェロール類としては、一般にトコフェロールとして知られるものであればよく、例えば、入手性等の点から、市販の $\alpha$ -トコフェロールが好ましく挙げられる。

10

【0048】

さらに、本発明の効果を損なわない限り、本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜は、リポソームを構成することのできる、公知の構成成分を含んでいてもよい。

【0049】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜の組成としては、例えば以下を挙げることができる：

20

(A) 不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質 1～99.8モル%；

(B) リポソームの安定化剤 0.2～75モル%

尚、各成分の含有量は、ペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜の全構成成分に対するモル%として表示する。

上記成分(A)の含有量は、リポソームの安定性の観点から、好ましくは10～90モル%、より好ましくは30～80モル%、更に好ましくは50～70モル%である。

上記成分(B)の含有量は、リポソームの安定性の観点から、好ましくは5～70モル%、より好ましくは10～60モル%、更に好ましくは20～50モル%である。安定化剤の含有量が75モル%を超えるとリポソームの安定性が損なわれ好ましくない。

30

【0050】

上記成分(A)には、以下が含まれる：

(a) ペプチドが結合していない、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質、及び

(b) ペプチドが結合した、不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有するリン脂質。

上記成分(a)の含有量は、通常0.01～85モル%、好ましくは0.1～80モル%、より好ましくは0.1～60モル%、更に好ましくは0.1～50モル%である。

上記成分(b)の含有量は、通常0.2～80モル%、好ましくは0.3～60モル%、より好ましくは0.4～50モル%、更に好ましくは0.5～25モル%である。含有量が0.2モル%未満であると、本発明のペプチドの量が低下するため、実用上十分なレベルに細胞傷害性Tリンパ球を活性化することが困難となり、80モル%を超えると、リポソームの安定性が低下する。

40

【0051】

上記成分(a)のリン脂質には、通常、上述の酸性リン脂質及び中性リン脂質が含まれる。また、上記成分(b)のリン脂質には、上述の反応性リン脂質が含まれる。

【0052】

酸性リン脂質の含有量は、通常1～85モル%、好ましくは2～80モル%、より好ましくは4～60モル%、更に好ましくは5～40モル%である。含有量が1モル%未満で

50

あると、ゼータ電位が小さくなりリポソームの安定性が低くなり、また、実用上十分なレベルに細胞傷害性Tリンパ球を活性化することが困難となる。一方、含有量が85モル%を超えると、結果として、リポソームのペプチドが結合したリン脂質の含有量が低下し、実用上十分なレベルに細胞傷害性Tリンパ球を活性化することが困難となる。

【0053】

中性リン脂質の含有量は、通常0.01~80モル%、好ましくは0.1~70モル%、より好ましくは0.1~60モル%、更に好ましくは0.1~50モル%である。含有量が80モル%を超えると、リポソームに含まれる酸性リン脂質、ペプチドが結合したリン脂質及びリポソームの安定化剤の含有量が低下し、実用上十分なレベルに細胞傷害性Tリンパ球を活性化することが困難となる。

10

【0054】

ペプチドが結合したリン脂質は、前記の反応性リン脂質にペプチドが結合して得られるもので、反応性リン脂質がペプチドと結合する割合は、本発明の効果を妨げない範囲において、結合に用いる官能基の種類、結合処理条件等を適宜実施して選択することができる。

【0055】

例えば、ジアシルホスファチジルエタノールアミンの末端アミノ基に2価反応性化合物であるジサクシンイミジルサクシネートの片末端を結合して得たジアシルホスファチジルエタノールアミンの末端変性体を反応性リン脂質として用いる場合、結合処理諸条件の選択によって反応性リン脂質の10~99%をペプチドと結合することができる。この場合、ペプチドと結合していない反応性リン脂質は、酸性リン脂質となってリポソームに含有される。

20

【0056】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜の好ましい態様としては、以下の組成を挙げることができる：

(I) 不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有する酸性リン脂質1~85モル%；

(II) 不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有する中性リン脂質0.01~80モル%；

(III) ペプチドが結合した、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有するリン脂質0.2~80モル%；

30

(IV) リポソームの安定化剤0.2~75モル%。

(合計100モル%)

【0057】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜のより好ましい態様としては、以下の組成を挙げることができる：

上記成分(I) 2~80モル%

上記成分(II) 0.1~70モル%

上記成分(III) 0.3~60モル%

40

上記成分(IV) 10~70モル%

(合計100モル%)

【0058】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜の更に好ましい態様としては、以下の組成を挙げることができる：

上記成分(I) 4~60モル%

上記成分(II) 0.1~60モル%

上記成分(III) 0.4~50モル%

上記成分(IV) 20~60モル%

(合計100モル%)

50

## 【0059】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜のとりわけ好ましい態様としては、以下の組成を挙げることができる：

上記成分（I） 5～40モル％  
 上記成分（II） 0.1～50モル％  
 上記成分（III） 0.5～25モル％  
 上記成分（IV） 25～55モル％  
 （合計100モル％）

## 【0060】

本発明のペプチド結合リポソームは、リポソーム部分を構成するリン脂質膜中のリン脂質に含まれる不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基の炭素数が14～24であることを特徴とするが、本発明の効果を妨げない範囲で、炭素数が14未満又は24を超える不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基を含むリン脂質を含んでいても差支えない。本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜中のリン脂質に含まれる全ての不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基の合計数に対して、炭素数が14～24である不飽和アシル基又は不飽和炭化水素基の数の割合は、例えば50％以上、好ましくは60％以上、より好ましくは75％以上、更に好ましくは90％以上、最も好ましくは97％以上（例えば実質的に100％）である。

10

## 【0061】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜は、本発明の効果を妨げない限り、炭素数が14～24の範囲のアシル基又は炭化水素基を有する、リン脂質以外の脂質を含んでもよい。該脂質の含有量は、通常は40モル％以下であり、好ましくは20モル％以下、より好ましくは10モル％以下、更に好ましくは5モル％以下（例えば実質的に0モル％）である。

20

## 【0062】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分は、構成成分であるリン脂質、反応性リン脂質、リポソームの安定化剤、ペプチド等を用い、適宜配合や加工を行い、これを適当な溶媒に添加する等の方法で得ることができる。

