

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/061924

発行日 平成24年4月26日 (2012. 4. 26)

(43) 国際公開日 **平成22年6月3日 (2010. 6. 3)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06 ZNA	4C076
A61K 47/48 (2006.01)	A61K 47/48	4C085
A61K 9/127 (2006.01)	A61K 9/127	4H045
A61P 31/16 (2006.01)	A61P 31/16	
A61P 37/04 (2006.01)	A61P 37/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 29 頁) 最終頁に続く		

出願番号 特願2010-540529 (P2010-540529)	(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
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/070053	
(22) 国際出願日 平成21年11月27日 (2009.11.27)	
(31) 優先権主張番号 特願2008-303444 (P2008-303444)	(71) 出願人 504173471 国立大学法人北海道大学 北海道札幌市北区北8条西5丁目
(32) 優先日 平成20年11月28日 (2008.11.28)	(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
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(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
	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鳥インフルエンザワクチン

(57) 【要約】

本発明は、ペプチドが結合したリポソームを含む鳥インフルエンザウイルスワクチンであって、
 該ペプチドが、(1) 配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、又は(2) 配列番号1~9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、
 9~11アミノ酸の長さを有し、且つ
 HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものであり；
 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、
 鳥インフルエンザウイルスワクチンを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

HLA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7、3又は8のいずれかで表されるアミノ酸配列、或いは(2)配列番号7、3又は8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。

【請求項 2】

HLAがHLA - A * 0201又はHLA - A * 2402である、請求項 1 記載のペプチド。

【請求項 3】

ペプチドが結合したリポソームであって、
該ペプチドが、(1)配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、又は(2)配列番号1~9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、

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものであり；

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。

【請求項 4】

HLAがHLA - A * 0201又はHLA - A * 2402である、請求項 3 記載のペプチド結合リポソーム

。

【請求項 5】

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 3 記載のペプチド結合リポソーム。

【請求項 6】

アシル基がオレオイル基である、請求項 3 記載のペプチド結合リポソーム。

【請求項 7】

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 3 記載のペプチド結合リポソーム。

【請求項 8】

リポソームの安定化剤がコレステロールである、請求項 3 記載のペプチド結合リポソーム。

【請求項 9】

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 3 記載のペプチド結合リポソーム。

【請求項 10】

リポソームが以下の組成を有する、請求項 3 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 0.2~75モル%。

【請求項 11】

リポソームが以下の組成を有する、請求項 3 記載のペプチド結合リポソーム：

(1) 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%；

10

20

30

40

50

(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%；

(IV) リポソームの安定化剤 0.2~75モル%。

【請求項12】

ペプチドを含む、細胞傷害性Tリンパ球活性化剤であって、
該ペプチドが、(1) 配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、又は(2) 配列番号1~9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、

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものである、
細胞傷害性Tリンパ球活性化剤。

【請求項13】

請求項3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14】

更にCpG-DNAを含有することを特徴とする、請求項12又は13記載の細胞傷害性Tリンパ球活性化剤。

【請求項15】

ペプチドを含む、鳥インフルエンザウイルスワクチンであって、
該ペプチドが、(1) 配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、又は(2) 配列番号1~9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、

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものである、
鳥インフルエンザウイルスワクチン。

【請求項16】

請求項3記載のペプチド結合リポソームを含む、鳥インフルエンザウイルスワクチン。

【請求項17】

更にCpG-DNAを含有することを特徴とする、請求項15又は16記載の鳥インフルエンザウイルスワクチン。

【請求項18】

細胞傷害性T細胞の活性化において使用するためのペプチドであって、
該ペプチドが、(1) 配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、或いは(2) 配列番号1~9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、

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものである、ペプチド。

【請求項19】

細胞傷害性T細胞の活性化において使用するための、請求項3記載のペプチド結合リポソーム。

【請求項20】

細胞傷害性T細胞の活性化において使用するための、請求項3記載のペプチド結合リポソーム及びCpG-DNAを含有する医薬組成物。

【請求項21】

鳥インフルエンザに対するワクチン接種において使用するためのペプチドであって、
該ペプチドが、(1) 配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、或いは(2) 配列番号1~9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、

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

10

20

30

40

50

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものである、ペプチド。

【請求項22】

鳥インフルエンザに対するワクチン接種において使用するための、請求項3記載のペプチド結合リポソーム。

【請求項23】

鳥インフルエンザに対するワクチン接種において使用するための、請求項3記載のペプチド結合リポソーム及びCpG-DNAを含有する医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、鳥インフルエンザワクチンとして有用なペプチド、ペプチド結合リポソーム、及びそれらの用途に関する。

【背景技術】

【0002】

インフルエンザウイルスは、表面の抗原性を連続変異で変化させ、毎年流行を引き起こしている。加えて約10年から40年の周期で、それらとは不連続変異により全く異なる抗原性の新型のウイルスが出現し、その新型のウイルスに対する免疫を有しない人類に、世界的大流行（以下「パンデミック」という）を引き起こしてきた。

【0003】

過去のスペイン風邪、香港風邪等のパンデミックは鳥インフルエンザウイルスに由来するものであった可能性が高いといわれており、将来鳥インフルエンザによって500万～1億5000万人の死者が出る可能性があるとの試算結果もある。現在致死率の高い高病原性鳥インフルエンザ（H5N1）の感染が世界各地で報告されてきており、有効な対策が急務となっている。

