

200500205 A

別添1

厚生労働科学研究研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

細胞結合配列を用いた易吸収性ペプチド製剤の設計

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 矢野 明

平成18(2006)年 4月

別添 2

目 次

I. 総括研究報告	
細胞結合配列を用いた易吸収性ペプチド製剤の設計	----- 1
矢野 明	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 6
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 7

別添3

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
(総括) 分担) 研究報告書

細胞結合配列を用いた易吸収性ペプチド製剤の設計

主任研究者 矢野 明 (財)岩手生物工学研究センター 主任研究員

研究要旨 アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) を代表とする細胞結合配列をペプチドに付加することで、ペプチドの免疫原性が増強され、その水溶液を鼻腔粘膜へ滴下するだけで血清中に様々な抗ペプチド抗体を誘導できることを確認した。今年度は抗原性が弱いペプチドに対して、さらに効率良く抗体誘導する方法を確立し、アルツハイマー病の治療や予防につながる、アミロイドβペプチドのN末端に特異的な抗体を誘導することに成功した。

A. 研究目的

近年、生理活性を持った様々なペプチドが報告され、薬剤としての応用が期待されている。ワクチンの分野においても、ペプチドは必要最小限のエピトープに対する免疫を誘導でき、安全性が高いことから、新しいタイプの感染防御ワクチンやガン細胞のみを攻撃させるガンワクチンとしての開発が行われている。しかし、ワクチンとして用いるためには抗原性が弱いという致命的な欠陥がある。そこで、リポソームなどのベクターを用いてペプチドを免疫するというアプローチが考えられ、様々なベクターの研究開発が精力的に行われている。これに対し、本研究ではペプチド製剤そのものに生体組織への親和性、選択性を持たせ、ペプチドの免疫原性を高めることを目的としている。これに成功すればワクチン以外のペプチド製剤に関しても、その有効性を高め使用濃度を下げられる可能性がある。将来は鼻からペプチド溶液を滴下あるいは噴

霧するだけで免疫誘導可能になり、手軽に感染予防やガン予防あるいは治療が可能になるかもしれない。

本年度は、抗原性の非常に弱いペプチド、抗体を誘導しづらいペプチドに対して、抗体誘導を可能にする手法に関して研究を行った。また、細胞結合後のペプチドの局所動態に関して、蛍光ラベルで標識したペプチドを用いて検討を行った。さらに、化学合成が困難な40アミノ酸残基長のペプチドの生物学的生産方法に関して低分子タンパク質の発現をモデル系として若干の検討を行った。

B. 研究方法

研究の実用化、および社会への還元を意識し、世界的な重要疾患であるアルツハイマー病の治療、予防につながるペプチドワクチンの設計を行った。アルツハイマー病のワクチン療法は、脳内に蓄積するアミロイドβペプチドを患者に免疫し、抗アミロイド抗体を誘導することでその可溶化を行

い、疾患の治療につなげる方法である。実際にアミロイドペプチド全長を用いた臨床試験が行われ免疫療法の有効性が確認されたが、数パーセントのヒトに細胞性免疫による脳炎が生じるという深刻な副作用も報告された。脳炎を誘導しない新しい免疫療法の開発が望まれている。本研究では治療に最も効果が高いとされるアミロイドβペプチドのN末端配列に対する抗体誘導を行うためのペプチドを設計、合成してマウスの免疫実験を行った。しかしペプチドの免疫原性が弱く、抗体誘導ができなかった。そこで、より強い抗体誘導を可能にするため、各種データベースを用いたペプチドの *in silico* デザインを行った。市販のワクチンに含まれているタンパク質（BCG（ツベルクリンタンパク質画分）由来の Mpt64、三種混合ワクチンに含まれるジフテリア毒素及び破傷風毒素）から様々な HLA-II に対して結合が予測されるペプチド配列を抽出し、それらを T 細胞エピトープとして用いた。アミロイドβペプチドのN末端配列（1-13）を B 細胞エピトープとして設計、合成しマウスを用いた免疫実験を行った。この時、市販のワクチン接種によって生じる免疫記憶をペプチドの免疫に利用するため、ツベルクリンタンパク質画分、ジフテリア破傷風混合ワクチンをあらかじめ免疫した後、ペプチドを免疫した。また、ワクチンに対する T 細胞メモリーが、実際にヒトに応用できるか、BCG および三種混合ワクチンの接種経験のあるボランティアから末梢血を採取し、T 細胞エピトープペプチドを添加したときの *in vitro* リンパ球増殖試験を行った。