## 【0063】

例えば、エクストルージョン法、ボルテックスミキサー法、超音波法、界面活性剤除去法、逆相蒸発法、エタノール注入法、プレベシクル法、フレンチプレス法、W/O/Wエマルジョン法、アニーリング法、凍結融解法等の製造方法が挙げられる。リポソームの形態は、特に限定されず、前記のリポソーム製造方法を適宜選択することにより、多重層リポソーム、小さな一枚膜リポソーム、大きな一枚膜リポソーム等、種々の大きさや形態を有するリポソームを製造することができる。

30

## 【0064】

リポソームの粒径は特に限定されるものではないが、保存安定性等の点から、粒径は20～600nmが挙げられ、好ましくは30～500nm、次に好ましくは40～400nmであり、更に好ましくは、50～300nmであり、最も好ましくは70～230nmである。

40

## 【0065】

なお、本発明においては、リポソームの物理化学的安定性を向上させるために、リポソーム調製過程又は調製後に、リポソームの内水相及び/又は外水相に、糖類又は多価アルコール類を添加しても良い。特に、長期保存或いは製剤化途上での保管が必要な場合には、リポソームの保護剤として、糖類或いは多価アルコール類を添加・溶解し、凍結乾燥により水分を除いてリン脂質組成物の凍結乾燥物とすることが好ましい。

## 【0066】

糖類としては、例えばグルコース、ガラクトース、マンノース、フルクトース、イノシトール、リボース、キシロース等の単糖類；サッカロース、ラクトース、セロビオース、トレハロース、マルトース等の二糖類；ラフィノース、メレジトース等の三糖類；シクロ

50

デキストリン等のオリゴ糖；デキストリン等の多糖類；キシリトール、ソルビトール、マンニトール、マルチトール等の糖アルコール等が挙げられる。これらの糖類の中では単糖類又は二糖類が好ましく、中でもグルコース又はサッカロースが入手性等の点からより好ましく挙げられる。

【0067】

前記多価アルコール類としては、例えば、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、テトラグリセリン、ペンタグリセリン、ヘキサグリセリン、ヘプタグリセリン、オクタグリセリン、ノナグリセリン、デカグリセリン、ポリグリセリン等のグリセリン系化合物；ソルビトール、マンニトール等の糖アルコール系化合物；エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、テトラエチレングリコール、ペンタエチレングリコール、ヘキサエチレングリコール、ヘプタエチレングリコール、オクタエチレングリコール、ノナエチレングリコール等が挙げられる。このうち、グリセリン、ジグリセリン、トリグリセリン、ソルビトール、マンニトール、分子量400～10,000のポリエチレングリコールが入手性の点から好ましく挙げられる。

10

【0068】

リポソームの内水相及び/又は外水相に含ませる、糖類或いは多価アルコール類の濃度は、リポソーム液に対する重量濃度で、例えば1～20重量%が挙げられ、好ましくは2～10重量%が挙げられる。

【0069】

本発明のペプチド結合リポソームを製造する場合、ペプチドを結合させる前のリポソームを作製した後、ペプチドを結合させることにより簡便に本発明のペプチド結合リポソームを得ることができる。

20

【0070】

例えば、リン脂質、リポソームの安定化剤及び膜表面にペプチドを結合するための反応性リン脂質を含有したリポソームの懸濁液を調製し、その外水相に前記の糖類の一つであるスクロースを2～10重量%程度加えて溶解する。この糖添加製剤を10mlガラス製バイアルに移して棚段式凍結乾燥機内に置き、-40℃等に冷却して試料を凍結した後、常法により凍結乾燥物を得る。

【0071】

ここで得たリポソームの凍結乾燥物は、水分が取り除かれているため長期の保存が可能であり、必要時に特定のペプチドを加えて後の工程を実施することにより、本発明の最終的なペプチド結合リポソームを簡便に迅速に得ることができる。ペプチドとリポソームとの相互作用が強く不安定性が高い場合等は、このようにリポソームの凍結乾燥物の段階で保存し、必要な際にペプチドを結合して用いると非常に簡便である。

30

【0072】

本発明のペプチド結合リポソームのリポソーム部分を構成するリン脂質膜は、ペプチドが結合したリン脂質を有し得る。ペプチドが結合したリン脂質を含有するリポソームを得る方法としては、次の(A)及び(B)による方法が挙げられる。

(A)リン脂質、反応性リン脂質、リポソームの安定化剤を含有するリポソームを調製し、これにペプチド及び2価反応性化合物を添加し、リポソーム中に含有される反応性リン脂質の官能基と、該ペプチドの官能基とを、2価反応性化合物を介して連結する方法。ここで用いることができる2価反応性化合物は、反応性リン脂質の末端変性体調製において用いたものを同様に用いることができる。具体的には、アルデヒド基を有する2価反応性化合物として、グリオキサール、グルタルアルデヒド、サクシンジアルデヒド、テレフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましくは、グルタルアルデヒドが挙げられる。更に、コハク酸イミド基を有する2価反応性化合物として、ジチオビス(サクシイミジルプロピオネート)、エチレングリコール-ビス(サクシイミジルサクシネート)、ジサクシイミジルサクシネート、ジサクシイミジルスベレート、又はジサクシイミジルグルタレート等が挙げられる。また、片末端にサクシイミド基、もう一方の片末端にマレイミド基を有する2価反応性化合物として、N-サクシイミジル-4-(p-マレイミドフ

40

50

ェニル)ブチレート、スルホサクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル)ブチレート、N - サクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル)アセテート、N - サクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル)プロピオネート、サクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドエチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、スルホサクシンイミジル - 4 - (N - マレイミドエチル) - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート、N - ( - マレイミドブチリルオキシ)サクシンイミド、N - ( - マレイミドカプロイルオキシ)サクシンイミド等を使用することができる。かかる2価反応性化合物を使用すると、官能基としてマレイミド基を有する反応性リン脂質(例えばホスファチジルエタノールアミン)の末端変性体が得られる。

(B)リン脂質、反応性リン脂質、リポソームの安定化剤を含有するリポソームを調製し、これにペプチドを添加し、リポソームに含まれる反応性リン脂質の官能基と、該ペプチドの官能基を連結して結合させる方法。