【0004】

鳥インフルエンザウイルスを含め、一般的に、インフルエンザウイルスは増殖の過程で突然変異を起こしやすい。更に、人間に感染したウイルスが体内でヒトインフルエンザウイルスと遺伝子再集合をした場合、高病原性を保持したまま人間同士での感染力の高いウイルスが生まれる可能性もある。こういったウイルス本体の頻繁な変化が、上記のような流行を繰り返す原因となっている。

【0005】

点突然変異（抗原連続変異）はウイルス表面糖タンパク質[ヘマグルチニン（赤血球凝集素；HA）及びノイラミニダーゼ（NA）]をコードする遺伝子に生じ、抗原の不連続変異では両遺伝子が免疫学的に異なった新規の株が生じることになる。

【0006】

従来ワクチンでは、インフルエンザウイルスの表面タンパク質に特異的に結合する抗体の産生を誘導し、この抗体の作用によってウイルスの感染能力を失わせる。しかしながら上記のように表面タンパク質は変異しやすく、このようなワクチンによって誘導される抗体が必ずしも常に有効なわけではなかった。現状では、流行するウイルスの型を予想してワクチンを準備しているが、その予想が外れ、被害が拡大することもあり得る。

【0007】

他方、インフルエンザウイルスの内部タンパク質は連続変異株及び不連続変異株内でも比較的高度に保存されるが、これにウイルス外部から抗体を結合させて失活させることは困難であり、従来ワクチンの標的として積極的には用いられてこなかった。

【0008】

ウイルスが感染した細胞はウイルス内部タンパク質のアミノ酸配列の1部を組み込んだ主要組織適合抗原複合体（MHC）を細胞表面に露出する。このような特徴を示すウイルス感染細胞を特異的に殺傷できる細胞傷害性Tリンパ球を調製できれば、それによって変異に影響されずにウイルスの複製、ひいては増殖及び拡散を効果的に防ぐことができる。

【0009】

10

20

30

40

50

特許文献1には、抗原が結合したリポソームを用いて、病原体感染細胞又は癌細胞を殺傷するための細胞傷害性Tリンパ細胞（CD8⁺T細胞、サイトトキシンホサイト：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。しかし、実際に鳥インフルエンザウイルスの感染防御に有効となり得るのか、更には有効な細胞傷害性Tリンパ球を調製するためには、どのような抗原を用いたらよいのかは、全く明らかではなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2008-37831号公報

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明が解決しようとする課題は、ウイルス突然変異の影響を受けにくい、高病原性鳥インフルエンザウイルスの感染を効果的に予防するための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】

【0012】

本発明者らは、前記課題を解決すべく鋭意検討した結果、高病原性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に、上記細胞傷害性Tリンパ球の調製に特別に有効な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リンパ球を誘導し得ることを見出し、本発明を完成させた。

20

【0013】

即ち、本発明は以下に示すとおりである。

[1] HLA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7、3又は8のいずれかで表されるアミノ酸配列、或いは(2)配列番号7、3又は8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。

30

[2] HLAがHLA-A*0201又はHLA-A*2402である、[1]記載のペプチド。

[3] ペプチドが結合したリポソームであって、

該ペプチドが、(1)配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、又は(2)配列番号1~9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、

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものであり；

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、

40

ペプチド結合リポソーム。

[4] HLAがHLA-A*0201又はHLA-A*2402である、[3]記載のペプチド結合リポソーム。

[5] 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、[3]記載のペプチド結合リポソーム。

[6] アシル基がオレオイル基である、[3]記載のペプチド結合リポソーム。

[7] 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

50

である、[3] 記載のペプチド結合リポソーム。

[8] リポソームの安定化剤がコレステロールである、[3] 記載のペプチド結合リポソーム。

[9] 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、[3] 記載のペプチド結合リポソーム。

[10] リポソームが以下の組成を有する、[3] 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 0.2~75モル%。

10

[11] リポソームが以下の組成を有する、[3] 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 1~85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%；

(IV) リポソームの安定化剤 0.2~75モル%。

[12] ペプチドを含む、細胞傷害性Tリンパ球活性化剤であって、

該ペプチドが、(1) 配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、又は(2) 配列番号1~9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、

20

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものである、細胞傷害性Tリンパ球活性化剤。

[13] [3] 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。

[14] 更にCpG - DNAを含有することを特徴とする、[12] 又は[13] 記載の細胞傷害性Tリンパ球活性化剤。

[15] ペプチドを含む、鳥インフルエンザウイルスワクチンであって、

30

該ペプチドが、(1) 配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、又は(2) 配列番号1~9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、

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものである、鳥インフルエンザウイルスワクチン。

[16] [3] 記載のペプチド結合リポソームを含む、鳥インフルエンザウイルスワクチン。

[17] 更にCpG - DNAを含有することを特徴とする、[15] 又は[16] 記載の鳥インフルエンザウイルスワクチン。

40

[18] 細胞傷害性T細胞の活性化において使用するためのペプチドであって、

該ペプチドが、(1) 配列番号1~9のいずれかで表されるアミノ酸配列、或いは(2) 配列番号1~9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、

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものである、ペプチド。

[19] 細胞傷害性T細胞の活性化において使用するための、[3] 記載のペプチド結合リポソーム。

[20] 細胞傷害性T細胞の活性化において使用するための、[3] 記載のペプチド結合リポソーム及びCpG-DNAを含有する医薬組成物。

50

[2 1] 鳥インフルエンザに対するワクチン接種において使用するためのペプチドであって、

該ペプチドが、(1) 配列番号 1 ~ 9 のいずれかで表されるアミノ酸配列、或いは(2) 配列番号 1 ~ 9 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、