一方で、細胞結合配列を持つペプチドが細胞内に取り込まれ、MHC-II 分子によって効率良く提示されるのか、*in vitro* アッセ

イを試みた。RGD 配列を付加したペプチドに蛍光ラベルを行い、BALB/c 由来のマクロファージ系細胞培養液に加えたときのペプチドの動態を顕微鏡下で観察した。また、N 末端を FLC、C 末端を TMR ラベルし、単独では超波長側の蛍光を発し、細胞に取り込まれてリジンリンカーが切断されると短波長側の蛍光を発する（FRET 効果）ペプチドを作成し、その動態を顕微鏡下で観察した。

ペプチドの生物学的な生産法に関して、植物細胞における生産の検討を進めた。まず、実績のある植物培養細胞を用いた抗体生産系を軸に、長鎖ペプチドに近い大きさの低分子タンパク質断片として Fab の L および H 鎖の生産を行い、その精製を試みた。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた免疫実験に関しては、動物愛護の観点に則り、最小限の実験で最大の効果が得られるよう心掛けた。実験遂行に関しては、あらかじめ動物実験委員会の審査を受け、倫理上問題がないと承認をえて行った（科学院動物実験委員会承認番号 17-001）。また、ヒト末梢血を用いた実験に関しても同様に倫理委員会の審査を受け、倫理上問題が無いよう配慮して研究を行った（承認番号 NIPH-IBRA#05006）。ペプチドの生物学的な生産系に関する研究は、過去に国立感染症研究所 DNA 組換え実験計画審査を受け許可を得て（機 16-005）作成したタバコ培養細胞を用いた Fab 生産系（組換え生物ではない）を用いた精製実験等を行うことで実施した。

C. 研究結果

従来用いていたマルチアグレトープ型の T 細胞エピトープ、HIV Gag(298-312)、あるいは文献で C57BL/6 の強力な T 細胞エ

ピトープとして報告されていた OVA(258-276)などを用いて、アミロイドβペプチド N 末端 (Ab) の免疫を試みた。不完全アジュバントを用いて免疫を行っても、BALB/c、C57BL/6 とともに弱い免疫応答しか得られなかった。そこで、新たに設計したツベルクリン由来エピトープ、Mpt、ジフテリア毒素由来エピトープ、DiTox、破傷風毒素由来エピトープ、TeTox1、TeTox3 を用いて Ab 抗体誘導用ペプチド、RGD-Mpt-KK-Ab, RGD-DiTox-KK-Ab, RGD-TeTox1-KK-Ab, RGD-TeTox3-KK-Ab、を合成して不完全アジュバントを用いて C57BL/6 に免疫した。その結果 DiTox を用いたペプチドで非常に強い Ab 抗体の誘導が確認できた。さらに、アジュバントを用いずに鼻腔免疫を行ったところ、C57BL/6 において DiTox ペプチド、BALB/c において DiTox、TeTox1 ペプチドで抗 Ab 抗体の誘導が確認できた。この時、ペプチドを免疫する 2 週間前に市販のジフテリア破傷風 2 種混合ワクチン、あるいはツベルクリン画分を結核菌死菌体を含む完全アジュバントで免疫しておく、BALB/c では 3 種のペプチド、C57BL/6 では DiTox ペプチドを用いたペプチドにおいて、抗 Ab 抗体誘導が顕著に増強されることを確認した。それぞれのペプチドの T 細胞エピトープ部分のみを用いて、マウスリンパ球幼若化試験を行うと、ペプチドに反応して幼若化が起きることが確認できた。また、ボランティア数名から末梢血を採取し、Mpt、DiTox、TeTox1、TeTox3 それぞれの T 細胞エピトープペプチドによるリンパ球幼若化試験を行った結果、個々人により反応性に差があるが幼若化が確認された。

マウスマクロファージ様培養細胞に、蛍光ラベルしたペプチドを作用させたところ、

ペプチドが数分のうちに細胞膜上に付着し、数十分の時間で細胞内に取り込まれるのが観察された。細胞内局在はエンドソーム、リソソームのマーカールと一致したが、ペプチド配列上細胞結合配列の有無によって大きな差は見いだせなかった。また、細胞内でのペプチドの消化から MHC-II による細胞表面への提示を FRET 解析によって確認を試みたが、FRET 効果が低いためか、あるいは消化効率が低いためか明瞭な結果が得られなかった。

ペプチド生産系のモデルとして FabL、H 鎖のタバコ培養細胞による生産を試みた。発現量増強のため、ER 滞留シグナルである KDEL 配列を C 末端に付加したものと付加しないものとで比較を行った。その結果、低分子タンパク質は細胞内へ蓄積させるより、細胞外へ分泌させた方がより効率の良い生産が期待できることが明らかになった。

