

明 細 書

発明の名称：

SARS-CoV-2 蛋白由来ペプチドおよびそれを含むワクチン

技術分野

[0001] 本発明は、生物科学の分野、より具体的にはウイルス感染症予防の分野に関する。特に本発明は、感染予防ワクチンとして有効な新規ペプチド、該ペプチドを用いた感染症の予防および治療のいずれかまたは両方のための方法、ならびに該ペプチドを含む薬学的組成物に関する。

本出願は、2020年9月30日に出願された特願2020-164630の恩典を主張し、その全内容が参照によって本明細書に組み入れられる。

背景技術

[0002] 新型コロナウイルス (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 : SARS-CoV-2) に感染することによって引き起こされる呼吸器感染症 (Coronavirus Disease 2019 : COVID-19) は、中国の武漢(Wuhan)で最初に報告されて以来、世界中に拡大している。

世界保健機関 (WHO) の報告によると、2020年9月の時点での感染者数は2700万人を超え、死亡者数は89万人に上る。更に、2021年4月の時点での感染者数は1億2000万人を超え、死亡者数は280万人に上る。感染拡大を抑止するための有効な手段として予防用ワクチンの接種が挙げられるが、COVID-19に対するワクチンとして実用化されたものは無い。

[0003] BCGワクチンが結核以外の感染症に対しても予防効果があることは以前より知られている。最近の研究においても、65歳以上の高齢者へのBCG接種の結果、感染症の抑制効果が認められたことが報告されている (非特許文献1 : Giamarellos-Bourboulis EJ et al., Cell 2020, Online ahead of print)。

COVID-19における致死率あるいは死亡者数の増加率の抑制とBCGワクチン接種との関連性が示唆されている (非特許文献2 : Toyoshima Y et al., J Hum Genet 2020, Online ahead of print ; 非特許文献3 : Berg MK et al., Scie

nce Advances 2020, Online ahead of print)。

ウイルス感染に対するヒトの防御機構においては、はじめに免疫細胞（マクロファージ、NK細胞、好中球など）を中心とした自然免疫応答がはたらく、次いでB細胞およびT細胞を中心とした獲得免疫（液性免疫および細胞性免疫）による抗原特異的な免疫応答が生じる。BCGワクチン接種後、免疫細胞における炎症性サイトカインの転写活性が促進され、その状態（trained immunity）でウイルスに感染すると、生体内では速やかに炎症性サイトカインが放出される。その結果、活性化されたB細胞による液性免疫応答やT細胞による細胞性免疫応答がウイルスの増殖を抑制すると推測される（非特許文献4：Netea MG et al., Cell 2020, 181(5):969-977）。

[0004] SARS-CoV-2がヒト細胞内に侵入する際に中心的な機能を果たすのがスパイク蛋白である（非特許文献5：Hoffmann M et al., Cell 2020, 181(2):271-280）。現在、研究開発が進められているCOVID-19に対するワクチンの多くは、SARS-CoV-2のスパイク蛋白に対する中和抗体の誘導（液性免疫の誘導）を主な目的としたものである（非特許文献6：Jeyanathan M et al., Nat Rev Immunol 2020, Online ahead of print）。しかし、SARS-CoV-2が増殖を繰り返す中でウイルスゲノムの突然変異が生じ得る。スパイク蛋白をコードする遺伝子に変異が生じる場合、ワクチンによって誘導された中和抗体は無効となる可能性がある。また、COVID-19の回復者を対象とした研究により、ヒト体内で誘導された中和抗体の存続期間は短い可能性が示唆されている（非特許文献7：Ibarrondo FJ et al., N Engl J Med 2020, 383(11):1085-1087；非特許文献8：Long QX et al., Nat Med 2020, 26(8):1200-1204）。したがって、中和抗体による液性免疫を誘導することを目的としたワクチン開発には課題が残る懸念がある。

[0005] T細胞による細胞性免疫もまた感染症に対する防御反応として非常に重要である。細胞傷害性T細胞（cytotoxic T lymphocyte：CTL）はCD8陽性のT細胞であり、樹状細胞（Dendritic cell：DC）によるウイルス抗原（ウイルス蛋白由来のエピトープペプチド）の提示を受けて誘導される。その後、ウイル

ス感染細胞表面に発現するヒト白血球抗原（HLA）クラスI分子上に提示されるエピトープペプチドを認識し、ウイルス感染細胞を殺傷する。この作用によって、ウイルス粒子の複製場所である感染細胞が破壊され、結果としてウイルスの増殖が抑制される。中和抗体が主として、複製後のウイルス粒子の新たな細胞への感染を阻害するのと比べ、ウイルス粒子の複製工程そのものを標的とするCTLの作用は、ウイルスの増殖を防ぐうえで、より直接的な作用を果たすといえる。したがって、CTLは生体内からウイルスを排除し、感染症の重症化を抑制する役割を担うと考えられる。COVID-19の重症患者の末梢血中では、健常人と比較してCD8陽性T細胞の減少が顕著に認められるという報告は、CTLがCOVID-19の重症化を抑制するための重要な因子であることを示唆する（非特許文献9：Zheng M et al., Cell Mol Immunol 2020, 17(5):533-535）。

またCTLの一部は、メモリーT細胞として長期間体内に留まり続けることが知られている。2003年にSARS-CoVが流行し、8000人以上の感染者が発生した。その17年後、回復者の血中から依然としてSARS-CoVに対するCTLが検出されたことから（非特許文献10：Le Bert N et al., Nature 2020, 584(7821):457-462）、SARS-CoV-2に対するCTLもまた、誘導されたのちに体内に長期間留まる可能性がある。

したがって、細胞性免疫の惹起を目的としたワクチンがCOVID-19に対する有効な予防手段となりうる。SARS-CoV-2蛋白に由来するエピトープペプチドからなるワクチンによって誘導されたCTLがメモリーT細胞として体内に留まり、SARS-CoV-2感染後、迅速にウイルス感染細胞に対する傷害活性を示すが、COVID-19の重症化抑制に繋がると考えられる。そこで、ヒト体内でCTLを誘導することができるSARS-CoV-2蛋白由来のエピトープペプチドの同定が望まれる。

[0006] バイオインフォマティクスに基づいて決定されたエピトープペプチド候補が報告されているが、それらが実際にHLAに結合し、CTL誘導能を持つか否かの検証は為されておらず、エピトープペプチドの同定には至っていない。（

非特許文献11: Grifoni A et al., Cell Host Microbe 2020, 27(4):671-680
; 非特許文献12: Crooke SN et al., Sci Rep 2020, 10(1):14179)。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Giamarellos-Bourboulis EJ et al., Cell 2020, Online ahead of print

非特許文献2: Toyoshima Y et al., J Hum Genet 2020, Online ahead of print

非特許文献3: Berg MK et al., Science Advances 2020, Online ahead of print

非特許文献4: Netea MG et al., Cell 2020, 181(5):969-977

非特許文献5: Hoffmann M et al., Cell 2020, 181(2):271-280

非特許文献6: Jeyanathan M et al., Nat Rev Immunol 2020, Online ahead of print

非特許文献7: Ibarondo FJ et al., N Engl J Med 2020, 383(11):1085-1087

非特許文献8: Long QX et al., Nat Med 2020, 26(8):1200-1204

非特許文献9: Zheng M et al., Cell Mol Immunol 2020, 17(5):533-535

非特許文献10: Le Bert N et al., Nature 2020, 584(7821):457-462

非特許文献11: Grifoni A et al., Cell Host Microbe 2020, 27(4):671-680

非特許文献12: Crooke SN et al., Sci Rep 2020, 10(1):14179

発明の概要

[0008] 本発明はSARS-CoV-2（参照配列: GenBank accession number MN908947（配列番号: 16））が持つ4つの構造蛋白質と6つの非構造蛋白質に由来するペプチドの中から選択されたHLA-A*24:02もしくはHLA-A*02:01に結合し、CTL誘導能を持つエピトープペプチドを提供することである。

4つの構造蛋白質とは、具体的には以下の蛋白質を指す:

スパイク蛋白

(参照配列 : GenBank accession number QHD43416 (配列番号 : 17)) ;

エンベロープ蛋白

(参照配列 : GenBank accession number QHD43418 (配列番号 : 18)) ;

マトリックス蛋白

(参照配列 : GenBank accession number QHD43419 (配列番号 : 19)) ; およ
び

核蛋白

(参照配列 : GenBank accession number QHD43423 (配列番号 : 20)

一方、6つの非構造蛋白とは、具体的には以下の蛋白を指す :

ORF1ab

(参照配列 : GenBank accession number QHD43415 (配列番号 : 21)) ;

ORF3a

(参照配列 : GenBank accession number QHD43417 (配列番号 : 22)) ;

ORF6

(参照配列 : GenBank accession number QHD43420 (配列番号 : 23)) ;

ORF7a

(参照配列 : GenBank accession number QHD43421 (配列番号 : 24)) ;

ORF8

(参照配列 : GenBank accession number QHD43422 (配列番号 : 25)) ; およ
び

ORF10

(参照配列 : GenBank accession number QHI42199 (配列番号 : 26))

本発明のエピトープペプチドは、日本をはじめとするアジア諸国で人口が多いHLA-A*24:02陽性者あるいは欧米で人口が多いHLA-A*02:01陽性者 (Cao K et al., Hum Immunol 2001, 62(9): 1009-1030 ; Gonzalez-Galarza FF et al., Nucleic Acids Res 2020, 48(D1):D783-D788) を対象として、COVID-19に対する特異的かつ強力な免疫応答を誘導し得ることが実証される。

本発明で提供されるエピトープペプチドのアミノ酸配列とヒト蛋白に由来

するアミノ酸配列との類似性は低いことから、予期せぬ副反応を引き起こしにくい安全性の高いワクチンの創生が期待できる。その一方で過去に流行したSARS-CoVやMERS-CoVには共通して認められるアミノ酸配列であることから、将来出現する新型のコロナウイルス蛋白にも認められる可能性がある。したがって当該エピトープペプチドから成るワクチンは、現在のSARS-CoV-2にとどまらず将来流行するコロナウイルス感染症に対しても有効となり得る。

[0009] 本発明はまた、本発明の1種類もしくは複数種のペプチド、本発明の1種類もしくは複数種のペプチドをコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド、本発明のAPC、本発明のペプチドを提示するエキソソーム、および／または本発明のCTLを含む組成物を提供する。本発明の組成物は好ましくは薬学的組成物である。本発明の薬学的組成物は、コロナウイルス感染症の治療および／または予防、ならびに重症化の抑制のために用いることができる。またコロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導するために用いることができる。対象に投与した場合、本発明のペプチドは、APCの表面上に提示され、それにより該ペプチドを標的とするCTLが誘導される。したがって、CTLを誘導する組成物であって、本発明の1種類もしくは複数種のペプチド、本発明の1種類もしくは複数種のペプチドをコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド、本発明のAPC、および／または本発明のペプチドを提示するエキソソームを含む組成物を提供することは、本発明のさらなる目的である。

[0010] CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法であって、APCを本発明の1種類もしくは複数種のペプチドと接触させる段階、または本発明のペプチドのいずれか1つをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階を含む方法を提供することは、本発明のさらなる目的である。

[0011] 本発明はまた、CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共培養する段階、CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階、または細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るT細胞受容体 (T cell receptor : TCR) の各サブユニットをコー

ドするポリヌクレオチドを含むベクターをCD8陽性T細胞に導入する段階を含む、CTLを誘導する方法を提供する。

[0012] HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する単離されたAPCを提供することは、本発明のさらに別の目的である。本発明はさらに、本発明のペプチドを標的とする単離されたCTLを提供する。これらのAPCおよびCTLは、コロナウイルス感染症に対する免疫療法に用いることができる。

[0013] 対象においてコロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導する方法であって、本発明のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、本発明のAPC、本発明のペプチドを提示するエキソソーム、および／または本発明のCTLを該対象に投与する段階を含む方法を提供することは、本発明の別の目的である。さらに、対象においてコロナウイルス感染症を治療および／または予防、ならびに重症化を抑制する方法であって、本発明のペプチド、該ペプチドをコードするポリヌクレオチド、本発明のAPC、本発明のペプチドを提示するエキソソーム、および／または本発明のCTLを該対象に投与する段階を含む方法を提供することは、本発明の別の目的である。

[0014] 上記に加え、本発明の他の目的および特徴は、添付の図表および実施例と併せて以下の詳細な説明を読むことによって、より十分に明らかになる。しかしながら、前述の発明の概要および以下の詳細な説明はいずれも例示的な態様であり、本発明または本発明のその他の代替的な態様を限定するものではないことが理解されるべきである。特に、本発明をいくつかの特定の態様を参照して本明細書において説明するが、その説明は本発明を例証するものであり、本発明を限定するものとして構成されていないことが理解されよう。添付の特許請求の範囲によって記載される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、当業者は様々な変更および適用に想到することができる。同様に、本発明のその他の目的、特徴、利益、および利点は、本概要および以下に記載する特定の態様から明らかになり、当業者には容易に明白になるであろう。そのような目的、特徴、利益、および利点は、添付の実施例、データ、図表、およびそれらから引き出されるあらゆる妥当な推論と併せて上

記から、単独で、または本明細書に組み入れられる参考文献を考慮して、明らかになるであろう。

図面の簡単な説明

- [0015] [図1]図1は、SARS-CoV-2蛋白に由来するペプチドで誘導した細胞を用いて実施したIFN- γ 酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイの結果を示す画像で構成される。図中、「(+)」は、目的のペプチドをパルスしたHLA-A*24:02 発現標的細胞 (TISI細胞) に対するIFN- γ 産生を示し、「(-)」は、いずれのペプチドもパルスしていないTISI細胞に対するIFN- γ 産生を示す (陰性対照)。ペプチド1 (配列番号: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド3 (配列番号: 3)、ペプチド4 (配列番号: 4)、ペプチド5 (配列番号: 5)、ペプチド7 (配列番号: 7)、ペプチド9 (配列番号: 9)、ペプチド10 (配列番号: 10)、ペプチド11 (配列番号: 11)、ペプチド12 (配列番号: 12)、ペプチド13 (配列番号: 13) およびペプチド15 (配列番号: 15) においてペプチド特異的なIFN- γ 産生が認められたことが、陰性対照との比較からわかる (図1a)。一方、ペプチド特異的なIFN- γ 産生が認められなかった典型的な陰性データの例として、ペプチド6 (配列番号: 6) を示す (図1b)。
- [0016] [図2]図2は、ペプチド1 (配列番号: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド4 (配列番号: 4)、ペプチド5 (配列番号: 5)、ペプチド7 (配列番号: 7)、ペプチド9 (配列番号: 9)、ペプチド10 (配列番号: 10) またはペプチド13 (配列番号: 13) で刺激された細胞から産生されるIFN- γ を酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって測定した結果を表す折れ線グラフで構成される。これらの結果は、ペプチドによる誘導後、ペプチド特異的にIFN- γ を産生するHLA-A*24:02拘束性のCTLラインが樹立されたことを示している。図中、「(+)」は目的のペプチドをパルスしたHLA-A*24:02発現標的細胞 (TISI細胞) に対するCTLラインのIFN- γ 産生を示し、「(-)」はいずれのペプチドもパルスしていないTISI細胞に対するCTLラインのIFN- γ 産生を示す。R/S比は、応答細胞 (Responder cells) であるCTLラインの細胞数とそれを刺激する標的細胞 (Stimulator cells) の細胞数の比を表す。

[0017] [図3]図3は、SARS-CoV-2蛋白に由来するペプチドで誘導した細胞を用いて実施したIFN- γ 酵素結合免疫スポット (ELISPOT) アッセイの結果を示す画像で構成される。図中、「(+)」は、目的のペプチドをパルスしたHLA-A*02:01発現標的細胞 (T2細胞) に対するIFN- γ 産生を示し、「(-)」は、いずれのペプチドもパルスしていないT2細胞に対するIFN- γ 産生を示す (陰性対照)。ペプチド1 (配列番号: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド4 (配列番号: 4)、ペプチド7 (配列番号: 7)、ペプチド10 (配列番号: 10)、ペプチド12 (配列番号: 12) およびペプチド13 (配列番号: 13) においてペプチド特異的なIFN- γ 産生が認められたことが、陰性対照との比較からわかる (図3a)。一方、ペプチド特異的なIFN- γ 産生が認められなかった典型的な陰性データの例として、ペプチド5 (配列番号: 5) を示す (図3b)。

[0018] [図4]図4は、ペプチド1 (配列番号: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド10 (配列番号: 10) またはペプチド13 (配列番号: 13) で刺激された細胞から産生されるIFN- γ を酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) によって測定した結果を表す折れ線グラフで構成される。これらの結果は、ペプチドによる誘導後、ペプチド特異的にIFN- γ を産生するHLA-A*02:01拘束性のCTLラインが樹立されたことを示している。図中、「(+)」は目的のペプチドをパルスしたHLA-A*02:01発現標的細胞 (T2細胞) に対するCTLラインのIFN- γ 産生を示し、「(-)」はいずれのペプチドもパルスしていないT2細胞に対するCTLラインのIFN- γ 産生を示す。R/S比は、応答細胞 (Responder cells) であるCTLラインの細胞数とそれを刺激する標的細胞 (Stimulator cells) の細胞数の比を表す。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明の態様を実施または試験するにあたって、本明細書に記載の方法および材料と類似のまたは同等の任意の方法および材料を用いることができるが、好ましい方法、装置、および材料をここに記載する。しかしながら、本発明の材料および方法について記載する前に、本明細書に記載の特定の大きさ、形状、寸法、材料、方法論、プロトコール等は慣例的な実験法および最

適化に応じて変更可能であるため、本発明がこれらに限定されないことが理解されるべきである。本記載に使用する専門用語は特定の型または態様のみを説明する目的のためのものであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図されないことも、また理解されるべきである。

[0020] 1. 定義

本明細書で用いる「1つの (a)」、「1つの (an)」および「その (the)」という単語は、他に特記されない限り「少なくとも1つの」を意味する。

物質（例えば、ペプチド、抗体、ポリヌクレオチド等）に関して用いる「単離された」および「精製された」という用語は、該物質がそうでなければ天然源中に含まれ得る少なくとも1種の物質を実質的に含まないことを示す。したがって、単離または精製されたペプチドは、そのペプチドが由来する細胞もしくは組織源からの他の細胞材料、例えば糖質、脂質および他の混入タンパク質を実質的に含まないペプチドを指す。またペプチドが化学合成される場合には、単離または精製されたペプチドは前駆体物質もしくは他の化学物質を実質的に含まないペプチドを指す。「細胞材料を実質的に含まない」という用語は、それが単離された細胞または組換え産生された細胞の細胞成分から、ペプチドが分離されたペプチドの調整物を含む。したがって、細胞材料を実質的に含まないペプチドは、約30%、20%、10%、または5%、3%、2%または1%（乾燥重量ベース）未満の他の細胞材料を含有する、ペプチドの調整物を包含する。ペプチドを組換え産生する場合、単離または精製されたペプチドは、培養培地も実質的に含まず、培養培地を実質的に含まないペプチドは、培養培地をペプチド調製物の容量の約20%、10%、または5%、3%、2%または1%（乾燥重量ベース）未満で含有する、ペプチドの調製物を包含する。ペプチドを化学合成する場合、単離または精製されたペプチドは、前駆体物質および他の化学物質を実質的に含まず、前駆体物質および他の化学物質を実質的に含まないペプチドは、前駆体物質および他の化学物質をペプチド調製物の容量の約30%、20%、10%、5%、3%、2%または1%（乾燥重量ベース）未満で

含有する、ペプチドの調製物を包含する。特定のペプチド調製物が単離または精製されたペプチドであることは、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）－ポリアクリルアミドゲル電気泳動およびゲルのクーマシーブリリアントブルー染色等の後の単一バンドの出現によって確認することができる。好ましい態様では、本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドは単離または精製されている。