9~11アミノ酸の長さを有し、且つ

HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得るものである、ペプチド。

[2 2] 鳥インフルエンザに対するワクチン接種において使用するための、[3] 記載のペプチド結合リポソーム。

[2 3] 鳥インフルエンザに対するワクチン接種において使用するための、[3] 記載のペプチド結合リポソーム及びCpG-DNAを含有する医薬組成物。

10

【発明の効果】

【 0 0 1 4 】

本発明のペプチド及びペプチド結合リポソームを用いることにより、保存性が高い鳥インフルエンザウイルスの内部タンパク質由来の抗原から鳥インフルエンザワクチンを調製できる。本発明により、従来鳥インフルエンザワクチンとは異なる、ウイルス表面タンパク質変異の影響を受けにくく、流行ウイルス株(型・亜型)の正確な予測を要しない、汎用性の高い鳥インフルエンザワクチンを提供できる。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 5 】

本発明は、HLA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 ~ 9 のいずれかで表されるアミノ酸配列、又は(2) 配列番号 1 ~ 9 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。

20

【 0 0 1 6 】

本発明は、高病原性鳥インフルエンザウイルス抗原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 ~ 9 のいずれかで表されるアミノ酸配列
- ・ 配列番号 1 ~ 9 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HLAに拘束された細胞傷害性Tリンパ球を誘導し得る)。

30

【 0 0 1 7 】

配列番号 1 ~ 9 で表されるアミノ酸配列は、高病原性鳥インフルエンザウイルスA/Hong Kong/483/97(H5N1)の内部タンパク質、PA(配列番号 2 及び 3)、PB1(配列番号 1、4、5、6 及び 9)及びPB2(配列番号 7 及び 8)のアミノ酸配列中に存在する部分配列に相当する。

【 0 0 1 8 】

(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HLA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、異なる鳥インフルエンザウイルス株(型・亜型)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。そのような例としては、例えば、以下を挙げることができる。

40

MYQKCCTLF (配列番号 6)	MYQRCCNLF (配列番号 10)	PR8 (H1N1)
KTTTPRPLRL (配列番号 3)	KTTTPRPIKL (配列番号 11)	Moscow (H3N2)
RYTKTTYWW (配列番号 4)	KYTKTTYWW (配列番号 12)	Moscow (H3N2)
SYINRTGTF (配列番号 5)	SYINKTGTF (配列番号 13)	Moscow (H3N2)
MYQKCCTLF (配列番号 6)	MYQKCCNLF (配列番号 14)	Moscow (H3N2)
SYLIRALTL (配列番号 9)	GYLIRALTL (配列番号 15)	Moscow (H3N2)

【 0 0 1 9 】

本発明のエピトープ配列、及び該配列からなるペプチド(本発明のエピトープペプチド

50

)は、以下の優れた特性を有する：

(A)本発明のエピトープ配列は、鳥インフルエンザウイルスの連続変異株及び不連続変異株において高度に保存されている。

(B)本発明のエピトープペプチドは、ヒト主要組織適合性抗原(HLA)上に安定に提示される。HLAの型は特に限定されないが、本発明のエピトープペプチドは特に世界的に最もポピュラーなHLAの型であるHLA-A*0201及びHLA-A*2402への結合性に優れている。

(C)本発明のエピトープペプチドは、上記(B)の特性を有するため、HLA(好ましくはHLA-A*0201又はHLA-A*2402)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HLA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HLA(例えばHLA-A*0201又はHLA-A*2402)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HLA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(例えば細胞傷害活性)が上昇することを意味する。上述のように、HLA-A*0201及びHLA-A*2402は世界的に最もポピュラーであることから、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。以上のような観点から、HLA-A*0201拘束性のPB1_410:GMFNLSTV(配列番号1)並びにHLA-A*2402拘束性のPA_130:YYLEKANKI(配列番号2)、PA_262:KTTPRPLRL(配列番号3)、PB1_430:RYTKTTYWW(配列番号4)、PB1_482:SYINRTGTF(配列番号5)、PB1_688:MYQKCCTLF(配列番号6)及びPB2_549:TYQWIIIRNW(配列番号7)のエピトープが好ましく、PB1_410:GMFNLSTV(配列番号1)、PA_130:YYLEKANKI(配列番号2)、PB1_430:RYTKTTYWW(配列番号4)、PB1_688:MYQKCCTLF(配列番号6)及びPB2_549:TYQWIIIRNW(配列番号7)がとりわけ好ましい。

【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鳥インフルエンザウイルスワクチンの製造に供した場合、鳥インフルエンザウイルスが感染した細胞の殺傷や鳥インフルエンザウイルスの感染防御に優れた効果を発揮する。

【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。本発明のペプチドの長さが10アミノ酸以上である場合には、本発明のペプチドは、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、本発明の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、鳥インフルエンザウイルス(例えば高病原性鳥インフルエンザウイルスA/Hong_Kong/483/97(H5N1))のPA、PB1及びPB2タンパク質のアミノ酸配列中で、配列番号1~9のいずれかに相当する部分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。また上記ペプチドが、細胞内で主要組織適合抗原複合体(MHC)を形成する際に、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であればとりわけ好ましい。

