

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-514415

(P2007-514415A)

(43) 公表日 平成19年6月7日(2007.6.7)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 B O 5 0
G O 1 N 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Q	4 B O 6 3
C O 7 K 19/00 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A	4 B O 6 5
C O 7 K 14/35 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 64 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2006-540414 (P2006-540414)
 (86) (22) 出願日 平成16年11月19日 (2004.11.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年7月12日 (2006.7.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2004/014087
 (87) 国際公開番号 W02005/054851
 (87) 国際公開日 平成17年6月16日 (2005.6.16)
 (31) 優先権主張番号 60/523, 704
 (32) 優先日 平成15年11月21日 (2003.11.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 593218462
 インスティテュート・パスツール
 I N S T I T U T P A S T E U R
 フランス国、75724 パリ・セデュ・
 15、リュウ・デュ・ドクトール・ルー、
 25-28

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断及び免疫モニタリングに使用するための *Bordetella* sp. の組換えアデニル酸シクラーゼ、該組換えアデニル酸シクラーゼを使用する診断方法又は免疫モニタリング方法、並び

(57) 【要約】

送達システムとして遺伝子的に解毒された *Bordetella pertussis* C y a A を使用する診断試験及び免疫モニタリングは、例えば、感染性及び非感染性疾患又はワクチン接種により発生した免疫応答の如きいかなる免疫応答も追跡するのに有効である。与えられた抗原により以前に刺激された T 細胞は、C y a A 又はその断片に融合された若しくは化学的にカップリングされた同じ抗原により *in vitro* で再刺激されうる。本発明は、M . t u b e r c u l o s i s 免疫優勢タンパク質 E S A T - 6 及び C F P - 1 0 を、ヒト細胞及び非ヒト動物細胞、例えばウシの細胞、に送達することができる送達システムを提供することによる結核の診断試験又は免疫モニタリングを含む。更に、C y a A とがん抗原との融合タンパク質は、がん、例えば、メラノーマのための診断試験及び免疫モニタリングシステムとしても提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物の疾患を *in vitro* 診断又は免疫モニタリングする方法又はいかなる他の T 細胞応答も免疫モニタリングする方法であって、

(A)

(1) *Bordetella Cya A* 又はその断片、及び

(2) 前記哺乳動物の T 細胞を以前に刺激した疑いのある抗原のペプチド、を含む組換えタンパク質に前記動物の T 細胞を曝露し、そして

(B) T 細胞の活性化の変化を検出する、

ことを含む方法。

10

【請求項 2】

組換えタンパク質が 1 種以上のペプチドを含む、請求項 1 に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 3】

組換えタンパク質が 1 種以上の抗原を含む、請求項 1 に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 4】

Bordetella Cya A が、*Bordetella pertussis*、*Bordetella parapertussis* 又は *Bordetella bronchiseptica* に由来する、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

20

【請求項 5】

Bordetella Cya A 又はその断片が解毒されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 6】

Cya A 及び組換えタンパク質のペプチドが遺伝子的に融合されているか又は化学的に結合している、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 7】

疾患が非ヒト動物の疾患である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

30

【請求項 8】

非ヒト動物が雌ウシである、請求項 7 に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 9】

疾患がヒトの疾患である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 10】

疾患が結核である、請求項 9 に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 11】

組換えタンパク質が融合タンパク質である、請求項 10 に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

40

【請求項 12】

融合タンパク質が *Cya A - ESAT - 6* 又は *Cya A - CFP 10* である、請求項 11 に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 13】

疾患がメラノーマである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 14】

抗原が、感染性物質、アレルゲン又はがん細胞からの抗原である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 15】

50

ワクチン接種された個体又は動物の免疫モニタリングのために使用する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

組換えタンパク質が *Bordetella Cya A* の断片を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 17】

組換えタンパク質が、*Bordetella Cya A* における任意の許容的部位に局在する、以前に前記細胞を刺激したことがありうる抗原のペプチドを含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 18】

T細胞の活性化の変化が、IL - 2、IL - 4、IL - 5 又は IFN - 産生の変化である、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 19】

試験サンプルが末梢血単核細胞 (PBMC)、全血又は全血の画分である、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 20】

T細胞活性化の変化の検出が、ELISPOTアッセイ、ELISA 又は T細胞活性化を検出するための他のアッセイにより達成される、請求項 1 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の診断又は免疫モニタリング方法。

【請求項 21】

哺乳動物における疾患の診断試験用又は、疾患により生じた T細胞応答を含む、哺乳動物における T細胞応答を免疫モニタリングするためのキットであって、

(A)

(1) *Bordetella Cya A* 又はその断片、及び

(2) 前記哺乳動物の T細胞を以前に刺激した疑いのある抗原のペプチド、を含む組換えタンパク質、及び

(B) T細胞の活性化の変化を検出するための試薬、を含むキット。

【請求項 22】

組換えタンパク質が 1 種以上のペプチドを含む、請求項 21 に記載のキット。

【請求項 23】

組換えタンパク質が 1 種以上の抗原を含む、請求項 21 に記載のキット。

【請求項 24】

Bordetella Cya A が、*Bordetella pertussis*、*Bordetella parapertussis* 又は *Bordetella bronchiseptica* に由来する、請求項 21 ~ 23 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 25】

抗原のペプチドが *Cya A* に遺伝子的に融合されているか又は化学的に結合している、請求項 21 ~ 24 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 26】

Bordetella Cya A 又はその断片が解毒されている、請求項 21 ~ 25 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 27】

疾患が非ヒト動物の疾患である、請求項 21 ~ 26 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 28】

非ヒト動物が雌ウシである、請求項 27 に記載のキット。

【請求項 29】

疾患がヒトの疾患である、請求項 21 ~ 26 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 30】

疾患が結核である、請求項 29 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

組換えタンパク質が融合タンパク質である、請求項 3 0 に記載のキット。

【請求項 3 2】

融合タンパク質が C y a A - E S A T - 6 又は C y a A - C F P 1 0 である、請求項 3 1 に記載のキット。

【請求項 3 3】

疾患がメラノーマである、請求項 2 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 4】

抗原が、感染性物質抗原、アレルゲン又はがん細胞からの抗原である、請求項 2 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 5】

融合タンパク質が、B o r d e t e l l a p e r t u s s i s C y a A における任意の許容的部位に局在する、以前に前記細胞を刺激したことがありうる抗原のペプチドを含む、請求項 2 1 ~ 3 4 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 6】

組換えタンパク質が B o r d e t e l l a p e r t u s s i s C y a A の断片を含む、請求項 2 1 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 7】

T 細胞の活性化の変化が、I L - 2、I L - 4、I L - 5 又は I F N - 産生である、請求項 2 1 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 8】

試験サンプルが、末梢血単核細胞 (P B M C)、全血又は全血の画分である、請求項 2 1 ~ 3 7 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 3 9】

T 細胞の活性化の変化の検出方法が、E L I S P O T アッセイ、E L I S A 又は T 細胞活性化を検出するための他のアッセイである、請求項 2 1 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 4 0】

C y a A - E S A T - 6 及び C y a A - C F P 1 0 のアミノ酸配列を含む組換えタンパク質。

【請求項 4 1】

組換えタンパク質 C y a A - E S A T - 6 及び C y a A - C F P 1 0 をコードする D N A を含む組換えベクター。

【請求項 4 2】

受託番号 I - 3 1 3 6 で C . N . C . M . に寄託されたプラスミド p T 7 C A C T 3 3 6 / E S A T - 6 。

【請求項 4 3】

受託番号 I - 3 1 3 5 で C . N . C . M . に寄託されたプラスミド p T 7 C A C T 3 3 6 / C F P - 1 0 。

【請求項 4 4】

請求項 3 7 又は 4 3 に記載のプラスミドのインサートを含むヌクレオチド配列。

【請求項 4 5】

請求項 4 2 又は 4 3 に記載のプラスミド又は請求項 4 3 に記載のヌクレオチド配列を含む細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、診断及び免疫モニタリング (immunomonitoring) のための B o r d e t e l l a s p . の組換えアデニル酸シクラーゼに関する。

【0 0 0 2】

10

20

30

40

50

本発明は、抗原によるT細胞の刺激の後の、診断試験及び疾患の免疫モニタリング並びにいかなるT細胞応答の免疫モニタリングにも関する。

【0003】

*Mycobacterium bovis*により引起されるウシ(cattle)における結核(TB)の発生率は、英国の国営牧場ではこの10年間にわたり劇的に増加している。この増加は、重要な動物健康問題、経済問題及び潜在的公衆衛生の問題を構成する(krebs et al., 1997)。人畜共通感染症疾患を制御するために、より良好でより特異的な診断試薬並びに有効なワクチンが緊急に必要とされる。英国政府は、このような試薬及びワクチンを開発するための研究プログラムに着手した。

【0004】

ウシ(cattle)のウシ結核(bovine tuberculosis)の診断は、殆どツベルクリン精製タンパク質誘導体(PPD)による皮膚試験でのみ行われる。この試験の特異性は、PPDの不明確で交差反応性の性質の故に限定される。ツベルクリンで誘発されたIFN- γ の産生を測定する血液に基づく試験も、現在限定的に現場で使用されている(Wood et al., 1994)。しかし、ツベルクリンをベースとする試薬の特異性は、ヒトTBワクチンM. bovis BCGによるワクチン接種の後弱められる(Budde et al., 2003に概説されている)。故に、ウシ用の有効なTBワクチンを開発することができる前に、M. bovis感染及びワクチン接種された動物の鑑別診断(differential diagnosis)を可能とする診断試薬が必要とされる。

【0005】

M. tuberculosisは、ヒトの健康に対しても大きな脅威であり、いかなる他のバクテリアよりも世界的なより多くの死亡の原因である。TBに対するワクチン及びTBの免疫学的診断は完全に満足できるものではない。例えば、活性な結核及び潜在的結核の両方の診断を助けるのに使用される皮膚試験試薬、PPDは、特異性及び感度に欠けている。Bacille Calmette Guerin(BCG)ワクチンは、TBを防止するのに非常に広く使用されているが、成体におけるその保護有効性はやはり限定される。