[0021] 「ポリペプチド」、「ペプチド」、「タンパク（蛋白）」および「タンパク質（蛋白質）」という用語は、本明細書で互換的に用いられ、アミノ酸残基のポリマーを指す。本用語は、天然型アミノ酸ポリマーのほか、1個もしくは複数個の非天然型アミノ酸残基を含む非天然型アミノ酸ポリマーにも適用される。非天然型アミノ酸には、アミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体などが含まれる。

[0022] 本明細書で用いる「アミノ酸」という用語は、天然アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然アミノ酸とは、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸、および細胞内で翻訳後に修飾されたアミノ酸（例えば、ヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸、および0-ホスホセリンなど）である。「アミノ酸類似体」という語句は、天然アミノ酸と同じ基本化学構造（水素、カルボキシ基、アミノ基、およびR基に結合した α 炭素）を有するが、修飾されたR基または修飾された骨格を有する化合物（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、およびメチオニンメチルスルホニウムなど）を指す。「アミノ酸模倣体」という語句は、一般的なアミノ酸とは異なる構造を有するが、同様の機能を有する化合物を指す。アミノ酸はL-アミノ酸またはD-アミノ酸のいずれであってもよいが、本発明のペプチドは、L-アミノ酸のポリマーであることが好ましい。

[0023] 「ポリヌクレオチド」、「オリゴヌクレオチド」、および「核酸」という用語は、本明細書において互換的に用いられ、ヌクレオチドのポリマーを指す。

- [0024] 本明細書で使用する「組成物」という用語は、特定量の特定成分を含む生成物、および特定量の特定成分の組み合わせから直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図される。組成物が薬学的組成物である場合には、組成物という用語は、有効成分および不活性成分を含む生成物、ならびに任意の2つもしくはそれ以上の成分の組み合わせ、複合体形成、もしくは凝集から、1つもしくは複数の成分の解離から、または1つもしくは複数の成分の他の種類の反応もしくは相互作用から直接または間接的に生じる任意の生成物を包含することが意図される。したがって、本発明の薬学的組成物は、本発明の化合物または細胞と薬学的または生理学的に許容される担体とを混合することにより作製される任意の組成物を包含する。本明細書で使用する「薬学的に許容される担体」または「生理学的に許容される担体」という語句は、液体もしくは固体の増量剤、希釈剤、賦形剤、溶媒および封入材料を含むがこれらに限定されない、薬学的または生理学的に許容される材料、組成物、物質、または媒体を意味する。
- [0025] 特記しない限り、「ウイルス感染症」という用語はコロナウイルス感染症を指し、コロナウイルスの例としては、SARS-CoV-2、MERS-CoVおよびSARS-CoVなどが含まれるが、これらに限定されない。また、例示的な態様において、「コロナウイルス感染症」は、HLA-A24またはHLA-A02陽性対象におけるSARS-CoV-2感染症である。
- [0026] 特記しない限り、「細胞傷害性Tリンパ球」、「細胞傷害性T細胞」、および「CTL」という用語は本明細書において互換的に用いられ、特に別段の定めのない限り、非自己細胞（例えば、腫瘍／がん細胞、ウイルス感染細胞）を認識し、そのような細胞の死滅を誘導することができるTリンパ球の亜群を指す。
- [0027] 特記しない限り、「HLA-A24」という用語は、HLA-A*24:01、HLA-A*24:02、HLA-A*24:03、HLA-A*24:04、HLA-A*24:07、HLA-A*24:08、HLA-A*24:20、HLA-A*24:25、HLA-A*24:88、などのサブタイプを含むHLA-A24型を指す。
- [0028] 特記しない限り、「HLA-A02（またはHLA-A2）」という用語は、HLA-A*02:01

、HLA-A*02:02、A*02:03、A*02:04、A*02:05、A*02:06、A*02:07、A*02:10、A*02:11、A*02:13、A*02:16、A*02:18、A*02:19、A*02:28、およびA*02:50などのサブタイプを含むHLA-A02型を指す。

[0029] 特記しない限り、「コロナウイルス蛋白」という用語は、コロナウイルスのゲノム配列によってコードされる各蛋白質の全長アミノ酸配列からなる蛋白質を指す。好ましい例としてはSARS-CoV-2の構造蛋白質や非構造蛋白質が挙げられる。また、コロナウイルスの例としては、SARS-CoV-2、MERS-CoVおよびSARS-CoVが含まれるが、これらに限定されない。これらの各コロナウイルスのゲノム塩基配列（参照配列）と、それによってコードされるコロナウイルス蛋白の各アミノ酸配列は、例えば、以下のようなGenbank accession numberで取得することができる：

SARS-CoV-2: MN908947

MERS-CoV: JX869059

SARS-CoV: Tor2: AY274119、BJ01: AY278488あるいはGZ02: AY390556

[0030] 特記しない限り、「SARS-CoV-2蛋白」という用語は、SARS-CoV-2のゲノム配列によってコードされる各蛋白質の全長アミノ酸配列からなる蛋白質を指し、SARS-CoV-2が持つ4つの構造蛋白質と6つの非構造蛋白質を含む。4つの構造配列と6つの非構造蛋白質を表1にまとめた。なお表中、非構造蛋白質であるorf1abについては、リボソーマルフレーンシフトにより、参照配列中の266..13468と13468..21555の2つのORFがつながって1つのORFを構成している。

[表1]

	蛋白質	参照配列: GenBank accession number	ゲノム塩基配列 (MN908947.3)中の コード配列(CDS)	アミノ酸配列 (配列番号)
4つの 構造蛋白質	スパイク蛋白	QHD43416	21563..25384	17
	エンベロープ蛋白	QHD43418	26245..26472	18
	マトリックス蛋白	QHD43419	26523..27191	19
	核蛋白	QHD43423	28274..29533	20
6つの 非構造蛋白質	ORF1ab	QHD43415	266..13468,13468..21555	21
	ORF3a	QHD43417	25393..26220	22
	ORF6	QHD43420	27202..27387	23
	ORF7a	QHD43421	27394..27759	24
	ORF8	QHD43422	27894..28259	25
	ORF10	QHI42199	29558..29674	26

[0031] 特記しない限り、「コロナウイルス感染細胞」、「ウイルス感染細胞」および「感染細胞」という用語は本明細書において互換的に用いられ、特に別段の定めのない限り、コロナウイルスに感染した細胞を指す。コロナウイルスの例としては、SARS-CoV-2、MERS-CoVおよびSARS-CoVなどが含まれるが、これらに限定されない。

[0032] 本明細書において、「感染」という用語は、細胞または体組織におけるウイルスによる侵入および／またはウイルスの増殖、およびウイルスによる侵入およびウイルスの増殖から生じる病状を含む。ウイルスのライフサイクルによる侵入およびウイルスのライフサイクルの増殖段階は、これらに限らないが、該ウイルス粒子が細胞に結合し、ウイルスの遺伝情報を細胞に導入し、ウイルス蛋白質を発現し、新規ウイルス粒子を産生し、細胞からウイルス粒子を放出することを含む。

[0033] 対象または患者との関連において、本明細書で使用される「対象の（または患者の）HLA抗原はHLA-A24またはHLA-A02である」という表現は、対象または患者がMHC（主要組織適合複合体）クラスⅠ分子としてのHLA-A24またはHLA-A02抗原遺伝子をホモ接合的またはヘテロ接合的に保有し、かつHLA-A24またはHLA-A02抗原が対象または患者の細胞においてHLA抗原として発現されることを指す。

- [0034] 本発明の方法および組成物がコロナウイルス感染症の「治療」との関連において有用である限り、治療が臨床的利点、例えば対象におけるコロナウイルス感染症の臨床症状の緩和、重症化の抑制等をもたらす場合に、治療は「有効である」とみなされる。コロナウイルス感染症の主な症状としては、一般に、発熱、咳、悪寒、硬直、および筋肉痛等が知られている。多くの感染患者の症状は軽度で、1－2週間程度で回復するとされている。しかし一部の患者では、呼吸ひっ迫の症状が見られ、顕著な呼吸困難、低酸素症、更には急性呼吸ひっ迫症候群(ARDS)を伴うこともある。また最近の報告によると、特にSARS-CoV-2感染患者においては、比較的軽症な患者において、嗅覚や味覚の異常といった固有の症状も観察されている。あるいは、重症患者における血栓やサイトカインストームが重症化をもたらしていることも知られている。治療を予防的に適用する場合、「有効な」とは、治療によって、コロナウイルス感染症の発症が遅延されるもしくは妨げられるか、またはコロナウイルス感染症の臨床症状が妨げられるもしくは緩和されることを意味する。有効性は、コロナウイルス感染症を診断または治療するための任意の公知の方法と関連して決定される。たとえば、先に挙げた具体的な症状のいずれかが、抑制される場合、治療や予防の有効性が示されるといえる。
- [0035] 本発明の方法および組成物がコロナウイルス感染症の「予防」との関連において有用である限り、「予防」という用語は本明細書において、疾患による死亡率または罹患率の負荷を軽減させる任意の働きを含む。予防は、「第一次、第二次、および第三次の予防レベル」で行われ得る。第一次の予防は疾患の発生を回避するのに対し、第二次および第三次レベルの予防は、疾患の進行および症状の出現を予防することに加え、機能を回復させ、かつ疾患関連の合併症を減少させることによって、既存の疾患の悪影響を低下させることを目的とした働きを包含する。あるいは、予防は、特定の障害の重症度を緩和すること、例えば発熱、息切れ、咳、上気道感染症などの臨床症状を減少させることを目的とした広範囲の予防的治療を含み得る。
- [0036] 本発明との関連において、コロナウイルス感染症の治療および／もしくは

予防、ならびに／または重症化の抑制は、コロナウイルス感染症の少なくとも1つの症状の発症の遅延、またはそれらの改善を含む。また、コロナウイルス感染細胞におけるウイルスの増殖阻害などを含む。コロナウイルス感染症の効果的な治療および／または予防は、死亡率を減少させ、コロナウイルス感染症に罹患した個体の予後を改善し、かつコロナウイルス感染症に伴う症状を緩和する。例えば、症状の軽減または改善は効果的な治療および／または予防を構成し、10%、20%、30%、もしくはそれ以上の軽減もしくは症状が安定した状態を含む。

[0037] 本発明において、ウイルスの増殖阻害とは、感染細胞内におけるウイルスの複製工程の阻害を含む。本発明のペプチドによって誘導されるCTLは、ウイルス感染細胞において、ウイルス複製過程で発現するウイルスの各蛋白質が抗原提示されると、その細胞傷害活性によって感染細胞の細胞機能（遺伝子の複製や蛋白質翻訳）を傷害する。あるいはCTLは、感染細胞そのものを破壊する。その結果、感染細胞の細胞機能に依存するウイルス粒子の複製過程が阻害され、ウイルスの増殖が阻害される。

また本発明において、重症化の抑制とは、コロナウイルス感染に伴う任意の症状の悪化、あるいは進行の抑制を意味する。具体的には、酸素吸入、あるいは人工呼吸器や体外式膜型人工肺(ECMO)の装着などの介入治療を要する呼吸の逼迫症状の進行は、コロナウイルス感染症における重症化の代表的な例である。したがって、これらの症状の進行（悪化）の防止、予防、あるいは軽減は、本発明における重症化の抑制に含まれる。

[0038] 本発明との関連において、「抗体」という用語は、指定のタンパク質またはそのペプチドと特異的に反応する免疫グロブリンおよびその断片を指す。抗体には、ヒト抗体、霊長類化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、ヒト化抗体、他のタンパク質または放射標識と融合させた抗体、および抗体断片が含まれ得る。さらに、本明細書において「抗体」は広義で使用され、具体的にはインタクトなモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、2以上のインタクトな抗体から形成される多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を包

含し、また所望の生物活性を示す限り、抗体断片を包含する。「抗体」は、いずれのクラス（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM）の抗体であってもよい。

[0039] 特記しない限り、本明細書で使用する技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する技術分野の当業者によって共通して理解されている用語と同じ意味を有する。

[0040] 1.1. ペプチド

HLA-A24は、アジア人の中でよく見られるアリルであり、HLA-A02は白人でよく見られるアリルである (Sette A, Sidney J., Immunogenetics 1999, 50:201-12; Cao K et al., Hum Immunol 2001, 62(9):1009-1030; Gonzalez-Galarza FF et al., Nucleic Acids Res 2020, 48(D1):D783-D788)。そのため、HLA-A24またはHLA-A02によって拘束されるSARS-CoV-2蛋白由来のCTL誘導性ペプチドを提供することにより、多くのアジア人または白人に、コロナウイルス感染症の有効な治療方法を提供することができる。よって、本発明は、HLA-A24またはHLA-A02拘束性の様式でCTLを誘導し得るSARS-CoV-2蛋白由来のペプチドを提供する。

[0041] 本発明のペプチドは、HLA-A24またはHLA-A02拘束性の様式でCTLを誘導し得るSARS-CoV-2蛋白由来のペプチドである。HLA-A24拘束性の様式でCTLを誘導し得るペプチドとしては、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。HLA-A02拘束性の様式でCTLを誘導し得るペプチドとしては、配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドが挙げられる。

[0042] これらのペプチドでパルスした樹状細胞によるT細胞のインビトロでの刺激により、これらのペプチドに特異的な細胞傷害活性を有するCTLが樹立され得る。樹立されたCTLは、各ペプチドをパルスした標的細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示す。

[0043] CTLはコロナウイルス抗原（コロナウイルス蛋白由来のエピトープペプチド

）の提示を受けて誘導され、その後、コロナウイルス感染細胞表面に発現するヒト白血球抗原（HLA）クラスI分子上に提示されるエピトープペプチドを認識し、ウイルス感染細胞を殺傷するため、コロナウイルス抗原は免疫療法のための優れた標的である。したがって本発明のペプチドは、コロナウイルス感染症の免疫療法のために好適に用いることができる。好ましいペプチドは、ノナペプチド（アミノ酸残基9個からなるペプチド）またはデカペプチド（アミノ酸残基10個からなるペプチド）であり、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドがより好ましい。例えば、配列番号：1、2、4、7、10、12または13に記載のアミノ酸配列を有するペプチドは、HLA-A24またはHLA-A02を有するコロナウイルス感染細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示すCTLの誘導に適しており、HLA-A24またはHLA-A02陽性患者におけるコロナウイルス感染症の免疫療法のために好適に使用することができる。より好ましい態様では、本発明のペプチドは、HLA-A24陽性患者に対しては、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドであり、HLA-A02陽性患者に対しては、配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中より選択されるアミノ酸配列からなるペプチドである。

[0044] 本発明のペプチドは、結果として生じるペプチドが元のペプチドCTL誘導能を保持する限り、本発明のペプチドのアミノ酸配列に付加的なアミノ酸残基を隣接させることができる。付加的なアミノ酸残基は、それらが元のペプチドのCTL誘導能を損なわない限り、任意の種類のアミノ酸から構成され得る。したがって本発明のペプチドは、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中より選択されるアミノ酸配列を含む、CTL誘導能を有するペプチドを包含する。そのようなペプチドは、例えば約40アミノ酸未満であり、多くの場合には約20アミノ酸未満であり、通常は約15アミノ酸未満である。したがって、本発明のペプチドは、元のペプチドがノナペプチドであれば、当該ペプチドに付加的なアミノ酸を隣接させることによって生じる10アミノ酸長、または11～40アミノ酸長のペプチドを包含する。また、元のペプ

チドが、デカペプチドであれば、11～40アミノ酸長のペプチドを包含する。そのようなペプチドは、例えば、11～20アミノ酸長のペプチドであることができ、11～15アミノ酸長のペプチドであることができる。付加的なアミノ酸残基の好ましい例は、SARS-CoV-2のゲノム配列によってコードされる各蛋白質の全長アミノ酸配列（例えば、配列番号：17-26）において本発明のペプチドのアミノ酸配列に隣接するアミノ酸残基である。したがって、本発明のペプチドは、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中より選択されるアミノ酸配列を含む、SARS-CoV-2蛋白のペプチド断片であって、CTL誘導能を有するペプチドを包含する。

[0045] 一般的に、あるペプチド中の1個、2個、またはそれ以上のアミノ酸の改変は該ペプチドの機能に影響を及ぼさず、場合によっては元のペプチドの所望の機能を増強することさえある。実際に、改変ペプチド（すなわち、元の参照配列と比較して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が改変された（すなわち、置換、欠失、挿入および／または付加された）アミノ酸配列から構成されるペプチド）は、元のペプチドの生物活性を保持することが知られている（Mark et al., Proc Natl Acad Sci USA 1984, 81: 5662-6; Zoller and Smith, Nucleic Acids Res 1982, 10: 6487-500; Dalbadie-McFarland et al., Proc Natl Acad Sci USA 1982, 79: 6409-13）。したがって、一態様において、本発明のペプチドは、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中より選択されるアミノ酸配列に対して1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、かつCTL誘導能を有するペプチドであり得る。

[0046] 当業者は、元のアミノ酸側鎖の特性の保存をもたらす傾向がある、単一のアミノ酸またはわずかな割合のアミノ酸を変更する、アミノ酸配列に対する個々の置換を認識することができる。したがって、それらはしばしば「保存的置換」または「保存的改変」と称され、「保存的置換」または「保存的改変」によるタンパク質の改変は、元のタンパク質と類似の機能を有する改変タンパク質を生じ得る。機能的に類似しているアミノ酸を提示する保存的置

換の表は、当技術分野において周知である。機能的に類似しているアミノ酸側鎖の特性の例には、例えば、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、ならびに以下の官能基または特徴を共通して有する側鎖が含まれる：脂肪族側鎖（G、A、V、L、I、P）；ヒドロキシル基含有側鎖（S、T、Y）；硫黄原子含有側鎖（C、M）；カルボン酸およびアミド含有側鎖（D、N、E、Q）；塩基含有側鎖（R、K、H）；および芳香族含有側鎖（H、F、Y、W）。加えて、以下の8群はそれぞれ、相互に保存的置換であるとして当技術分野で認められているアミノ酸を含む：

- 1) アラニン（A）、グリシン（G）；
- 2) アスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）；
- 3) アスパラギン（N）、グルタミン（Q）；
- 4) アルギニン（R）、リジン（K）；
- 5) イソロイシン（I）、ロイシン（L）、メチオニン（M）、バリン（V）；
- 6) フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、トリプトファン（W）；
- 7) セリン（S）、スレオニン（T）；および
- 8) システイン（C）、メチオニン（M）（例えば、Creighton, Proteins 1984を参照されたい）。

[0047] このような保存的改変ペプチドもまた、本発明のペプチドに包含される。しかしながら、本発明のペプチドはこれらに限定されず、改変ペプチドが元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、非保存的な改変を含み得る。さらに、改変ペプチドは、SARS-CoV-2蛋白の多型変異体、種間相同体、および対立遺伝子由来のCTL誘導可能なペプチドを排除しない。

[0048] 元のペプチドのCTL誘導能を保持する限り、少数の（例えば、1個、2個、または数個の）またはわずかな割合のアミノ酸を改変する（すなわち、置換、欠失、挿入および／または付加する）ことができる。本明細書において、「数個」という用語は、5個またはそれ未満のアミノ酸、例えば4個もしくは3個またはそれ未満を意味する。改変するアミノ酸の割合は、好ましくは20%もし

くはそれ未満、より好ましくは15%もしくはそれ未満、さらにより好ましくは10%もしくはそれ未満、または1～5%である。

[0049] 免疫療法との関連で用いられた場合、本発明のペプチドは、好ましくはHLA抗原との複合体として、細胞またはエクソソームの表面上に提示されるべきである。したがって、本発明のペプチドは、HLA抗原に対する高い結合親和性を有することが好ましい。そのため、アミノ酸残基の置換、欠失、挿入および／または付加によってペプチドを改変して、結合親和性が改善された改変ペプチドを得てもよい。HLA抗原への結合によって提示されるペプチドの配列の規則性は既知であることから (Falk, et al., Immunogenetics 1994 40 23 2-41; Chujoh, et al., Tissue Antigens 1998: 52: 501-9; Takiguchi, et al., Tissue Antigens 2000: 55: 296-302.)、そのような規則性に基づいた改変を本発明のペプチドに導入することができる。