【0022】

一つの好ましい態様において、本発明のペプチドは、複数種(例えば2~9種類、好ましくは5~9種類)の上記本発明のエピトープ配列を含む。エピトープ配列の種類の数や組み合わせは任意に設定することができる。このように本発明のペプチド中に複数の本発明のエピトープ配列が含まれることにより、本発明のペプチドの細胞傷害性Tリンパ球誘導能が上昇し、鳥インフルエンザウイルスワクチンの製造に供した場合に、鳥インフルエンザウイルスの感染防御効果が飛躍的に向上し得る。

【0023】

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、本発明のペプチドを発現し得る発現ベクターを導入し

10

20

30

40

50

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本発明のペプチドを単離することにより、本発明のペプチドを製造することができる。本発明の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、本発明の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。

【0024】

また、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。

【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。

【0026】

本発明のペプチドは、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本発明の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、本発明のペプチドをリポソームの表面に結合することができる。本発明のペプチドは、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。

【0027】

本発明のペプチドが有する官能基を介して、本発明の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。本発明のペプチドのリポソームへの結合に関与する、本発明の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、リポソーム表面の本発明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本発明のペプチドが結合していることを1つの特徴としており、これにより優れた細胞傷害性Tリンパ球活性化効果を達成している。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、本発明の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、本発明の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。

10

20

30

40

50

【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。

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。

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。

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。

【0030】

本発明の課題の一つは、鳥インフルエンザウイルス感染細胞を殺傷するための細胞傷害性Tリンパ細胞(CD8⁺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、リボ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、リボソームの安定性が悪くなる場合がある。

【0031】

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。

【0032】

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、ホスファチジン酸、ホスファチジリ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リノシトールが好ましく用いられる。酸性リン脂質は、リボソームの表面にアニオン性電離基を与えるので、リボソーム表面にマイナスのゼータ電位を付与する。このためリボソームは、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ボソームが水性溶媒中にある際のリボソームの安定性を確保する点で重要である。

【0033】

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、リボソームを安定化する機能が高く、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ボソームのリボ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ボ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。

【0034】

本発明のペプチド結合リボソームにおいては、本発明のペプチドがリボソームを構成す

10

20

30

40

50

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、リボソームの表面に結合する。

このペプチドの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。

【0035】

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、リボソームでの安定性、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。

【0036】

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ことが可能である。

【0037】

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。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等が挙げられる。

【0038】

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

10

20

30

40

50

変性体が得られる。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。

【0039】

リポソームの表面に本発明の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、次に本発明の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、予め本発明のペプチドを反応性リン脂質に結合しておき、次に、得られた本発明の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、本発明の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本発明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。

10

【0040】

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。

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。

20

【0041】

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。

30

【0042】

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 α -トコフェロールが好ましく挙げられる。

40

【0043】

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。

【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の組成としては、例えば以下を挙げることができる：

(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%

【0045】

50

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。

【0046】

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。

【0047】

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。

【0048】

上記成分(A)には、以下が含まれる：

(a)本発明の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)本発明の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。

【0049】

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。

【0050】

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。

【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、リポソームの本発明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80.0モル%を超えると、リポソームに含まれる酸性リン脂質、本発明の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。

【0054】

本発明の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本発明のペプチドが結合して得られるもので、反応性リン脂質が本発明の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考慮して選択することができる。

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%を本発明のペプチドと結合することができる。この場合、本発明の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。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 5 】

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) 本発明の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%；
- (IV) リポソームの安定化剤0.2～75モル%。

(合計100モル%)

【 0 0 5 6 】

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%
- 上記成分(IV) 10～70モル%

(合計100モル%)

【 0 0 5 7 】

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%)

【 0 0 5 8 】

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%)

【 0 0 5 9 】

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。

【 0 0 6 0 】

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

10

20

30

40

50

に0モル%)である。

【0061】

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、本発明のペプチド等を用い、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。

例えば、エクスツルージョン法、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。

10

【0062】

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。

【0063】

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、糖或いは多価アルコールを添加・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。

20

【0064】

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。

【0065】

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。

30

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。

40

【0066】

本発明のペプチド結合リポソームを製造する場合、本発明のペプチドを結合させる前のリポソームを作製した後、本発明の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。

例えば、リン脂質、リポソームの安定化剤及び膜表面に本発明の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

50

法により凍結乾燥物を得る。

ここで得たり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、必要時に特定の本発明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。本発明のペプチドとリポソームとの相互作用が強く不安定性が強い場合等は、このようにリポソームの凍結乾燥物の段階で保存し、必要な際に本発明のペプチドを結合して用いると非常に簡便である。

【0067】

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、本発明のペプチドが結合したリン脂質を有し得る。本発明の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、これに本発明のペプチド及び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、本発明の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等が挙げられる。また、片末端にサクシンイミド基、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、これに本発明のペプチドを添加し、リポソームに含まれる反応性リン脂質の官能基と、本発明のペプチドの官能基を連結して結合させる方法。

【0068】

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。

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本発明のペプチドを結合することができ、リポソームに本発明のペプチドを結合したリン脂質が形成される。

【0069】

前記の(A)の方法において、原料となるリポソームと本発明のペプチドとを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本発明の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、本発明の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本発明のペプチド中のアミノ基とをシッフ塩基を解して結合する方法を挙げることができる。

【0070】

10

20

30

40

50

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、本発明の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本発明の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本発明のペプチド、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。

【0071】

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。

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。

【0072】

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ポソーム構成成分(リン脂質、リポ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ポソームを作成する。

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

(B-4) 未反応の本発明のペプチド、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ン脂質を含有するリポソームの懸濁液を得る。