【0006】

ワクチン接種の他に、M. tuberculosisによる潜伏感染(LTB1)の臨床TBへの進行を防止するための別の制御戦略は、予防的抗結核薬物治療(PT)の使用による。この制御戦略の一つの観点は、診断試験であるが、潜伏感染を有する健康な個体を識別するのに使用されるツベルクリン皮膚試験(TST)は、いくつかの操作上の欠点を有する。第一に、TST試薬、PPDは、それが多くのmycobacteriaに見出されるエピトープを含有するので、交差反応性である。TST反応性は、環境のmycobacteriaによる感作により又はBCGワクチンから生じうる。第二に、TSTの感度は、HIV感染により減少させられる(Johnson, J.L et al, 1998)。第三に、TSTは、1つは投与のため、1つは判断(reading)のため、2回の来診を必要とする。この試験もオペレーターに依存する。これらの制限は、LTB1の識別を害し、それ故、PTのより広い適用を害する。BCGより大きい有効性のTBワクチン候補に対する当該技術分野における要求があるが、TST皮膚試験よりも高い感度、特異性及び実施可能性の免疫診断方法の開発に対する要求もある。

【0007】

これまでに、M. bovis 又はM. tuberculosisにより高度に発現されるが、BCGのゲノムからは欠失している抗原を使用することにより、診断試薬の特異性が改良されることが示された。このような抗原は、感染した動物又はヒト及びBCGワクチン接種された動物又はヒトの鑑別診断を可能とするのみならず、ワクチン接種の不存在下においてツベルクリン自体の特異性も改良する。

【0008】

結核の研究における大きな進歩は、M. tuberculosis複合体の病原性メンバー中に存在するが、すべての弱毒化されたBCG株には存在しないゲノムセグメント(欠失領域1-RD1と命名された)の同定であった(Gorden, S.V., et al. 1999; Behr,

10

20

30

40

50

M.A., et al. 1999 and Mahairas, G.G., 1999)。このセグメントにコードされた分子は、病原性の一因となり (Pym, A.S., et al. 2003) 又は防御潜在力の種特異的 T 細胞応答を刺激することができる (Weinrich Olsen, A., et al., 2001; Pym et al., 2003)。更に、多くの興味は、T B の免疫診断を改良するために R D 1 にコードされた抗原の可能性に集中した (Arend, S.M., et al, 2000; Ewer, K., et al.2003)。しかしながら、タンパク質サブユニットは、T 細胞応答を効率悪く刺激する傾向がありそして、最も有望な実験的なワクチン製剤すら、ヒトにおける使用が認可されていない強力なアジュバントを必要とする。同様に、既知の最善の免疫診断方法は、医療施設の不足した環境において使用するにはあまりにも複雑そうなペプチド混合物及び E L I S P O T 分析に頼る (Arend, S.M., et al. 2002)。M . b o v i s / M . t u b e r c u l o s i s の R D 1 領域、
B C G のすべての株において欠如している領域、にコードされている抗原 E S A T - 6 及び C F P - 1 0 は、I F N - 試験において組換えタンパク質又は合成ペプチドとして使用される場合に、診断試薬として特に有望であることを示したが (Budde et al. 1999, V ordermeier et al., 1999 and 2001)、M . t u b e r c u l o s i s 抗原に対する T 細胞応答を高めることができる簡単な方法に対する要求が当該技術分野には依然としてある (Wilkinson, K.A., et al. 2000; Wilkinson, K.A., et al., 1999)。

【 0 0 0 9 】

抗原 (A g) 提示の古典的経路の下では、病原体の外因性及び内因性抗原は、一般に 2 つの異なる経路により A g 提示細胞 (A P C s) においてプロセッシングされて、主要組織適合複合体 (M H C) 拘束性提示 (major histocompatibility complex(MHC)-restricted presentation) のためのペプチドを生じる (Germain, R.N. 1994)。外因性 A g s は、エンドサイトーシス経路 (endocytic pathway) に沿ってプロテアーゼにより取り込まれそして分解される。これらのプロセッシングされたペプチドは、次いで新生 M H C クラス I I 分子 (nascent MHC class II molecules) に結合しそして A P C 細胞膜において C D 4 ⁺ T 細胞に提示される (Villadangos, J. 2001)。この特異的認識及び共刺激分子 (co-stimulatory molecules) との相互作用の後に、活性化された C D 4 ⁺ T 細胞は、サイトカインを分泌することにより B 細胞又は C D 8 ⁺ T 細胞に助力を与えることができる。内因性タンパク質は、A P C 細胞質中のプロテアソームにより分解されて、M H C クラス I 拘束性ペプチド (MHC class I-restricted peptides) を生じ、このペプチドは、小胞体に輸送され、そこでそれらは新生初期 M H C クラス I 分子に結合する。次いで、M H C 1 - ペプチド複合体が送り出されそして A P C 細胞膜において C D 8 ⁺ T 細胞に提示される (Rock, K. L., and A. L. Goldberg. 1999)。

【 0 0 1 0 】

A g 提示のこれらの古典的経路に加えて、ある外因性細胞関連 A g 又は粒状 A g (exogenous cell-associated or particulate Ag) は別のプロセッシングの経路を介して M H C クラス I 分子上に交差提示され (cross-presented) うることが今やよく実証されている (Jondal, M., et al., 1996; Heath, E. R., and F.R.carbone. 2001; Reimann, J., and R. Schirmbeck. 1999; Moron, G., et al. 2002)。外因性 A g に対する C T L 応答を誘発するための一つの特定のアプローチは、ある種のタンパク質、主としてバクテリア毒素が、A P C の細胞質ゾルに入り、M H C クラス I 提示経路に沿ってプロセッシングされ、次いで C D 8 ⁺ T 細胞に提示される能力を利用する。かくして、組換えバクテリア毒素を使用するいくつかのワクチンストラテジーが、外因性 A g に対する C T L 応答を発生させるためにさまざまな研究室でデザインされた (Ballard, J. D., et al. 1996; Bona, C. A. et al., 1998; Goletz, T.J., et al. 1997; Haicheur, N., et al. 2000)。

【 0 0 1 1 】

ワクチンデザインへの魅力的なアプローチは、非複製性タンパク質ベクター (non-replicating protein vectors)、例えば、バクテリア毒素又はトキソイドによるタンパク質の送達である。B o r d e t e l l a p e r t u s s i s は、カルモジュリンで活性化されるアデニル酸シクラーゼ毒素、C y a A を分泌するが、これは、 μ_2 インテグリン受容体 (C D 1 1 b / C D 1 8) を発現する骨髄性食細胞 (myeloid phagocytic cells) 40

を主標的とし、そしてこの骨髄性食細胞は専門的抗原提示細胞、例えば、好中球、マクロファージ、NK細胞及び樹状細胞を含む (Guernonprez, P., et al., 2000)。Cy a A は、そのN末端触媒アデニル酸シクラーゼドメイン (400アミノ酸残基) を、直接細胞質膜 (cytoplasmic membrane) を通して真核標的細胞の細胞質ゾル中に送達することができる (Guernonprez, P., et al., 2000; Sebo, P., et al., 1995)。

【0012】

Cy a A は、マウスモデルにおいて有望であることを示したベクター系である。ペプチド及び小タンパク質は、Cy a A との融合タンパク質として挿入されそして発現されるか又はCy a A に化学的に結合させることができる。Cy a A は、標的細胞の形質膜を横切る直接のトランスロケーションを促進する。重要なことに、Cy a A によるワクチン接種は、MHCクラスI拘束性CD8⁺T細胞応答 (MHC class I restricted CD8⁺T cell response) を誘発することができることが示された (例えば、Guernonprez et al., 1999)。

【0013】

遺伝子的に解毒された (genetically detoxified) Cy a A は、CD4⁺及びCD8⁺T細胞エピトープが最初の600アミノ酸内のCy a A トキソイドのアデニル酸シクラーゼ活性ドメイン (AC) 内に挿入されるとき、CD4⁺及びCD8⁺T細胞エピトープの両方を抗原提示細胞に送達するためのピークルとして使用することができる。次いで抗原提示細胞は特異的T細胞応答をトリガーする (Dadaglio, G., et al., 2000; Saron, M.F., et al., 1997; Osicka, R., et al., 2000; Loucka, J., et al., 2002; Fayolle, C., et al., 1996)。Cy a A はそのN末端触媒ドメイン (ACドメイン) を m_2 インテグリン (CD11b / CD18) を有する真核細胞の細胞質ゾルに送達する。遺伝子的に解毒されたCy a A ACドメインに挿入されたCD8⁺T細胞エピトープは、*in vitro* 及び *in vivo* の両方でCD11c⁺CD11b^{high} DC細胞質に送達される (Guernonprez, P., et al. 2002)。このMHCクラスI経路へのCD8⁺T細胞エピトープの標的化された送達の機構は、効率的な提示、それに続く強固で防御的なCTL応答をもたらす (Fayolle, C., et al., 1996, 1999, and 2001)。更に、この送達システムにより *in vivo* で発生したT細胞応答は、Th1に向けて強く分極化され (Polarized) (Dadaglio, G., et al., 2000)、そしてCD8⁺T細胞活性化は、CD4⁺T細胞の助力又はCD40シグナリングを必要としない (Guernonprez, P., et al., 2002)。ゆえに、Cy a A は、CD8⁺T細胞プライミングをもたらす、CD11b^{high} DCs への *in vivo* 標的化されたAg送達のための安全で強力なピークルであると思われる (El Azami El Idrissi, M., et al., 2002)。抗腫瘍予防及び治療免疫において及びある感染性病原体に対して最適のCD8⁺T細胞応答の発生は、CD4⁺T細胞応答の同時的活性化に依存するというのを、いくつかの研究が証明した (Kern, D.E., et al., 1986; Toes, R.E., et al., 1999; Schnell, S., et al., 2000; Pardoll, D.M., et al., 1998; Wong, P., et al., 2003; Zajac, A.J. et al., 1998)。最適のワクチンストラテジーは、T細胞プライミングのためのCD4⁺及びCD8⁺T細胞エピトープの両方の同時送達を必要としうる。