[0050] 例えば、HLA Class Iに対する結合性を有するペプチドでは、一般に、N末端から2番目のアミノ酸およびC末端のアミノ酸がHLA Class Iへの結合に関与するアンカー残基であることが多い (Rammensee HG, et al., Immunogenetics, 1995;41(4):178-228.)。

例えば、高いHLA-A24結合親和性を保有するペプチドは、フェニルアラニン、チロシン、メチオニン、またはトリプトファンで置換されたN末端から2番目のアミノ酸を有する傾向がある。同様に、C末端アミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、またはメチオニンで置換されたペプチドも高いHLA-A24結合親和性を保有する傾向がある。したがって、HLA-A24結合親和性を高めるためには、N末端から2番目のアミノ酸をフェニルアラニン、チロシン、メチオニン、もしくはトリプトファンで置換すること、および／またはC末端のアミノ酸を、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン、もしくはメチオニンで置換することが望ましい可能性がある。したがって、N末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニンもしくはトリプトファンで置換されている、および／またはC末端がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファン

ンもしくはメチオニンで置換されている、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、本発明に包含される。

[0051] 同様に、本発明は、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15において1個、2個または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列を含むペプチドであって、（a）N末端から2番目のアミノ酸がフェニルアラニン、チロシン、メチオニンもしくはトリプトファンである；および（b）C末端アミノ酸がフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンもしくはメチオニンである、との特徴の一方または両方を有するペプチドを包含する。好ましい態様において、本発明のペプチドは、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15のアミノ酸配列において、N末端から2番目のアミノ酸のフェニルアラニン、チロシン、メチオニン、もしくはトリプトファンによる置換、およびC末端アミノ酸のフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンもしくはメチオニンによる置換の、いずれかまたは両方を含むアミノ酸配列を含む。

[0052] 同様に、高いHLA-A02結合親和性を保有するペプチドは、ロイシンもしくはメチオニンで置換されたN末端から2番目のアミノ酸および／またはバリンもしくはロイシンで置換されたC末端のアミノ酸を有する傾向がある。したがって、HLA-A02結合親和性を高めるために、N末端から2番目のアミノ酸をロイシンもしくはメチオニンで置換すること、および／またはC末端のアミノ酸をバリンもしくはロイシンで置換することが望ましい可能性がある。したがって、N末端から2番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンで置換されている、および／またはC末端がバリンもしくはロイシンで置換されている、配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、本発明に包含される。

[0053] 同様に、本発明は、配列番号：1、2、4、7、10、12および13において1個、2個または数個のアミノ酸が、置換、欠失、挿入および／または付加されてい

るアミノ酸配列を含むペプチドであって、(a) N末端から2番目のアミノ酸がロイシンもしくはメチオニンである、および (b) C末端アミノ酸がバリンもしくはロイシンである、との特徴の一方または両方を有するペプチドを包含する。好ましい態様において、本発明のペプチドは、配列番号：1、2、4、7、10、12および13のアミノ酸配列において、N末端から2番目のアミノ酸のロイシンもしくはメチオニンによる置換、およびC末端アミノ酸のバリンもしくはロイシンによる置換のいずれか、または両方を含むアミノ酸配列を含む。

[0054] 末端のアミノ酸においてだけでなく、ペプチドの潜在的なT細胞受容体 (TCR) 認識部位においても、置換を導入することができる。いくつかの研究は、例えばCAP1、p53₍₂₆₄₋₂₇₂₎、Her-2/neu₍₃₆₉₋₃₇₇₎、またはgp100₍₂₀₉₋₂₁₇₎ など、アミノ酸置換を有するペプチドが元のペプチドと同等の活性を有するかまたはより優れた活性を有し得ることを実証している (Zaremba et al. Cancer Res. 57, 4570-4577, 1997、T. K. Hoffmann et al. J Immunol. (2002) Feb 1; 168(3):1338-47、S. O. Dionne et al. Cancer Immunol immunother. (2003) 52: 199-206、およびS. O. Dionne et al. Cancer Immunology, Immunotherapy (2004) 53, 307-14)。

[0055] 本発明はまた、本発明のペプチド (例えば、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチド) のN末端および／またはC末端に、1個、2個、または数個のアミノ酸を付加することができることを企図する。CTL誘導能を保持するような改変ペプチドもまた、本発明に含まれる。例えば、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13または15に記載のアミノ酸配列からなるペプチドのN末端および／またはC末端に1個、2個、または数個のアミノ酸が付加されたペプチドは、APCに接触させると、APC内に取り込まれてプロセッシングを受け、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13または15に記載のアミノ酸配列からなるペプチドとなる。その後、抗原提示経路を経て、APCの細胞表面に提示することにより、CTLを誘導し得る。

[0056] しかしながら、ペプチドのアミノ酸配列が、異なる機能を有する内因性マ

たは外因性タンパク質のアミノ酸配列の一部と同一である場合、自己免疫障害および／または特定の物質に対するアレルギー症状などの副作用が誘発される可能性がある。したがって、ペプチドのアミノ酸配列が他のタンパク質のアミノ酸配列と一致する状況を回避するために、利用可能なデータベースを用いて相同性検索を行うことが好ましい。相同性検索から、対象ペプチドと比較して1個または2個のアミノ酸が異なるペプチドさえも存在しないことが明らかになった場合には、そのような副作用の危険を伴うことなしに、HLA抗原との結合親和性を増大させるため、および／またはそのCTL誘導能を増大させるために、該対象ペプチドを改変することができる。

[0057] 本発明のペプチドの1個、2個、または数個のアミノ酸が改変されたペプチドは、元のペプチドのCTL誘導能を保持し得ると予測されるが、改変ペプチドに関してCTL誘導能を確認することが好ましい。本明細書において「CTL誘導能を有するペプチド」とは、そのペプチドで刺激されたAPCによって、CTLが誘導されるペプチドを指す。「CTLの誘導」には、CTLへの分化誘導、CTL活性化の誘導、CTL増殖の誘導、CTLの細胞傷害活性の誘導、CTLによる標的細胞の溶解の誘導、およびCTLのIFN- γ 産生増加の誘導が含まれる。

[0058] CTL誘導能の確認は、HLA抗原を保有するAPC（例えば、Bリンパ球、マクロファージ、および樹状細胞）を誘導し、ペプチドで刺激した後、CD8陽性T細胞と混合し、その後、標的細胞に対してCTLによって放出されたIFN- γ を測定することにより行うことができる。APCは、好ましくは、ヒト末梢血単核白血球由来の樹状細胞を使用することができる。反応系として、HLA抗原を発現するように作製されたトランスジェニック動物を用いることもできる。また、例えば、標的細胞を ^{51}Cr 等で放射標識し、標的細胞から放出された放射活性からペプチドで誘導されたCTLの細胞傷害活性を算出することができる。あるいは、ペプチドで刺激したAPCの存在下で、CTLによって産生および放出されたIFN- γ を測定し、抗IFN- γ モノクローナル抗体を用いて培地上の阻止帯を可視化することによって、CTL誘導能を評価することができる。

[0059] 上記の改変に加えて、本発明のペプチドは、結果として生じる連結ペプチ

ドがCTL誘導能を保持する限り、他のペプチドに連結させることもできる。本発明のペプチドと連結させる適切なペプチドの例としては、コロナウイルス蛋白に由来する他のCTL誘導性ペプチドが挙げられる。また、本発明のペプチド同士を連結させることもできる。ペプチド間の連結に使用できる適切なリンカーは当技術分野で公知であり、例えばAAY (P. M. Daftarian et al., J Trans Med 2007, 5:26)、AAA、NKRK (配列番号: 27) (R. P. M. Suttmüller et al., J Immunol. 2000, 165: 7308-15)、またはK (S. Ota et al., Can Res. 62, 1471-6、K. S. Kawamura et al., J Immunol. 2002, 168: 5709-15) のようなリンカーを使用することができる。ペプチドは、様々な配置 (例えば、連鎖状、重複など) で連結することができ、3つ以上のペプチドを連結することもできる。

[0060] 本発明のペプチドはまた、結果として生じる連結ペプチドがCTL誘導能を保持する限り、他の物質に連結させることもできる。本発明のペプチドと連結させる適切な物質の例としては、例えば、ペプチド、脂質、糖もしくは糖鎖、アセチル基、および天然もしくは合成のポリマー等が挙げられる。本発明のペプチドは、CTL誘導能が損なわれない限り、糖鎖付加、側鎖酸化、またはリン酸化などの修飾を行うこともできる。このような種類の修飾を行って、付加的な機能 (例えば、標的化機能および送達機能) を付与すること、またはペプチドを安定化することができる。

[0061] 例えば、ペプチドのインビボ安定性を高めるために、D-アミノ酸、アミノ酸模倣体、または非天然アミノ酸を導入することが当技術分野において公知であり、この概念を本発明のペプチドに適合させることもできる。ペプチドの安定性は、いくつかの方法でアッセイすることができる。例えば、ペプチダーゼ、ならびにヒトの血漿および血清などの様々な生体媒質を用いて、安定性を試験することができる (例えば、Verhoef et al., Eur J Drug Metab Pharmacokin 1986, 11: 291-302を参照されたい)。

[0062] さらに、上述したように、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入および／または付加された改変ペプチドの中から、元のペプチド

と比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有するものをスクリーニングまたは選択することができる。したがって本発明はまた、元のものと比較して同じかまたはそれよりも高い活性を有する改変ペプチドをスクリーニングまたは選択する方法を提供する。具体的には、本発明は、CTL誘導能を有するペプチドをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法を提供する：

- (a) 配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列からなる元のアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなる候補配列を作成する段階；
- (b) (a) で作成した候補配列の中からいかなる公知のヒト遺伝子産物とも有意な相同性（配列同一性）を有さない候補配列を選択する段階；
- (c) (b) で選択した候補配列からなるペプチドと、APCとを接触させる段階；
- (d) (c) のAPCとCD8陽性T細胞とを接触させる段階；および
- (e) 元のアミノ酸配列からなるペプチドよりも同等かまたはより高いCTL誘導能を有するペプチドを選択する段階。

ある態様において、ペプチドと接触させるためのAPCは、HLA-A02およびHLA-A24のいずれか、または両方が陽性のAPCである。

[0063] 本明細書において、本発明のペプチドはまた、「SARS-CoV-2ペプチド」または「SARS-CoV-2ポリペプチド」とも記載される。

[0064] 111. 本発明のペプチドの調製

周知の技法を用いて、本発明のペプチドを調製することができる。例えば、組換えDNA技術または化学合成を用いて、本発明のペプチドを調製することができる。本発明のペプチドは、個々に、または2つもしくはそれ以上のペプチドを含むより長いポリペプチドとして、合成することができる。組換えDNA技術を用いて宿主細胞内で産生させた後、または化学合成した後、宿主細胞または合成反応物から、本発明のペプチドを単離することができる。すなわ

ち、他の宿主細胞タンパク質およびそれらの断片、または他のいかなる化学物質も実質的に含まないように、本発明のペプチドを精製または単離することができる。

[0065] 本発明のペプチドは、修飾によって元のペプチドの生物活性が損なわれない限り、糖鎖付加、側鎖酸化、またはリン酸化などの修飾を含み得る。他の例示的な修飾には、例えば当該ペプチドの血清半減期を延長させるために用いることができる、D-アミノ酸または他のアミノ酸模倣体の取り込みが含まれる。

[0066] 選択されたアミノ酸配列に基づいた化学合成によって、本発明のペプチドを得ることができる。該合成に適合させることのできる従来のペプチド合成法の例には、以下のような文献に記載の方法が含まれる：

(i) Peptide Synthesis, Interscience, New York, 1966；

(ii) The Proteins, Vol. 2, Academic Press, New York, 1976；

(iii) 「ペプチド合成」(日本語)，丸善，1975；

(iv) 「ペプチド合成の基礎と実験」(日本語)，丸善，1985；

(v) 「医薬品の開発」(日本語)，続第14巻(ペプチド合成)，広川書店，1991；

(vi) W099/67288；および

(vii) Barany G. & Merrifield R.B., Peptides Vol. 2, Solid Phase Peptide Synthesis, Academic Press, New York, 1980, 100-18。

[0067] あるいは、ペプチドを産生するための任意の公知の遺伝子工学的方法を適合させて、本発明のペプチドを得ることもできる(例えば、Morrison J, J Bacteriology 1977, 132: 349-51；Clark-Curtiss & Curtiss, Methods in Enzymology (Wu et al.) 1983, 101: 347-62)。例えば、最初に、本発明のペプチドを発現可能な形態で(例えば、プロモーター配列に相当する調節配列の下流に)コードするポリヌクレオチドを含む適切なベクターを調製し、適切な宿主細胞に形質転換する。次いで、該宿主細胞を培養して、本発明のペプチドを産生させる。あるいは、インビトロ翻訳系を用いて、本発明のペプ

チドをインビトロで作製することもできる。

[0068] I V. ポリヌクレオチド

本発明はまた、本発明のペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドを提供する。これらには、天然SARS-CoV-2遺伝子（例えば、GenBankアクセッション番号MN908947（配列番号：16））由来のポリヌクレオチド、およびその保存的に改変されたヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。本明細書において「保存的に改変されたヌクレオチド配列」という語句は、同一のまたは本質的に同一のアミノ酸配列をコードする配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、数多くの機能的に同一の核酸が任意の特定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCG、およびGCUはすべて、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、あるコドンによってアラニンが指定される任意の位置において、コードされるポリペプチドを変化させることなく、該コドンを前記の対応するコドンのいずれかに変更することができる。そのような核酸の変異は「サイレント変異」であり、保存的に改変された変異の一種である。ペプチドをコードする本明細書中のあらゆる核酸配列は、該核酸のあらゆる可能なサイレント変異をも表す。核酸中の各コドン（通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および通常トリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く）を改変して、機能的に同一の分子を得ることができることを、当業者は認識するであろう。したがって、ペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、開示した各配列において非明示的に記載されている。

[0069] 本発明のポリヌクレオチドは、DNA、RNA、およびそれらの誘導体から構成され得る。DNAはA、T、C、およびGなどの塩基から適切に構成され、RNAではTはUに置き換えられる。

[0070] 本発明のポリヌクレオチドは、介在するアミノ酸配列を間に伴って、または伴わずに、本発明の複数のペプチドをコードし得る。例えば、介在するアミノ酸配列は、ポリヌクレオチドまたは翻訳されたペプチドの切断部位（例えば、酵素認識配列）を提供し得る。さらに、ポリヌクレオチドは、本発明

のペプチドをコードするコード配列に対する任意の付加的配列を含み得る。例えば、ポリヌクレオチドは、ペプチドの発現に必要な調節配列を含む組換えポリヌクレオチドであってよく、またはマーカー遺伝子等を有する発現ベクター（例えば、プラスミド）であってもよい。一般に、例えばポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを用いる従来の組換え技法によりポリヌクレオチドを操作することによって、そのような組換えポリヌクレオチドを調製することができる。

[0071] 組換え技法および化学合成技法のいずれを用いても、本発明のポリヌクレオチドを作製することができる。例えば、適切なベクターに挿入することによってポリヌクレオチドを作製することができ、これはコンピテント細胞にトランスフェクトした場合に発現され得る。あるいは、PCR技法または適切な宿主内での発現を用いて、ポリヌクレオチドを増幅することもできる（例えば、Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989を参照されたい）。あるいは、Beaucage SL & Iyer RP, *Tetrahedron* 1992, 48: 2223-311; Matthes et al., *EMBO J* 1984, 3: 801-5に記載されている固相技法を用いて、ポリヌクレオチドを合成することもできる。

[0072] V. エキソソーム

本発明はさらに、本発明のペプチドとHLA抗原との間に形成された複合体を自身の表面上に提示する、エキソソームと称される細胞内小胞を提供する。エキソソームは、例えば特表平11-510507号およびW099/03499に詳述されている方法を用いて調製することができ、治療および／または予防の対象となる患者から得られたAPCを用いて調製することができる。本発明のエキソソームは、本発明のペプチドと同様の様式で、ワクチンとして接種することができる。

[0073] 前記複合体中に含まれるHLA抗原の型は、治療および／または予防を必要とする対象のものと一致しなければならない。例えば日本をはじめとするアジア諸国では、HLA-A24（例えば、HLA-A*24:02）、欧米ではHLA-A02（例えばHLA

-A*02:01) が広く一般的に見られるアリルであり、これらのHLA抗原の型はアジア人または白人患者の治療に適していると考えられる。典型的には、クリニックにおいて、治療を必要とする患者のHLA抗原の型を予め調べることにより、特定のHLA抗原に対して高レベルの結合親和性を有する、または特定のHLA抗原を介した抗原提示によるCTL誘導能を有するペプチドの適切な選択が可能となる。

[0074] 本発明のエキソソームは、本発明のペプチドとHLA-A24またはHLA-A02との複合体をその表面上に提示する。本発明のペプチドと複合体を形成するHLAがHLA-A24である場合、本発明のペプチドは、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドまたはその改変ペプチドであることがより好ましい。

本発明のペプチドと複合体を形成するHLAがHLA-A02である場合、本発明のペプチドは、配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドまたはその改変ペプチドであることがより好ましい。

[0075] V I . 抗原提示細胞 (APC)

本発明はまた、HLA抗原と本発明のペプチドとの間に形成される複合体を自身の表面上に提示するAPCを提供する。あるいは、本発明は、HLA抗原と本発明のペプチドとの間に形成された複合体をその細胞表面上に有するAPCを提供する。本発明のAPCは、単離されたAPCであり得る。細胞 (APC、CTL等) に関して用いられる場合、「単離された」という用語は、該細胞が他の種類の細胞から分離されていることを指す。本発明のAPCは、治療および／または予防の対象となる患者に由来するAPCから誘導されたものであってもよく、かつ単独で、または本発明のペプチド、エキソソーム、もしくはCTLを含む他の薬物と併用して、ワクチンとして投与することができる。

[0076] 本発明のAPCは特定の種類の細胞に限定されず、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られている細胞、例えば樹状細胞（dendritic cell：DC）、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞、および活性化T細胞が含まれる。DCは、APCの中で最も強力なCTL誘導作用を有する代表的なAPCであるため、DCは本発明のAPCとして好ましく使用され得る。

[0077] 例えば、末梢血単球からDCを誘導し、次にそれらをインビトロ、エキスピボ、またはインビボで本発明のペプチドで刺激することによって、本発明のAPCを得ることができる。本発明のペプチドを対象に投与した場合、本発明のペプチドを提示するAPCが該対象の体内で誘導される。したがって、本発明のAPCは、本発明のペプチドを対象に投与した後、該対象からAPCを回収することによって得ることができる。あるいは、本発明のAPCは、対象から回収されたAPCを本発明のペプチドと接触させることによって得ることもできる。

[0078] 対象において、コロナウイルス感染細胞に対する免疫応答を誘導するために、本発明のAPCを単独で、または本発明のペプチド、エキソソーム、もしくはCTLを含む他の薬剤と併用して、対象に投与することができる。例えば、エキスピボ投与は以下の段階を含み得る：

- (a) 第1の対象からAPCを回収する段階、
- (b) 段階（a）のAPCをペプチドと接触させる段階、および
- (c) 段階（b）のAPCを第2の対象に投与する段階。

[0079] 第1の対象と第2の対象は同一の個体であってもよく、または異なる個体であってもよい。第1の対象と第2の対象が異なる個体である場合、第1の対象と第2の対象のHLAは同一の型であることが好ましい。上記の段階（b）によって得られたAPCは、コロナウイルス感染症を治療および／または予防するためのワクチンとなり得る。