【0073】

リポソームと本発明の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。

【0074】

本発明のペプチドやペプチド結合リポソームを用いれば、HLA(好ましくはHLA-A*0201又はHLA-A*2402)拘束的且つ特異的に、本発明のペプチド(好ましくは本発明の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ポソームにより誘導される細胞傷害性Tリンパ球は

10

20

30

40

50

、鳥インフルエンザウイルスに感染した結果、HLA上に本発明の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。従って、本発明のペプチドやペプチド結合リポソームは、細胞傷害性Tリンパ球活性化剤や鳥インフルエンザウイルスワクチンとしてとして有用である。

【0075】

上述のように、本発明のペプチドは、鳥インフルエンザウイルスの連続変異株及び不連続変異株において高度に保存されたエピトープを含む。従って、本発明のペプチドやペプチド結合リポソームは、多様な型[(H1~H16) × (N1~N9)]の鳥インフルエンザウイルスに対するワクチンとして有用であるが、とりわけ、高病原性鳥インフルエンザウイルス(H5N1型)に対して有効である。また、本発明のペプチドやペプチド結合リポソームは、種々の変異株に対するワクチンとして有用である。

10

【0076】

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鳥インフルエンザ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である動物は、通常、標的とする鳥インフルエンザウイルスが感染し得る哺乳動物及び鳥類である。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。

20

【0077】

本発明の細胞傷害性Tリンパ球活性化剤及び鳥インフルエンザ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。

【0078】

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。

30

【0079】

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。

40

【0080】

本発明の細胞傷害性Tリンパ球活性化剤及び鳥インフルエンザ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. Bi

50

ophys. 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。

【0081】

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。

【0082】

本発明の細胞傷害性Tリンパ球活性化剤又は鳥インフルエンザ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。

10

【0083】

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60 kg) あたり本発明のペプチドとして一回当たり1 µg~1000 µgの範囲、好ましくは20 µg~100 µg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、皮下投与により鳥インフルエンザウイルス感染に対して予防する場合には、本発明のペプチドとして一回当たり1 µg~1000 µgの範囲、好ましくは20 µg~100 µg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。

20

【実施例】

【0084】

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。

【0085】

[実施例1]

CTLエピトープの検索

高病原性鳥インフルエンザウイルスA/Hong_Kong/483/97 (H5N1) 株の8種類のウイルス内部タンパク質 (M1、M2、NP、NS1、NS2、PA、PB1、PB2) のアミノ酸配列から、ヒト主要組織適合抗原複合体 (MHC) クラスI分子の1つであるHLA-A*0201又はHLA-A*2402に結合し、キラーT細胞 (CTL) に対して抗原性を持つと予想されるエピトープの検索を、ネット上で利用できる次の4種類の予測プログラムを使って行った。

30

- a. NetCTL server 1.2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetCTL/>)
- b. nHLAPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/nhlapred/>)
- c. BIMAS (http://www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/)
- d. SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de/home.htm>)

【0086】

それぞれのプログラムによりエピトープ活性を持つと予想された41種類の候補ペプチドの中から、

40

- PB1_410 : GMFNMLSTV (配列番号1)
 PA_130 : YYLEKANKI (配列番号2)、
 PA_262 : KTTPRPLRL (配列番号3)、
 PB1_430 : RYTKTTYWW (配列番号4)、
 PB1_482 : SYINRTGTF (配列番号5)、
 PB1_688 : MYQKCCTLF (配列番号6)、
 PB2_549 : TYQWIIRNW (配列番号7)、
 PB2_322 : SFSFGGFTF (配列番号8)、
 PB1_216 : SYLIRALTL (配列番号9)、
 M2_40 : LWILDRLFF (配列番号16)、

50

PB2_117 : TYFEKVERL (配列番号 1 7) 、
 PB1_331 : EWFRNVLSI (配列番号 1 8) 、
 PA_8 : CFNPMIVEL (配列番号 1 9) 、
 NP_257 : IFLARSALI (配列番号 2 0) 、
 NP_481 : MSNEGSYFF (配列番号 2 1) 、
 M2_2 : SLLTEVETL (配列番号 2 2)

を選び、ペプチド合成後にそれぞれのペプチドによる免疫で誘導されるCTL活性の測定を行った。

【 0 0 8 7 】

[実施例 2]

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 μ 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、エバポレーター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。

【 0 0 8 8 】

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 $^{\circ}$ C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。

【 0 0 8 9 】

3) リポソームの調製

次に、別途作製した緩衝液 (1.0mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.25 M 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 $^{\circ}$ C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8 μ mのポリカーボネートフィルターを通過させ、続いて5 μ m、3 μ m、1 μ m、0.65 μ m、0.4 μ m及び0.2 μ m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。

【 0 0 9 0 】

[実施例 3]

リポソーム製剤の調製

実施例 2 (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の各ペプチド溶液 (1.25mM、緩衝液溶液) を加えた後、5 $^{\circ}$ C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

10

20

30

40

50

過した。尚、リポソーム画分は白濁しているので、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。

ここで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。

【0091】

[実施例4]