【0014】

これまでに、Cy a A の最初の600アミノ酸の範囲内に挿入されたM a l E C D 4⁺T細胞エピトープは、APCsのMHCクラスII提示経路に有効に標的化されそして特異的T細胞ハイブリドーマに提示されることが示された (Louca, J., et al., 2002)。それぞれ、MHCクラスI及びクラスII拘束性提示経路へのCD4⁺及びCD8⁺T細胞エピトープの共送達 (co-delivery) は、M a l E C D 4⁺T細胞エピトープ及びO V A C D 8⁺T細胞エピトープをそのACドメインに有する組換え解毒Cy a A により証明される。両エピトープを送達してMHC - ペプチド複合体を形成するためのこのタンパク質の能力も重要である。

【0015】

ウシは、結核の実際の標的種においてCy a A をベースとする構築物を試験するのに理

10

20

30

40

50

想的なモデルである。マイコバクテリア抗原とのCyaA融合タンパク質は、特にそれらが慣用の組換えタンパク質より有効にウシにおいて認識される場合には、ウシにおけるサブユニットワクチンの候補のみならず、診断抗原の候補でもある。

【0016】

これらの融合タンパク質の増加した有効性は、高められた感度から生じる。何故ならばこれらの融合タンパク質はより低いタンパク質濃度で認識されるからである。後者の考察は、大きなコスト利益を与えることができる。何故ならば、それは、潜在的に数百万試験/年の試験を実施するのに産生されなければならない抗原の量を有意に減少させることができるからである。

【0017】

一般に、動物及びヒトにおけるTBの検出用の診断試薬に対する当該技術分野での要求がある。M. bovis感染された動物及びワクチン接種された動物の鑑別診断(differential diagnosis)をすることができそして有効なTBワクチンを開発することができるように、この要求は存在する。ヒトでは、TST皮膚試験より高い感度、特異性及び実用性の免疫診断方法の開発に対する要求がある。このような免疫診断方法はM. tuberculosisに対する高められたT細胞応答を可能とする方法から生じるであろう。

【0018】

本発明の簡単な要約

本発明は、M. tuberculosisに対する高められたT細胞応答を可能とする免疫診断方法、特にin vitroで行われる免疫診断方法を提供することにより当該技術分野での要求を達成するのを助け、更に詳しくは、本発明は、送達システムとして遺伝子的に解毒されたBordetella sp.のCyaA(Bordetella sp. CyaA)を使用する診断試験及び免疫モニタリングのための新規なシステムを提供する。

【0019】

本発明は、CyaAに遺伝子的に融合され又は化学的に結合されたペプチドによる診断試験及び免疫モニタリングの方法を提供する。組換えCyaAによる試験の結果は定量的であり、ゆえに、免疫モニタリング及び簡単な診断試験を提供することができる。

【0020】

1つの態様では、本発明は、動物における抗原によるT細胞刺激の後で、疾患を診断若しくは免疫モニタリングするか又はいかなるT細胞応答も免疫モニタリングする方法であって、(A) Bordetella CyaA又はその断片及び前記哺乳動物のT細胞を以前に刺激した疑いのある抗原に相当するペプチドを含む組換えタンパク質を前記動物のT細胞に曝露し、そして(B) T細胞の活性化の変化を検出することを含む方法である。

【0021】

他の態様では、本発明は、動物における抗原によるT細胞刺激の後の、疾患の診断若しくは免疫モニタリング試験又はT細胞応答の免疫モニタリングのためのキットであって、(A) Bordetella CyaA又はその断片及び前記動物のT細胞を以前に刺激した疑いのある抗原に相当するペプチドを含む組換えタンパク質並びに(B) T細胞の活性化の変化を検出するための試薬を含むキットである。

【0022】

本発明の態様では、組換えタンパク質は、1種以上の抗原に相当する1種以上のペプチドを含む。

【0023】

本発明の態様では、Bordetella CyaAは、Bordetella pertussis、Bordetella parapertussis又はBordetella bronchisepticaからのものである。

【0024】

本発明の態様では、診断試験及び免疫モニタリングストラテジーは、ヒト又は動物の疾患、例えばウシの疾患であることができるが、それらに限定はされない。

【0025】

10

20

30

40

50

本発明の特定の態様では、疾患は、感染性疾患、例えば、結核であるか又はがん、例えばメラノーマである。

【0026】

本発明の態様では、組換えタンパク質は、C y a A - E S A T - 6又はC y a A - C F P 10である。

【0027】

本発明の態様では、試験に使用される抗原は、感染性物質 (infectious agent)、アレルギー又はがん細胞、例えばメラノーマからの抗原を含むことができるが、それらに限定はされない。

【0028】

好ましい態様の詳しい説明

実施例に示されたとおり、与えられた抗原により予め刺激されたT細胞は、C y a Aに含まれた同じ抗原により *in vitro*で再刺激されうる。この発見に基づいて、本発明は、C y a Aを含むタンパク質として、M . t u b e r c u l o s i s免疫優勢タンパク質 (immunodominant proteins) E S A T - 6及びC F P - 10並びに他のタンパク質を送達することができる送達システムを提供することによるTBに対する診断試験及び免疫モニタリングを含む。

【0029】

本発明は、C F P - 10に対するポジティブ応答の頻度がC y a A送達により増加する ($p = 0.021$) 結核感染を検出するための簡便化された全血モデルも提供する。ポジティブ応答のこの増加した頻度は、危険にさらされている集団 (at risk population) における潜伏感染を識別するのに助けことができ、かくして活性な結核のより良好な阻止を促進することができる重要な特性である。

【0030】

本発明は、動物、例えば、ウシ及びヒトにおける改良された診断試験及び免疫モニタリングに有効であることが示された。特に、ウシT細胞は、E S A T - 6又はC F P - 10とのC y a A融合タンパク質を *in vitro*で認識する。

【0031】

更に、本発明は、TB以外の疾患の診断試験及び免疫モニタリングを提供する。C y a AのA Cドメインは、C D 8⁺T細胞エピトープ、O V A及びC D 4⁺T細胞エピトープ、M a l Eを、それぞれ、B M D C s M H CクラスI及びクラスII提示経路に共送達することができる。これらのエピトープはTBからのものではないので、それらは、本発明の非TB態様の有用性を証明する。C y a Aが送達されると、M a l Eタンパク質と比較してC D 4⁺T細胞エピトープ提示の強い増強があるが、これは、抗C D 11 b m A b sによりC y a Aのその受容体との相互作用をブロックすることにより抑制される (abrogate)。A Cドメインは、そのインターナリゼーションの後に、従来のエンドサイトーシス経路又は細胞質経路に沿ってプロセッシングされて、それぞれ、M a l E及びO V Aペプチドを発生させる。 *in vivo*で、C y a AはM a l E及びO V Aエピトープに対する特異的Th1 C D 4⁺及びC D 8⁺T細胞応答を誘発する。

【0032】

ゆえに、C y a A送達システムは新規な診断試験のために有用である。何故ならば、それはD C sを標的化し、有効な提示のためのM H C I及びI I拘束性T細胞エピトープを送達し、そしてTh1分極化された (Th1 polarized) C D 4⁺T細胞及び強固な (robust) C T L応答を *in vivo*で誘発するからである。

【0033】

本明細書で使用した、「免疫モニタリング」という用語は、免疫学的アッセイにより疾患の進行を追跡すること又は疾患からの回復を追跡することを指す。それは、抗原による刺激後に免疫応答、特に哺乳動物のT細胞応答を試験することを指す。例えば、免疫モニタリングは、例えば、臨床試験においてワクチン接種された個体のT細胞応答を試験することを指す。本発明に従う免疫応答の試験は、生物学的サンプルで、特に *in vitro*

10

20

30

40

50

oで行われる。本発明は、特に、T細胞応答の免疫モニタリングの結果として、ヒト患者又は動物における腫瘍クリアランスを含む腫瘍進展の診断及び免疫モニタリングを指向する。T細胞応答モニタリングは、ある場合には、B細胞応答のモニタリングよりも適当な腫瘍免疫モニタリングであることが特に示される。

【0034】

本明細書で使用された、「抗原」という用語は、免疫応答を誘発することができる異種ペプチドを指す。特定の態様では、興味ある抗原又は分子は異種抗原である。本明細書で使用された、「異種」("heterologous")という用語は、ベクターにおいて使用されるCyaA以外の種の抗原由来の抗原を指すか、又は、ベクターにおいて使用されるCyaAと同じ種の抗原に由来する抗原であるが、しかしそれが天然には存在しない位置においてCyaA内に位置した抗原を指す。

10

【0035】

本明細書で使用された、「エピトープ」という用語は、免疫応答を誘発することができる抗原の最小ペプチド配列を指す。

【0036】

本明細書で使用された「抗原に相当するペプチド又は抗原のペプチド」という用語は、ペプチド、エピトープ、あるいは、例えば、特に抗原提示細胞による抗原/エピトーププロセッシングを高める天然に若しくは非天然に存在するフランキング領域によりフランキングされた抗原又はペプチドを包含する。

【0037】

「再刺激された」という用語は、感染、ワクチン接種又は特に*in vivo*での抗原への他の暴露により抗原によって最初に刺激されそして本発明の方法において、*in vitro*で再び刺激された、特許請求の範囲に記載の方法のT細胞を指す。本発明に従う「再刺激」試験は、試験される生物学的サンプルにおいて、決定された抗原と接触させられるT細胞は、サンプルを提供する患者が該抗原を有する作用物質(感染性、腫瘍又は他の病原性作用物質を含む)と以前に接触していた場合にのみ、この抗原に应答することができる(例えば、サイトカイン、例えばインターフェロンを有意に産生することによって)ということに基づいている。