D. 考察

Mpt、DiTox、TeTox1、TeTox3 という T 細胞エピトープを用いてマウス免疫実験を行った結果、特に DiTox が非常に強い抗体誘導能を示し、その効果は 2 種混合ワクチンの免疫記憶によってさらに増強されることが明らかとなった。他のエピトープに関してもマウスでは DiTox ほどの効果は見られなかったが、ヒトでは効果が期待できる可能性もある。特に、Mpt においては本来 BCG を接種した後に効果を見るべきものであったが、BCG を用いた場合感染実験となり、既存の施設では対応できなかったため、ツベルクリン画分と完全アジュバントで代用することにしたため、その効果を完全に評価できているとはいえない。事実、ヒト末梢血を用いた増殖試験では、Mpt に

反応しているケースも見受けられる。アルツハイマー病のワクチン療法を考えた時には抗アミロイド抗体を強く誘導することが第一に求められるが、そのためには個人が持つメモリーT細胞のうち、より強いものを利用することが成功の鍵を握る。従って、これら4種のペプチドはもちろん、他にもいくつかのT細胞エピトープを準備しておき、個人に合ったエピトープを *in vitro* アッセイで選択して用いるという手法も考えられる。また、治療に先んじてBCGや2種混合ワクチンの再接種によって、メモリーT細胞を増やすことも実用的な手法であろう。一方、我々のペプチドはMHC-IIをターゲットとする上に、アジュバントなしの鼻腔免疫により抗体誘導を行うため、従来のアルツハイマー病の副作用である脳炎を引き起こす可能性が考えにくい。このようなことから、実用的な治療法開発に直結した研究成果を出せたのではないかと考えている。

一方で、ペプチドの細胞局所の動態解析は思った成果が得られなかった。これは、もともと異物の取り込み能が高いマクロファージ系の細胞を用いたために、細胞結合配列の効果を見ることができなかったことが、大きな原因である。一方で、エンドソーム活性が低い細胞を用いた場合にはペプチドの取込みそのものが弱く、可視化が困難になるなど問題が多い。*In vivo*での粘膜への投与から抗原提示細胞への取込み、T細胞への提示といった動態を再現するためには、複数種の細胞を混合培養するなど、更なる工夫が不可欠であると考えられる。

長鎖ペプチドの生産系に関しては、分泌系が有望であるという結果が得られた。従来からバクテリアなどでペプチドを発現させた場合には、細胞内ですみやかに分解さ

れてしまうことが示唆されており、分泌系の利用は有力な候補の一つであった。現在、主任研究者の得意とするタバコ培養細胞を用いた発現系をモデルとして検討を行っているが、分泌系を用いれば様々な宿主において高効率のペプチドの生産が可能かもしれない。

E. 結論

本年度の研究で、ペプチドの免疫原性を増強する新しい2つのアプローチ、*in silico*によるマルチアグレトープ型T細胞エピトープの設計、宿主のもつ免疫記憶の利用を試みた。また、2つのアプローチを用いてアルツハイマー病ワクチン療法のためのペプチド設計を試みた。実際にヒトリンパ球増殖実験を行った結果、*in silico*の設計、免疫記憶の利用がヒトにおいて有効である可能性が示唆された。これらの結果は予想を上回るものであり、ヒト臨床用のワクチンに近づくことができたのではないかと考えている。

今後はアルツハイマー病のワクチン療法の実用化、またその他の様々な疾患にペプチド設計を適用し、研究成果の社会還元を進めていきたい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Yano A, Onozuka A, Asahi-Ozaki A, Imai S, Hanada N, Miwa Y, Nisizawa T. An ingenious design for peptide vaccines. *Vaccine* 23(17-18):2322-2326 (2005).

Yano A, Takekoshi M, Morita E, Imai S, Nisizawa T, Hanada N. Production of the Fab fragment to surface protein antigen of

Streptococcus mutans serotype c derived peptide by *Escherichia coli* and tobacco cell cultures. J. Biosci. Bioeng. (in press).