CTL活性の検出

ペプチド活性の検出は、in vivoにおけるキリング活性の誘導能を重視したため、次の方法で行った。まずマウス本来のMHCクラスI分子(H2-D及びH2-K)を持たず、配列番号1のペプチドについてはHLA-A*0201分子を発現する遺伝子導入マウス(HHDマウス)、配列番号2以降のペプチドについてはHLA-A*2402分子を発現する遺伝子導入マウス(A24Tg)を、オレイン酸リポソームに結合したそれぞれの候補ペプチド(0.5 µg/µlを200 µl/匹)及びCpG5002(5'-TCCATGACGTTCTGATGTT-3'(配列番号23);詳細はVaccine 25, 4914-4921(2007)参照)(10 µg/匹)で1週間間隔で2回免疫した。最終免疫から6日後、免疫したペプチド(0.5 µM)と蛍光色素(CFDA-SE)で標識した標的細胞(A24Tgマウス脾細胞 5×10^5 個/匹)を対照とともに静脈内投与し、16時間後、安楽殺した後に脾臓を回収して、その中の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。

10

【0092】

脾臓接着細胞(SAC)、CD4⁺及びCD8⁺T細胞の調製

20

脾臓細胞懸濁液を10%FCSを含有するRPMI-1640を用いて調製した。5mlの10%FCSを含有する培地中の細胞(5×10^7 個)を50mmプラスチック組織培養ディッシュ(No.#3002; Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ)中に播種し、加湿5%CO₂雰囲気下、37℃にて2時間インキュベートした。培養後、非接着細胞を、暖かい培地中での穏やかな洗浄(washing)により除去し、次に接着細胞をセルスクレーパーにより回収した。各ペプチド-アラムで免疫されたマウスの脾臓細胞(SC)からのCD4⁺及びCD8⁺T細胞精製は、磁気セルソーターシステムMACSにより、製造者のプロトコールに従って、抗CD4及び抗CD8抗体被覆マイクロビーズ(Miltenyi Biotec GmbH)を用いて行った。T細胞は、10%FCSを含むRPMI-1640中に、 2×10^6 mlの細胞密度で懸濁された。

【0093】

30

インビボ細胞障害性アッセイ(CTL活性の測定)

上記マウスの脾細胞を0.5又は5 µM CFDA-SE(Sigma)により室温で15分間標識し、2回洗浄した。次に、CFDA-SEが明るい(M2)細胞を、0.5 µg/ml各ペプチドにより37℃で90分間パルスした。CFDA-SEが暗い細胞(M1)を、対照として、無関係のNP366-374(ASNENMDAM)ペプチドにより、37℃で90分間パルスした。細胞を1:1の比で混合し、全部で 5×10^6 個の細胞を、1~2週間前に100 µgの抗IL-10モノクローナル抗体2A5、5 µgのCpG5002及びそれぞれの各ペプチド結合リポソームが注入されたマウスへ静注した。8時間後にそれぞれのマウスから回収された脾細胞をフローサイトメーターにより解析した。各ペプチドでパルスされた画分の蛍光標識脾細胞の減少の程度をCTL活性の指標とした。各ペプチド結合リポソームにより免疫されたマウスにCTLが誘導されていれば、各ペプチドでパルスされた画分の蛍光標識脾細胞のみが消滅することとなる。

40

【0094】

結果

以下に活性のあったペプチドと、そのスクリーニング結果を示す。

【0095】

【表 1】

ペプチド名	アミノ酸配列	特異的キリング
PB1_410	GMFNMLSTV (配列番号 1)	87%
PA_130	YYLEKANKI (配列番号 2)	95%
PA_262	KTTTPRPLRL (配列番号 3)	58%
PB1_430	RYTKTTYWW (配列番号 4)	96%
PB1_482	SYINRTGTF (配列番号 5)	56%
PB1_688	MYQKCCTLF (配列番号 6)	89%
PB2_549	TYQWIIRNW (配列番号 7)	96%
PB2_322	SFSFGGFTF (配列番号 8)	38%
PB1_216	SYLIRALTL (配列番号 9)	22%
M2_40	LWILDRLFF (配列番号 16)	10%
PB2_117	TYFEKVERL (配列番号 17)	13%
PB1_331	EWFRNVLSI (配列番号 18)	7%
PA_8	CFNPMIVEL (配列番号 19)	10%
NP_257	IFLARSALI (配列番号 20)	16%
NP_481	MSNEGSYFF (配列番号 21)	5%
M2_2	SLLTEVETL (配列番号 22)	-

10

20

【0096】

検索によって選択したペプチドのうち、PB1_410 : GMFNMLSTV (配列番号 1)、PA_130 : YYLEKANKI (配列番号 2)、PA_262 : KTTTPRPLRL (配列番号 3)、PB1_430 : RYTKTTYWW (配列番号 4)、PB1_482 : SYINRTGTF (配列番号 5)、PB1_688 : MYQKCCTLF (配列番号 6)、PB2_549 : TYQWIIRNW (配列番号 7)、PB2_322 : SFSFGGFTF (配列番号 8)、PB1_216 : SYLIRALTL (配列番号 9) は高い CTL 活性を示したが、M2_40 : LWILDRLFF (配列番号 16)、PB2_117 : TYFEKVERL (配列番号 17)、PB1_331 : EWFRNVLSI (配列番号 18)、PA_8 : CFNPMIVEL (配列番号 19)、NP_257 : IFLARSALI (配列番号 20)、NP_481 : MSNEGSYFF (配列番号 21)、M2_2 : SLLTEVETL (配列番号 22) の活性は低かった。

30

【0097】

[実施例 5]