20

【0038】

アデニル酸シクラーゼ(CyaA)又はその断片を含む使用される組換えタンパク質は、本発明の「再刺激」試験に対する感度の有意な増加を誘発することが本発明で示された。

30

【0039】

本明細書で使用された、「免疫原性」という用語は、免疫応答を誘発することができるものとしてのタンパク質の特徴を示す。

【0040】

「*Bordetella* sp.のCyaA」又は「*Bordetella* CyaA」という用語は、*Bordetella* sp.の病原体のアデニル酸シクラーゼトキソイドを指す。このような*Bordetella* CyaAは、*Bordetella pertussis*、*Bordetella parapertussis*又は*Bordetella parapertussis*由来のものであることができる。

40

【0041】

「*Bordetella* CyaA」又は「*Bordetella* アデニル酸シクラーゼ」という用語は、修飾されているか又は修飾されていないが、しかしCD11b/CD18受容体への特異的結合及び触媒ドメインのトランスロケーションのプロセスが影響を受けていない、*Bordetella* CyaAタンパク質又はその断片を包含する。例えば、*Bordetella* CyaAは、解毒されるために修飾されうる。

【0042】

「ペプチド」という用語は、少なくとも3個のアミノ酸、好ましくは6個より多くのアミノ酸を含むアミド結合により連結された一連のアミノ酸を示す。

50

【0043】

「腫瘍抗原」という用語は、免疫応答を誘発しそして抗体又はT細胞と特異的に反応する腫瘍からの物質を指す。

【0044】

本発明の試験で使用される組換えタンパク質の抗原部分は、CyaAアデニル酸シクラーゼトキシドのいかなる許容される部位(permissive sites)にも局在することができる(WO93/21324)。更に、本発明は、組換えタンパク質におけるCyaAアデニル酸シクラーゼの断片のみを使用する試験を包含する(US Patent Nos. 5,503,829、5,679,784及び5,935,580に対応するEPO03/291,486.3; El-Azami-El-Idrissi, et al., 2003, Interaction of Bordetella pertussis Adenylate Cyclase with CD11b/CD18, J. Biol. Chem., vol. 278, pp. 38514-21参照)。

10

【0045】

本発明の抗原はCyaAに融合しているか又は化学的に結合していることができる(PCR/EPO1/11315)。

【0046】

本明細書で使用された「CyaAアデニル酸シクラーゼの断片」という用語は、末端部ではない1つ以上のアミノ酸が欠失しておりそしてアデニル酸シクラーゼ毒素の所望の機能的性質が実質的に影響を受けていない、即ち、CD11b/CD18受容体に対する特異的結合に必要なドメイン及び触媒ドメインのトランスロケーションのプロセスが影響を受けていない、CyaAタンパク質を含む前記タンパク質の断片に関する。例えば、アミノ酸224~240が欠失しているCyaA。

20

【0047】

本明細書で使用された、「許容される部位」という用語は、アデニル酸シクラーゼ毒素の所望の機能的性質に実質的に影響を与えることなく、即ち、CD11b/CD18受容体への特異的結合のために必要なドメインに影響を与えることなく、そして触媒ドメインのトランスロケーションのプロセスに影響を与えることなく有利に、異種ペプチドを挿入することができる部位に関する。

【0048】

Bordetella pertussisアデニル酸シクラーゼの許容される部位は、残基137~138(Val~Ala)、残基224~225(Arg~Ala)、残基228~229(Glu~Ala)、残基235~236(Arg~Glu)及び残基317~318(Ser~Ala)を含むが、それらに限定はされない(Sebo et al., 1985参照)。下記の追加の許容される部位も本発明の態様に含まれる：残基107~108(Gly~His)、残基132~133(Met~Ala)、残基232~233(Gly~Leu)、及び335~336(Gly~Gln)。(一般に、Glaser et al., 1988 Bordetella pertussis adenylate cyclase: the gene and the protein, Tokai j. Exp. Clin. Med., 13 Suppl.: 239-52参照)。

30

【0049】

本発明は、Tリンパ球の活性化により引起されるいかなる変化も検出する診断試験及び免疫モニタリングシステムを包含する。これらの変化は、IL-2、IL-4、IL-5又はIFN- γ 産生の変化を含むが、それらに限定はされない。

40

【0050】

本発明は、試験サンプルが、例えば、末梢血単核細胞(PBMC)、全血又は全血の画分であることができる診断試験及び免疫モニタリングシステムも包含する。

【0051】

本発明の診断試験及び免疫モニタリングシステムは、検出方法、例えば、ELISPOTアッセイ及びELISA又は抗体を使用する他のアッセイ、テトラマーを使用するアッセイ及びT細胞活性化を検出するためのいかなる他のアッセイも含むが、それらに限定はされない。

50

【0052】

本発明の更に他の態様は、プラスミド pT7CACT336 / ESAT-6 及び pT7CACT336 / CFP-10 のインサートのヌクレオチド配列を含む。これらのプラスミドは、下記のようにして調製される：Mycobacterium tuberculosis H374v 遺伝子 esat-6 及び cfp-10 のオープンリーディングフレームを、表1に示されたプライマーを使用しそしてテンプレートとして RD1 領域の pYUB412 コスミドクローン (Gorden, et al.1999) を使用する PCR により増幅させた。PCR 産物を、PCR プライマーに組み込まれた部位で BsrGI により消化し、そして抗原をコードする精製された断片を、pT7CACT336 - BsrGI 発現ベクターの cyaA のコドン 335 と 336 との間にインフレームで挿入した (Osicka, et al. 2000)。クローニングされたインサートの正確な配列は、DNA 配列決定により確認された。組換え DNA 構築のため及び CyaA に挿入された抗原の発現のためにこの研究全体にわたり、Escherichia coli XL1 - Blue (Stratagene) を使用した。pT7CACT1 に由来する適切なプラスミドで形質転換されたバクテリア (Gordon et al.1999) を 150 µg アンピシリン/ml を補充された Luria - Bertani 培地中で 37 °C で成育させた。

【0053】

【表1】

表1. esat-6及びcfp-10遺伝子のクローニングのために使用されたPCRプライマー

プライマー	配列
Esat6-I	5'-GATGTGTACACATGACAGAGCAGCAGTGG-3'
Esat6-II	5'-GATGTGTACTACTGAGCGAACATCCCAGTGACG-3'
Cfp10-I	5'-CATGTGTACACATGGCAGAGATGAAGACC-3'
Cfp10-II	5'-CATGTGTACTACTGAAGCCCATTTGCGAGGA-3'

【0054】

プラスミド pT7CACT336 / CFP-10 は、受託番号 I-3135 の下に C.N.C.M に 2003 年 11 月 18 日に寄託された。プラスミド pT7CACT336 / ESAT-6 も、受託番号 I-3136 の下に C.N.C.M., Paris, France に 2003 年 11 月 18 日に寄託された。

【0055】

更に、CyaA - Tyr を発現するプラスミド XL1 / pTRACES5 - Tyros 369 は、受託番号 I-2679 の下に C.N.C.M に 2003 年 5 月 31 日に寄託された。プラスミド pTRACES5 - Tyros 369 は、ファージ Pr プロモーターの制御下に Bordetella pertussis からの cyac 及び cyaA 遺伝子を発現する発現ベクター pTRACG の誘導体である (pTRACAG もアンピシリン耐性選択マーカー及び感熱性 リプレッサー Cl⁸⁵⁷ を有する)。pTRACES5 - Tyros 369 においては、cyaA 遺伝子は、野生型 CyaA のコドン 188 と 189 との間にジペプチド Leu - Gln の挿入により (アデニル酸シクラーゼ活性の不活性化をもたらす) 及び、CyaA のコドン 224 と 240 との間に挿入された下記のペプチド配列 PASYMDGTM SQV GTRARK をコードする DNA 配列の挿入により修飾される。下線を施したペプチド (YMDGTM SQV) はチロシナーゼのアミノ酸配列 369 ~ 377 に相当する。CyaA - GnTV を発現するプラスミド XL1 / pTRACES - GnTV は受託番号 I-3111 の下に C.N.C.M., Paris, France に

2003年10月16日に寄託された。プラスミド pTRACE5 - GnTV は、ファージ Pr プロモーターの制御下に Bordetella pertussis からの cy a C 及び cy a A 遺伝子を発現する発現ベクター pTRACG の誘導体である (pTRCAG も、アンピシリン耐性選択マーカー及び感熱性 リプレッサ C1⁸⁵⁷ を有する)。pTRACE5 - GnTV において、cy a A 遺伝子は、野生型 Cy a A のコドン 188 と 189 との間にジペプチド Leu - Gln の挿入 (アデニル酸シクラーゼ活性の不活性化をもたらす) により、及び Cy a A のコドン 224 と 240 との間に挿入された下記のペプチド配列 P A S V L P D V F I R C G T をコードする DNA 配列の挿入により修飾される。下線を施したペプチド (V L P D V F I R C) は、N - アセチルグルコサミニル - トランスフェラーゼ V 遺伝子に由来する H L A - A 2 拘束性メラノーマエピトープ N A - 17 A に相当する。(G.Dadaglio, et al.(2003) Recombinant adenylate cyclase of Bordetella pertussis induces CTL responses against HLA-A2-restricted melanoma epitope. Int. Immuno)。

10

【0056】

腫瘍抗原に対する T 細胞応答の誘発に関する結果は、刊行物 Dadaglio G. et al (International Immunology, 2003, vol.15, No.12, pp.1423-1430) に説明されている。

【0057】

本明細書に示されたデータは、Cy a A - CFP - 10 融合タンパク質は、より高い最大値及び同等な刺激を達成するのに必要な減少した抗原濃度の両方に関して、CFP - 10 単独よりも有効にウシ T 細胞により *in vitro* で認識されることを示す。この認識は、CD11b で媒介される。Cy a A をベースとする融合タンパク質は、全血 IFN - 試験に適用することができる。ESAT - 6 及び CFP - 10 をベースとする Cy a A 融合タンパク質の両方共、それらの非融合タンパク質対応物よりも強く認識される。Cy a A - CFP - 10 は、特により低い試験濃度で CFP - 10 単独により創り出された感度より高い増加した感度を与えた。与えられた実施例は、マイコバクテリア抗原 CFP - 10 及び ESAT - 6 に融合された Cy a A 融合タンパク質がウシ T 細胞により認識されること及びこの認識は CD11b で媒介されることを証明する。これらの Cy a A をベースとする組換え融合タンパク質は、対応する融合タンパク質よりも有効にウシ T 細胞により認識され、これは減少した試験濃度を可能とする。本発明の診断試験の Cy a A をベースとする融合タンパク質は全血 IFN - 試験に適用ことができ、そしてこれらの試験フォーマットは現場 (*field*) で使用することができる。実施例は、これらの Cy a A をベースとする試薬がウシにおける有用な診断試薬でありそしてウシにおけるサブユニットワクチン候補であることを示す。