2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

出願番号 特願 2006-044808

出願日 平成 18 年 2 月 22 日

特許の名称 抗βアミロイドポリペプチド
抗体産生用のペプチドワクチン

2. 実用新案登録
予定なし

3. その他
特になし

別添 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yano A, Onozuka A, Asahi-Ozaki A, Imai S, Hanada N, Miwa Y, Nisizawa T	An ingenious design for peptide vaccines.	Vaccine	23(17-18)	2322-2326	2005
Yano A, Takekoshi M, Morita E, Imai S, Nisizawa T, Hanada N.	Production of the Fab fragment to surface protein antigen of <i>Streptococcus mutans</i> serotype c derived peptide by <i>Escherichia coli</i> and tobacco cell cultures.	J. Biosci. Bioeng.	In press		



An ingenious design for peptide vaccines

Akira Yano^{a,*}, Atsuko Onozuka^a, Yasuko Asahi-Ozaki^b, Susumu Imai^a,
Nobuhiro Hanada^a, Yoshikatsu Miwa^c, Tosiki Nisizawa^{a,c}

^a Department of Oral Health, National Institute of Public Health, Minami 2-3-6, Wako-shi, Saitama 351-0197, Japan

^b Department of Pathology, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan

^c Research and Development Center, Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc. Okayama, Japan

Available online 21 January 2005

Abstract

For humoral immunization, it may be possible to make effective and safe peptide vaccines for various diseases by selection of proper B-cell epitopes. However, a lack of T-cell epitopes on short peptides, such as those associated with major histocompatibility complex (MHC)-restriction, is a major problem for peptide vaccine development. We propose a solution for the design of peptide vaccines that involves induction of broadly reactive T-cell epitopes via agretopes. The strategy involves positioning multi-agretope type peptides on the N-terminal side of a di-lysine linker and B-cell epitopes on the C-terminal side. The addition of the arginine–glycine–aspartate (RGD)-motif to the N terminus of the peptide enhances its immunogenicity, and enables nasal immunization without adjuvants.
© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: RGD-motif; Multi-agretope; MHC-restriction

1. Introduction

The advantage of a peptide vaccine is that it can induce immune responses to a specific sequence of amino acids. However, the vaccine peptide must contain at least one major histocompatibility complex (MHC) binding motif (agretope) as an antigen, since antigens are presented by the immune system as a short peptide that binds to the MHC. Subsequently, the T-cell receptors recognize the peptide as a T-cell epitope on the MHC molecules [1–3]. For a humoral immune response, a peptide must have B-cell epitopes to induce specific antibodies and at least one agretope/T-cell epitope for presentation by MHC class II (MHC-II) molecules [1–3]. However, there are over 10 haplotypes of MHC-II in human [1] and the agretopes are different for each haplotype. The MHC-restriction is the most critical impediment to the development of peptide vaccines.

A peptide vaccine has another disadvantage. The weak antigenicity of peptide vaccines dictates a need for use of

strong adjuvants, such as Freund's, for induction of antibodies. Several approaches, such as liposome capsulation [4], MAPs [5], and lipopeptides [6] have been used to eliminate the need for strong adjuvants. We have introduced the arginine–glycine–aspartate (RGD)-motif into peptide antigens. The RGD-motif is the most representative cell attachment motif seems to enhance the binding of peptides to specific receptors. Antigenicity of the peptides was enhanced and nasal immunization by peptides was successful without adjuvants [7].

We have proposed a design for peptide vaccines that contain the RGD-motif, and the lysine linker (-KK-) that joins two peptides [7,8]. The lysine linker is the target sequence of the lysosomal protease, cathepsin B, which is one of the important proteases for antigen processing in the context of MHC-II antigen presentation [2]. When two peptide antigens are joined with -KK-, we can avoid induction of antibodies to the amino acid sequence that is generated by joining of two peptides and most antibodies are reactive to each peptide [8]. In our previous report, we have noticed a bias between the peptides, depending upon whether they are on the N- or C-terminal side of -KK- for induction of antibodies [7]. In this study, we have investigated the reason for this bias and pro-

* Corresponding author. Tel.: +81 48 458 6286; fax: +81 48 458 6288.
E-mail address: akiray@niph.go.jp (A. Yano).

pose the use of the bias as a solution to the MHC-restriction problem.

2. Materials and methods

2.1. Peptide synthesis

All peptides used in this study were synthesized by a stepwise solid-phase procedure as described previously [7]. Peptides were verified by MALDI-TOF/MS (Voyager-DETMMS TR work station: Applied Biosystems Foster City, CA) when necessary. The single-letter universally accepted notation for amino acids is used throughout the text.

2.2. Immunizations

BALB/c, B10.D2, B10.S, B10.A, and C3H/HeJ mice were obtained from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan) and were used at 6 weeks of age to begin the immunization in all experiments. Groups of four to six mice were immunized intranasally with 50 µg of a peptide, either with or without 1 µg of cholera toxin (CT: Sigma-Aldrich, Missouri). A micropipettor was used to gently instill 4 µL of immunogen-containing saline solution into the nasal cavities of each mouse (2 µL into each nasal orifice). Two identical booster doses were given at 2-week intervals.