細胞内サイトカイン染色を、J Virol 78, 9093-9104 (2004) に記載された通りに行った。下記の各ペプチド (PB1_410、PA_130、PB1_430、PB2_549) 0.7 µg/µl を 50 µl 又は実施例 3 に準じて製造した該ペプチドが結合したリボソーム 50 µl を 5 µg CpG 存在下で fp 投与し、1 週間後、安楽殺した後に脾臓を回収して、脾臓細胞 2×10^6 個を brefeldin A (GolgiPlug™, BD Biosciences, San Jose, CA) 存在下、37 °C で 5 時間、10 µM の各ペプチド (PB1_410、PA_130、PB1_430、PB2_549) それぞれとインキュベートした。ラット抗マウス CD16/CD32 モノクローナル抗体 (Fc Block™, BD Biosciences) により Fc 受容体をブロックした後、細胞を FITC 結合ラット抗マウス CD8 モノクローナル抗体 (BD Biosciences) により 4 °C で 30 分間染色した。次いで細胞を固定し、透過性を高め、フィコエリトリン (PE) 結合ラット抗マウスインターフェロン (IFN-) モノクローナル抗体 (BD Biosciences) により染色した。細胞を洗浄後、サイトメトリ解析を行った。

40

【0098】

50

結果

以下に染色結果を示す。

【0099】

【表2】

ペプチド	配列	抗原特異性 CD8 ⁺ 細胞誘導率	
		ペプチドのみ	リポソーム結合
—	—	0.5%	—
PB1_410	GMFNLSTV (配列番号1)	0.2%	7.3%
PA_130	YYLEKANKI (配列番号2)	0.9%	11.1%
PB1_430	RYTKTTYWW (配列番号4)	0.5%	7.3%
PB2_549	TYQWIIRNW (配列番号7)	2.7%	19.2%

10

【0100】

各ペプチドを、リポソームに結合させた状態でマウスに免疫することにより、高い効率で、抗原特異的CD8⁺細胞が誘導された。中でも、PB2_549の抗原特異的CD8⁺細胞誘導能は極めて高かった。上記結果により、本発明のペプチド結合リポソームの優れた抗原特異的CD8⁺細胞誘導効果が確認できた。PB1_410、PA_130及びPB1_430の各ペプチドを、リポソームへの結合なしで免疫に用いても、ほとんど抗原特異的CD8⁺細胞を誘導しなかったが、PB2_549については、リポソームへの結合なしで免疫に用いた場合に、他のペプチドをはるかに上回る有意な抗原特異的CD8⁺細胞誘導効果が確認できた。

20

【0101】

[実施例6]

ウイルス感染抵抗性試験を以下の通り行った。DDW中のPA_130及びPB2_549各5mgをジサクシンイミジルスベレート-ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DSS-Ole) 用いて実施例3と同様にリポソームにカップリングした。マウス当たり50 µl又は100 µlのペプチド結合リポソームを5 µg CpG存在下でfp投与し、1週間後、ketamine (175 mg/g weight) (Sigma-Aldrich) 及びxylazine (3.5 mg/g weight) (Bayer Holding Ltd., Tokyo, Japan) を腹膜内注射してマウスを麻酔し、40 µl PBS中に再懸濁したH3N2(A/Uruguay) ウイルスをマウス1匹当たり10000PFU鼻腔内投与した。ウイルスのタイターについては、マウスをウイルス接種から5日後に安楽殺してその肺中のウイルスタイターを、Cottey R, Rowe CA, Bender BS (2001) Influenza virus. In Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc. 19.11.1-19.11.32に記載された通りにMDCK細胞を用いてTCID50を測定することにより決定した。即ち、肺を1ml PBS中でホモジェナイズし、ホモジェネートを2,000rpmで10分間遠心して破砕片を沈殿させた。次いで当該ホモジェネートの10倍希釈系列を、U字形底の96ウェルプレートに希釈1回につき5ウェルずつ調製した。希釈系列は5% FCSを含むDMEMで10⁻¹から10⁻⁷まで調製した。D-5中のMDCK細胞を全ウェルに添加 (2.5 × 10⁴細胞/ウェル) し、5%CO₂の下、35 °Cでインキュベートした。1日後、各ウェル中の培養培地を2 µg/mlのアセチル化トリプシン (Sigma-Aldrich) 含有DMEMと交換し、プレートをCO₂インキュベーター中35 °Cで4日間更にインキュベートした。PBS中0.5%ニワトリ赤血球懸濁液50 µlを各ウェルに添加後、各試料について凝集パターンを観察し、TCID50 (詳細はCottey R, Rowe CA, Bender BS (2001) Influenza virus. In Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc. 19.11.1-19.11.32を参照) を算出することによりウイルスタイターを決定した。各実験群にはマウスを5匹ずつ用いた。本アッセイの検出限界は10³ TCID50/マウスであった。

30

40

【0102】

結果

以下に感染抵抗性試験結果を示す。

【0103】

【表 3】

抗原ペプチド	アジュバント	注入量(μ l)	平均 PFU/肺	%阻害
なし	なし	0	227,500	
PA_130	CpG	50	39,933	82.4
	CpG	100	33,640	85.2
PB2_549	CpG	50	40,820	82.1
	CpG	100	31,000	86.4

【0104】

10

いずれのペプチドを結合させたりリポソームによって免疫した場合においても、高いウイルス感染阻害効果が確認できた。用いたペプチドは高病原性鳥インフルエンザウイルスA/Hong_Kong/483/97(H5N1)由来のものであるが、亜型の異なるH3N2ウイルスに対しても上記のような高効率の感染阻害効果が示されたことから、本発明のペプチド結合リポソームのプレパンデミックワクチンとしての効果が証明された。