20

30

【0058】

実施例 3 ~ 5 は、マウス系 (*murine system*) で以前に記載されたとおり、Cy a A 融合タンパク質は、CD11b で媒介される機構を介してウシにおいて認識されることを示す。ウシ DC を標的化するこれらの Cy a A 融合タンパク質は、マウスにおいて記載されたとおり、同様な方法で *in vivo* での免疫応答を誘発するためのサブユニットワクチンとして使用することもできる。しかしながら、免疫診断試薬としての ESAT - 6 及び CFP - 10 の独特な感度及び特異性は、もしそれらがサブユニットワクチン接種のために使用されるべき場合には考慮されなければならない。

40

【0059】

実施例 3 ~ 5 に示されたデータにより証明されるとおり、Cy a A をベースとする融合タンパク質はウシにおけるウシ結核を検出する *in vitro* 診断試薬である。それらの使用の実用性は、現場において、それぞれ、それらの感度及び特異性を決定するために、農場から集められたウシ結核を有する多数のウシ (現場リアクター (*field reactors*)) 及びウシ結核のない牧場からのウシにおいて決定することができる。大規模な現場の適用におけるこれらの試薬の実用性の他の決定は、それらを大量に産生できる容易さ及び慣用の組換えタンパク質又は合成ペプチドに比較したそれらの生産コストである。

50

【0060】

ESAT-6又はCFP-10を有するCyAトキソイドは、TB患者及び健常な感作されたドナーの91.1%以上からのT細胞を再刺激することができた。CyAによる抗原の送達は、T細胞を再刺激するのに必要なESAT-6及びCFP-10の量を10倍減少させ、そして低い応答者では、検出されたIFN- γ 産生細胞の全体の頻度は増加した。CyAによるこれらの抗原の送達は、CD4⁺T及びCD8⁺T細胞の両方の応答を高めそして、この応答は、それぞれ、阻害MHCクラスII又は古典的MHCクラスI抗原プロセッシング (inhibition MHC Class II or classical MHC Class I antigen processing) によりブロックされうる。CyA担体とESAT-6の単純な混合物は応答を高めなかったことからトキソイドの抗原プロセッシングは必要である。更に、トキソイドのCD4認識は、クロロキンによる阻害に感受性であった。CFP-10に対するポジティブ応答の頻度はLTB1を検出するための単純化された全血モデルでは、危険にさらされている集団においてLTB1を同定するのを助けることができる潜在的に重要な特質である、CyA送達により増加し、かくして活性な感染性TBのより良好な予防を促進する。

10

【0061】

実施例で与えられたデータは、CyAによる抗原送達が、プロセッシングされたM.tuberculosis由来のペプチドの新生MHC分子へのアベイラビリティを増加させるという解釈と合致している。CyAトキソイドは、CyAがCD11b/CD18を介して特異的に取り込まれることから、細胞質プロセッシングにおいてプロテオソーム開裂を受けやすくなることが知られている (Guernonprez, P., et al. 2001)。in vivoで、CyAは、樹状細胞の細胞質ゾルに有効に送達されることが証明された (Guernonprez, P., et al. 2001)。かくして、可溶性組換え抗原は典型的にはエンドソームにおいてプロセッシングされ、かくしてMHCクラスIにはアクセスし難いことから、CD8⁺T細胞は、結核に対するヒト保護応答に潜在的に貢献するが (Pathan, A.A., et al. 2000; Lalvani, A., et al., 1998)、抗原特異的応答の検出は、ペプチドプール対象の興味ある抗原を発現する組換えVacciniaウイルスを使用する必要によりこれまで制限されてきた (Pathan, A.A., et al. 2000; Lalvani, A., et al., 1998; Wilkinson, R.J., et al., 1998)。CyAによる抗原の送達は、全M.tuberculosisタンパク質に対するCD8⁺T細胞の応答をアッセイすることができる新規な方法を提示する。

20

30

【0062】

M.tuberculosis特異的CD4⁺T細胞の応答もまた高められ、これは以前の所見と合致している (Loucka, J., et al., 2002)。CyAに融合された抗原に対する応答の増強は、遊離抗原 (free antigen) に対する低い応答を有するドナーにおいて特に顕著であった。これは、抗原提示細胞のCD11b/CD18インテグリン受容体に特異的に結合し (Guernonprez, P., et al. 2001)、その後急速にエンドサイトーシスされる (Loucka, J., et al., 2001) 巨大分子CyA抗原コンジュゲートよりも、可溶性組換え抗原はピノサイトーシスによってより少なく有効に取り込まれ (かくしてエンドソームプロセッシングにはより少なく利用可能性である) からでありうる。これは、モル基準で10~20倍少ないトキソイド抗原がなぜ同じ応答を再刺激するか (図5) そして組換え抗原に対するネガティブ応答を有するいくつかのドナーがなぜCyAに融合された抗原に対する応答を示すか (図6) も説明するであろう。

40

【0063】

数年前、限定されたM.tuberculosisに反応してT細胞により産生されたIFN- γ のin vitro産生をアッセイする試験によりTSTを代替することが討論された (Jurcevic, S., et al., 1996)。このアプローチは、高度に免疫原性のRD1にコードされた抗原ESAT-6及びCFP-10の組み込みにより改良されそして改善された (Sorensen, A.L., et al., 1995; Berthet, F.X., et al., 1998)。いくつかの

50

研究は、R D 1 にコードされた抗原に対する *in vitro* 応答は、病原性マイコバクテリアによる感染からの B C G による免疫感作を鑑別する (differentiate) ことを示した (Arend, S.M., et al., 2000; Cockle, P.J., 2002; Lalvani, A., et al., 2001)。E S A T - 6 の複数のペプチドに対する I F N - E L I S P O T 応答は、96% の感度及び 92% の特異性で潜在的及び明白な結核感染を検出するのに利用することができる (Lalvani, A., et al., 2001)。M . t u b e r c u l o s i s 感作された対象において観察される E S A T - 6 及び C F P - 10 抗原トキシイドの認識の非常に高い頻度は、これらの評価とぴったり一致する。抗原刺激された全血培養物を使用するより実際的なアプローチは、都合の悪いことに感度の 72% への低下と関連している (Brock, L., et al., 2001)。しかしながら、データは、送達システムとしての C y a A トキシイドの使用はこの欠陥を克服することができることを示唆する。更に、C y a A による送達は、低応答対象における I F N - の検出、H I V のセッティングにおける明白な利点でありうる特質、を最善に高めた。

10

【0064】

研究の結果は、C y a A の A C ドメインが B M D C s の M H C クラス I 及びクラス II 拘束性提示経路の両方へ *in vitro* で送達されることを証明する。M a l E タンパク質又は M a l E ペプチドの提示と比較して、C y a A - M a l E によるクラス II 提示の高い増強が観察された。この増強は、C D 11b - C y a A 相互作用に依存する。何故ならばそれは抗 C D 11b m A b s によりブロックされるからである。提示アッセイにおいて薬物及び T A P 1 欠失 B M D C s を使用すると、受容体媒介エンドサイトーシス後に、C y a A の A C ドメインは、B M D C s の細胞質ゾルにトランスロケーションされて従来の M H C クラス I プロセッシング経路に沿ってプロセッシングされるか又はプロセッシングのエンドサイトーシス経路にしたがって分解されることは明らかである。*in vivo* では、C y a A は、C D 4⁺ 及び C D 8⁺ T 細胞プライミングのための M a l E 及び O V A ペプチドを同時に送達し、そして O V A ペプチドに対する C T L を誘発しそして M a l E 及び O V A エピトープの両方に特異的な T h - 1 サイトカイン産生を誘発する。

20

【0065】

B o r d e t e l l a p e r t u s s i s の遺伝子的に解毒されたアデニル酸シクラーゼの A C ドメインに挿入された M a l E C D 4⁺ T 細胞エピトープは、B M D C s により、C R M C 3、M a l E - 特異的 C D 4⁺ T 細胞ハイブリドーマに、非常に有効に提示される。得られる M H C クラス II 拘束性提示は、同等な濃度の精製された M a l E タンパク質で観察された提示より 100 倍も多く有効である。A P C s が高濃度の外因性 A g とインキュベーションされる場合すら、少数の M H C クラス II 分子のみがその A g に由来するペプチドを提示することが十分に証明される (Lich, J.D., et al., 2000)。ここでは、エンドサイトーシス経路への C y a A による M H C クラス II エピトープ送達の増強は、C y a A のその細胞受容体 C D 11b との相互作用が抗 C D 11b m A b s によりブロックされるとき妨害される。これらの結果は、C y a A の C D 11b との相互作用は、T 細胞ハイブリドーマに対する提示のための M H C クラス II 拘束性ペプチドの発生を促進することを示す。M H C クラス II 提示の増強は、M a l E 及び O V A C D 8⁺ T 細胞エピトープの両方を有する C y a A で依然として観察される。この場合に、C y a A は、O V A 及び M a l E エピトープを、それらのそれぞれの提示経路へ、これらのエピトープの 1 つのみを有する C y a A s と同じく有効に同時に送達する。

30

40

【0066】

C y a A は、その N 末端 A C ドメインを、直接であり、次いで従来の細胞質ゾル経路に沿った A C ドメインプロセッシングが続くと考えられるトランスロケーションにより標的細胞細胞質ゾル内に送達することが、繰り返し示された (Ladant, D., and A. Ulmann. 1999)。C y a A A C ドメインはまた M H C クラス II 提示経路に非常に有効に送達されるので、このような二重送達に関係したプロセッシング機構が分析された。細胞質ゾル A g s に由来するペプチドの M H C クラス II 拘束性提示は、別のプロセッシング経路により発生させることができることを、いくつかの研究が報告している (Rudensky, A., et