One group of mice was primed subcutaneously with 100 µg of peptides in 100 µL phosphate-buffered saline (PBS) either with or without 100 µL Freund's incomplete adjuvants (FIA: Pierce and Endogen: Funakoshi Co. Ltd., Tokyo, Japan). The same subcutaneous booster dose was given at 2-week intervals.

HA vaccine (split-product virus vaccine) was prepared from influenza virus A/PR/8/34 (A/PR8, H1N1) according to the method of Davenport et al. [9] at the Kitasato Institute (Saitama, Japan). Groups of BALB/c mice were intranasally immunized 1 µg of HA vaccine with 1 µg of peptide or 1 µg of CT. Four booster doses were given at 2-week intervals.

One week after the last booster dose, animals were bled and serum samples were prepared from clotted blood by centrifugation and stored individually with CompleteTM protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics Japan, Tokyo) and 0.05% (w/v) of sodium azide.

2.3. ELISA assays

Protein antigens used for ELISA were BSA, OVA, and PAC. Recombinant PAC was isolated from *Streptococcus mutans* TK18 as described previously [10]. For the ELISA, 96-well microtiter H-plates (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) were coated with 2 µg/well peptide or 1 µg/well protein antigen in 100 µL of 50 mM carbonate buffer pH 9.6 and held overnight at 4 °C. All assays were performed with alkaline phosphatase and *p*-nitrophenyl phosphate systems as described previously [7]. The OD_{405–620} was measured using

a microtiter plate reader (Multiskan BICHROMATIC, Labosystem, Helsinki, Finland). The ELISA antibody titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution giving an OD_{405–620} of 0.1 unit above that of the control wells without antigen.

3. Results and discussion

3.1. Investigation of B-cell epitopes

SmU, with the amino acid sequence TYEAALKQ-YEADL, is a minimum peptide antigen (Pac365–377) for the induction of antibodies that cross react with the cell surface protein antigen of *S. mutans* [10]. SmU has both a strong B-cell epitope and the helper T-cell epitope for H-2^d haplotype mice, but lacks the T-cell epitope for H-2^s haplotype [11]. OVAp is a peptide antigen (OVA323–336: ISQAVHAA-HAEINE) for induction of antibodies that are cross-reactive to ovalbumin, which has strong epitopes for both B- and the T-cells of H-2^d haplotype mice [11]. To investigate the position bias of the peptide containing lysine linker, we synthesized the long peptides, SmU-KK-OVAp, OVAp-KK-SmU, RGD-SmU-KK-OVAp and RGD-OVAp-KK-SmU. We immunized mice both nasally and subcutaneously with the peptides, either with or without FIA. The serum titers to peptide antigens, PAC and OVA are shown in Fig. 1. In all cases, both SmU and OVAp were good antigens for BALB/c mice (H-2^d) and induced antibodies cross-reactive to PAC and OVA. When we focused on SmU, it was unclear whether the N- or C-terminal side of -KK- linker was the more favorable position for induction of antibodies to PAC. This was also true for OVAp. When the RGD-motif was added to the peptides

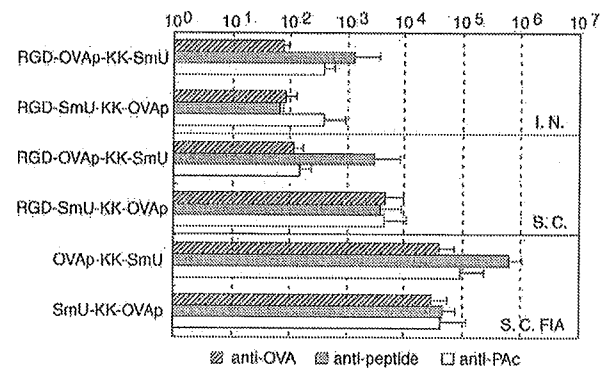


Fig. 1. Serum titres induced by intranasal and subcutaneous immunization with peptides. BALB/c mice were intranasally (I.N.) immunized with 50 µg of RGD added peptides, followed by two booster doses at two-week intervals. One hundred micrograms of peptide with FIA was used for subcutaneous (S.C.) immunization and immunization with RGD added peptides without adjuvant was followed by a booster dose given at a two-week interval. One week after the last booster dose, serum samples were collected and serum antibody titres were determined by ELISA. Average serum titers are shown for anti-OVA (hatched-box), anti-peptide antigen (grey-box) and anti-PAC (open box) with SD bars for each group.

and used for nasal immunization, SmU was a stronger antigen than OVAp, independent of its position. Those results clearly indicated that if both peptides, placed either on the N- or C-terminal side of -KK- linker, were strong enough as helper T-cell epitopes, antibody titers were dependent upon the strength of B-cell epitopes.