【0073】

前記(A)及び(B)における結合の種類としては、例えば、イオン結合、疎水結合、共有結合等が挙げられるが、好ましくは共有結合である。更に共有結合の具体例としては、シッフ塩基結合、アミド結合、チオエーテル結合、エステル結合等が挙げられる。

【0074】

以上の2つの方法いずれとも、リポソームを構成するリン脂質膜に含まれる反応性リン脂質にペプチドを結合することができ、リポソームにおいてペプチドを結合したリン脂質が形成される。

【0075】

前記の(A)の方法において、原料となるリポソームとペプチドとを2価反応性化合物を介して結合させる方法の具体例としては、例えば、シッフ塩基結合を利用する方法が挙げられる。シッフ塩基結合を介してリポソームとペプチドとを結合する方法としては、アミノ基を表面に有するリポソームを調製し、ペプチドを該リポソームの懸濁液に添加し、次に、2価反応性化合物としてジアルデヒドを加え、リポソーム表面のアミノ基と該ペプチド中のアミノ基とをシッフ塩基を介して結合する方法を挙げることができる。

【0076】

この結合手順の具体例としては、例えば、次の方法が挙げられる。

(A-1)アミノ基を表面に有するリポソームを得るために、不飽和結合を1個有する炭素数14~24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14~24の炭化水素基を有する反応性リン脂質(例 ホスファチジルエタノールアミン)をリポソーム原料脂質(リン脂質、リポソームの安定化剤等)中に混合して、アミノ基がリポソーム表面に所定量存在するリポソームを作成する。

(A-2)前記リポソーム懸濁液に、ペプチドを添加する。

(A-3)次に、2価反応性化合物としてグルタルアルデヒドを加えて、所定の時間反応させてリポソームとペプチドとの間にシッフ塩基結合を形成する。

(A-4)その後、余剰のグルタルアルデヒドの反応性を失活させるため、アミノ基含有水溶性化合物としてグリシンをリポソーム懸濁液に加えて反応させる。

(A-5)ゲルろ過、透析、限外ろ過、遠心分離等の方法により、リポソームに未結合のペプチド、グルタルアルデヒドとグリシンとの反応産物、及び余剰のグリシンを除去して、本発明のペプチド結合リポソーム懸濁液を得る。

【0077】

前記の(B)の方法の具体例としては、アミド結合、チオエーテル結合、シッフ塩基結合、エステル結合等を形成することのできる官能基を有する反応性リン脂質を、リポソームを構成するリン脂質膜に導入する方法が挙げられる。このような官能基の具体例としては、サクシンイミド基、マレイミド基、アミノ基、イミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基等が挙げられる。

【0078】

リポソームを構成するリン脂質膜に導入する反応性リン脂質の例としては、前記の不飽

10

20

30

40

50



和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基又は不飽和結合を1個有する炭素数14～24の炭化水素基を有する反応性リン脂質(例 ホスファチジルエタノールアミン)のアミノ基末端の末端変性物を用いることができる。

【0079】

この結合手順の具体例として、ジアシルホスファチジルエタノールアミンを用いた場合を例にとって、以下説明する。

(B-1) 不飽和結合を1個有する炭素数14～24のアシル基を有するジアシルホスファチジルエタノールアミンとジサクシンイミジルサクシネートを公知の方法で片末端のみ反応させて、官能基としてサクシンイミド基を末端に有するジサクシンイミジルサクシネート結合ジアシルホスファチジルエタノールアミンを得る。

(B-2) 前記ジサクシンイミジルサクシネート結合ジアシルホスファチジルエタノールアミンと他のリボソーム構成成分(リン脂質、リボソームの安定化剤等)とを公知の方法で混合し、表面に官能基としてサクシンイミド基を有するリボソームを作成する。

(B-3) 前記リボソーム懸濁液に、ペプチドを加え、該ペプチド中のアミノ基と、リボソーム表面のサクシンイミド基とを反応させる。

(B-4) 未反応のペプチド、反応副生物等を、ゲルろ過、透析、限外ろ過、遠心分離等の方法により除去して、本発明のペプチド結合リボソームの懸濁液を得る。

【0080】

リボソームとペプチドとを結合する場合、官能基として含有されることが多いアミノ基又はチオール基を対象とすることが実用上好ましい。アミノ基を対象とする場合には、サクシンイミド基と反応させることによりシッフ塩基結合を形成させることができる。チオール基を対象とする場合には、マレイミド基と反応させることによりチオエーテル結合を形成させることができる。

【0081】

3. 本発明のペプチド及びペプチド結合リボソームの用途

本発明は、上記本発明のペプチド又は本発明のペプチド結合リボソームを含む細胞傷害性Tリンパ球活性化剤及びエボラウイルスワクチンを提供する。本発明のペプチドやペプチド結合リボソームを用いれば、HLA-A\*0201拘束的に、本発明のペプチド又はエピトープペプチドを認識する細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を強力に誘導することが可能となる。本発明のペプチドやペプチド結合リボソームにより誘導される細胞傷害性Tリンパ球は、エボラウイルス感染等の結果、HLA-A\*0201上に本発明のペプチド又はエピトープペプチドを提示した細胞を殺傷し、これらの細胞を除去することができる。従って、本発明のペプチドやペプチド結合リボソームは、細胞傷害性Tリンパ球活性化剤やエボラウイルスワクチンとして、エボラウイルス感染や該感染により引き起こされる疾患(エボラ出血熱等)の治療や予防に有用である。

【0082】

本発明のエボラウイルスワクチンが標的とするエボラウイルスの株の種類は、該エボラウイルス感染に対して予防又は治療効果が発揮される限り特に限定されない。エボラウイルスの株としては、ザイール株、スーダン株、レストン株、コートジボアール株、ブンディブギョ株等が挙げられる。配列番号1～14で表されるエピトープ配列は、ザイール株の対応するタンパク質(NP、VP40、GP、L又はVP30)のアミノ酸配列に含まれるので、本発明のエボラウイルスワクチンは、ザイール株に対して特に効果が期待される。また、本発明のエピトープ配列が保存されたザイール株以外のエボラウイルスの株に対しても、ザイール株と同様に、本発明のエボラウイルスワクチンは、優れた効果を発揮することが期待される。各本発明のエピトープ配列が保存されたエボラウイルスの株を以下に列挙する。