[0080] 上記のような方法によって得られた、本発明のAPCは、CTL誘導能を有する。APCに関して用いられる「CTL誘導能」という用語は、CD8陽性T細胞と接触させたときに、CTLを誘導することができるAPCの能力を指す。本発明のAPCに

よって誘導されたCTLは、SARS-CoV-2蛋白に特異的なCTLであり、SARS-CoV-2感染細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示す。

[0081] 本発明のAPCは、上記の方法に加え、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをインビトロでAPCに導入することによって調製することもできる。導入するポリヌクレオチドは、DNAまたはRNAの形態であってよい。導入の方法の例には、特に限定されることなく、リポフェクション、エレクトロポレーション、およびリン酸カルシウム法などの、当分野において従来より実施されている様々な方法が含まれる。より具体的には、Cancer Res 1996, 56: 5672-7; J Immunol 1998, 161: 5607-13; J Exp Med 1996, 184: 465-72; 公表特許公報第2000-509281号に記載されているような方法を用いることができる。本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入することによって、該ポリヌクレオチドは細胞内で転写、翻訳等を受け、次いで、生じたペプチドはMHCクラスIによってプロセッシングされて、提示経路を経て本発明のペプチドがAPCの細胞表面に提示される。

[0082] 好ましい態様において、本発明のAPCは、HLA-A24（より好ましくはHLA-A*24:02）と本発明のペプチドとの間に形成される複合体を、自身の細胞表面上に提示しているAPCである。本発明のペプチドと複合体を形成するHLAがHLA-A24である場合、本発明のペプチドは、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドであることがより好ましい。

[0083] あるいは、好ましい態様において、本発明のAPCは、HLA-A02（より好ましくはHLA-A*02:01）と本発明のペプチドとの間に形成される複合体を、自身の細胞表面上に提示しているAPCである。本発明のペプチドと複合体を形成するHLAがHLA-A02である場合、本発明のペプチドは、配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：1、2、4、7、10、12および1

3の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドであることがより好ましい。

[0084] また、本発明のAPCは、好ましくは、以下の (a) または (b) に記載される段階を含む方法によって誘導されるAPCである：

(a) HLA-A24 (より好ましくはHLA-A*24:02) またはHLA-A02 (より好ましくはHLA-A*02:01) を発現しているAPCを本発明のペプチドと接触させる段階；

(b) HLA-A24 (より好ましくはHLA-A*24:02) またはHLA-A02 (より好ましくはHLA-A*02:01) を発現しているAPCに、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを導入する段階。

[0085] HLA-A24を発現しているAPCと接触させる本発明のペプチドは、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドであることがより好ましい。 HLA-A02を発現しているAPCと接触させる本発明のペプチドは、配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドであることが好ましく、配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配列からなるペプチドであることがより好ましい。

[0086] また、本発明によれば、CTL誘導能を有するAPCを誘導する薬学的組成物を製造するための本発明のペプチドの使用が提供される。加えて、本発明は、CTL誘導能を有するAPCを誘導する薬学的組成物を製造するための方法または工程を提供する。さらに、本発明はまた、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための本発明のペプチドを提供する。

[0087] V I I . 細胞傷害性Tリンパ球 (CTL)

本発明のペプチドによって誘導されたCTLは、インビボでコロナウイルス感染細胞を標的とする免疫応答を増強するため、本発明のペプチドと同様にワクチンとして用いることができる。したがって本発明は、本発明のペプチ

ドによって誘導または活性化された、CTLを提供する。本発明のCTLは、本発明のペプチドを標的とするCTLであり、本発明のペプチドとHLA抗原との複合体に結合することができるCTLである。該複合体へのCTLの結合は、CTLの細胞表面上に存在するT細胞受容体（TCR）を介して行われる。本発明のCTLは、単離されたCTLであり得る。

[0088] 本発明のCTLは、（1）本発明のペプチドを対象に投与すること、または（2）対象由来のAPC、およびCD8陽性T細胞、もしくは末梢血単核球（peripheral blood mononuclear cell：PBMC）をインビトロで本発明のペプチドで刺激すること、または（3）CD8陽性T細胞もしくはPBMCを、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCもしくはエキソソームとインビトロで接触させること、または（4）細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るT細胞受容体（TCR）の各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含むベクターをCD8陽性T細胞に導入すること、によって得ることができる。上記（2）または（3）の方法で使用されるエキソソームおよびAPCは、それぞれ「V. エキソソーム」および「V I. 抗原提示細胞（APC）」の章に記載の方法によって調製することができ、上記（4）の方法の詳細は「V I I I. T細胞受容体（TCR）」の章において記載する。

[0089] 本発明のCTLは、治療および／または予防の対象となる患者に対して、単独で投与することができ、または効果を調節する目的で本発明のペプチド、APCもしくはエキソソームを含む他の薬物と併用して投与することができる。また、本発明のCTLは、該CTLの投与対象となる患者に由来するCD8陽性T細胞から誘導されたCTLであり得る。本発明のCTLは、本発明のペプチド、例えば本発明のCTLの誘導に用いたものと同じのペプチドを提示する標的細胞に対して特異的に作用する。標的細胞は、コロナウイルス感染細胞のようにSARS-CoV-2蛋白を内因的に発現する細胞、またはSARS-CoV-2遺伝子をトランスフェクトした細胞であってよい。本発明のペプチドによる刺激によって該ペプチドを細胞表面上に提示する細胞もまた、本発明のCTLの攻撃の標的となり得る。また、本発明のCTLの標的細胞は、好ましくは、HLA-A24（より好ましくはHLA-A*

24:02) またはHLA-A02 (より好ましくはHLA-A*02:01) 陽性の細胞である。

[0090] 好ましい態様において、本発明のCTLは、HLA-A24 (より好ましくはHLA-A*24:02) またはHLA-A02 (より好ましくはHLA-A*02:01) とSARS-CoV-2蛋白の両方を発現している細胞を特異的に標的とする。本明細書において、CTLが細胞を「標的とする」とは、HLAと本発明のペプチドとの複合体を細胞表面に提示している細胞をCTLが認識して、該細胞に対して細胞傷害活性を示すことをいう。また、「特異的に標的とする」とは、CTLが該細胞に対して細胞傷害活性を示すが、それ以外の細胞に対しては傷害活性を示さないことをいう。また、CTLとの関連では、「細胞を認識する」という用語は、細胞表面に提示されるHLAと本発明のペプチドとの複合体にそのTCRを介して結合し、該細胞に対して特異的な細胞傷害活性を示すことを指す。したがって、本発明のCTLは、好ましくは、細胞表面上に提示されたHLA-A24 (より好ましくはHLA-A*24:02) またはHLA-A02 (より好ましくはHLA-A*02:01) と本発明のペプチドとの間に形成される複合体に、TCRを介して結合することができるCTLである。

また、本発明のCTLは、好ましくは、以下の (a) または (b) に記載される段階を含む方法によって誘導されたCTLである：

(a) CD8陽性T細胞を、HLA-A24 (より好ましくはHLA-A*24:02) またはHLA-A02 (より好ましくはHLA-A*02:01) と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソームとインビトロで接触させる段階；

(b) CD8陽性T細胞に、細胞表面上にHLA-A24 (より好ましくはHLA-A*24:02) またはHLA-A02 (より好ましくはHLA-A*02:01) により提示された本発明のペプチドに結合し得るTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを導入する段階。

[0091] V I I I . T細胞受容体 (TCR)

本発明はまた、細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含む組成物、およびそれを使用する方法を提供する。該ポリヌクレオチドは、HLA抗原により細胞表面上に提示された本発明のペプチドに結合し得るTCRを発現させる

ことにより、コロナウイルス感染細胞に対する特異性をCD8陽性T細胞に付与する。当技術分野における公知の方法を用いることにより、本発明のペプチドで誘導されたCTLのTCRサブユニットとしての α 鎖および β 鎖をコードするポリヌクレオチドを同定することができる（W02007/032255、およびMorgan et al., J Immunol, 171, 3288 (2003)）。例えば、TCRを分析するためにはPCR法が好ましい。分析のためのPCRプライマーは、例えば、5'側プライマーとしての5'-Rプライマー（5'-gtctaccaggcattcgcttcat-3'）（配列番号：28）、および3'側プライマーとしての、TCR α 鎖C領域に特異的な3-TRa-Cプライマー（5'-tcagctggaccacagccgcagcgt-3'）（配列番号：29）、TCR β 鎖C1領域に特異的な3-TRb-C1プライマー（5'-tcagaaatcctttctcttgac-3'）（配列番号：30）、またはTCR β 鎖C2領域に特異的な3-TR β -C2プライマー（5'-ctagcccttggaatcctttctctt-3'）（配列番号：31）であってよいが、これらに限定されない。同定されたポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入することによって形成されるTCRは、本発明のペプチドを提示する標的細胞と高い結合力で結合することができ、かつ、本発明のペプチドを提示する標的細胞の効率的な殺傷をインビボおよびインビトロで媒介する。

[0092] TCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドは、適切なベクター、例えばレトロウイルスベクターに組み込むことができる。これらのベクターは、当技術分野において周知である。該ポリヌクレオチドまたはそれらを発現可能な形態で含むベクターを、CD8陽性T細胞、例えば患者由来のCD8陽性T細胞に導入することができる。本発明は、患者自身のT細胞（または別の対象由来のT細胞）の迅速な改変により、優れたコロナウイルス感染細胞殺傷特性を有する改変T細胞を迅速かつ容易に作製することを可能にする既成の組成物を提供する。

[0093] 本明細書において、特異的TCRとは、該TCRがCD8陽性T細胞の表面上に存在する場合に、標的細胞表面上に提示された本発明のペプチドとHLA抗原との複合体を特異的に認識して、標的細胞に対する特異的な細胞傷害活性を付与し得るTCRである。上記複合体の特異的認識は任意の公知の方法によって確認す

ることができ、その好ましい例には、HLA分子および本発明のペプチドを用いるHLA多量体染色分析、ならびにELISPOTアッセイ法が含まれる。ELISPOTアッセイを行うことにより、上記ポリヌクレオチドを導入したT細胞がTCRによって標的細胞を特異的に認識すること、およびシグナルが細胞内で伝達されることを確認することができる。上記TCRがCD8陽性T細胞表面上に存在する場合に、該TCRが、CD8陽性T細胞に対して、標的細胞特異的な細胞傷害活性を付与し得るという確認もまた、公知の方法によって行うことができる。好ましい方法には、例えば、クロム放出アッセイ法などにより標的細胞に対する細胞傷害活性を測定することが含まれる。

[0094] また本発明は、HLA-A24との関連では、例えば配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに結合するTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを、CD8陽性T細胞に形質導入することによって調製されるCTLを提供する。HLA-A02との関連では、例えば配列番号：1、2、4、7、10、12および13から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに結合するTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを、CD8陽性T細胞に形質導入することによって調製されるCTLを提供する。

[0095] 形質導入されたCTLは、インビボでホーミングすることができ、かつ周知のインビトロ培養法によって増殖させることができる（例えば、Kawakami et al., J Immunol., 142, 3452-61 (1989)）。本発明のCTLは、治療または予防を必要としている患者における疾患の治療または予防に有用な免疫原性組成物を形成するために使用することができる（その内容が参照により本明細書に組み入れられるW02006/031221を参照されたい）。

[0096] IX. 薬学的組成物

本発明はまた、以下の中から選択される少なくとも1つの有効成分を含む、組成物または薬学的組成物を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；

- (c) 本発明のAPC；
- (d) 本発明のエキソソーム；
- (e) 本発明のCTL。

[0097] 本発明の薬学的組成物は、上記の有効成分に加えて、医薬品に通常用いられる担体、賦形剤等を特に制限なく必要に応じて含み得る。本発明の薬学的組成物に使用可能な担体の例としては、滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、培養液等が挙げられる。したがって、本発明はまた、以下の(a)～(e)から選択される少なくとも1つの有効成分と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のAPC；
- (d) 本発明のエキソソーム；
- (e) 本発明のCTL。

[0098] さらに、本発明の薬学的組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤、溶解補助剤、pH調整剤、凝集抑制剤等を含み得る。

SARS-CoV-2蛋白の発現は、コロナウイルス非感染細胞と比較して、コロナウイルス感染細胞において、有意に上昇する。そのため、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを、コロナウイルス感染症の治療、予防、および重症化の抑制から選択されるいずれか、または組み合わせの目的のために用いることができる。したがって本発明は、コロナウイルス感染症の治療、予防、および重症化の抑制から選択されるいずれか、または複数の目的のための薬学的組成物であって、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドの1種類または複数種を有効成分として含む組成物を提供する。あるいは、薬学的組成物として用いるために、本発明のペプチドを、エキソソームまたはAPCの表面上に提示させることができる。加えて、本発明のペプチドのいずれか1つを標的とする本発明のCTLもまた、本発明の薬学的組成物の有効成分として用いることができる。本発明の薬学的組成物は、治療的有

効量または薬学的有効量の上記有効成分を含み得る。

[0099] 本発明の薬学的組成物はまた、ワクチンとして使用され得る。本発明との関連において、「ワクチン」（「免疫原性組成物」とも称される）という語句は、動物に接種した際に、コロナウイルスに対しての抗感染作用をもたらす免疫応答を誘導する機能を有する組成物を指す。したがって、本発明の薬学的組成物は、コロナウイルスに対しての抗感染作用をもたらす免疫応答を誘導するために用いることができる。本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、CTLおよび薬学的組成物によって誘導される免疫応答は、コロナウイルスに対しての抗感染作用をもたらす免疫応答であれば特に限定されないが、例示的には、コロナウイルス感染細胞に特異的なCTLの誘導、およびコロナウイルス感染細胞に特異的な細胞傷害活性の誘導を含む。

本発明の薬学的組成物は、ヒトである対象または患者において、コロナウイルス感染症を治療、予防、および重症化の抑制から選択されるいずれか、または組み合わせのために用いることができる。本発明の薬学的組成物は、HLA-A24またはHLA-A02陽性の対象に対して、好ましく使用することができる。また、本発明の薬学的組成物は、HLA-A24またはHLA-A02を有する対象におけるコロナウイルス感染症を治療および／もしくは予防するため、ならびに／または重症化を抑制するために、好ましく用いることができる。

[0100] 別の態様において、本発明はまた、コロナウイルス感染症の治療および予防のいずれか、または両方のための薬学的組成物の製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0101] あるいは、本発明はさらに、コロナウイルス感染症の治療、および予防のいずれか、または両方において用いるための、以下の中より選択される有効成

分を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0102] あるいは、本発明はさらに、コロナウイルス感染症の治療、および予防のいずれか、または両方のための薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される少なくとも1つの有効成分と、薬学的にまたは生理学的に許容される担体とを製剤化する段階を含む方法または工程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0103] 別の態様において、本発明はまた、コロナウイルス感染症の治療、および予防のいずれか、または両方のための薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される有効成分を薬学的にまたは生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0104] 別の態様において、本発明はまた、コロナウイルス感染症の治療、および予防のいずれか、または両方のための方法であって、以下の中より選択される少なくとも1つの有効成分を対象に投与する段階を含む方法を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0105] 本発明において、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A24拘束性エピトープペプチドとして見出された。したがって、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドの少なくとも1つを含む本発明の薬学的組成物は、HLA抗原としてHLA-A24（例えば、HLA-A*24:02）を有する対象への投与に特に適している。同じことが、これらのペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド（すなわち、本発明のポリヌクレオチド）、これらのペプチドを提示するAPCまたはエキソソーム（すなわち、本発明のAPCまたはエキソソーム）、およびこれらのペプチドを標的とするCTL（すなわち、本発明のCTL）を含む薬学的組成物にも当てはまる。すなわち、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに関連する有効成分を含む薬学的組成物は、HLA-A24を有する対象（すなわち、HLA-24陽性の対象）への投与に適している。より好ましい態様では、本発明の薬学的組成物は、配列番号：1、2、4、5、7、9、10または13のアミノ酸配列を有するペプチドを含む薬学的組成物である。

[0106] 同様に、本発明において、配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中より選択されるアミノ酸配列を有するペプチドは、強力かつ特異的な免疫応答を誘導し得るHLA-A02拘束性エピトープペプチドとして見出された。したがって、配列番号：1、2、4、7、10、12および13から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドの少なくとも1つを含む本発明の薬学的組成物は、HLA抗原としてHLA-A02（例えば、HLA-A*02:01）を有する対象への投与に特に適している。同じことが、これらのペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド

(すなわち、本発明のポリヌクレオチド)、これらのペプチドを提示するAPCまたはエキソソーム(すなわち、本発明のAPCまたはエキソソーム)、およびこれらのペプチドを標的とするCTL(すなわち、本発明のCTL)を含む薬学的組成物にも当てはまる。すなわち、配列番号1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに関連する有効成分を含む薬学的組成物は、HLA-A02を有する対象(すなわち、HLA-A02陽性の対象)への投与に適している。より好ましい態様では、本発明の薬学的組成物は、配列番号:1、2、10および13のアミノ酸配列を有するペプチドを含む薬学的組成物である。

[0107] 本発明の薬学的組成物によって治療および／または予防されるウイルス感染症は、コロナウイルス感染症であれば特に限定されず、コロナウイルスはSARS-CoV-2、MERS-CoVおよびSARS-CoVなどを含む。

[0108] 本発明の薬学的組成物は、前述の有効成分に加えて、コロナウイルス感染細胞に対してCTLを誘導する能力を有するその他のペプチド(例えば他のコロナウイルス蛋白由来のCTL誘導性ペプチド)、該その他のペプチドをコードするその他のポリヌクレオチド、該その他のペプチドを提示するその他の細胞等を含み得る。

[0109] 本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチドなどの上記有効成分のコロナウイルスに対する抗感染効果が阻害されない限り、その他の治療物質もまた有効成分として任意に含み得る。例えば、本発明の薬学的組成物は、抗炎症組成物、鎮痛剤、化学療法薬等を任意に含み得る。本発明の薬学的組成物自体にその他の治療物質を含めることに加えて、本発明の薬学的組成物を、1つまたは複数のその他の薬学的組成物と連続してまたは同時に投与することもできる。本発明の薬学的組成物およびその他の薬学的組成物の投与量は、例えば、使用する薬学的組成物の種類、治療する疾患、ならびに投与のスケジュールおよび経路に依存する。

[0110] 本明細書において具体的に言及される成分に加えて、本発明の薬学的組成物は、製剤の種類を考慮して、当技術分野において慣例的なその他の成分も

含み得ることが理解されるべきである。

- [0111] 本発明はまた、本発明の薬学的組成物を含む製品またはキットを提供する。本発明の製品またはキットは、本発明の薬学的組成物を収容した容器を含み得る。適切な容器の例としては、ボトル、バイアル、および試験管が挙げられるが、これらに限定されない。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。容器には、ラベルが貼付されていてもよく、ラベルには、本発明の薬学的組成物が使用されるべき疾患または疾患の状態を記載することができる。ラベルはまた、投与等に関する指示も示し得る。
- [0112] 本発明の製品またはキットは、本発明の薬学的組成物を収容した容器に加えて、任意で、薬学的に許容される希釈剤を収容した第2の容器をさらに含み得る。本発明の製品またはキットは、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、注射針、シリンジ、および使用説明を記載した添付文書などの、商業上の観点および使用者の観点から望ましいその他の材料をさらに含み得る。
- [0113] 必要に応じて、有効成分を含む1つまたは複数の単位剤形を含み得るパックまたはディスペンサー装置にて、本発明の薬学的組成物を提供することができる。該パックは、例えば、ブリスターパックのように金属ホイルまたはプラスチックホイルを含み得る。パックまたはディスペンサー装置には、投与に関する説明書が添付され得る。
- [0114] (1) 有効成分としてペプチドを含む薬学的組成物

本発明のペプチドを含む薬学的組成物は、必要であれば、従来の製剤化法によって製剤化することができる。本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチドに加えて、医薬品に通常用いられる担体、賦形剤等を特に制限なく必要に応じて含み得る。本発明の薬学的組成物に使用可能な担体の例としては、滅菌水（例えば、注射用水）、生理食塩水、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水、0.3%グリシン、培養液等が挙げられる。さらに、本発明の薬学的組成物は、必要に応じて、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤、溶解補助剤、pH調整剤、凝集抑制剤等を含み得る。本発明の薬