3.2. The position of T-cell epitopes and MHC-restriction

The effects of both the position and the strength of T-cell epitopes in the peptide, including the lysine linker, were examined. During the screening of SmU from the PAC, we had analyzed B- and T-cell epitopes of several peptides. PAC305–318 (NEADYQAKLTAYQT) has weaker B- and T-cell epitopes for H-2^d mice than SmU. However, unlike SmU, it has T-cell epitopes for H-2^s mice [11]. We have synthesized two peptides, SmU-KK-PAC305–318 and PAC305–318-KK-SmU that were used with FIA to subcutaneously immunize B10.D2 (H-2^d) and B10.S (H-2^s) mice (Fig. 2). B10.D2 mice responded with antibodies to both PAC305–318 and SmU in response to both peptides. SmU is a stronger B-cell epitope than PAC305–318, since anti-SmU titers are always higher than those of anti-PAC305–318. When we investigated the importance of the peptide position on either the N- or C-terminal side of the linker, the C-terminal position was best for induction of antibodies. B10.S mice produced antibodies only to the PAC305–318-KK-SmU. In this case, T-cell epitopes for H-2^s haplotype mice existed only on PAC305–318. Thus, we could conclude that T-cell epitopes should be placed on the N-terminal side of -KK- linker. The cause of this phenomenon is not clear. There may be molecular mechanisms that preferentially achieve MHC-II loading of peptides that are placed on the N-terminal side of the lysosomal digestion site. Since SmU lacks T-cell epitopes for H-2^s haplotype, B10.S mice could not produce antibodies by immunization with SmU alone. However, we were able to induce antibodies to SmU by immunization with PAC305–318-KK-SmU.

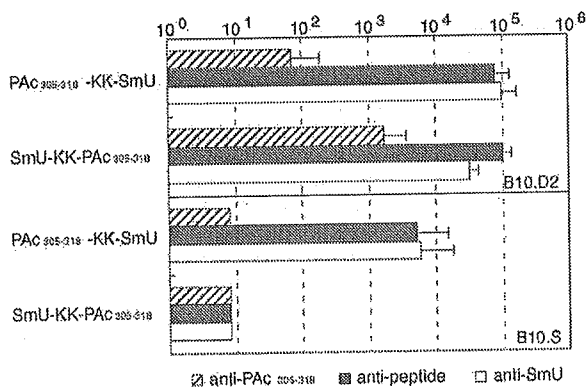


Fig. 2. Serum titres induced by subcutaneous immunization of peptides. B10.D2 and B10.S mice after subcutaneous immunization using peptides with FIA followed by a booster dose. Average serum titres are shown for anti-PAC305–318 (hatched-box), anti-peptide antigen (grey-box) and anti-SmU (open-box) with SD bars for each group.

This result shows a solution to MHC-restriction and points to the possibility of developing peptide vaccines for clinical use.

Thus, T-cell epitopes on the N-terminal side of -KK- linker were sufficient for induction of the antibodies. Therefore, if we placed the multi-agrepto type peptide, broadly cross-reactive T-cell epitopes, such as T1 [12], Gag298–312 (KRWIILGLNKIVRMY)[13], or overlapping multi-agrepto type peptide (OMP: LAVYWELLAKYLL-DRVQKVA) [7], on the N-terminal side of -KK- linker, we should be able to develop broadly effective peptide vaccines for human and veterinary use. However, peptides on the N-terminal side should not induce antibodies. We examined the ability of those peptides to induce antibodies by immunization of several types of mice. OMP and Gag298–312 with FIA were used to immunize B10.BR (H-2^k), B10.D2 (H-2^d), B10.S (H-2^s), BALB/c (H-2^d) and CH3/HeJ (H-2^k) mice and those peptides seemed to have very weak B-cell epitopes (Fig. 3A). Those peptides are suitable for T-cell epitopes in our peptide vaccines. We have synthesized peptides for induction of antibodies to SmU ((RGD-)OMP-KK-SmU) by immunization of B10.S mice (Fig. 3B). Intranasal immunization with OMP-KK-SmU alone did not induce specific antibodies because of its weak immunogenicity. Immunization with either RGD-added peptide alone or with CT induced