50

al., 1991; Mukherjee, P., et al., 2001)。しかしながら、C y a A A CドメインのM H CクラスI Iプロセッシングはプロテアソーム活性もT A P輸送体も必要としないので、小胞酸性化後に活性化されるエンドサイトーシスプロテアーゼにより行われる。これらの結果もまた、M a l Eペプチド提示がM H CクラスI I分子ネオ合成を必要とすることを確認する。ゆえに、M H CクラスI I拘束性提示のためのA Cドメインプロセッシングは従来のエンドサイトーシス経路に従って起こる。

【0067】

この結果及びC y a A提示のためのC D 1 1 b要求は、この毒素が受容体媒介エンドサイトーシスによっても細胞に入ることができ、その後小胞から標的細胞細胞質ゾルへのA Cドメインの急速なトランスロケーション、又はエンドサイトーシス小胞に沿ったこのドメインの分解が続くことを示唆する。あるいは、A Cドメインは、細胞膜から細胞質ゾルに直接トランスロケーションされるか、又は取り込まれてエンドサイトーシス経路の小胞に入る。C y a A取り込みは、ファゴサイトーシスも、マクロピノサイトーシスも、カベオラ媒介エンドサイトーシスも必要としない。しかしながら、結果は、C y a AのM H CクラスI I拘束性提示は受容体媒介エンドサイトーシスによるC y a Aインターナリゼーションに依存することを示す。これは、C D 1 1 b媒介エンドサイトーシスは、標的細胞へのC y a Aエンターリーの機構の1つであることを示唆する。次いで、C y a A A Cドメインは、M H CクラスI提示経路に沿って更にプロセッシングされるために細胞質ゾルにトランスロケーションされうる。

10

【0068】

C y a Aは、C D 1 1 bポジティブ細胞を標的化し(Guermonprez, P., et al., 2001 and 2002) ;そしてペプチドをM H CクラスI提示経路に送達する非常に有効なベクターである。この標的化された送達は、i n v i v oでの防御C T Lを誘発することが示された(Fayolle, C., et al., 2001)。この研究では、C y a Aはi n v i v oでO V A及びM a l E T細胞エピトープをそれらのそれぞれの提示経路に共送達し、そしてC D 8⁺及びC D 4⁺T細胞応答を誘発する。アジュバントなしで静脈内経路によるC y a A 5 0 µgの1回の注射は、T h 1に向けて分極化されるC D 4⁺及びC D 8⁺T細胞応答を誘発した。C D 1 1 b⁺細胞の中でも、C D 1 1 b C D 8 - D Cサブセットは、C y a Aのi n v i v o提示をもたらす(Guermonprez, P., et al., 2002)。このマウスD C亜集団(murine DC subpopulation)は、C T L誘発において最も有効であるが(Schlecht, G., et al., 2001; Ruedl, C., et al., 1999)、主にT h - 2に向けてC D 4⁺T細胞応答をバイアスさせることも報告された。しかしながら、ある種の微生物化合物による活性化後に、このD Cサブセットは、T h - 1 T細胞応答を誘発する能力を獲得する(Manickasingham, S.P., et al., 2003; Boonstra, A., et al., 2003)。実施例で示されたとおり、誘発されたT細胞応答はT h - 1に向けて強く分極化され、これはC y a Aが、挿入されたエピトープを送達することに加えてD C成熟を促進することができることを示唆する。追加の研究は、C y a AがT h - 1応答を発生することを可能とするシグナルの性質を説明することができる。

20

30

【0069】

強固なT h - 1 C D 4⁺及びC T L C D 8⁺T細胞応答の同時誘発は、ワクチン接種の1つの目標である。実際に、現在使用されるサブユニットワクチンの大部分は、T h - 2分極化されたC D 4⁺T細胞応答を発生させる。ウイルス又は細胞内病原体により誘発された疾患又は抗腫瘍免疫においては、C D 8⁺T細胞及びT h - 1 C D 4⁺T細胞型の応答が必要である。C y a Aは、C D 4⁺及びC D 8⁺T細胞応答を非常に有効に発生させることができる。ゆえに、M H CクラスI提示経路へのクラスIエピトープ送達におけるC y a Aの高い有効性と組み合わせられた観察されたM H CクラスI I提示の増強は、このベクターを新規な診断試験及び免疫モニタリングのために非常に有用なものとし、そしてワクチンデザインのために非常に有望なものとする。

40

【0070】

本発明を下記の実施例でより詳細に説明する。

50

【 0 0 7 1 】

実施例 1

ウシの研究のための物質及び方法

ウシツベルクリン (P P D - B) 及びトリツベルクリン (P P D - A) は、Veterinary Laboratories Agency-WeybridgeにおけるTuberculin Production Unitから得られそして 1 0 μ g/mlで培養において使用された。組換え E S A T - 6 は、Dr.A.Whelen(VLAWeybridge)により供給され、組換え C F P - 1 0 は、Lionex Ltd., Braunschweig, Germanyから得られた。C y a A、C y a A - C F P - 1 0 及び C y a A - E S A T - 6 は、Dr.C.Leclerc, Institute Pasteur, Parisにより提供された。タンパク質の同一バッチを全体にわたり使用した。

10

【 0 0 7 2 】

M . b o v i s 感染したウシ (Vordemeier et al., 1999) の仔ウシを、 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ C F U の気管内点滴により G B からの M . b o v i s フィールド株 (M.bovis field strain) (A F 2 1 2 2 / 9 7) で感染させた。感染は、これらの動物の肺及びリンパ節における結核性病巣 (tuberculous lesions) の存在並びに感染の約 2 0 週間後に行われた死後に集められた組織からの M . b o v i s の培養により確かめられた。ヘパリンを加えた血液サンプルは、強くそして持続した i n v i t r o ツベルクリン応答が観察された、感染の少なくとも 6 週間後に得られた。

【 0 0 7 3 】

インターフェロン - ガンマ E L I S P O T アッセイ (Vordermeier et al., 2002)

20

末梢血単核細胞 (P B M C) を、ヘパリンを加えた血液から H i s t o p a q u e - 1 0 7 7 (Sigma) 勾配遠心により単離し、そして組織培養培地 (5 % C P S R - 1 (制御されたプロセス血清代替物 - 1 型、Sigma Aldrich, Poole, UK)、非必須アミノ酸 (Sigma Aldrich)、 5×10^{-5} M 2 -メルカプトエタノール、1 0 0 U / ml ペニシリン及び 1 0 0 μ g/ml ストレプトマイシンサルフェート) を補充された R P M I 1 6 4 0) (Life Technologies, Paisley, Scotland, U.K.) 中で培養した。直接 E L I S P O T s を以前に記載されたとおりに数えた。簡単に言えば、E L I S P O T プレート (I m m u n o b i l o n - P ポリフッ化ビニリデン膜、Millipore, Molsheim, France) を、ウシ I F N - 特異的モノクローナル抗体 2 . 2 . 1 で 4 にて一晚コーティングした。結合しなかった抗体を洗浄により除去し、そしてウエルを R P M I 1 6 4 0 培地中の 1 0 % F C S で

30

【 0 0 7 4 】

C D 1 1 b の関与は、1 0 0 μ l 中に分配した 2×10^5 P B M C に、マウス m A b C C 9 4 及び I L A 1 5 (両 I g G 1、親切にも、Dr.C.Howard, IAH, Compton, UK) により提供された) の添加 (5 0 μ l / ウエルの E L I S P O T プレート) により決定された。3 7 で 3 0 分の予備インキュベーションの後に、C y a A - C F P - 1 0 の段階希釈物を加え、そして培養物を上記したとおりに 2 4 時間インキュベーションし、次いで E L I S P O T 分析を行った。

40

【 0 0 7 5 】

前記したとおりに (Vordermeier et al., 2001) M A C S システム (ヤギ抗マウス I g G コーテッドビーズ、L S 分離カラム、Miltenyi Biotec Ltd, Bergisch-Gladbach, Germany) と協同して抗ウシ C D 4 又は C D 8 特異的 m A b C C 3 0 及び C C 5 8 (C. Howard, IAH) を使用する磁性ネガティブ選択により、C D 4 ⁺ 及び C D 8 ⁺ T 細胞亜集団を枯渇さ

50

せた (depleted)。

【0076】

インターフェロン - ガンマ (IFN -) アッセイ (Wood et al., 1994; Vordermeier et al., 1999)。ヘパリンを加えた血液 0.1 ml を等容積の抗原含有溶液と混合することにより、96 ウエルプレート中で 0.2 ml / ウエルアリクオートにおいて、全血培養を行った。上清を培養の 24 時間後に回収し、Bovigam EIA キット (CSL, Melbourne, Australia) を使用してインターフェロン - ガンマ (IFN -) を決定した (Vordermeier et al., 2002)。データを OD 450 単位 (OD 450 × 1000) として表す。CyaA バックグラウンドレベルを CyaA - ESAT - 6 及び CyaA - CFP 10 の値から減じた。

10

【0077】

統計的分析。iMac パーソナルコンピュータで Instat v3.0a (GraphPad, San Diego, CA, USA) を使用して統計的分析を行った。片側又は両側ウイルコクソン符号付順位マッチドペア検定 (one- or two-tailed Wilcoxon signed rank matched pairs test) を使用して、データを分析した。

【0078】

実施例 2

完全な (entire) マイコバクテリア抗原 Cfp10 又は Esat - 6 を有する組換え CyaA の構築及び精製

組換え DNA 構築のため及び CyaA に挿入された抗原の発現のために、Escherichia coli XL1 - Blue (Stratagene) を使用した。pT7CACT1 (Osicka et al., 2000) に由来する適切なプラスミドで形質転換されたバクテリアを、アンピシリン 150 µg/ml を補充された Luria - Bertani 培地中で 37 °C にて成育させた。Mycobacterium tuberculosis H37Rv 遺伝子 esat - 6 及び cfp - 10 のオープンリーディングフレームを、下記のプライマー：

20

【0079】

【表 2】

Esat6-I 5'-GATGTGTACACATGACAGAGCAGCAGTGG-3'

Esat6-II 5'-GATGTGTACACTGAGCGAACATCCCAGTGACG-3'

30

CFP-10-I 5'-CATGTGTACACATGGCAGAGATGAAGACC-3'

CFP-10-II 5'-CATGTGTACACTGAAGCCCATTGCGAGGA-3'.