【産業上の利用可能性】

【0105】

本発明によれば、パンデミックを引き起こす可能性が高い高病原性鳥インフルエンザウイルスに対し、その表面タンパク質の変異の影響を受けにくく、効果が高いワクチンを提供できる。また、本発明の鳥インフルエンザワクチンによれば、実際の流行株(型・亜型)が予測と異なった場合、効果が限定的となるであろう現在のプレパンデミックワクチンの弱点を克服できる、新規のプレパンデミックワクチンを提供できる。

20

【0106】

本発明は、2008年11月28日出願の日本国特許出願、特願2008-303444を基礎としており、その内容は全て本明細書に包含される。

【配列表】

2010061924000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070053

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K7/06(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K47/28 (2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i		
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) C07K7/06, A61K9/127, A61K39/00, A61K47/28, A61K47/48, A61P31/16, A61P37/04		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus(JDreamII), UniProt/GeneSeq, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2008/039267 A2 (PHARMEXA INC.), 03 April 2008 (03.04.2008), entire text & EP 2069376 A	12, 15, 18, 21/ 1-23
X/Y	WO 2001/000225 A1 (EPIMMUNE INC.), 04 January 2001 (04.01.2001), entire text & JP 2003-535024 A & US 2007/0055049 A1 & US 2008/0260762 A1 & EP 1189624 A & EP 1917970 A2	12, 15, 18, 21/ 1-23
Y	US 2008/0032921 A1 (PHARMEXA INC.), 07 February 2008 (07.02.2008), entire text & EP 2023952 A & WO 2008/054540 A2	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 16 December, 2009 (16.12.09)	Date of mailing of the international search report 28 December, 2009 (28.12.09)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/070053

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Tetsuya UCHIDA, et al., "Banno Influenza Vaccine Jitsugen e Tsunagaru CTL Yudogata Liposome Vaccine no Kaihatsu", 12 November 2008 (12.11.2008), <i>Bio Industry</i> , vol.25, no.11, pages 95 to 103, entire text	1-23
Y	JP 2008-037831 A (NOF Corp.), 21 February 2008 (21.02.2008), claims 1 to 12; paragraphs [0014], [0069] (Family: none)	1-23
A	Tetsuya UCHIDA, et al., "Liposome Hyomen Ketsugo Kogen o Mochiita Vaccine Sosei", 01 October, 2008 (01.10.2008), <i>Japanese Journal of Clinical Medicine</i> , vol.66, no.10, pages 1894 to 1902, entire text	1-23
A	JP 2005-145959 A (NOF Corp.), 09 June 2005 (09.06.2005), entire text	1-23

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 7 0 0 5 3									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/06(2006.01)i, A61K9/127(2006.01)i, A61K39/00(2006.01)i, A61K47/28(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P31/16(2006.01)i, A61P37/04(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K7/06, A61K9/127, A61K39/00, A61K47/28, A61K47/48, A61P31/16, A61P37/04											
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), UniProt/GeneSeq, PubMed											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X/ Y	WO 2008/039267 A2 (PHARMEXA INC.) 2008.04.03, 全文 & EP 2069376 A	12, 15, 18, 21/ 1-23									
X/ Y	WO 2001/000225 A1 (EPIMMUNE INC.) 2001.01.04, 全文 & JP 2003-535024 A & US 2007/0055049 A1 & US 2008/0260762 A1 & EP 1189624 A & EP 1917970 A2	12, 15, 18, 21/ 1-23									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 16.12.2009		国際調査報告の発送日 28.12.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 福澤 洋光	4 B 3963								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 7 0 0 5 3
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	US 2008/0032921 A1 (PHARMEXA INC.) 2008.02.07, 全文 & EP 2023952 A & WO 2008/054540 A2	1-23
Y	内田哲也, et al., 万能インフルエンザワクチン実現へ繋がる CTL 誘導型リボ ソームワクチンの開発, 2008.11.12, <u>Bio Industry</u> , Vol.25, No.11, p.95-103 全文	1-23
Y	JP 2008-037831 A (日油株式会社) 2008.02.21, 請求項1-12、【0014】段落、【0069】段落 (ファミリーなし)	1-23
A	内田哲也, et al., リボソーム表面結合抗原を用いたワクチン創製, 2008.10.01, 日本臨床, Vol.66, No.10, p.1894-1902 全文	1-23
A	JP 2005-145959 A (日油株式会社) 2005.06.09, 全文	1-23

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/28 (2006.01)	A 6 1 K 47/28	
A 6 1 K 39/145 (2006.01)	A 6 1 K 39/145	

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

(74) 代理人 100125070
弁理士 土井 京子

(74) 代理人 100136629
弁理士 鎌田 光宜

(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

(74) 代理人 100174296
弁理士 當麻 博文

(72) 発明者 内田 哲也
東京都新宿区戸山一丁目2番1号 国立感染症研究所内

(72) 発明者 種市 麻衣子
東京都新宿区戸山一丁目2番1号 国立感染症研究所内

(72) 発明者 梶野 喜一
北海道札幌市北区北8条西5丁目 国立大学法人北海道大学内

(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 小田 洋
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) 4C076 AA11 AA19 AA22 AA29 BB01 BB13 BB15 BB16 BB17 CC06
CC35 DD63 DD70 EE59 FF63 FF68
4C085 AA03 BA55 CC32 EE05 FF19 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08
4H045 AA11 AA20 AA30 BA15 CA01 DA86 EA31 FA20

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。