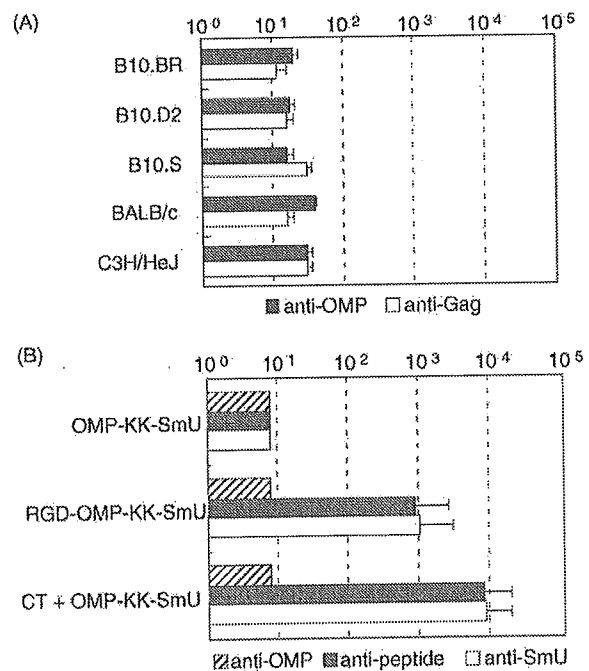


Fig. 3. Effect of multi-agrepto type peptide on peptide antigens. (A) Each group of mice was immunized subcutaneously with FIA, followed by a booster dose, then specific antibody titres were determined by ELISA. Average titres are shown for anti-OMP (grey-box), and anti-Gag (open-box) with SD bars for each group. (B) B10.S mice were intranasally immunized either with or without CT. Average titres are shown for anti-OMP (hatched-box), anti-peptide antigen (grey-box), and anti-SmU (open-box) with SD bars for each group.

antibodies to SmU. OMP served as a T-cell for MHC-II of H-2^s mice in the same way as PAc305–318.

3.3. Application of the design of peptide vaccines

We have applied our design for peptide vaccines to an influenza vaccine. Several B-cell epitopes were reported that are involved in neutralization of the experimental strains of influenza virus A/PR8, HA1 (VTGLRNIPSIQSR) [14] and M2 (EVETPIRNEWGCRCNGSSD) [15]. We have synthesized peptide vaccines, RGD-Gag298-312-KK-HA1 and RGD-Gag298-312-KK-M2. In order to obtain high titer of antibodies, we immunized several mouse strains (data not shown) and B10.A was found to be the most reactive strain. Nasal immunization with peptides was repeated five times and serum titers were measured (Fig. 4A). In all cases, anti-HA1 and anti-M2 titers were specifically elevated. When two peptides were used for immunization at the same time, HA1 was a major antigen and when CT was used as mucosal adjuvant, M2 was major. It may be necessary to use additional approaches for the induction of antibodies to several peptides at the same time.

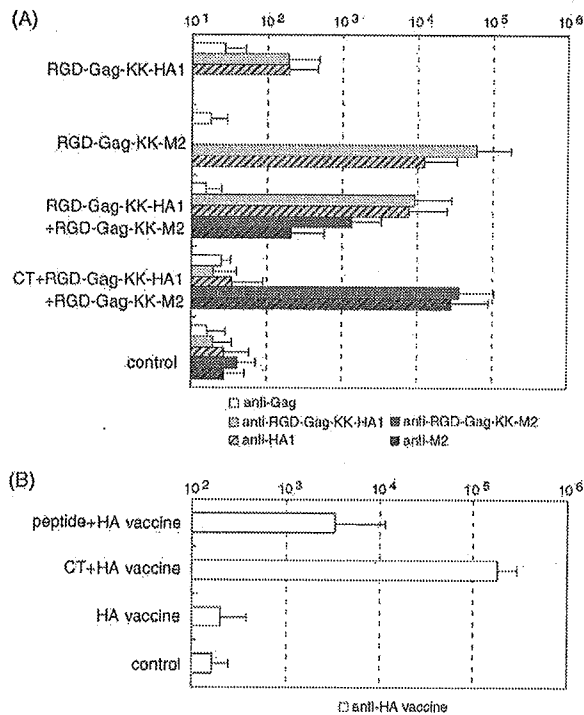


Fig. 4. Intranasal immunization with influenza vaccines. (A) B10.A mice were intranasally immunized with HA1 and M2 peptide vaccines, either with or without CT. Average titers are shown for anti-Gag (open-box), anti-HA1 (light grey-box), anti-RGD-Gag-KK-HA1 (hatched light grey-box), anti-M2 (dark grey-box) and anti-RGD-Gag-KK-M2 (hatched dark grey-box with SD bars for each group. (B) BALB/c mice were intranasally immunized with influenza HA vaccine (1 μ g), with RGD-OMP-KK-OVAp (1 μ g), or CT (1 μ g), followed by four booster doses. Average anti-HA vaccine titers are shown as open-boxes with SD bars for each group.