配列番号1：ザイール株、スーダン株、コートジボアール株、ブンディブギョ株

配列番号2：ザイール株、スーダン株、レストン株、コートジボアール株、ブンディブギョ株

配列番号3：ザイール株、コートジボアール株、ブンディブギョ株

配列番号 4 : ザイール株

配列番号 5 : ザイール株、スーダン株、レストン株、コートジボアール株、ブンディブギョ株

配列番号 6 : ザイール株

配列番号 7 : ザイール株

配列番号 8 : ザイール株、スーダン株、コートジボアール株、ブンディブギョ株

配列番号 9 : ザイール株

配列番号 10 : ザイール株

配列番号 11 : ザイール株、スーダン株、レストン株、コートジボアール株、ブンディブギョ株

配列番号 12 : ザイール株、コートジボアール株

配列番号 13 : ザイール株、コートジボアール株

配列番号 14 : ザイール株

#### 【 0 0 8 3 】

上に列挙された株以外であっても、当業者であれば、評価対象のエボラウイルス株において、目的とするエピトープ配列が保存されているか否かを、RT-PCRやダイレクトシーケンシング等の周知のヌクレオチド配列解析方法により、容易に決定することが出来る。

#### 【 0 0 8 4 】

本発明のペプチドやペプチド結合リポソームを細胞傷害性Tリンパ球活性化剤やエボラウイルスワクチンとして使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。本発明のペプチドやペプチド結合リポソームは低毒性であり、そのまま液剤として、又は適当な剤形の医薬組成物として、ヒト、非ヒト哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サル等）、鳥類（ニワトリ、ガチョウ、アヒル、ダチョウ、ウズラ等）等に対して経口的又は非経口的（例、血管内投与、皮下投与等）に投与することができる。本発明のペプチドやペプチド結合リポソームの投与対象は、通常、標的とするエボラウイルスが感染し得る哺乳動物（例、ヒト）であり、好ましくはHLA-A\*0201を発現するヒト又はトランスジェニック哺乳動物（例：HHDマウス（Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. The Journal of Experimental Medicine 1997; 185(12):2043-2051）等のトランスジェニックマウス）であり、最も好ましくはHLA-A\*0201を発現するヒトである。本発明のペプチドやペプチド結合リポソームは、通常、非経口的に投与される。

#### 【 0 0 8 5 】

本発明の細胞傷害性Tリンパ球活性化剤及びエボラウイルスワクチンは、その有効成分であるペプチド又はペプチド結合リポソーム自体を投与しても良いし、又は適当な医薬組成物として投与しても良い。投与に用いられる医薬組成物としては、上記ペプチド又はペプチド結合リポソームと薬理的に許容され得る担体、希釈剤又は賦形剤とを含むものであっても良い。このような医薬組成物は、経口又は非経口投与に適する剤形として提供される。

#### 【 0 0 8 6 】

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。このような注射剤は、公知の方法に従って調製できる。注射剤の調製方法としては、例えば、上記ペプチド又はペプチド結合リポソームを通常注射剤に用いられる無菌の水性溶媒に溶解又は懸濁することによって調製できる。注射用の水性溶媒としては、例えば、蒸留水；生理的食塩水；リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、トリス緩衝液、酢酸緩衝液等の緩衝液等が使用できる。このような水系溶媒のpHは5～10が挙げられ、好ましくは6～8である。調製された注射液は、適当なアンプルに充填されることが好ましい。

#### 【 0 0 8 7 】

また、本発明のペプチドの溶解液又は本発明のペプチド結合リポソームの懸濁液を、真

10

20

30

40

50

空乾燥、凍結乾燥等の処理に付すことにより、本発明のペプチド又は本発明のペプチド結合リポソームの粉末製剤を調製することもできる。本発明のペプチド又は本発明のペプチド結合リポソームを粉末状態で保存し、使用時に該粉末を注射用の水系溶媒で分散することにより、使用に供することができる。

#### 【0088】

本発明の細胞傷害性Tリンパ球活性化剤及びエボラウイルスワクチンは、その効果を増強するため、アジュバントをさらに含有してもよい。アジュバントとしては、水酸化アルミニウムゲル、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、百日咳菌アジュバント、ポリ(I, C)、CpG-DNA等が挙げられるが、CpG-DNAがとりわけ好ましい。CpG-DNAは細菌の非メチル化CpGモチーフを含むDNAであり、特定の受容体(Toll-like receptor 9)のリガンドとしてはたらくことが知られている(詳細はBiochim. Biophys. Acta 1489, 107-116 (1999)及びCurr. Opin. Microbiol. 6, 472-477 (2003)参照)。CpG-DNAは樹状細胞(DC)を活性化することにより、本発明のペプチド又はペプチド結合リポソームによる細胞傷害性Tリンパ球の誘導を増強することができる。

10

#### 【0089】

医薬組成物中の有効成分(本発明のペプチド又はペプチド結合リポソーム)の含有量は、通常、医薬組成物全体の約0.1~100重量%、好ましくは約1~99重量%、さらに好ましくは約10~90重量%程度である。

#### 【0090】

本発明の細胞傷害性Tリンパ球活性化剤又はエボラウイルスワクチンがアジュバントを含む場合、該アジュバント(例えばCpG-DNA)の含有量は、細胞傷害性Tリンパ球の誘導を増強し得る範囲で適宜設定することができるが、通常、医薬組成物全体の約0.01~10重量%、好ましくは約0.1~5重量%程度である。

20

#### 【0091】

本発明のペプチド又は本発明のペプチド結合リポソームの投与量は、投与する対象、投与方法、投与形態等によって異なるが、例えば、皮下投与或いは経鼻投与により生体内の細胞傷害性Tリンパ球を活性化する場合には、通常成人1人(体重60kg)あたり本発明のペプチドとして一回当たり1 $\mu$ g~1000 $\mu$ gの範囲、好ましくは20 $\mu$ g~100 $\mu$ gの範囲で、通常4週間から18ヶ月に亘って、2回から3回投与する。また、皮下投与によりエボラウイルス感染を予防する場合には、本発明のペプチドとして一回当たり1 $\mu$ g~1000 $\mu$ gの範囲、好ましくは20 $\mu$ g~100 $\mu$ gの範囲で、通常4週間から18ヶ月に亘って、2回から3回投与する。更に、皮下投与によりエボラウイルス感染に起因する疾患(例、エボラ出血熱)を治療する場合には、本発明のペプチドとして一回当たり1 $\mu$ g~1000 $\mu$ gの範囲、好ましくは20 $\mu$ g~100 $\mu$ gの範囲で、通常4週間から18ヶ月に亘って、2回から3回投与する。