学的組成物は、コロナウイルス感染細胞に対して特異的な免疫を誘導することができるため、コロナウイルス感染症の治療または予防の目的に用いることができる。

[0115] 例えば、本発明の薬学的組成物は、滅菌水（例えば、注射用水）、生理食塩水、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水等の薬学的または生理学的に許容される水溶性の担体に溶解し、必要に応じて、安定剤、懸濁液、保存剤、界面活性剤、溶解補助剤、pH調整剤、凝集抑制剤等を添加した後、該ペプチド溶液を滅菌することにより調製することができる。ペプチド溶液の滅菌方法は、特に限定されないが、ろ過滅菌により行うことが好ましい。ろ過滅菌は、例えば、 $0.22\mu\text{m}$ 以下の孔径のろ過滅菌フィルターを用いて行うことができる。ろ過滅菌後のペプチド溶液は、これに限定されないが、例えば、注射剤として対象に投与することができる。また、本発明の薬学的組成物は、上記ペプチド溶液を凍結乾燥することにより、凍結乾燥製剤として調製してもよい。凍結乾燥製剤は、上記のように調製したペプチド溶液をアンプル、バイアル、またはプラスチック容器等の適切な容器に充填した後、凍結乾燥を行い、復圧後に滅菌洗浄したゴム栓等で容器を封入することにより調製することができる。凍結乾燥製剤は、投与前に、滅菌水（例えば、注射用水）、生理食塩水、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス緩衝生理食塩水等の薬学的または生理学的に許容される水溶性の担体に再溶解した後、対象に投与することができる。本発明の薬学的組成物の好ましい例には、このようろ過滅菌されたペプチド溶液の注射剤、および該ペプチド溶液を凍結乾燥した凍結乾燥製剤が含まれる。さらに、このような凍結乾燥製剤と再溶解液とを含むキットもまた本発明に包含される。また、本発明の薬学的組成物である凍結乾燥製剤が収容されている容器と、その再溶解液が収納されている容器とを含むキットもまた本発明に包含される。

[0116] 本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチドの2種類またはそれ以上の種類の組み合わせを含むこともできる。ペプチドの組み合わせは、ペプチドが混合されたカクテルの形態をとってよく、または標準的な技法を用いてペプチ

ドを互いに結合させてもよい。例えば、ペプチドを化学的に結合させても、または単一の融合ポリペプチド配列として発現させてもよい。本発明のペプチドを投与することによって、該ペプチドはHLA抗原によってAPC上に高密度で提示され、次いで、提示されたペプチドと該HLA抗原との間に形成された複合体に対して特異的に反応するCTLが誘導される。あるいは、対象からAPC（例えば、DC）を取り出し、次に本発明のペプチドにより刺激して、本発明のペプチドのいずれかを自身の細胞表面上に提示するAPCを得る。これらのAPCを対象に再度投与して、該対象においてCTLを誘導し、結果として、コロナウイルス感染細胞に対する攻撃性を増大させることができる。中和抗体がその標的エピトープの変異によって感染防止機能を失う（ウイルスの免疫逃避 ; immune escape）可能性がある。一般に、単一のエピトープに抗原結合特異性を依存しているモノクローナル抗体においては特に抗原変異の影響が大きい。一方、複数のCTLエピトープを含む場合は（カクテル）、いずれかのエピトープが変異したとしても、他のエピトープを認識するCTLは有効である。複数のタンパク由来のエピトープの混合は、ウイルスの免疫逃避（immune escape）による治療効果の低下を避けるうえでも有効な戦略と言える。

[0117] 本発明の薬学的組成物は、細胞性免疫を効率的に確立することが知られているアジュバントもまた含み得る。アジュバントとは、免疫学的活性を有する抗原と共に（または連続して）投与した場合に、該抗原に対する免疫応答を増強する化合物を指す。アジュバントとしては、例えばClin Microbiol Rev 1994, 7: 277-89等の文献に記載されている公知のものを使用することができる。適切なアジュバントの例には、アルミニウム塩（リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、オキシ水酸化アルミニウム等）、ミョウバン、コレラ毒素、サルモネラ毒素、不完全フロイントアジュバント（IFA）、完全フロイントアジュバント（CFA）、ISCOMatrix、GM-CSFその他の免疫刺激性サイトカイン、CpGモチーフを含むオリゴデオキシヌクレオチド（CpG7909等）、水中油型エマルション、サポニンもしくはその誘導體（QS21等）、リピドAもしくはその誘導體等のリポ多糖（MPL、RC529、GLA、E6020等）、リポペプチド

、ラクトフェリン、フラジェリン、二本鎖RNAもしくはその誘導体（ポリIC等）、バクテリアDNA、イミダゾキノリン（イミキモド（Imiquimod）、R848等）、C型レクチンリガンド（トレハロースジベヘン酸（trehalose-6,6'-dibehenate：TDB）等）、CD1dリガンド（ α -ガラクトシルセラミド等）、スクアレンエマルジョン（MF59、AS03、AF03等）、PLGA等が含まれるが、これらに限定されない。

アジュバントは、本発明の薬学的組成物を含むキットにおいて、本発明のペプチドを含む薬学的組成物とは別の容器に収容されていてもよい。この場合、該アジュバントと該薬学的組成物は、連続して対象に投与されてもよく、対象への投与直前に混合されてもよい。このような本発明のペプチドを含む薬学的組成物とアジュバントとを含むキットもまた、本発明によって提供される。本発明の薬学的組成物が凍結乾燥製剤である場合には、該キットはさらに再溶解液を含むことができる。また、本発明は、本発明の薬学的組成物が収容されている容器と、アジュバントが収容されている容器とを含むキットを提供する。該キットは、必要に応じて、再溶解液が収容されている容器をさらに含み得る。

[0118] アジュバントとして油性アジュバントを用いる場合には、本発明の薬学的組成物は、エマルジョンとして調製されてもよい。エマルジョンは、例えば、上記のように調製したペプチド溶液と油性アジュバントとを混合・攪拌することにより調製することができる。ペプチド溶液は、凍結乾燥後に再溶解したものであってもよい。エマルジョンは、W/O型エマルジョンおよびO/W型エマルジョンのいずれであってもよいが、高い免疫応答増強効果を得るためにはW/O型エマルジョンであることが好ましい。油性アジュバントとしてはIFAを好ましく用いることができるが、これに限定されない。エマルジョンの調製は対象に投与される直前に行われてもよく、この場合には、本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチド溶液および油性アジュバントを含むキットとして提供されてもよい。本発明の薬学的組成物が凍結乾燥製剤である場合には、該キットはさらに再溶解液を含むことができる。

- [0119] さらに、本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチドを封入したリポソーム製剤、直径数マイクロメートルのビーズにペプチドが結合している顆粒製剤、またはペプチドに脂質が結合している製剤であってもよい。
- [0120] 本発明の別の態様において、本発明のペプチドはまた、薬学的に許容される塩の形態で投与してもよい。塩の好ましい例には、アルカリ金属（リチウム、カリウム、ナトリウムなど）との塩、アルカリ土類金属との塩（カルシウム、マグネシウムなど）、その他の金属（銅、鉄、亜鉛、マンガンなど）との塩、有機塩基との塩、アミンとの塩、有機酸（酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、シュウ酸、安息香酸、メタンスルホン酸など）との塩、および無機酸（塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸など）との塩が含まれる。したがって、本発明のペプチドの薬学的に許容される塩を含む薬学的組成物もまた、本発明に包含される。また「本発明のペプチド」には、遊離体のペプチドのほか、その薬学的に許容される塩も包含される。
- [0121] いくつかの態様において、本発明の薬学的組成物は、CTLを刺激する成分をさらに含み得る。脂質は、ウイルス抗原に対してインビボでCTLを刺激し得る物質として同定された。例えば、パルミチン酸残基をリジン残基の ϵ アミノ基および α アミノ基に付着させ、次に本発明のペプチドに連結させることができる。次いで、脂質付加したペプチドを、ミセルもしくは粒子の状態で直接投与するか、リポソーム中に取り込ませて投与するか、またはアジュバント中に乳化させて投与することができる。CTL応答の脂質による刺激の別の例として、適切なペプチドに共有結合している場合、トリパルミトイル-S-グリセリルシステイニル-セリル-セリン（P3CSS）などの大腸菌（*E. coli*）リポタンパク質を用いてCTLを刺激することができる（例えば、Deres et al., *Nature* 1989, 342: 561-4を参照されたい）。
- [0122] 本発明のペプチドまたは薬学的組成物の投与方法の例には、経口、皮内、皮下、筋肉内、骨内、腹膜および静脈内注射等、ならびに全身投与または標的部位的近傍への局所投与が含まれるが、これらに限定されない。好ましい

投与方法としては、腋窩または鼠頸部等のリンパ節近傍への皮下注射が挙げられる。投与は、単回投与によって行うこともできるし、または複数回投与によってブーストすることもできる。本発明のペプチドは、コロナウイルス感染症を治療するための治療的もしくは薬学的有効量またはコロナウイルス感染細胞に対する免疫（より具体的にはCTL）を誘導するための治療的もしくは薬学的有効量で、対象に投与することができる。本発明のペプチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは各本発明のペプチドに関して、通常0.001mg～1000mg、例えば0.01mg～100mg、例えば0.1mg～30mg、例えば0.1mg～10mgであり、例えば0.5mg～5mgであることができる。また、投与間隔は数日～数ヶ月に1度であることができ、例えば週に1回の間隔で投与することができる。当業者は、適切な用量を適宜選択することができる。

[0123] 好ましい態様において、本発明の薬学的組成物は、治療的有效量の本発明のペプチドと、薬学的または生理学的に許容される担体を含む。別の態様では、本発明の薬学的組成物は、治療的有效量の本発明のペプチド、薬学的または生理学的に許容される担体、およびアジュバントを含む。本発明の薬学的組成物は、本発明のペプチドを、0.001mg～1000mg、好ましくは0.01mg～100mg、より好ましくは0.1mg～30mg、さらに好ましくは0.1mg～10mg、例えば0.5mg～5mg含むことができる。また、本発明の薬学的組成物が注射剤である場合には、本発明のペプチドを、0.001mg/ml～1000mg/ml、好ましくは0.01mg/ml～100mg/ml、より好ましくは0.1mg/ml～30mg/ml、さらに好ましくは0.1mg/ml～10mg/ml、例えば0.5mg/ml～5mg/mlの濃度で含むことができる。この場合、例えば、0.1～5ml、好ましくは0.5ml～2mlの本発明の薬学的組成物を、注射により対象に投与することができる。一方、本発明の薬学的組成物がアジュバントを含む場合には、アジュバントは、ペプチドに対する対象の免疫応答の増強に有効な量を配合することができる。

[0124] または、本発明は、治療的有效量の本発明のペプチドまたは本発明の薬学的組成物を対象に投与することを含む、コロナウイルス感染症の治療、予防

および重症化の抑制から選択されるいずれか、または複数の目的のための方法を提供する。本発明のペプチドは、上記のとおり、通常0.001mg～1000mg、例えば0.01mg～100mg、例えば0.1mg～30mg、例えば0.1mg～10mgであり、例えば0.5mg～5mgを1回の投与において対象に投与することができる。好ましい態様においては、本発明のペプチドは、アジュバントとともに対象に投与される。また、投与間隔は、数日～数ヶ月に1度、好ましくは数日～1か月に1度の間隔であることができ、例えば、週に1回または2週に1回の間隔であることができる。一方、本発明の方法において、ペプチドともにアジュバントを投与する場合には、アジュバントは、ペプチドに対する対象の免疫応答の増強に有効な量を投与することができる。

[0125] (2) 有効成分としてポリヌクレオチドを含む薬学的組成物

本発明の薬学的組成物はまた、本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチドを含み得る。本明細書において、「発現可能な形態で」という語句は、ポリヌクレオチドが、細胞に導入された場合に、本発明のペプチドが発現されることを意味する。例示的な態様において、本発明のポリヌクレオチドの配列は、本発明のペプチドの発現に必要な調節エレメントを含む。本発明のポリヌクレオチドには、標的細胞のゲノムへの安定した挿入が達成されるために必要な配列を備えさせることができる（相同組換えカセットベクターの説明に関しては、例えばThomas KR & Capecchi MR, Cell 1987, 51: 503-12を参照されたい）。例えば、Wolff et al., Science 1990, 247: 1465-8；米国特許第5,580,859号；第5,589,466号；第5,804,566号；第5,739,118号；第5,736,524号；第5,679,647号；およびWO98/04720を参照されたい。DNAに基づく送達技術の例には、「naked DNA」、促進された（ブピバカイン、ポリマー、ペプチド媒介性）送達、カチオン性脂質複合体、および粒子媒介性（「遺伝子銃」）または圧力媒介性の送達が含まれる（例えば、米国特許第5,922,687号を参照されたい）。

[0126] ウイルスベクターまたは細菌ベクターによって、本発明のペプチドを発現させることもできる。発現ベクターの例には、ワクシニアウイルスまたは鶏

痘ウイルスなどの弱毒化ウイルス宿主が含まれる。例えば、本発明のペプチドを発現させるためのベクターとして、ワクシニアウイルスを使用することができる。宿主に導入すると、組換えワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それによって免疫応答を誘発する。免疫化プロトコールに有用なワクシニアベクターおよび方法は、例えば米国特許第4,722,848号に記載されている。別のベクターはBCG（カルメット・ゲラン桿菌）である。BCGベクターは、Stover et al., *Nature* 1991, 351: 456-60に記載されている。治療的な投与または免疫化に有用である多種多様な他のベクター、例えばアデノウイルスベクターおよびアデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、チフス菌（*Salmonella typhi*）ベクター、無毒化炭疽毒素ベクター等が明らかである。例えば、Shata et al., *Mol Med Today* 2000, 6: 66-71; Sheddlock et al., *J Leukoc Biol* 2000, 68: 793-806; Hipp et al., *In Vivo* 2000, 14: 571-85を参照されたい。

[0127] 本発明のポリヌクレオチドの患者内への送達は、直接的であってもよく、この場合には本発明のポリヌクレオチドを保有するベクターに患者を直接曝露することができる。または間接的であってもよく、この場合にはまずインビトロで細胞を本発明のポリヌクレオチドを保有するベクターで形質転換し、次いで該細胞を患者内に移植する。これら2つのアプローチはそれぞれ、インビボおよびエクスピボの遺伝子治療として公知である。

[0128] 遺伝子治療の方法の一般的な総説に関しては、Goldspiel et al., *Clinical Pharmacy* 1993, 12: 488-505; Wu and Wu, *Biotherapy* 1991, 3: 87-95; Tolstoshev, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993, 33: 573-96; Mulligan, *Science* 1993, 260: 926-32; Morgan & Anderson, *Ann Rev Biochem* 1993, 62: 191-217; *Trends in Biotechnology* 1993, 11(5): 155-215を参照されたい。本発明にも用いることのできる、組換えDNA技術の分野において一般に公知の方法は、Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY, 1993; およびKrieger, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY, 1990に記載されている。投与方

法は、経口、皮内、皮下、静脈内注射等であってよく、全身投与または標的部位の近傍への局所投与が使用される。

投与は、単回投与によって行うこともできるし、または複数回投与によってブーストすることもできる。本発明のポリヌクレオチドは、コロナウイルス感染症を治療するための治療的もしくは薬学的有効量またはコロナウイルス感染細胞に対する免疫（より具体的にはCTL）を誘導するための治療的もしくは薬学的有効量で、対象に投与することができる。適切な担体中のポリヌクレオチドの用量、または本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換された細胞中のポリヌクレオチドの用量は、治療される疾患、患者の年齢、体重、投与方法等に応じて適宜調整することができ、これは通常0.001mg～1000mg、例えば0.01mg～100mg、例えば、0.1mg～30mg、例えば0.1mg～10mg、例えば0.5mg～5mgであることができる。投与間隔は数日に1度～数ヶ月に1度であることができ、例えば週に1回の間隔で投与することができる。当業者は、適切な用量を適宜選択することができる。

[0129] X. ペプチド、エキソソーム、APC、およびCTLを用いる方法

本発明のペプチドおよびポリヌクレオチドを用いて、APCおよびCTLを誘導することができる。本発明のエキソソームおよびAPCを用いて、CTLを誘導することもできる。本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、およびAPCは、それらのCTL誘導能が阻害されない限り、任意の他の化合物と組み合わせ用いることができる。したがって、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APCおよびエキソソームのいずれかを含む薬学的組成物を用いて本発明のCTLを誘導することができる。また、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを含む薬学的組成物を用いて本発明のAPCを誘導することができる。

[0130] (1) APCを誘導する方法

本発明は、本発明のペプチドまたはポリヌクレオチドを用いて、CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法を提供する。

[0131] 本発明の方法は、APCを本発明のペプチドとインビトロ、エクスピボ、またはインビボで接触させる段階を含む。例えば、APCを該ペプチドとエクスピボで

接触させる方法は、以下の段階を含み得る：

- (a) 対象からAPCを回収する段階；および
- (b) 段階 (a) のAPCを本発明のペプチドと接触させる段階。

前記APCは特定の種類の細胞に限定されず、リンパ球によって認識されるように自身の細胞表面上にタンパク質性抗原を提示することが知られている細胞、例えばDC、ランゲルハンス細胞、マクロファージ、B細胞、および活性化T細胞を用いることができる。DCはAPCの中で最も強力なCTL誘導能を有するため、好ましくはDCを用いることができる。本発明の任意のペプチドを単独で、または本発明の他のペプチドと共に用いることができる。また、本発明のペプチドと、他のCTL誘導性ペプチド（例えば、他のコロナウイルス蛋白由来のCTL誘導性ペプチド）とを組み合わせることもできる。

[0132] 一方、本発明のペプチドを対象に投与した場合、APCは該ペプチドとインビボで接触し、結果的に、高いCTL誘導能を有するAPCが該対象の体内で誘導される。したがって本発明の方法は、本発明のペプチドを対象に投与する段階を含み得る。同様に、本発明のポリヌクレオチドを発現可能な形態で対象に投与した場合、本発明のペプチドがインビボで発現し、これがAPCとインビボで接触し、結果的に、高いCTL誘導能を有するAPCが該対象の体内で誘導される。したがって本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを対象に投与する段階を含み得る。

[0133] 本発明はまた、CTL誘導能を有するAPCを誘導するために、本発明のポリヌクレオチドをAPCに導入する段階を含み得る。例えば、本方法は以下の段階を含み得る：

- (a) 対象からAPCを回収する段階；および
- (b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを段階 (a) のAPCに導入する段階。

段階 (b) は、「V I. 抗原提示細胞 (APC)」の章に上述したように行うことができる。

[0134] したがって、一態様において、本発明は、以下の (a) または (b) の段階

を含む、CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法を提供する：

- (a) APCを本発明のペプチドと接触させる段階；
- (b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

[0135] また、本発明は、以下の (a) または (b) の段階を含む、CTL誘導能を有するAPCを調製する方法を提供する：

- (a) APCを本発明のペプチドと接触させる段階；
- (b) 本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

[0136] 上記の方法は、インビトロ、エクスピボ、またはインビボのいずれでも行うことができるが、インビトロまたはエクスピボで行うことが好ましい。上記方法で使用されるAPCは、誘導されたAPCの投与が予定されている対象に由来するものであってもよいが、異なる対象に由来するものであってもよい。投与が予定されている対象とは異なる対象（ドナー）に由来するAPCを使用する場合、投与対象者とドナーのHLA型は、同一である必要がある。本発明の方法において、本発明のペプチドとして配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドを使用する場合、投与対象者とドナーのHLA型は、いずれもHLA-A24（より好ましくはHLA-A*24:02）であることが好ましい。あるいは、上記の方法で使用するAPCは、HLA-A24（より好ましくはHLA-A*24:02）を発現しているAPCであることが好ましい。