Our peptide vaccines with the RGD-motif were reported as being useful adjuvants for nasal immunization [7]. When soluble proteins, such as BSA or OVA, were used for intranasal immunization with a small amount of RGD peptide vaccine, antibodies to BSA or OVA were strongly induced. However, background level antibodies to the RGD peptide were detected. In Fig. 4B, we have intranasally immunized mice using HA vaccines either with or without RGD peptide (RGD-OMP-KK-OVAp). The RGD peptide was already confirmed to be a nasal adjuvant in BALB/c mice [7]. After a series of five nasal immunizations, serum titers to HA vaccine were elevated by addition of the peptide, but the effects were weaker than when CT was added. In order to develop clinically useful peptide vaccines and adjuvants, we have to select for strong B-cell epitopes and develop the methods for enhancing the adjuvanticity of peptides.

In conclusion, our approach to the design of a peptide vaccine enables intranasal immunization without the need for adjuvant and solves the problem of MHC-restriction. Specifically, the design places the RGD at the N-terminus, a multi-epitope peptide at the N-terminal side of lysine linker, and a B-cell epitope at the C-terminus. We suggest that our design might be universally applicable to the development of peptide vaccines and adjuvants for intranasal vaccination.

Acknowledgments

We would like to thank Ms Makiko Teramura-Hiramatsu, Ms Miho Sawada and Ms Yukiko Yamamoto for their assistance in performing the study. This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan.

References

- [1] Margulies DH. The major histocompatibility complex. In: Paul WE, editor. *Fundamental immunology*. 4th ed. New York: Lippincott-Raven; 1999. p. 263–85.
- [2] Lennon-Duménil AM, Bakker AH, Wolf-Bryant P, Ploegh HL, Lagaudrière-Gesbert C. A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2002;14(1):15–21.
- [3] Bjorkman PJ. MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell* 1997;89(2):167–70.
- [4] Alving CR, Koulchin V, Glenn GM, Rao M. Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol Rev* 1995;145:5–31.
- [5] Tam JP. Synthetic peptide vaccine design: synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85(15):5409–13.
- [6] BenMohamed L, Wechsler SL, Nesburn AB. Lipopeptide vaccines—yesterday, today, and tomorrow. *Lancet Infect Dis* 2002;2(7):425–31.
- [7] Yano A, Onozuka A, Matin K, Imai S, Hanada N, Nisizawa T. RGD motif enhances immunogenicity and adjuvanticity of peptide antigens following intranasal immunization. *Vaccine* 2003;22(2):237–43.

- [8] Oishi Y, Onozuka A, Kato H, Shimura N, Imai S, Nisizawa T. The effect of amino acid spacers on the antigenicity of dimeric peptide-inducing cross-reacting antibodies to a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16(1):40–4.
- [9] Davenport FM, Hennessy AV, Brandon FM, Webster RG, Barrett CD, Lease GO. Comparisons of serologic and febrile responses in humans to vaccination with influenza A viruses or their hemagglutinins. *J Lab Clin Med* 1964;63:5–13.
- [10] Senpuku H, Miyauchi T, Hanada N, Nisizawa T. An antigenic peptide inducing the cross-inhibiting antibodies against the interaction of *Streptococcus mutans* PAc with human salivary components. *Infect Immun* 1995;63(12):4695–703.
- [11] Senpuku H, Iizima T, Yamaguchi Y, Nagata S, Ueno Y, Saito M, et al. Immunogenicity of peptides coupled with multiple T-cell epitopes of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Immunology* 1996;88(2):275–83.
- [12] Ahlers JD, Takeshita T, Pendleton CD, Berzofsky JA. Enhanced immunogenicity of HIV-1 vaccine construct by modification of the native peptide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94(20):10856–61.
- [13] Wilson CC, Palmer B, Southwood S, Sidney J, Higashimoto Y, Appella E, et al. Identification and antigenicity of broadly cross-reactive and conserved human immunodeficiency virus type 1-derived helper T-lymphocyte epitopes. *J Virol* 2001;75(9):4195–207.
- [14] Rajnavölgyi É, Horváth A, Gogolák P, Tóth GK, Fazekas G, Fridkin M, et al. Characterizing immunodominant and protective influenza hemagglutinin epitopes by functional activity and relative binding to major histocompatibility complex class II sites. *Eur J Immunol* 1997;27(12):3105–14.
- [15] Neirynck S, Deroo T, Saelens X, Vanlandschoot P, Jou WM, Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat Med* 1999;5(10):1157–63.