30

#### 【0092】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものではない。

#### 【実施例】

40

#### 【0093】

#### [参考例1]

#### リポソームの調製

#### 1) 脂質混合粉末の調製

末端変性ホスファチジルエタノールアミンからなる反応性リン脂質(サクシンイミジル基-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン)の合成

ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン2g及びトリエチルアミン180 $\mu$ lをクロロホルム50mlに溶解及び添加し、300ml容の4つ口フラスコに入れた。このフラスコをマグネットスターで室温で攪拌しつつ、別に調製した2価反応性化合物であるジサクシンイミジルスベレート3gをクロロホルム80mlに溶解した溶液を、常法に従って4時間に亘って滴

50

下し、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基にジサクシンイミジルスベレートの片末端を反応させた。この粗反応溶液をナス型フラスコに移し、エバポレータによって溶媒を留去した。次に、このフラスコに粗反応物を溶解できるだけのクロロホルムを少量加えて高濃度粗反応物溶液を得、クロロホルム/メタノール/水(65/25/1、体積比)で平衡化したシリカゲルを用いて常法に従ってカラムクロマトグラフィーを行い、目的のジオレオイルホスファチジルエタノールアミンのアミノ基にジサクシンイミジルスベレートの片末端が結合した画分のみを回収し、溶媒を留去して目的の反応性リン脂質であるサクシンイミド基-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミンを得た。

## 2) 脂質混合粉末の調製

ジオレオイルホスファチジルコリン1.3354g(1.6987mmol)、前項で調製したサクシンイミド基-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン0.2886g(0.2831mmol)、コレステロール0.7663g(1.9818mmol)及びジオレオイルホスファチジルグリセロールNa塩0.4513g(0.5662mmol)をナス型フラスコに取り、クロロホルム/メタノール/水(65/25/4、容量比)混合溶剤50mlを入れ、40℃にて溶解した。次にロータリーエバポレーターを使用して減圧下で溶剤を留去し、脂質の薄膜を作った。更に注射用蒸留水を30ml添加し、攪拌して均一のスラリーを得た。このスラリーを凍結させ、凍結乾燥機にて24時間乾燥させ脂質混合粉末を得た。

## 3) リポソームの調製

次に、別途作製した緩衝液(1.0mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.25M サッカロース、pH7.4、以後緩衝液と略す)60mlを上記脂質混合粉末の入ったナス型フラスコ内に入れ、40℃にて攪拌しながら脂質を水和させ、リポソームを得た。次にエクストルーダーを用いてリポソームの粒径を調整した。まず8µmのポリカーボネートフィルターを通過させ、続いて5µm、3µm、1µm、0.65µm、0.4µm及び0.2µmの順にフィルターを通過させた。リポソーム粒子の平均粒径206nm(動的光散乱法による測定)が得られた。

【0094】

[実施例1]

### CTLエピトープの検索

エボラウイルス(ザイル株)polyproteinのアミノ酸配列から、モチーフ配列等に基づき、HLA-A\*0201拘束性CTLのエピトープの候補を94種類選択した。これらのエピトープからなるペプチド(9アミノ酸長)について、以下の方法によりHLA-A\*0201に対する結合性を評価した。

【0095】

RMA-S-HHD細胞を26℃にて終夜インキュベートした。その後、RMA-S-HHD細胞を、種々の濃度の評価対象のペプチドと供に、37℃で3時間インキュベートした。細胞を回収し、コンフォメーション感受性の抗HLA-A\*0201モノクローナル抗体(BB7.2)(1次抗体)にて処理し、引き続きFITC標識した2次抗体で染色した後、フローサイトメトリーによりHLA-A\*0201の発現を解析した。RMA-S-HHD細胞は、TAPを欠損しているため、26℃において、自己ペプチドが結合していない空の(empty)HLA-A\*0201を安定に発現する。一方、37℃では、ペプチドが結合していない空の(empty)HLA-A\*0201は不安定であり、BB7.2はこれを認識できないため、評価対象のペプチド存在下で37℃にてインキュベートした後のHLA-A\*0201の発現をBB7.2にて解析することにより、評価対象のペプチドのHLA-A\*0201への結合性を評価することができる。

【0096】

各ペプチドについてBL<sub>50</sub>(µM)を算出した。BL<sub>50</sub>は、26℃にて14~16時間インキュベートしたRMA-S-HHD細胞の半最大MFI(half-maximal MFI)を与える各ペプチドの濃度を意味する。結果を表1に示す。

【0097】

【表 1】

Peptide	BL50
L-Q	108.6
L-R	238.1
L-S	1295
L-T	231.3
L-d	5590.3
L-771	98.4
L-e	540.6
L-U	98
L-V	113.4
L-W	224.5
L-X	157.9
L-Y	84.2
L-Z	116.5
L-A-A	162.2
L-A-B	100.2
L-932	93.1
L-f	218.9
L-A-C	63.4
L-A-D	99.5
L-A-E	161.1
L-A-F	118
L-A-G	51.5

Peptide	BL50
L-A	178.6
L-B	122.7
L-C	100.2
L-D	89.7
L-E	45.3
L-F	63.5
L-G	-80.1
L-H	214
L-I	57.3
L-1955	106.7
L-J	191.5
L-293	113.3
L-K	101.2
L-a	3570.1
L-L	-161.2
L-M	388.1
L-b	69.2
L-c	95.7
L-209	91.8
L-N	149.7
L-O	189.9
L-1099	195.2
L-P	76.5

Peptide	BL50
GP-A	145.6
GP-B	126.1
GP-25	152.4
GP-160	55
GP-C	3500.7
GP-D	150.1
GP-252	72.5
GP-E	128.3
GP-F	3561.7
GP-546	138