本発明のペプチドとして配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドを使用する場合、投与対象者とドナーのHLA型は、いずれもHLA-A02（より好ましくはHLA-A*02:01）であることが好ましい。あるいは、上記の方法で使用するAPCは、HLA-A02（より好ましくはHLA-A*02:01）を発現しているAPCであることが好ましい。

APCは、ドナーから採取された血液から比重遠心分離法等によりPBMCを分離し

た後、該PBMCから公知の方法を用いて調製することができる。

[0137] 別の態様において、本発明はまた本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための薬学的組成物を提供する。

[0138] あるいは、本発明はさらに、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための薬学的組成物の製造における、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドの使用を提供する。

[0139] あるいは、本発明はさらに、CTL誘導能を有するAPCの誘導において用いるための、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

[0140] あるいは、本発明はさらに、APCを誘導するための薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドと、薬学的にまたは生理学的に許容される担体とを製剤化する段階を含む方法または工程を提供する。

[0141] 別の態様において、本発明はまた、CTL誘導能を有するAPCを誘導するための薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、本発明のペプチドまたは該ペプチドをコードするポリヌクレオチドを薬学的にまたは生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程を提供する。

本発明の方法によって誘導されたAPCは、コロナウイルス蛋白に特異的なCTL（すなわち本発明のCTL）を誘導することができる。

[0142] (2) CTLを誘導する方法

本発明はまた、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、またはAPCを用いてCTLを誘導する方法を提供する。

[0143] 本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、エキソソーム、またはAPCを対象に投与すると、該対象の体内でCTLが誘導され、コロナウイルス感染細胞を標的とする免疫応答の強度が増強される。したがって本発明の方法は、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、またはエキソソームを対象に投与する段階を含み得る。

[0144] あるいは、それらをインビトロまたはエキスピボで用いることによってCTLを誘導することもできる。例えば、本発明の方法は以下の段階を含み得る：

- (a) 対象からAPCを回収する段階、
- (b) 段階 (a) のAPCを本発明のペプチドと接触させる段階、および
- (c) 段階 (b) のAPCをCD8陽性T細胞と共培養する段階。

誘導されたCTLは、その後対象に戻してもよい。

[0145] 上記の段階 (c) においてCD8陽性T細胞と共培養するAPCは、「V I. 抗原提示細胞 (APC)」の章に上述したように、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入することによって調製することもできる。しかしながら、本発明の方法で用いられるAPCはこれに限定されず、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示する任意のAPCを用いることができる。

[0146] 本発明の方法では、そのようなAPCの代わりに、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームを用いることもできる。すなわち、本発明の方法は、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームとを共培養する段階を含み得る。そのようなエキソソームは、「V. エキソソーム」の章に上述した方法によって調製することができる。

[0147] さらに、細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含むベクターをCD8陽性T細胞に導入することによって、CTLを誘導することもできる。そのような形質導入は、「V I I I. T細胞受容体 (TCR)」の章に上述したように行うことができる。

[0148] したがって、一態様において、本発明は、以下の中より選択される段階を含む、CTLを誘導する方法を提供する：

- (a) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共培養する段階；
- (b) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と本発明のペプチドとの複合体を自身の表面

上に提示するエキソソームと共培養する段階；および

(c) 細胞表面上にHLA抗原により提示された本発明のペプチドに結合し得るTCRの各サブユニットをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを、CD8陽性T細胞に導入する段階。

[0149] 上記の方法は、インビトロ、エクスピボ、またはインビボのいずれでも行うことができるが、インビトロまたはエクスピボで行うことが好ましい。上記方法で使用されるAPCもしくはエキソソーム、およびCD8陽性T細胞は、誘導されたCTLの投与が予定されている対象に由来するものであってもよいが、異なる対象に由来するものであってもよい。投与が予定されている対象とは異なる対象（ドナー）に由来するAPCもしくはエキソソーム、およびCD8陽性T細胞を使用する場合、投与対象者とドナーのHLA型は、同一である必要がある。例えば、本発明のペプチドとして配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドを用いる場合、投与対象者とドナーのHLA型は、いずれもHLA-A24（より好ましくはHLA-A*24:02）であることが好ましい。あるいは、上記の方法で使用するAPCまたはエキソソームは、HLA-A24（より好ましくはHLA-A*24:02）と本発明のペプチド（配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチド）との複合体を自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソームであることが好ましい。この場合、誘導されたCTLは、HLA-A24と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞（例えば、コロナウイルスに感染したHLA-A24陽性細胞）に対して、特異的な細胞傷害活性を示す。

本発明のペプチドとして配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドまたはその改変ペプチドを用いる場合、投与対象者とドナーのHLA型は、いずれもHLA-A02（より好ましくはHLA-A*02:01）であることが好ましい。あるいは、上記の方法で使用するAPCまたはエキソソームは、HLA-A02（より好ましくはHLA-A*02:01）と本発明のペプチド（配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配

列を有するペプチドまたはその改変ペプチド)との複合体を自身の表面上に提示するAPCまたはエキソソームであることが好ましい。この場合、誘導されたCTLは、HLA-A02と本発明のペプチドとの複合体を提示する細胞(例えば、コロナウイルスに感染したHLA-A02陽性細胞)に対して、特異的な細胞傷害活性を示す。

[0150] 別の態様において、本発明はまた、以下の中より選択される少なくとも1つの有効成分を含む、CTLを誘導するための組成物または薬学的組成物を提供する:

- (a) 本発明のペプチド;
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド;
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC; および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム。

[0151] 別の態様において、本発明はまた、CTLを誘導するための組成物または薬学的組成物の製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する:

- (a) 本発明のペプチド;
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド;
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC; および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム。

[0152] あるいは、本発明はさらに、CTLの誘導において用いるための、以下の中より選択される有効成分を提供する:

- (a) 本発明のペプチド;
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド;
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC; および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム。

[0153] あるいは、本発明はさらに、CTLを誘導するための組成物または薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される有効成分と、薬学的にまたは生理学的に許容される担体とを製剤化する段階を含む。

む方法または工程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム。

[0154] 別の態様において、本発明はまた、CTLを誘導するための組成物または薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、以下の中より選択される有効成分を薬学的にまたは生理学的に許容される担体と混合する段階を含む方法または工程を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；および
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム。

[0155] XI. 免疫応答を誘導する方法

さらに本発明は、コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。そのコロナウイルスには、SARS-CoV-2、MERS-CoVおよびSARS-CoVなどが含まれるがこれらに限定されない。また、コロナウイルス感染細胞は、HLA-A24またはHLA-A02を発現していることが好ましい。

[0156] 本発明はまた、コロナウイルス感染細胞に対する免疫応答を誘導する方法を提供する。本発明のペプチドはSARS-CoV-2の構造蛋白質または非構造蛋白質に由来し、また、SARS-CoV蛋白およびMERS-CoV蛋白で共通して認められるアミノ酸配列でもある。そのため、コロナウイルス感染細胞に対する免疫応答が誘導されると、その結果として、コロナウイルス感染細胞におけるウイルスの増殖が阻害される。したがって、本発明はまた、コロナウイルス感染細胞におけるウイルスの増殖を阻害する方法も提供する。本発明の方法は特に、HLA-A24またはHLA-A02を発現するコロナウイルス感染細胞におけるコロナウイルスの増殖阻害に適している。

[0157] 本発明の方法は、本発明のペプチドのいずれかまたはそれらをコードする

ポリヌクレオチドを含む組成物を投与する段階を含み得る。本発明の方法はまた、本発明のペプチドのいずれかを提示するエキソソームまたはAPCの投与を企図する。詳細については、「IX. 薬学的組成物」の項、特に本発明の薬学的組成物のワクチンとしての使用について記載している部分を参照されたい。加えて、免疫応答を誘導するために本発明の方法に使用することができるエキソソームおよびAPCは、前記の「V. エキソソーム」、「VI. 抗原提示細胞（APC）」、ならびに「X. ペプチド、エキソソーム、APC、およびCTLを用いる方法」の（1）および（2）の項において詳述されている。

[0158] 別の態様において、本発明はまた、コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導するための薬学的組成物またはワクチンであって、以下の中より選択される有効成分を含む、薬学的組成物またはワクチンを提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0159] あるいは、本発明はさらに、コロナウイルス感染細胞に対する免疫応答を誘導するための薬学的組成物またはワクチンであって、以下の中より選択される有効成分を含む、薬学的組成物またはワクチンを提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0160] あるいは、本発明はさらに、コロナウイルス感染細胞におけるコロナウイルスの増殖を阻害するための薬学的組成物またはワクチンであって、以下の中より選択される有効成分を含む、薬学的組成物またはワクチンを提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0161] 別の態様において、本発明はまた、コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導するための薬学的組成物またはワクチンの製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面状に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0162] あるいは、本発明はさらに、コロナウイルス感染細胞に対する免疫応答を誘導するための薬学的組成物またはワクチンの製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0163] あるいは、本発明はさらに、コロナウイルス感染細胞におけるコロナウイルスの増殖を阻害するための薬学的組成物またはワクチンの製造における、以下の中より選択される有効成分の使用を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および

(e) 本発明のCTL。

[0164] 本発明はまた、コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導する薬学的組成物を製造するための方法または工程であって、本発明のペプチドを薬学的に許容される担体と共に混合または製剤化する段階を含み得る方法を提供する。

[0165] あるいは、本発明は、以下の中より選択される有効成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を対象に投与する段階を含む、コロナウイルス感染細胞におけるコロナウイルスの増殖を阻害するための方法、またはコロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導する方法を提供する：

- (a) 本発明のペプチド；
- (b) 本発明のペプチドを発現可能な形態でコードするポリヌクレオチド；
- (c) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するAPC；
- (d) 本発明のペプチドを自身の表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) 本発明のCTL。

[0166] 本発明との関連において、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、エキソソームおよび／またはCTLを投与することにより、コロナウイルス感染症を治療することができる。あるいは、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、エキソソームおよび／またはCTLを投与することにより、コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導することができる。そのようなコロナウイルスの例には、SARS-CoV-2、MERS-CoVおよびSARS-CoVなどが含まれるが、これらに限定されない。また、本発明のペプチド、ポリヌクレオチド、APC、エキソソームおよび／またはCTLを投与することにより、コロナウイルス感染細胞に対する免疫応答を誘導することができる。したがって、上記の有効成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を投与する前に、治療する対象がコロナウイルスに感染しているかどうかを確認することが好ましい。

[0167] したがって一態様において、本発明は、コロナウイルス感染症の治療を必要とする患者において該感染症を治療する方法を提供し、そのような方法は以下の段階を含む：

i) コロナウイルスに感染した対象から採取された生体試料中のSARS-CoV-2遺伝子、またはそれによってコードされる蛋白の発現レベルを測定する段階

;

ii) i) で測定SARS-CoV-2遺伝子、またはそれによってコードされる蛋白発現レベルに基づいて、コロナウイルスに感染した対象を特定する段階; および

iii) 上記の (a) ~ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの成分を、コロナウイルスに感染した対象に投与する段階。

[0168] あるいは、本発明はまた、コロナウイルスに感染した対象に投与するための、上記の (a) ~ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含むワクチンまたは薬学的組成物を提供する。本発明はさらに、上記の (a) ~ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分で治療する対象を特定または選択する方法を提供し、そのような方法は以下の段階を含む:

i) コロナウイルスに感染した対象から採取された生体試料中のSARS-CoV-2遺伝子、またはそれによってコードされる蛋白の発現レベルを測定する段階;

ii) i) で測定されたSARS-CoV-2遺伝子、またはそれによってコードされる蛋白の発現レベルに基づいて、SARS-CoV-2遺伝子、またはそれによってコードされる蛋白を発現するコロナウイルス感染細胞を有する対象を特定する段階; および

iii) ii) で特定された対象を、上記の (a) ~ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分で治療され得る対象として特定または選択する段階。

[0169] 上記の方法においてSARS-CoV-2遺伝子、またはそれによってコードされる蛋白の発現レベルを測定するために対象から採取される生体試料は特に限定されないが、例えば、生検等により採取されたコロナウイルス感染細胞を含む組織試料を好ましく用いることができる。あるいは、咽頭拭い液や唾液中のコロナウイルスRNAの検出は、コロナウイルス感染者の特定において、一般的に行われている。したがって、本発明において、コロナウイルス遺伝子と

は、コロナウイルスのゲノムRNA、あるいはそれが転写されたmRNAを含む。生体試料中のSARS-CoV-2遺伝子、またはそれによってコードされる蛋白の発現レベルは公知の方法で測定することができ、例えば、SARS-CoV-2遺伝子の転写産物をプローブやPCR法により検出する方法（例えば、cDNAマイクロアレイ法、ノーザンブロット法、RT-PCR法など）、SARS-CoV-2遺伝子の翻訳産物を抗体等により検出する方法（例えば、ウェスタンブロット法、免疫染色法、イムノクロマトグラフ法など）等を用いることができる。また、生体試料は血液試料であってもよく、この場合には、SARS-CoV-2蛋白に対する抗体の血中レベルを測定し、該血中レベルに基づいてSARS-CoV-2蛋白の発現レベルを評価してもよい。SARS-CoV-2蛋白に対する抗体の血中レベルの測定は公知の方法を用いて行うことができ、例えば、SARS-CoV-2タンパク質や本発明のペプチドを抗原として用いた酵素免疫測定法（EIA）、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、および放射免疫測定法（RIA）等を用いることができる。

また、本発明のペプチドに特異的なCTLを検出することにより、対象におけるSARS-CoV-2蛋白の発現レベルを評価してもよい。本発明のペプチドに特異的なCTLレベルの測定は、例えば、対象から採取された血液からPBMCを分離し、本発明のペプチドをパルスした標的細胞に対する細胞傷害活性を測定することにより、行うことができる。細胞傷害活性の測定は、例えばインターフェロンの放出量などにより測定することができる。また、下記に記載する本発明のペプチドとHLAとの複合体も、CTLレベルの測定に用いることができる。なお、対象の有するコロナウイルス感染細胞がSARS-CoV-2蛋白を発現しているか否かの判断は、コロナウイルスに感染していない対象から採取された同種の生体材料における測定結果との比較により行ってもよい。すなわち、コロナウイルスに感染していない対象から採取された同種の生体材料における測定対象物のレベル（正常対照レベル）と比較して、コロナウイルスに感染した対象から採取された生体試料における該レベルが上昇している場合には、コロナウイルスに感染した対象の細胞はSARS-CoV-2蛋白を発現していると判断することができる。

[0170] 好ましい態様では、上記の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を投与する前に、対象のHLA型を確認することが好ましい。例えば、配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに関連する有効成分の投与対象としては、HLA-A24陽性対象を選択することが好ましい。

配列番号：1、2、4、7、10、12および13の中から選択されるアミノ酸配列を有するペプチドに関連する有効成分の投与対象としては、HLA-02陽性対象を選択することが好ましい。

[0171] 本発明はまた、本発明のペプチドとHLAとの複合体を提供する。前記本発明の複合体は、単量体であっても多量体であってもよい。本発明の複合体が多量体である場合、重合数は特に限定されず、任意の重合数の多量体であることができる。例としては、四量体、五量体、六量体等が挙げられるが、これらに限定されない。また、デキストラマー (W02002/072631)、ストレプトマー (Knabel M et al., Nat Med. 2002 Jun;8(6):631-7.) もまた本発明の多量体に包含される。本発明のペプチドとHLAとの複合体は、公知の方法に従って調製することができる (例えば、Altman JD et al., Science.1996,274(5284):94-6、W02002/072631、W02009/003492、Knabel M et al., Nat Med. 2002 Jun;8(6):631-7.等)。本発明の複合体は、例えば、本発明のペプチドに特異的なCTLの定量に用いることができる。例えば、本発明の薬学的組成物を投与した対象から血液試料を採取し、PBMCを分離した後CD4陰性細胞を調整し、蛍光色素を結合させた本発明の複合体と該CD4陰性細胞とを接触させる。その後、フローサイトメトリーで解析することにより、本発明のペプチドに特異的なCTLの割合を測定することができる。例えば、本発明の薬学的組成物の投与前、投与中、および／または投与後に、本発明のペプチドに特異的なCTLを測定することにより、本発明の薬学的組成物による免疫応答誘導効果をモニタリングすることができる。

[0172] X I I. 抗体

本発明はさらに、本発明のペプチドに結合する抗体を提供する。好ましい

抗体は本発明のペプチドに特異的に結合し、本発明のペプチドではないものには結合しない（または弱く結合する）。抗体の結合特異性は、阻害試験で確認することができる。すなわち、分析する抗体と全長SARS-CoV-2のゲノム配列によってコードされる各蛋白質のアミノ酸配列からなるポリペプチド（配列番号：17-26）との間の結合が、本発明のペプチドの存在下で阻害される場合、この抗体が本発明のペプチドに特異的に結合することが示される。本発明のペプチドに対する抗体は、疾患の診断および予後診断のアッセイ、ならびに本発明の薬学的組成物の投与対象の選択および本発明の薬学的組成物のモニタリングにおいて使用され得る。

[0173] 本発明はまた、本発明のペプチドもしくはその断片を検出および／または定量するための様々な免疫学的アッセイ法を提供する。そのような免疫学的アッセイ法は、放射免疫測定法、免疫クロマトグラフ法、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）、酵素結合免疫蛍光測定法（ELIFA）等を含むがこれらに限定されない、当技術分野で周知の様々な免疫学的アッセイ形式の範囲内で行われる。

[0174] 本発明の抗体は、コロナウイルス感染細胞を検出し得る免疫学的画像化法に用いることができ、その例には、本発明の標識抗体を使用する放射性シンチグラフィー画像化法が含まれるが、これに限定されない。そのようなアッセイ法は、コロナウイルス感染細胞の検出、モニタリング、および予後診断において臨床的に使用され、そのようなコロナウイルス感染症のコロナウイルスの例には、SARS-CoV-2、MERS-CoV、SARS-CoVなどが含まれるが、これらに限定されない。

[0175] 本発明の抗体は、例えばモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体などの任意の形態で用いることができ、ウサギなどの動物を本発明のペプチドで免疫することにより得られる抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、ヒト抗体、ならびに遺伝子組換えにより作製されたキメラ抗体およびヒト化抗体をさらに含み得る。

[0176] 抗体を得るための抗原として用いられる本発明のペプチドもしくはその断

片は、本明細書に開示するアミノ酸配列に基づいて、化学合成により、または遺伝子工学的手法により得ることができる。

- [0177] 免疫抗原として用いられるペプチドは、本発明のペプチドまたは本発明のペプチドの断片であってよい。また、免疫原性を高めるために、ペプチドを担体と結合または連結させてもよい。担体として、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）が周知である。KLHとペプチドを結合する方法もまた、当技術分野において周知である。
- [0178] 任意の哺乳動物を前記抗原で免疫することができるが、モノクローナル抗体を作製する場合には、細胞融合に用いられる親細胞との適合性を考慮に入れることが好ましい。一般に、齧歯目（Rodentia）、ウサギ目（Lagomorpha）、または霊長目（Primate）の動物を使用することができる。齧歯目科の動物には、例えばマウス、ラット、およびハムスターが含まれる。ウサギ目科の動物には、例えばウサギが含まれる。霊長目科の動物には、例えばカニクイザル（*Macaca fascicularis*）、アカゲザル、マントヒヒ、およびチンパンジーなどの狭鼻下目（Catarrhini）（旧世界ザル）のサルが含まれる。
- [0179] 動物を抗原で免疫する方法は、当技術分野で公知である。抗原の腹腔内注射または皮下注射は、哺乳動物を免疫するための標準的な方法である。より具体的には、抗原を適量のリン酸緩衝食塩水（PBS）、生理食塩水等で希釈し、懸濁させる。必要に応じて、抗原懸濁液を、フロイント完全アジュバントなどの適量の標準的アジュバントと混合し、乳化した後、哺乳動物に投与することができる。その後、適量のフロイント不完全アジュバントと混合した抗原を、4～21日ごとに数回投与することが好ましい。免疫化には、適切な担体を用いてもよい。上記のように免疫した後、血清を、所望の抗体の量の増加に関して標準的方法で調べることができる。
- [0180] 本発明のペプチドに対するポリクローナル抗体は、免疫後に血清中の所望の抗体レベルの上昇が確認された哺乳動物から血液を回収し、任意の従来法により血液から血清を分離することによって、調製することができる。ポリクローナル抗体はポリクローナル抗体を含む血清であってもよく、またポリ