【0080】

を使用して RD1 領域 (Gordon et al., 1999) の pYUB412 コスミドクローンからの PCR により増幅させた。

【0081】

PCR 産物を、PCR プライマーに組み込まれた部位で BsrGI により消化し、そして抗原をコードする精製した断片を、pT7CACT - 336 - BsrGI 発現ベクター (Osicka et al., 2000) 上に保持された CyaA 遺伝子オープンリーディングフレームのコードン 335 と 336 との間にインフレーム内で挿入された。クローニングされたインサートの正確な配列は、DNA 配列決定により確認された。

40

【0082】

それぞれ、ESAT - 6 及び CFP - 10 抗原を有するコントロール解毒モック CyaA (control detoxified mock CyaA) 及び組換え CyaA タンパク質を、前記したとおり (karimova et al., 1998)、E. coli において産生させ、DEAE - セファロースでのイオン交換クロマトグラフィー及びフェニル - セファロースでの疎水性クロマトグラフィーの組み合わせにより封入体から精製した。最終段階で、タンパク質を 8 M 尿素、5

50

0 mM Tris - HCl pH 8、2 mM EDTAで溶離し、そして以前に記載されたとおりにして特徴付けた (karimova et al., 1998)。得られたタンパク質は、如何なる検出可能なアデニル酸シクラーゼ酵素活性も含んでいなかった。

【0083】

実施例 3

実験的に感染したウシの IFN - 応答

実験的に感染させたウシから PBMC を調製し、そして抗原 (組換え ESAT - 6、CFP - 10、Cy a A - ESAT - 6、Cy a A - CFP - 10 及び Cy a A コントロール) の段階希釈物とインキュベーションさせた。抗原で誘発された IFN - 応答を、鋭敏な ELISPOT アッセイを使用して 24 時間の培養の後に決定した。抗原を加えないで (培地コントロール) 見出されたスポット形成性細胞 (SFC) の数を、Cy a A - ESAT - 6 及び Cy a A - CFP - 10 刺激後に誘発された SFC の数から減じた。データがその後いかに表されそして比較されたかを説明するために、1 頭の仔ウシで試験した CFP - 10 についての代表的結果を図 1 に示す。この仔ウシでは、Cy a A - CFP - 10 は、組換え CFP - 10 より高いピーク応答を誘発し (水平線 a と b により示された値の比較により示されたとおり)、そして、組換えタンパク質で誘発された「半最大」 (half maximum) (ピーク応答の 50%) 応答 (線 c) に必要な濃度を示す垂線 d 及び e により示されるとおりより有効に認識された。

10

【0084】

次いで、6 頭の実験的に M. bovis 感染させた仔ウシの更なるバッチを試験し、そして結果を同じく解釈した。CFP - 10 又は Cy a A - CFP - 10 により誘発されたピーク応答の比較及び 50% 最大応答に必要な減少した濃度により証明されたとおり、Cy a A - CFP - 10 融合タンパク質は、その非融合同等物より優れており (図 2) : Cy a A - CFP - 10 ピーク応答は CFP - 10 で観察されたピーク応答よりも約二倍高かった (メディアン応答 (median response) ; Cy a A - CFP - 10 : 157 SFC ; CFP - 10 : 75 SFC ; $p = 0.03$)。50% 最大応答に必要な濃度により判定されたとおり、Cy a A - CFP - 10 は、CFP - 10 より約 20 倍有効に認識された (50% 最大濃度 ; Cy a A - CFP - 10 : 0.3 nM CFP - 10 : 6.25 nM、 $p = 0.017$)。

20

【0085】

ESAT - 6 又は Cy a A - ESAT - 6 融合タンパク質により誘導された IFN - 応答は、お互いに有意には異ならなかった (図 2)。興味深いことに、組換え ESAT - 6 は CFP - 10 より約 70 倍有効に認識された (50% 最大濃度のメディアン (median of 50% maximum concentrations) : CFP - 10 による 6.25 に比較して ESAT - 6 での 0.09)。これらの 2 つのタンパク質間の有効性のこの差は、Cy a A 融合タンパク質として ESAT - 6 を呈示することの追加の利益が何故これらの実験で実現されなかったかを説明することができよう。

30

【0086】

実施例 4

Cy a A - CFP 10 の認識は CD 11 b により媒介される

Cy a A - CFP 10 の認識が CD 11 b 依存性機構 (マウスで最近示されたとおりの) を介して媒介されるかどうかを決定するために、感染した仔ウシからの PBMC を、ウシ CD 11 b に対して特異的な同じアイソタイプ (Ig G 1) の 2 つの mAb (親切にも、Dr C. Howard, IAH, Compton, UK により提供された) の存在下に Cy a A - CFP - 10 で刺激した。これらの mAb の 1 つ、(ILA 15) は、SFC の数が有意に減少したので、Cy a A - CFP - 10 の CD 11 b との相互作用を妨害したが、これに対して、非ブロッッキングアイソタイプコントロール mAb (CC 94) は妨害しなかった (図 3、一側ウイルクスンマッチドペア検定 one-tailed Wilcoxon matched pairs test) により決定して、試験された各濃度について $p < 0.02$)。これらの結果は、マウス系における如く、Cy a A はウシの APC 上の CD 11 b と相互作用するという証拠を与える。

40

50

【0087】

Cy a A - C F P - 1 0 は、C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞の両方により認識されることも示された。これは、磁性ビーズにより両方の亜集団を枯渇させることにより分析された。ウシ結核の早期段階のウシは、弱い又は検出できない C D 8 + T 細胞応答しか示さない (Pollock et al., 1996, Vordermeier, 公表されていない観察)。その結果として、この研究のために入手可能な実験的に感染させた動物のすべてを、感染後相対的に早期に (即ち、感染後約 4 ~ 6 ヶ月) 試験し、そして有意な P P D - B 及び C F P - 1 0 特異的 C D 8 + T 細胞応答が試験された 4 頭の乳牛 (cows) の 1 頭のみにおいて観察された。それにもかかわらず、数年前に感染した成体乳牛 (adult cows) から得られた結果は、組換えタンパク質のように、Cy a A - C F P - 1 0 は C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞により認識 10
されることを示した。しかしながら、Cy a A - C F P - 1 0 は、その差は統計的に有意ではないとしても、組換えタンパク質と比較してより高い *in vitro* C D 8 + T 細胞応答を誘発した (応答する細胞の C D 8 / C D 4 比: C F P - 1 0 : 0 . 8、Cy a A - C F P - 1 0 : 1 . 0 5、データは示されていない)。

【0088】

実施例 5

全血 I F N - 試験における Cy a A - E S A T - 6 及び Cy a A - C F P - 1 0 の成績 (B O V I G A M アッセイ)

全血アッセイ (B O V I G A M 試験) のフォーマットにおいて現場での診断アッセイとして I F N - 試験を適用した。このフォーマットにおいて、農場で集められた血液にヘ 20
パリンを加え、それをツベルクリン又は特異的抗原とインキュベーションした。24 時間のインキュベーション期間の後に、血漿上清中の抗原で誘発された I F N - の量を E L I S A により決定した。E S A T - 6 及び C F P - 1 0 との Cy a A 融合タンパク質の性能を決定するために、第 2 バッチの 8 頭の実験的に *M . b o v i s* に感染した仔ウシから血液を得た。これらの血液サンプルを 4 及び 20 nM の E S A T - 6、C F P - 1 0、Cy a A - E S A T - 6 及び Cy a A - C F P - 1 0 で刺激した。24 時間後に行った E L I S A アッセイの結果を図 4 に示す。E L I S P O T により測定された P B M C 応答について上記に示されたとおり、組換え C F P - 1 0 タンパク質と比較して有意により強い I F N - 30
応答が、両試験濃度で Cy a A - C F P - 1 0 で観察された (両濃度で $p = 0 . 0 7 8$)。この増加した応答は、血液を 4 nM 濃度の抗原で刺激したとき、特に明白であった (メディアン O D 4 5 0 単位、Cy a A - C F P - 1 0 : 3 1 3、C F P - 1 0 : 1 0 5)。Cy a A - E S A T - 6 及び E S A T - 6 の応答は、20 nM では有意に異ならなかったが、4 nM での Cy a A - E S A T - 6 による刺激後に有意に高められた応答が観察された ($p = 0 . 0 1 5$ 、メディアン O D 4 5 0 単位、Cy a A - E S A T - 6 : 4 8 6 ; E S A T - 6 : 2 6 0)。

【0089】

1 0 0 O D 4 5 0 単位の普通に適用されるカットオフを使用して診断結果を評価したとき、8 頭の試験された動物のうち 6 頭は、両試験濃度で適用された E S A T - 6 及び Cy a A - E S A T - 6 を使用するウシ T B についてはポジティブであると思われる (図 4)。対照的に、Cy a A - C F P - 1 0 の使用は、Cy a A - C F P - 1 0 による 2 0 40
及び 4 nM 試験濃度で試験した動物の 8 頭の内 7 及び 8 頭の内 6 頭はポジティブであり、これに対して、対応する試験濃度で組換え C F P - 1 0 による刺激後に、8 頭のうち 6 頭及び 8 頭のうち 4 頭がポジティブと分類された (図 4) ので、抗原としての C F P - 1 0 の感度を改良した。

【0090】

8 頭の中の 1 頭の試験ネガティブ動物は、*M . b o v i s* は採取されたいかなる組織サンプルからも培養されうるとしても、この実験が行われた数ヵ月後に行われた死後の結核病巣なしと呈示された。この動物は、ツベルクリン皮膚試験もネガティブであった。合わせて考えると、これは、この動物における実験的感染は封じ込められ (contained) そして疾患は生じなかったことを示唆する。予想されたとおり、P P D - B、Cy a A - E S 50