Peptide	BL50
VP30-a	349.9
VP30-94	113.2
VP30-b	633.1

Peptide	BL50
VP24-A	78.7
VP24-B	191.5
VP24-C	142.5
VP24-D	168
VP24-E	-362.4
VP24-F	233.6
VP24-a	219.2
VP24-G	1055.5
VP24-H	340.9

Peptides	BL50
NP-A	66.3
NP-B	85.5
NP-C	352.7
NP-D	178.9
NP-E	251.5
NP-56	116.4
NP-401	129.9
NP-F	410.9
NP-G	90.3
NP-H	144.1
NP-I	127.3
NP-J	196.7
NP-K	93.4

Peptides	BL50
VP35-A	311.2
VP35-B	53.6
VP35-C	139.4
VP35-D	-2224.7
VP35-E	112.4
VP35-F	90.7
VP35-G	600.3
VP35-H	106.3
VP35-a	84.7
VP35-I	157

Peptide	BL50
VP40-A	139
VP40-73	322.7
VP40-B	223.7
VP40-C	-1998

【0098】

[実施例 2]

エボラウイルス特異的 CD8<sup>+</sup> / IFN-<sup>+</sup> T細胞誘導能の評価

実施例 1 に記載した 94 種類のエピトープペプチドについて、エボラウイルス特異的 CD8<sup>+</sup> / IFN-<sup>+</sup> T細胞誘導能を評価した。

評価対象のペプチド (10 μM) でパルスした 2 × 10<sup>7</sup> 個の同種同系脾臓細胞で、HHD マウスを免疫した。HHD マウスにおいては、マウス固有の MHC クラス I 遺伝子である H-2D、及びマウス 2-microglobulin 遺伝子がノックアウトされ、ヒトの HLA-A\*0201 及びヒト 2-microglobulin 遺伝子が導入され発現している (Pascolo S, Bervas N, Ure JM, Smith AG, Lemonnier FA, Perarnau B. The Journal of Experimental Medicine 1997; 185(12):2043-2051)。1 週間後、免疫したマウスからの脾臓細胞を、10 μM の対応する

10

20

30

40

50

評価対象のペプチドと共に、プレフェルジンAの存在下、5時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター中でインキュベートした。

細胞を回収し、細胞上のFcレセプターをブロックするために抗マウスCD16/CD32モノクローナル抗体を加え、FITC標識抗マウスCD8モノクローナル抗体で染色した。細胞を固定し、透過処理し、PE標識抗マウスIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体でさらに染色した後、フローサイトメトリーにより解析した。CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T細胞の割合の増加により、CTL誘導能を評価した。

【0099】

評価した94種類のエピトープペプチドのうち、図1に示す24種類のエピトープペプチドが各エピトープに特異的なCTLを誘導した。

【0100】

[実施例3]

ペプチド結合リポソームのエボラウイルス特異的CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T細胞誘導能の評価

1) ペプチド結合リポソーム製剤の調製

実施例2においてCTL誘導活性を示した24種類のエピトープペプチドを用いて、ペプチド結合リポソームを以下の方法により調製した。

参考例1(リポソームの調製)のリポソーム1.5mlを試験管に採取し、別に調製した3mlの各ペプチドプール溶液を加えた後、5分間で48時間穏やかに攪拌し反応させた。この反応液を、緩衝液で平衡化したSepharoseCL-4Bを用いて常法に従ってゲル濾過した。尚、リポソーム画分は白濁しているため、目的画分は容易に確認できるが、UV検出器等で確認しても良い。

得られたリポソーム懸濁液中のリン濃度を測定し(リン脂質テストWako)、リン脂質由来のリン濃度を2mMになるように濃度を緩衝液で希釈調整し、各ペプチド結合リポソームの懸濁液を得た。

【0101】

2) エボラウイルス特異的CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T細胞誘導能の評価

CpGと共に、評価対象のペプチド結合リポソームでHHDMウスを免疫した。1週間後、免疫したマウスからの脾臓細胞を、10 $\mu$ Mの対応する評価対象のペプチドと共に、プレフェルジンAの存在下、5時間、CO<sub>2</sub>インキュベーター中でインキュベートした。

細胞を回収し、細胞上のFcレセプターをブロックするために抗マウスCD16/CD32モノクローナル抗体を加え、FITC標識抗マウスCD8モノクローナル抗体で染色した。細胞を固定し、透過処理し、PE標識抗マウスIFN- $\gamma$ モノクローナル抗体でさらに染色した後、フローサイトメトリーにより解析した。CD8<sup>+</sup>/IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>T細胞の割合の増加により、CTL誘導能を評価した。

【0102】

評価した24種類のエピトープペプチドのうち、以下の14種類のエピトープペプチドを用いて調製したペプチド結合リポソームが、有意にCTLを誘導した。

NP-56: 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

NP-401: 配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

VP40-73: 配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

GP-25: 配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

GP-160: 配列番号5で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

GP-252: 配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

GP-546: 配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

VP30-94: 配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

L-209: 配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

L-293: 配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

L-771: 配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

10

20

30

40

50

L - 932 : 配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。  
 L - 1099 : 配列番号13で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。  
 L - 1955 : 配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるペプチド。

【0103】

これら14種類のエピトープペプチドに関する結果を図2に示す。特に、NP56、L293及びL209のCTL誘導能が強力であった。VP40-73、GP160及びGP252は、2回免疫した場合に、強力的にCTLを誘導した。

【0104】

[実施例4]