クローナル抗体を含む画分を該血清から単離してもよい。免疫グロブリンGまたはMは、本発明のペプチドのみを認識する画分から、例えば、本発明のペプチドを結合させたアフィニティーカラムを用いた上で、この画分をプロテインAまたはプロテインGカラムを用いてさらに精製して、調製することができる。

- [0181] モノクローナル抗体を調製するには、免疫後に血清中の所望の抗体レベルの上昇を確認した上で、哺乳動物から免疫細胞を回収し、細胞融合に供する。細胞融合に用いる免疫細胞は、好ましくは脾臓から得ることができる。上記の免疫細胞と融合させるもう一方の親細胞には、例えば、哺乳動物の骨髓腫細胞、およびより好ましくは薬物による融合細胞の選択のための特性を獲得した骨髓腫細胞を用いることができる。
- [0182] 公知の方法、例えば、Milstein et al. (Galfre and Milstein, Methods Enzymol 73: 3-46 (1981)) の方法に従って、上記の免疫細胞と骨髓腫細胞を融合させることができる。
- [0183] 細胞融合によって得られたハイブリドーマは、それらをHAT培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含む培地）などの標準的な選択培地中で培養することによって選択することができる。細胞培養は典型的に、HAT培地中で、所望のハイブリドーマを除く他のすべての細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な期間（例えば数日間から数週間）にわたって継続する。その後、標準的な限界希釈を行い、所望の抗体を産生するハイブリドーマ細胞をスクリーニングおよびクローニングすることができる。
- [0184] ハイブリドーマを調製するために非ヒト動物を抗原で免疫する上記の方法に加えて、EBウイルスに感染したリンパ球などのヒトリンパ球を、ペプチド、ペプチドを発現している細胞、またはそれらの溶解物でインビトロにおいて免疫することもできる。次いで、免疫後のリンパ球を、U266などの無限に分裂可能なヒト由来骨髓腫細胞と融合させて、該ペプチドに結合し得る所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる（特開昭63-17688号）。

- [0185] 続いて、得られたハイブリドーマをマウスの腹腔内に移植し、腹水を抽出する。得られたモノクローナル抗体は、例えば、硫酸アンモニウム沈殿、プロテインAもしくはプロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、または本発明のペプチドを結合させたアフィニティーカラムにより精製することができる。
- [0186] あるいは、免疫したリンパ球などの、抗体を産生する免疫細胞をがん遺伝子によって不死化し、モノクローナル抗体の調製に用いることもできる。
- [0187] このようにして得られるモノクローナル抗体は、遺伝子操作技法を用いて組換えにより調製することもできる（例えば、MacMillan Publishers LTD (1990)により英国で刊行された、Borrebæck and Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodiesを参照されたい）。例えば、抗体をコードするDNAを、抗体を産生するハイブリドーマまたは免疫化リンパ球などの免疫細胞からクローニングし、適切なベクターに挿入した上で、宿主細胞に導入して、組換え抗体を調製することができる。本発明はまた、上記のようにして調製された組換え抗体を提供する。
- [0188] さらに、本発明の抗体は、本発明のペプチドに結合する限り、抗体の断片または修飾抗体であってもよい。例えば、抗体断片は、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖およびL鎖由来のFv断片が適切なリンカーによって連結されている一本鎖Fv (scFv) であってもよい (Huston et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 5879-83 (1988))。より具体的には、抗体断片は、抗体をパパインまたはペプシンなどの酵素で処理することにより作製することができる。あるいは、抗体断片をコードする遺伝子を構築し、発現ベクターに挿入し、適切な宿主細胞内で発現させることができる（例えば、Co et al., J Immunol 152: 2968-76 (1994); Better and Horwitz, Methods Enzymol 178: 476-96 (1989); Pluckthun and Skerra, Methods Enzymol 178: 497-515 (1989); Lamoyi, Methods Enzymol 121: 652-63 (1986); Rousseaux et al., Methods Enzymol 121: 663-9 (1986); Bird and Walker, Trends Biotechnol 9: 132-7 (1991)を参照されたい）。

- [0189] 抗体は、ポリエチレングリコール（PEG）などの様々な分子との結合によって修飾することができる。本発明は、そのような修飾抗体を提供する。修飾抗体は、抗体を化学的に修飾することによって得ることができる。これらの修飾法は、当技術分野で慣例的である。
- [0190] あるいは、本発明の抗体は、非ヒト抗体に由来する可変領域とヒト抗体に由来する定常領域との間のキメラ抗体として、または非ヒト抗体に由来する相補性決定領域（CDR）と、ヒト抗体に由来するフレームワーク領域（FR）および定常領域とを含むヒト化抗体として得ることもできる。そのような抗体は、公知の技術に従って調製することができる。ヒト化は、非ヒト抗体のCDR配列でヒト抗体の対応する配列を置換することによって行うことができる（例えば、Verhoeyen et al., Science 239:1534-6 (1988)を参照されたい）。したがって、そのようなヒト化抗体は、実質的に完全には満たないヒト可変ドメインが、非ヒト種由来の対応する配列によって置換されたキメラ抗体である。
- [0191] ヒトのフレームワーク領域および定常領域に加えて、ヒト可変領域をも含む完全なヒト抗体を用いることもできる。そのような抗体は、当技術分野で公知の様々な技法を用いて作製することができる。例えば、インビトロの方法には、バクテリオファージ上に提示されたヒト抗体断片の組換えライブラリーの使用が含まれる（例えば、Hoogenboom & Winter, J. Mol. Biol. 227: 381 (1991)）。同様に、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を、内因性免疫グロブリン遺伝子が部分的または完全に不活性化されたトランスジェニック動物、例えばマウスに導入することによって、ヒト抗体を作製することもできる。このアプローチは、例えば米国特許第6,150,584号、第5,545,807号；第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,661,016号に記載されている。
- [0192] 上記のようにして得られた抗体は、均一になるまで精製してもよい。例えば、一般的なタンパク質に対して用いられる分離法および精製法に従って、抗体の分離および精製を行うことができる。例えば、これらに限定されない

が、アフィニティークロマトグラフィーなどのカラムクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、および等電点電気泳動の使用を適切に選択しかつ組み合わせることにより、抗体を分離および単離することができる (Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。プロテインAカラムおよびプロテインGカラムをアフィニティークラムとして使用することができる。用いられるべき例示的なプロテインAカラムには、例えば、Hyper D、POROS、およびSepharose F.F. (Pharmacia) が含まれる。

[0193] 例示的なクロマトグラフィーには、アフィニティークロマトグラフィー以外に、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が含まれる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996))。クロマトグラフィー手順は、HPLCおよびFPLCなどの液相クロマトグラフィーによって行うことができる。

[0194] 例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、酵素免疫測定法 (EIA)、放射免疫測定法 (RIA)、および／または免疫蛍光法 (IF) を用いて、本発明の抗体の抗原結合活性を測定することができる。ELISAの場合、本発明の抗体をプレート上に固定化し、本発明のペプチドを該プレートに添加し、次に抗体産生細胞の培養上清または精製抗体といった所望の抗体を含む試料を添加する。次いで、一次抗体を認識し、アルカリホスファターゼなどの酵素で標識された二次抗体を添加し、プレートをインキュベートする。続いて洗浄後に、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を該プレートに添加し、吸光度を測定して、試料の抗原結合活性を評価する。抗体の結合活性を評価するために、C末端またはN末端断片などのペプチドの断片を抗原として用いてもよい。本発明の抗体の活性を評価するために、BIAcore (Pharmacia) を用いてもよい。

[0195] 本発明の抗体を本発明のペプチドを含むと考えられる試料に対して曝露し

、該抗体と該ペプチドとによって形成される免疫複合体を検出または測定することにより、上記のような方法によって本発明のペプチドの検出または測定が可能になる。

例えば、本発明の抗体は、対象の血液試料（例えば血清試料）中に存在する本発明のペプチドを検出するために用いることもできる。あるいは、逆に、対象の血液試料（例えば血清試料）中に存在する本発明の抗体を、本発明のペプチドを用いて検出することもできる。対象の血液試料中において本発明のペプチドまたは本発明の抗体を測定した結果は、本発明の薬学的組成物の投与対象の選択、または本発明の薬学的組成物の効果のモニタリングに役立てることができる。

[0196] XIII. ベクターおよび宿主細胞

本発明はまた、本発明のペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターおよび該ベクターが導入された宿主細胞を提供する。本発明のベクターは、宿主細胞中に本発明のポリヌクレオチドを保持するため、宿主細胞に本発明のペプチドを発現させるため、または遺伝子治療用に本発明のポリヌクレオチドを投与するために使用され得る。

[0197] 大腸菌が宿主細胞であり、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 α 、HB101、またはXL1-Blue）内で増幅して大量に生成する場合、ベクターは、大腸菌内で増幅するための「複製起点」と、形質転換された大腸菌を選択するためのマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール等の薬物によって選択される薬物耐性遺伝子）とを有する必要がある。例えば、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Script等を用いることができる。加えて、pGEM-T、pDIRECT、およびpT7もまた上記のベクターと同様にクローニングのために用いることができる。ベクターを本発明のペプチドの産生に用いる場合には、発現ベクターが使用され得る。例えば、大腸菌内で発現させる発現ベクターは、大腸菌内で増幅するために上記の特徴を有する必要がある。JM109、DH5 α 、HB101、またはXL1-Blueなどの大腸菌を宿主細胞として用いる場合、ベクターは、

大腸菌内で所望の遺伝子を効率的に発現し得るプロモーター、例えば、lacZプロモーター (Ward et al., Nature 341: 544-6 (1989) ; FASEB J 6: 2422-7 (1989))、araBプロモーター (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988))、T7プロモーター等を有する必要がある。この点に関して、例えば、pGEX-5X-1 (Pharmacia)、「QIAexpressシステム」(Qiagen)、pEGFP、およびpET (この場合、宿主は好ましくはT7 RNAポリメラーゼを発現するBL21である)を上記のベクターの代わりに用いることができる。さらにベクターは、ペプチド分泌のためのシグナル配列を含んでもよい。ペプチドを大腸菌のペリプラズムに分泌させる例示的なシグナル配列は、pelBシグナル配列 (Lei et al., J Bacteriol 169: 4379 (1987))である。ベクターを標的宿主細胞に導入する手段には、例えば塩化カルシウム法およびエレクトロポレーション法が含まれる。

[0198] 大腸菌に加えて、例えば、哺乳動物由来の発現ベクター (例えば、pcDNA3 (Invitrogen)、およびpEGF-BOS (Nucleic Acids Res 18(17): 5322 (1990))、pEF、pCDM8)、昆虫細胞由来の発現ベクター (例えば、「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」(GIBCO BRL)、pBacPAK8)、植物由来の発現ベクター (例えば、pMH1、pMH2)、動物ウイルス由来の発現ベクター (例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw)、レトロウイルス由来の発現ベクター (例えば、pZIpneo)、酵母由来の発現ベクター (例えば、「ピキア (Pichia) 発現キット」(Invitrogen)、pNV11、SP-Q01)、および枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 由来の発現ベクター (例えば、pPL608、pKTH50) を、本発明のポリペプチドの産生に使用することができる。

[0199] ベクターをCHO、COS、またはNIH3T3細胞などの動物細胞内で発現させるためには、ベクターはこのような細胞における発現に必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター (Mulligan et al., Nature 277: 108 (1979))、MM LV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター (Mizushima et al., Nucleic Acid Res 18: 5322 (1990))、CMVプロモーター等、および好ましくは形質転換体を選択するためのマーカー遺伝子 (例えば、薬物 (例えば、ネオマイシン

、G418)によって選択される薬物耐性遺伝子)を有する必要がある。これらの特徴を有する公知のベクターの例には、例えばpMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、およびpOP13が含まれる。

[0200] 上記説明に基づく本発明の態様を以下に例示するが、本発明はこれらに限定されない。

[1] 以下の群より選択されるアミノ酸配列を含む、細胞傷害性T細胞 (CTL) 誘導能を有する15アミノ酸未満のペプチド：

(a) 配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15からなる群より選択されるアミノ酸配列；および

(b) 配列番号1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列。

[2] 配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、以下の特徴の一方または両方を有する、[1]記載のペプチド：

(a) N末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；および

(b) C末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている。

[3] 配列番号：1、2、4、7、10、12および13からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、以下の特徴の一方または両方を有する、[1]記載のペプチド：

(a) N末端から2番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；および

(b) C末端のアミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている。

[4] 配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、[1]記載のペプチド。

[5] [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

[6] 薬学的に許容される担体と、以下の（a）～（e）からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む組成物：

（a）[1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

（b）[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

（c）[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

（d）[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエクソソーム；および

（e）[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[7] 前記有効成分が以下の（a）～（d）からなる群より選択される少なくとも1つの成分であり、CTLを誘導するための組成物である、[5]記載の組成物：

（a）[1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

（b）[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

（c）[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；および

（d）[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエクソソーム。

[8] 薬学的組成物である、[6]記載の組成物。

[9] （i）コロナウイルス感染症の治療、（ii）コロナウイルス感染症の予防、および（iii）コロナウイルス感染症の重症化の抑制からなる群より選択される1以上の用途のための薬学的組成物である、[8]記載の組成物。

[10] コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導するための、[8]記載の組

成物。

[11] コロナウイルス感染症のコロナウイルスが、SARS-CoV-2、MERS-CoVおよびSARS-CoVからなる群より選択される、[9]または[10]記載の組成物。

[12] HLA-A24またはHLA-A02陽性である対象への投与のために製剤化される、[6]～[11]のいずれか一項記載の組成物。

[13] 以下の (a) および (b) からなる群より選択される段階を含む、CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法：

(a) APCを、[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとインビトロ、エキスビボ、またはインビボで接触させる段階、および

(b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。

[14] 以下の (a) ～ (c) からなる群より選択される段階を含む、CTLを誘導する方法：

(a) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共培養する段階、

(b) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階、および

(c) 細胞表面上にHLA抗原により提示された[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドに結合し得るT細胞受容体 (TCR) の各サブユニットをコードするポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入する段階。

[15] HLA抗原と[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPC。

[16] [13]記載の方法によって誘導される、[15]記載のAPC。

[17] [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[18] [14]記載の方法によって誘導される、[17]記載のCTL。

[19] 以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの成分を含む組成物を対象に投与する段階を含む、コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導する方法：

- (a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；
- (d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[20] 以下の（a）～（e）からなる群より選択される少なくとも1つの成分を対象に投与する段階を含む、コロナウイルス感染症の治療、予防および重症化の抑制から選択される、いずれか、または複数の目的のための方法：

- (a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；
- (d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[21] [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドに結合する抗体。

[22] CTL誘導能を有するペプチドをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

- (a) 配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列からなる元のアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなる候補配列を作成する段階；
- (b) (a) で作成した候補配列の中からいかなる公知のヒト遺伝子産物とも有意な相同性（配列同一性）を有さない候補配列を選択する段階；

(c) (b) で選択した候補配列からなるペプチドと、APCとを接触させる段階；

(d) (c) のAPCとCD8陽性T細胞とを接触させる段階；および

(e) 元のアミノ酸配列からなるペプチドよりも同等かまたはより高いCTL誘導能を有するペプチドを選択する段階。

[23] コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導するための組成物の製造における、以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの成分の使用：

(a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[24] コロナウイルス感染症の治療、予防、および重症化の抑制から選択される、いずれか、または複数の目的のための薬学的組成物の製造における、以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分の使用：

(a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[25] コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導するための、以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分の使用：

- (a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；
- (d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[26] コロナウイルス感染症の治療、予防および重症化の抑制から選択される、いずれか、または複数の目的のための、以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分の使用：

- (a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；
- (d) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および
- (e) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[27] 以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を対象に投与する段階を含む、コロナウイルス感染細胞に対する細胞傷害活性を誘導する方法：

- (a) [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の

細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

（d）[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

（e）[1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[28] [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチドを含む凍結乾燥製剤。

[29] [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチドを水溶性の担体に溶解し、ろ過滅菌することを含む方法で調製された、薬学的組成物。

[30] [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチドと水溶性の担体とを含む水溶液であって、ろ過滅菌された水溶液。

[31] [1]～[4]のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド、水溶性の担体、および油性アジュバントを含むエマルション。

[32] [8]～[12]のいずれか一項記載の薬学的組成物が収容されている容器、およびアジュバントが収納されている容器を含むキット。

[33] [1]～[4]のいずれか一項記載のペプチドを含む凍結乾燥製剤が収納されている容器、アジュバントが収納されている容器、および凍結乾燥製剤のための再溶解液が収納されている容器を含むキット。

[34] [6]～[12]のいずれか一項記載の組成物が収容されている容器、およびアジュバントが収容されている容器を含むキット。

[0201] 本発明をその特定の態様に関して本明細書において詳細に説明してきたが、前述の説明は事実上、例示的かつ説明的なものであって、本発明およびその好ましい態様を説明することを意図していることが理解されるべきである。当業者は、慣例的な実験を通して、本発明の精神および範囲から逸脱することなく様々な変更および修正がその中でなされ得ることを容易に理解するであろう。したがって本発明は、上記の説明によって規定されるのではなく、添付の特許請求の範囲およびそれらの等価物によって規定されることが意図される。

[0202] 以下、実施例を参照して本発明をより詳細に記載する。しかしながら、以下の材料、方法および実施例は、本発明のある形態の作製および使用において当業者を支援するために役立ち得る一方、本発明の局面を説明するためのものにすぎず、したがって本発明の範囲を決して限定することを意図しない。当業者は、本明細書に記載のものと類似または同等の方法および材料を本発明の実施または試験において使用することができる。

実施例

[0203] 材料および方法

細胞株

ヒトリンパ芽球様細胞株であるTISI細胞（HLA-A*24:02/-）は、International Histocompatibility Working Groupから購入した。ヒトリンパ芽球細胞株であるT2細胞（HLA-A*02:01/-）は、ATCCから購入した。

[0204] SARS-CoV-2由来ペプチドの選択

HLA-A*24:02への結合が期待されるSARS-CoV-2蛋白由来の9merおよび10merペプチドを結合予測サーバー「NetMHC 4.0」（<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHC/>）（Nielsen M et al., Protein Sci 2003, 12(5):1007-1017; Andreatta M et al., Bioinformatics 2016, 32(4):511-517）を用いて決定した。なかでもSARS-CoV Tor2（GenBank accession number AY274119）、SARS-CoV BJ01（GenBank accession number AY278488）およびSARS-CoV GZ02（GenBank accession number AY390556）やMERS-CoV（GenBank accession number JX869059）にも共通して認められるペプチドをエピトープ候補として選択した（Kiyotani K et al., J Hum Genet 2020, 65(7):569-575）。

[0205] ペプチドの合成

ペプチドは、コスモ・バイオ株式会社（東京、日本）により、固相合成法に従って合成され、逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって精製された。HPLCおよび質量分析法によって該ペプチドの品質（純度90%以上）は保証された。ペプチドをジメチルスルホキシドで溶解し（最終濃度：20mg/ml）、-80℃で保存した。