インビボにおけるCTL活性誘導能の評価

HHDマウスを、リポソームに結合したそれぞれの評価対象のペプチド(0.5 µg/µlを100 µl/匹)及びCpG5002 (Vaccine 25, 4914-4921 (2007)参照) (5 µg/匹)で1回免疫した。免疫7日後に、別のナイーブなHHDマウスから脾細胞を調製した。2 × 10<sup>8</sup>個の脾細胞を2 mlのRPMI 1640にサスペンドし、そのサスペンションを1 mlずつ2本のチューブに分けた。片方のチューブに免疫に使用したペプチド(10 µM)を加え、37 °Cで1時間インキュベートすることにより、脾細胞を該ペプチドでパルスした。脾細胞を遠心分離し、上清を除いた。脾細胞を10 mlのT10により1回洗浄し、遠心分離し、上清を除いた。脾細胞のペレットに20 mlのPBS/0.1%BSAを加え、素早くボルテックスすることにより脾細胞を再分散した。脾細胞の分散液に5 mMのCFSEを10 µl加え(最終濃度: 2.5 µM)、素早くボルテックスし、37 °Cで10分間インキュベートすることにより、ペプチドでパルスした脾細胞を濃い蛍光色素(CFSE)で標識した。もう片方のチューブにはペプチドを加えないで、薄い蛍光色素(CFSE)(最終濃度: 0.25 µM)で標識した。双方の脾細胞を遠心分離し、上清を除いた。洗浄した脾細胞に10 mlのR10を加え、遠心分離し、上清を除いた。双方の脾細胞をそれぞれHBSS(又は血清不含RPMI)に再懸濁し、5 × 10<sup>7</sup>個/mlの濃度に調整した。この2グループの細胞懸濁液を同体積混ぜて、免疫したマウスの静脈内に注射することにより、脾細胞を移入(1 × 10<sup>7</sup>個/匹)した。翌日(移入から4~12時間後)、マウスを安楽殺した後に脾臓を回収して、その中の濃い蛍光色素(CFSE)2.5 µMで標識した標的細胞の減少率をフローサイトメーターにより解析した。

【0105】

図3に示されるように、いずれのペプチド結合リポソームも、インビボにおいて各エピトープに特異的なCTL活性を誘導した。特に、NP56、NP401、VP40-73、GP160、GP252、L1955、L293、L209、L1099、L771及びVP30-94の誘導能が強力であった。

【産業上の利用可能性】

【0106】

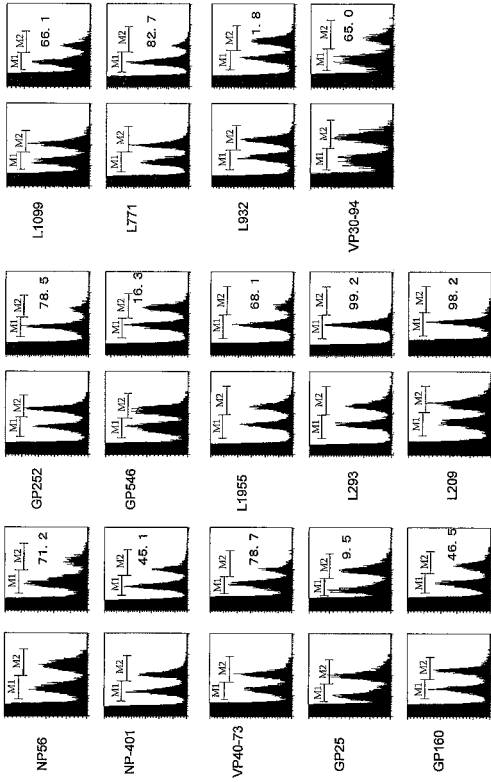
本発明のペプチド又はペプチド結合リポソームを用いれば、エボラウイルスに対する細胞傷害性Tリンパ球を効率よく誘導することができ、エボラウイルス感染に対する優れた治療又は予防効果が期待できる。

10

20

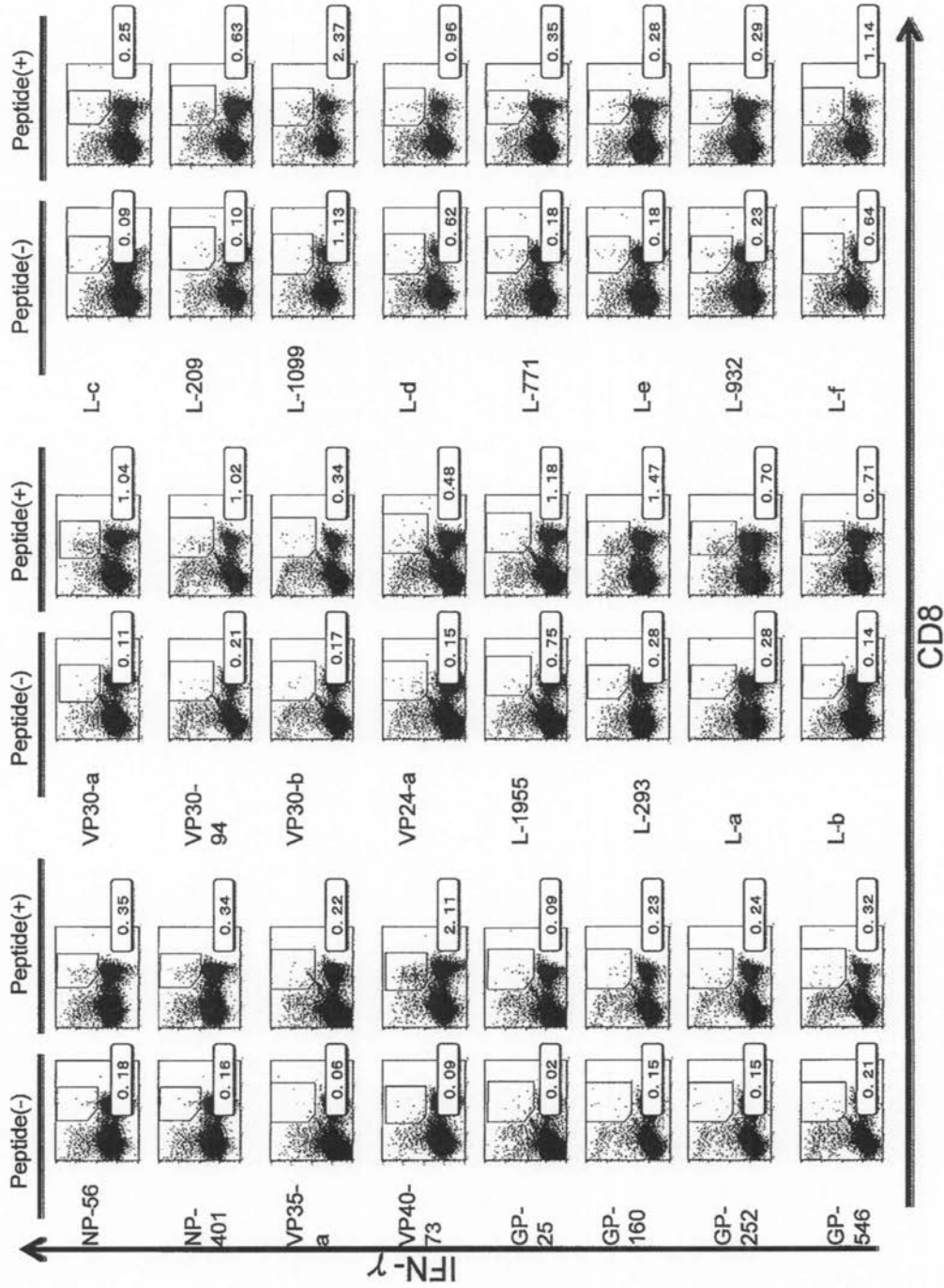
30

【 3 】

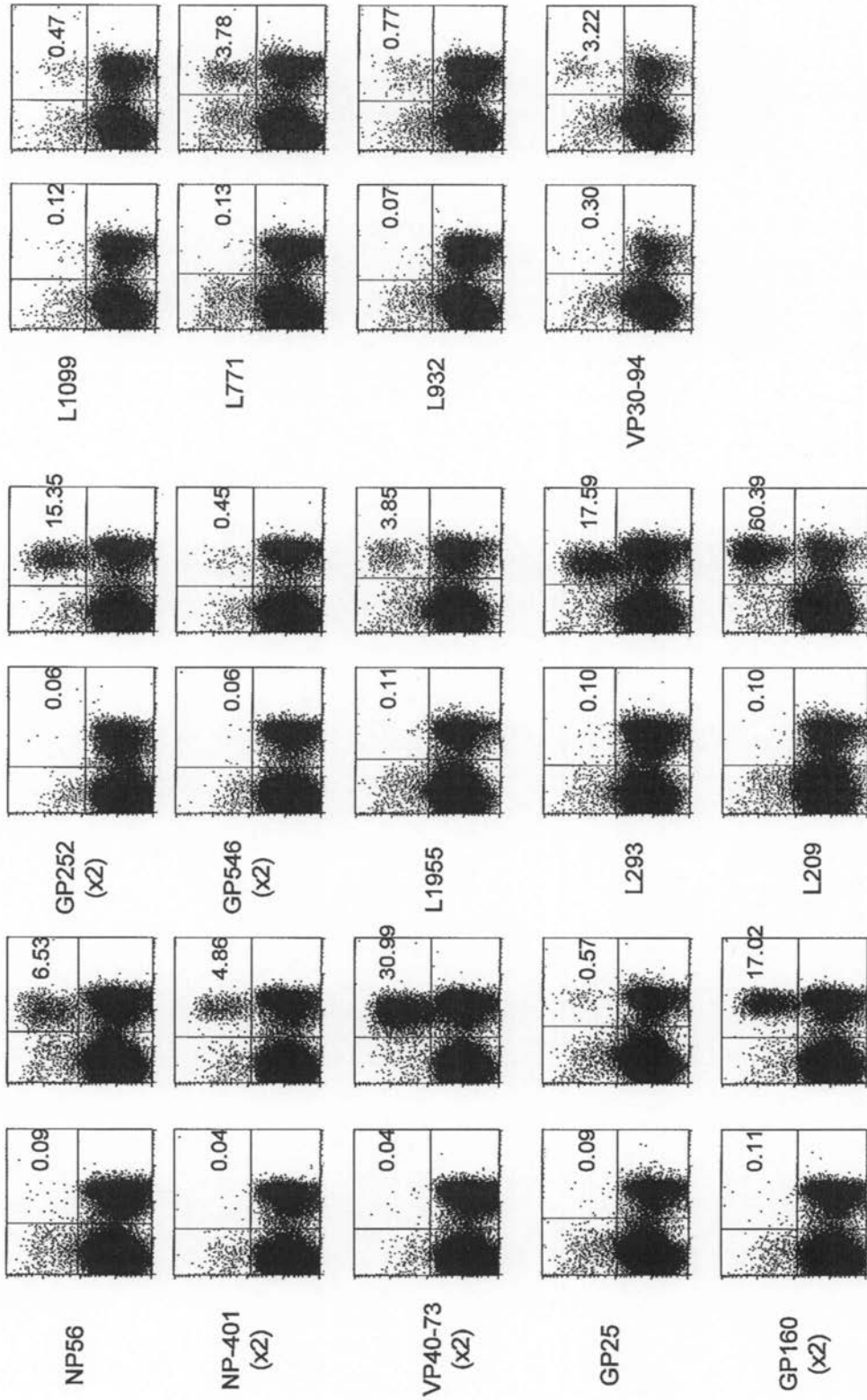




【 1 】



【 図 2 】



【 配列表 】

2014005205000001.app

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 47/28 (2006.01)</b>	A 6 1 K 47/28	
<b>A 6 1 K 39/12 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/12	
<b>A 6 1 P 31/14 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/14	
C 1 2 N 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/00	2 0 2 L
C 1 2 N 7/04 (2006.01)	C 1 2 N 7/04	
(74)代理人 100121212 弁理士 田村 弥栄子		
(74)代理人 100122688 弁理士 山本 健二		
(74)代理人 100117743 弁理士 村田 美由紀		
(74)代理人 100163658 弁理士 小池 順造		
(72)発明者 松井 政則 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷 3 8 学校法人 埼玉医科大学内		
(72)発明者 内田 哲也 東京都新宿区戸山 1 - 2 3 - 1 国立感染症研究所内		
(72)発明者 種市 麻衣子 東京都新宿区戸山 1 - 2 3 - 1 国立感染症研究所内		
(72)発明者 三熊 愛 神奈川県川崎市川崎区千鳥町 3 - 3 日油株式会社内		
(72)発明者 横山 晶一 神奈川県川崎市川崎区千鳥町 3 - 3 日油株式会社内		
F ターム (参考) 4B065 AA94X AA95X BD39 CA24 CA45 4C076 AA19 AA95 CC06 CC35 DD63 DD70 4C084 AA02 AA03 AA07 BA01 CA01 NA14 ZB33 4C085 AA03 AA38 BA51 CC08 4H045 AA10 AA20 AA30 BA15 CA01 CA42 DA86 EA31 FA20 FA74		