[0206] インビトロでのCTL誘導

単球由来の樹状細胞（DC）を抗原提示細胞として使用し、ヒト白血球抗原（HLA）上に提示されたペプチドに対する特異的な細胞傷害性T細胞（CTL）を誘導した。すでに文献で報告されている通り、DCはインビトロで作製した（Nakahara S et al., Cancer Res 2003, 63(14):4112-4118）。具体的には、健康人ボランティア（HLA-A*24:02陽性またはHLA-A*02:01陽性）から採取した末梢血単核細胞（PBMC）を組織培養ディッシュ（Corning）へ播き、PBMC中の単球をディッシュへ接着させた。1000 IU/mlの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（R&D System）および1000 IU/mlのインターロイキン（IL）-4（R&D System）の存在下で7日間培養した。培地には非働化済みAB型血清（MP Biomedicals）を含むAIM-V培地（Invitrogen）を用いた（2%ABS/AIM-V 培地）。サイトカインによって単球から分化誘導されたDCとCD8 Positive Isolation Kit（Invitrogen）を用いて得られた自己CD8陽性T細胞を1：20の比率（ 1.5×10^4 個のDCと 3×10^5 個のCD8陽性T細胞）で混合し、48ウェルプレート（Corning）にて培養した。さらにはペプチドを添加した（ペプチド最終濃度：20 μ g/ml）。1ウェルあたりの2%ABS/AIM-V 培地量は0.5mlとし、IL-7（R&D System）およびIL-21（Cell Genix）を添加した（最終濃度：IL-7 10ng/ml、IL-21 30ng/ml）。培養開始から3日後、再びDCとペプチドを添加した（ペプチド最終濃度：20 μ g/ml）。DCは上記と同一の方法によって用時調製した。培養開始から7日後、IL-2（Novartis）、IL-7およびIL-15（Novoprotein）を添加した（最終濃度：IL-2 48IU/ml、IL-7 5ng/mlおよびIL-15 5ng/ml）（Wolfl M et al., Nat Protoc 2014, 9(4):950-966）。9日目以降（2回のDC刺激後）、ペプチドをパルスしたTISI細胞またはT2細胞に対するIFN- γ 産生を酵素結合免疫スポット（ELISPOT）アッセイで確認した。

[0207] CTL増殖手順

Riddellら（Walter EA et al., N Engl J Med 1995, 333(16): 1038-1044 ; Riddell SR et al., Nat Med 1996, 2(2): 216-223）によって報告されている方法と類似の方法を利用して、CTLを増殖させた。組織培養用フラスコ（

FALCON) において、マイトマイシンCで処理した2種類のヒトBリンパ芽球様細胞株 (各5 × 10⁶個) および抗CD3抗体 (BD biosciences, 最終濃度: 40ng/ml) とともにCTLを5%ABS/AIM-V培地中で培養した (培養液量: 25ml/フラスコ)。培養を開始した翌日、IL-2を該培養物に添加した (IL-2最終濃度: 120IU/ml)。5、8および11日目に、60IU/ml のIL-2を含む5%ABS/AIM-V培地による培地交換を行った (IL-2最終濃度: 30IU/ml) (Yoshimura S et al., PLoS One 2014, 9(1):e85267)。

[0208] IFN- γ 産生の確認

ペプチドを用いて誘導したCTLのペプチド特異的IFN- γ 産生を確認するために、IFN- γ ELISPOTアッセイおよびIFN- γ ELISAを実施した。ペプチドをパルスしたTISI細胞またはT2細胞を標的細胞として調製した。IFN- γ ELISPOTアッセイおよびIFN- γ ELISAは、アッセイキット製造業者の推奨する手順に従って実施した。

[0209] 結果

SARS-CoV-2蛋白に由来するHLA-A*24:02結合ペプチドの選択

表2aおよび表2bは、「NetMHC 4.0」によってHLA-A*24:02への結合が予測されたSARS-CoV-2蛋白由来の9merおよび10merペプチドを結合親和性が高い順に示す。SARS-CoVおよびMERS-CoVにも共通して認められるペプチドを表2aに示した。SARS-CoVとのみ共通しているペプチドを表2bに示した。HLA-A*24:02への結合能を有する可能性のあるエピトープペプチド候補として合計15種のペプチドを選択した。

[0210] [表2a]

HLA-A*24:02 への結合が予測された SARS-CoV-2 蛋白由来ペプチド (SARS-CoV および MERS-CoV と共通)

ペプチド	蛋白	位置	長さ	アミノ酸配列	結合親和性 (nM)	配列番号
1	ORF1ab	5080	9	AYANSVFNI	56	1
2	ORF1ab	5079	10	TAYANSVFNI	102	2
3	ORF1ab	5184	9	VFMSEAKCW	395	3

位置の数字は、ペプチドの1番目のアミノ酸が蛋白のN末端から数えて何番目にあたるかを示す。

結合親和性 (nM) は「NetMHC4.0」を利用して算出した。

[0211] [表2b]

HLA-A*24:02 への結合が予測された SARS-CoV-2 蛋白由来ペプチド(SARS-CoV のみと共通)

ペプチド	蛋白	位置	長さ	アミノ酸配列	結合親和性(nM)	配列番号
4	ORF1ab	4090	9	TYASALWEI	18	4
5	S	897	10	PFAMQMAYRF	39	5
6	ORF1ab	3811	10	YDYLVTQEF	41	6
7	ORF1ab	2560	10	YYSQLMCQPI	44	7
8	ORF1ab	4628	9	SYYSLLMPI	46	8
9	ORF1ab	6676	9	RYKLEGYAF	62	9
10	ORF1ab	4089	10	FTYASALWEI	69	10
11	ORF1ab	7039	10	SYSLFDMSKF	85	11
12	ORF1ab	4677	10	RYFKYWDQTY	90	12
13	M	54	9	LWLLWPVTL	108	13
14	ORF1ab	4090	10	TYASALWEIQ	111	14
15	ORF1ab	5138	10	YAYLRKHFSM	115	15

位置の数字は、ペプチドの 1 番目のアミノ酸が蛋白の N 末端から数えて何番目にあたるかを示す。

結合親和性 (nM) は「NetMHC4.0」を利用して算出した。

[0212] SARS-CoV-2蛋白由来ペプチドによるHLA-A*24:02拘束性CTLの誘導

HLA-A*24:02陽性PBMCを用いて、SARS-CoV-2蛋白由来ペプチド特異的CTLを「材料および方法」に記載したプロトコールに従って誘導した。ELISPOTアッセイによって、細胞のペプチド特異的なIFN- γ 産生を確認した(図1)。ペプチド1(配列番号:1)、ペプチド2(配列番号:2)、ペプチド3(配列番号:3)、ペプチド4(配列番号:4)、ペプチド5(配列番号:5)、ペプチド7(配列番号:7)、ペプチド9(配列番号:9)、ペプチド10(配列番号:10)、ペプチド11(配列番号:11)、ペプチド12(配列番号:12)、ペプチド13(配列番号:13)およびペプチド15(配列番号:15)において、ペプチド特異的なIFN- γ の産生が認められた(図1a)。一方、表2aおよび表2bに示されるその他のペプチドに対する特異的なIFN- γ 産生は認められなかった。例えば、ペプチド6(配列番号:6)に対する特異的なIFN- γ 産生は認められなかった(図1b)。いずれのペプチドもHLA-A*24:02へ結合する可能性があったが、結果としてHLA-A*24:02に結合し、CTL誘導能を有する12種のペプチドを同定し

た。

[0213] SARS-CoV-2蛋白由来ペプチド特異的なHLA-A*24:02拘束性CTLラインの樹立

HLA-A*24:02拘束性のIFN- γ ELISPOTアッセイにおいてペプチド1（配列番号：1）、ペプチド2（配列番号：2）、ペプチド4（配列番号：4）、ペプチド5（配列番号：5）、ペプチド7（配列番号：7）、ペプチド9（配列番号：9）、ペプチド10（配列番号：10）またはペプチド13（配列番号：13）に対する特異的なIFN- γ 産生を示した細胞を増殖させて、HLA-A*24:02拘束性CTLラインを樹立した。ELISAによるIFN- γ 測定の結果、ペプチド1（配列番号：1）、ペプチド2（配列番号：2）、ペプチド4（配列番号：4）、ペプチド5（配列番号：5）、ペプチド7（配列番号：7）、ペプチド9（配列番号：9）、ペプチド10（配列番号：10）またはペプチド13（配列番号：13）をパルスしたHLA-A*24:02発現標的細胞（TISI細胞）に対するCTLラインのIFN- γ 産生が認められた（図2）。このことから、ペプチド1（配列番号：1）、ペプチド2（配列番号：2）、ペプチド4（配列番号：4）、ペプチド5（配列番号：5）、ペプチド7（配列番号：7）、ペプチド9（配列番号：9）、ペプチド10（配列番号：10）およびペプチド13（配列番号：13）はHLA-A*24:02に結合し、CTL誘導能を有することが明確に実証された。

[0214] SARS-CoV-2蛋白由来ペプチドによるHLA-A*02:01拘束性CTLの誘導

HLA-A*24:02拘束性CTL誘導能を有することが確認されたペプチド1（配列番号：1）、ペプチド2（配列番号：2）、ペプチド3（配列番号：3）、ペプチド4（配列番号：4）、ペプチド5（配列番号：5）、ペプチド7（配列番号：7）、ペプチド9（配列番号：9）、ペプチド10（配列番号：10）、ペプチド11（配列番号：11）、ペプチド12（配列番号：12）、ペプチド13（配列番号：13）およびペプチド15（配列番号：15）が、HLA-A*02:01拘束性CTL誘導能を有するか否かを検証した。

HLA-A*02:01陽性PBMCを用いて、HLA-A*02:01拘束性CTLを「材料および方法」に記載したプロトコールに従って誘導した。ELISPOTアッセイによって、細胞のペプチド特異的なIFN- γ 産生を確認した（図3）。ペプチド1（配列番号

: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド4 (配列番号: 4)、ペプチド7 (配列番号: 7)、ペプチド10 (配列番号: 10)、ペプチド12 (配列番号: 12) およびペプチド13 (配列番号: 13) において、ペプチド特異的なIFN- γ の産生が認められた (図3a)。一方、ペプチド3 (配列番号: 3)、ペプチド5 (配列番号: 5)、ペプチド9 (配列番号: 9)、ペプチド11 (配列番号: 11) およびペプチド15 (配列番号: 15) に対する特異的なIFN- γ 産生は認められなかった。その一例としてペプチド5 (配列番号: 5) の結果を示す (図3b)。以上のことから、HLA-A*24:02拘束性CTL誘導能を有するペプチド1 (配列番号: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド4 (配列番号: 4)、ペプチド7 (配列番号: 7)、ペプチド10 (配列番号: 10)、ペプチド12 (配列番号: 12) およびペプチド13 (配列番号: 13) はまたHLA-A*02:01にも結合し、HLA-A*02:01拘束性CTL誘導能を有することが明らかとなった。

[0215] SARS-CoV-2蛋白由来ペプチド特異的なHLA-A*02:01拘束性CTLラインの樹立

HLA-A*02:01拘束性のIFN- γ ELISPOTアッセイにおいてペプチド1 (配列番号: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド10 (配列番号: 10) またはペプチド13 (配列番号: 13) に対する特異的なIFN- γ 産生を示した細胞を増殖させて、HLA-A*02:01拘束性CTLラインを樹立した。ELISAによるIFN- γ 測定の結果、ペプチド1 (配列番号: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド10 (配列番号: 10) またはペプチド13 (配列番号: 13) をパルスしたHLA-A*02:01発現標的細胞 (T2細胞) に対するCTLラインのIFN- γ 産生が認められた (図4)。このことから、ペプチド1 (配列番号: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド10 (配列番号: 10) およびペプチド13 (配列番号: 13) はHLA-A*02:01にも結合し、HLA-A*02:01拘束性CTL誘導能を有することが明確に実証された。

[0216] ペプチドの相同性解析

ペプチド1 (配列番号: 1)、ペプチド2 (配列番号: 2)、ペプチド3 (配列番号: 3)、ペプチド4 (配列番号: 4)、ペプチド5 (配列番号: 5)、ペプチド7 (配列番号: 7)、ペプチド9 (配列番号: 9)、ペプチド10 (配列番号: 1

0)、ペプチド11(配列番号:11)、ペプチド12(配列番号:12)、ペプチド13(配列番号:13)およびペプチド15(配列番号:15)は、ペプチド特異的なIFN- γ 産生を示すCTLを誘導し得ることが確認された。そこで、ペプチド1(配列番号:1)、ペプチド2(配列番号:2)、ペプチド3(配列番号:3)、ペプチド4(配列番号:4)、ペプチド5(配列番号:5)、ペプチド7(配列番号:7)、ペプチド9(配列番号:9)、ペプチド10(配列番号:10)、ペプチド11(配列番号:11)、ペプチド12(配列番号:12)、ペプチド13(配列番号:13)およびペプチド15(配列番号:15)のアミノ酸配列と、ヒト蛋白に由来するアミノ酸配列との相同性を確認するために、BLASTアルゴリズム(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を用いて、相同性解析を行った。その結果、ペプチド1(配列番号:1)、ペプチド2(配列番号:2)、ペプチド3(配列番号:3)、ペプチド4(配列番号:4)、ペプチド5(配列番号:5)、ペプチド7(配列番号:7)、ペプチド9(配列番号:9)、ペプチド10(配列番号:10)、ペプチド11(配列番号:11)、ペプチド12(配列番号:12)、ペプチド13(配列番号:13)およびペプチド15(配列番号:15)のアミノ酸配列は、ヒト蛋白において認められなかった。したがって、本発明者らの知る限りでは、これらのペプチドはSARS-CoV-2あるいはSARS-CoVやMERS-CoVに由来するものであり、ヒト正常組織に対する意図しない免疫応答を引き起こす可能性はほとんど無いと考えられる。結論として、SARS-CoV-2蛋白由来の新規HLA-A*24:02またはHLA-A*02:01拘束性エピトープペプチドが同定され、COVID-19に対するペプチドワクチンに適用され得ることが示された。

産業上の利用可能性

[0217] 本発明は、コロナウイルス感染に対する強力かつ特異的な免疫応答を誘導し、したがって幅広いコロナウイルス感染症の種類に対する適用性を有し得る、SARS-CoV-2蛋白由来の新規HLA-A24またはHLA-A02拘束性エピトープペプチドを提供する。本発明のペプチド、組成物、APC、およびCTLは、コロナウイルス感染症、例えば、SARS-CoV-2、MERS-CoV、またはSARS-CoV感染症に対するペプチドワクチンとして使用され得る。

[0218] 本明細書において、本発明をその特定の態様に関して詳細に説明しているが、前述の説明は本質的に例示的かつ説明的なものであって、本発明およびその好ましい態様を説明することを意図していることが理解されるべきである。慣例的な実験を通して、当業者は、その境界および限界が添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な変更および改変がその中でなされ得ることを容易に認識する。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の群より選択されるアミノ酸配列を含む、細胞傷害性T細胞（CTL）誘導能を有する15アミノ酸未満のペプチド：
- （a）配列番号1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15からなる群より選択されるアミノ酸配列；および
- （b）配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、1個、2個、または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／または付加されているアミノ酸配列。
- [請求項2] 配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、以下の特徴の一方または両方を有する、請求項1記載のペプチド：
- （a）N末端から2番目のアミノ酸が、フェニルアラニン、チロシン、メチオニンおよびトリプトファンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；および
- （b）C末端のアミノ酸が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、トリプトファンまたはメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている。
- [請求項3] 配列番号：1、2、4、7、10、12および13からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、以下の特徴の一方または両方を有する、請求項1記載のペプチド：
- （a）N末端から2番目のアミノ酸が、ロイシンおよびメチオニンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている；および
- （b）C末端のアミノ酸が、バリンおよびロイシンからなる群より選択されるアミノ酸に置換されている。
- [請求項4] 配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15からなる群より選択されるアミノ酸配列からなる、請求項1記載のペプチド。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドをコードする、ポリヌク

レオチド。

[請求項6] 薬学的に許容される担体と、以下の (a) ～ (e) からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分とを含む組成物：

(a) 請求項1～4のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；

(d) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム；および

(e) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[請求項7] 前記有効成分が以下の (a) ～ (d) からなる群より選択される少なくとも1つの成分であり、CTLを誘導するための組成物である、請求項5記載の組成物：

(a) 請求項1～4のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；

(b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；

(c) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；および

(d) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエキソソーム。

[請求項8] 薬学的組成物である、請求項6記載の組成物。

[請求項9] (i) コロナウイルス感染症の治療、(ii) コロナウイルス感染症の予防、および (iii) コロナウイルス感染症の重症化の抑制からなる群より選択される1以上の用途のための、請求項8記載の組成物。

[請求項10] コロナウイルス感染に対する免疫応答を誘導するための、請求項8記

載の組成物。

- [請求項11] コロナウイルスが、SARS-CoV-2、MERS-CoVおよびSARS-CoVからなる群より選択される、請求項9または10記載の組成物。
- [請求項12] HLA-A24またはHLA-A02陽性である対象への投与のために製剤化される、請求項6～11のいずれか一項記載の組成物。
- [請求項13] 以下からなる群より選択される段階を含む、CTL誘導能を有するAPCを誘導する方法：
- (a) APCを、請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとインビトロ、エクスピボ、またはインビボで接触させる段階、および
 - (b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドをコードするポリヌクレオチドをAPCに導入する段階。
- [請求項14] 以下からなる群より選択される段階を含む、CTLを誘導する方法：
- (a) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPCと共培養する段階、
 - (b) CD8陽性T細胞を、HLA抗原と請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するエキソソームと共培養する段階、および
 - (c) 細胞表面上にHLA抗原により提示された請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドに結合し得るT細胞受容体（TCR）の各サブユニットをコードするポリヌクレオチドをCD8陽性T細胞に導入する段階。
- [請求項15] HLA抗原と請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとの複合体を自身の表面上に提示するAPC。
- [請求項16] 請求項13記載の方法によって誘導される、請求項15記載のAPC。
- [請求項17] 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。
- [請求項18] 請求項14記載の方法によって誘導される、請求項17記載のCTL。
- [請求項19] 以下の（a）～（e）からなる群より選択される少なくとも1つの成分を対象に投与する段階を含む、コロナウイルス感染に対する免疫応

答を誘導する方法：

- (a) 請求項1～4のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；
- (d) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[請求項20] 以下の（a）～（e）からなる群より選択される少なくとも1つの有効成分を含む組成物を対象に投与する段階を含む、コロナウイルス感染症を治療および／もしくは予防する、ならびに／または重症化を抑制する方法：

- (a) 請求項1～4のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド；
- (b) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを発現可能な形態でコードする1種類もしくは複数種のポリヌクレオチド；
- (c) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示する抗原提示細胞（APC）；
- (d) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドとHLA抗原との複合体を自身の細胞表面上に提示するエクソソーム；および
- (e) 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドを標的とするCTL。

[請求項21] 請求項1～4のいずれか一項記載のペプチドに結合する抗体。

[請求項22] CTL誘導能を有するペプチドをスクリーニングする方法であって、以下の段階を含む方法：

- (a) 配列番号：1、2、3、4、5、7、9、10、11、12、13および15の中から選択されるアミノ酸配列からなる元のアミノ酸配列に対して、1

個、2個、または数個のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、および／または付加されたアミノ酸配列からなる候補配列を作成する段階；

(b) (a) で作成した候補配列の中からいかなる公知のヒト遺伝子産物とも有意な相同性（配列同一性）を有さない候補配列選択する段階；

(c) (b) で選択した候補配列からなるペプチドと、APCとを接触させる段階；

(d) (c) のAPCとCD8陽性T細胞とを接触させる段階；および

(e) 元のアミノ酸配列からなるペプチドよりも同等かまたはより高いCTL誘導能を有するペプチドを選択する段階。

[請求項23] 請求項1～4のいずれか一項記載の1種類もしくは複数種のペプチド、水溶性の担体、および油性アジュバントを含むエマルション。

[請求項24] 請求項6～12のいずれか一項記載の組成物が収容されている容器、およびアジュバントが収容されている容器を含むキット。