A T - 6、C y a A - C F P - 1 0、E S A T - 6又はC F P - 1 0による刺激後のこの仔ウシの血中にI F N - は誘発されず、かくしてこれらの試薬の特異性を明らかにする(図4)。

【0091】

実施例6

ヒトの研究のための材料及び方法

ヒトの研究は、Harrow Local Research Ethics Committee (Harrow LREC 1645 and 2414)からの倫理的承認を伴って行われた。結核を有する患者及びそれらの健常な接触者は、Northwick Park Hospital, Harrow (North West London Hospitals NHS Trust)から動員された。異なる臨床表現型を有する3グループの人々が選ばれた。第1グループは、明白な(即ち、培養又は生検ポジティブ)結核を有する成人であった($n = 21$ 、14M、7F、平均年齢35.1歳)。第2グループは、正常な胸部X線写真を有するがそれにもかかわらず強くポジティブなTST反応(Heaf Grade 3以上)を示し、かくしてLTB1を有していそうだと思う無症候成人からなっていた($n = 44$ 、26M、18F、平均年齢34.7歳)。第3のコントロールグループは、TBへの証明された暴露(documented exposure)を持たず、その皮膚試験反応はネガティブである健常な成人からなっていた($n = 7$ 、3M、4F、平均年齢37.6歳)。最初の2つのグループは、M.tuberculosis特異的抗原に対するT細胞反応性の機会を最大にし、かくして組換えトキシイド及びC y a Aトキシイドに対する応答の比較を可能とするように選ばれた。すべての対象は、次いでBritish Thoracic Societyガイドラインに従ってアドバイスされそして、必要であれば、処置された(Thorax 55:887-901, 2000)。

10

20

【0092】

細胞。Ficoll-Paque Plus (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 上での遠心により血液20mlからPBMCを分離し、そして2mL - グルタミン、ペニシリン100U/ml、ゲンタマイシン5µg/ml及び10%熱不活性化されたウシ胎児血清(Sigma, St. Louis, MO)を補充されたRPMI中に懸濁させた。製造者の指示に従って、鉄含有ビーズ(Dynabeads M-450, Dynal, Oslo, Norway)にコンジュゲートした抗CD4又は抗CD8mAbを使用してCD4⁺及びCD8⁺T細胞を枯渇させた。これらの枯渇は97~99%純度を有する細胞集団を一貫して生じさせた。抗MHCクラスIIブロッキング抗体(L243, Lenico Technologies)、抗MHCクラスIブロッキング抗体(W6/32, Leinco)及びアイソタイプコントロール抗体(mouse IgG2a, Leinco)を、抗原の添加の30分後に5µg/mlで使用した。10µg/mlのクロロキン(Sigma)を抗原のすぐ前に培養物に加えた。

30

【0093】

単一細胞IFN-放出についてのex vivo酵素結合免疫スポット(ELISPOT)アッセイ。抗IFN-γ mAb 1-D1K(MAIPS45, Nacka, Sweden) 15µg/mlで予備コーティングされた96ウエルのPVDf裏打ちされたプレート(MAIPS45, Millipore, Bedford, MA)を、R10で2時間ブロックした。3×10⁵PBMCを100µl R10/ウエル中に加えた。C y a Aトキシイド及び組換えE S A T - 6及びC F P - 1 0の二重ウエル(duplicate wells)を図5に由来する最適濃度で使用した、100U/mlのPPD(Rvans Medical, Liverpool, UK)及び5µg/mlのフィトヘマグルチニン(ICN Biomedicals, Aurora, OH)をポジティブコントロールウエルに加えた。ネガティブコントロールウエルには抗原を加えなかった。5%CO₂中で37°Cでの14時間のインキュベーションの後に、プレートを0.05%Tween-20を含有するPBSで洗浄した。1µg/mlのビオチニル化された抗IFN-γ mAb、7-B6-1-ビオチン(Mabtech)、50µlを2時間加えた。プレートを洗浄しそしてストレプトアビジン-アルカリホスファターゼトキシイド(Mabtech)を1:1000希釈で加えた。1時間及び更なる洗浄の後に、脱イオン水で1:25に希釈された発色原性アルカリホスファターゼ基質(Biorad, Hercules, CA, USA) 50µlを加えた。10分後に、プレートを洗浄し、乾燥させ、そしてスポット形成性細胞(SFC)を拡大鏡で数えた。

40

【0094】

50

組換え抗原及びCyaAトキソイド構築。組換えネイティブESAT-6は、前記のよう
にして調製されそしてVeterinary Laboratories Agency, Weybridge, Surrey KT15, UK
からの贈り物であった。組換えCFP-10はLionexから商業的に得られた(Brawnschweig,
Germany)。N末端配列決定は、クローニングされた抗原の同一性を確証した。
。組換えDNA構築のため及びCyaAに挿入された抗原の発現のためのこの研究全体に
わたり、Escherichia coliXL1-Blue (Stratagene)を使用した。pT7CACT1(Osicka,
R., 2000)に由来する適切なプラスミドで形質転換されたバクテリアを、アンピシリン
150 µg/mlを補充されたLuria-Bertani培地中で37 °Cで成育させた。
Mycobacterium tuberculosisH37Rv遺伝子esat-6及びcfp-10のオープンリーディングフレームを、下記のプライマー：

10

【0095】

【表3】

Esat6-I 5'-GATGTGTACACATGACAGAGCAGCAGTGG-3'

Esat6-II 5'-GATGTGTACACTGAGCGAACATCCCAGTGACG-3'

CFP-10-I 5'-CATGTGTACACATGGCAGAGATGAAGACC-3'

CFP-10-II 5'-CATGTGTACACTGAAGCCCATTGCGAGGA-3'

20

【0096】

を使用してRD1領域のpYUB412コスミドクローン(Gordon, S.V., et al., 1999)
からPCRにより増幅させた。

【0097】

PCR産物を、PCRプライマーに組み込まれた部位でBsrGIにより消化し、そ
して抗原をコードする精製した断片を、pT7CACT-336-BsrGI発現ベクタ
ー(Osicka, et al., 2000)上のCyaAのコドン335と336の間にインフレームで
挿入した。クローニングされたインサートの正確な配列はDNA配列決定により立証され
た。

【0098】

コントロール解毒モックCyaA並びに、それぞれ、ESAT-6及びCFP-10表
現を有する組換えCyaAタンパク質を、E.coliにおいて産生させ、8M尿素、5
0mM Tris-HCl pH 8.2、2mMEDTA中で封入体から精製し、そして以前に記載
の如くして特徴付けた(Sebo, et al., 1999)。得られるタンパク質は、いかなる検出可
能なアデニル酸シクラーゼ酵素活性も含んでいなかった。

【0099】

全血アッセイ及びインターフェロン-γ ELISA。静脈血液を集め(BD Na Heparin
vacutainer, Cat368480)そしてサンプリングの4時間以内にプロセッシングした。全血
をRPMI (グルタミン及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充された)中で1:1
0に希釈した。希釈した血液180 µlを、二重ウエル中で刺激性抗原で96ウエルの丸
底プレート中で平板培養した。抗原の最終濃度は、250 nM (rESAT-6)、50 nM
(CyaA-ESAT-6)、500 nM (rCFP-10)、50 nM (CyaA-CFP-10)、50 nM (モックCyaAトキソイド)、5 µg/ml (PHA: ポジティブコント
ロール)及び20 µl/ml (RPMI: ネガティブコントロール)であった。刺激された
全血をCO₂インキュベーター中で37 °Cで培養した。二重ウエルからの上清を培養の6
0~72時間後に回収し、そして直ちにELISAによる後のIFN-γ測定のために凍
結させた。刺激剤の最適濃度及び回収のタイミングを用量応答及び時間経過実験により予
め決定した。ELISA反応を抗体製造者の指示に従って行った。簡単に言えば、96ウ
エル平底プレートを精製されたマウス抗ヒトIFN-γ (BD Pharmigen 554548)により
4 °Cで一晩コーティングした。ブロッキング及び洗浄後に、ウエルを、上清(二重に1:

30

40

50

2希釈)及び標準(15pg/ml~10000pg/mlの標準曲線希釈、二重の測定)で平板培養し、その後プレートを再び4で一晚インキュベーションした。洗浄した後に、ウェルをビオチニル化されたマウス抗ヒトIFN- γ (BD Pharmingen, 554550)と室温で1.5時間インキュベーションし、再び洗浄しそしてストレプトアビジン(Sigma Cat no A3151)と30分間インキュベーションした。検出のための基質としてOPDを使用しそしてカラー発色を停止させるための2NH₂SO₄を使用した。光学濃度をプレートリーダーで490nmで読み取り、そしてIFN- γ 濃度を標準曲線から計算した。独立変数間のSpearman順位相関係数(Spearman rank correlation coefficients)を、SPSS-10を使用して計算した。

【0100】

実施例7

M. tuberculosis 特異的T細胞を再刺激するのに必要なESAT-6又はCFP-10の用量はCyA送達により10~20倍減少する

CyAトキソイドとして組換え分子中に挿入された抗原の同等な用量(即ち、同じモル量のタンパク質)を使用して、*in vitro*でのESAT-6及びCFP-10及びそれぞれのCyAトキソイドの最適刺激用量を決定した。次いでオーバナイトELISPOTアッセイにおいてIFN- γ SFCの数を数えた。CyAトキソイドによるこれらの実権は、抗原性刺激が挿入されていない同じ量のCyAトキソイド(モックトキソイド)を含有するウェルにおけるIFN- γ SFCの数を減じることによりコントロールされた。ESAT-6に対応する9人の健常なTST+veドナーにおいて、この分子の最適認識が500nMの用量で観察された。抗原がCyA-ESAT-6として提示される場合は、10倍少ないESAT-6(50nM)が必要であった(図5A)。

【0101】

興味深いことに、CyA-ESAT-6の用量を500nMに増加させると、CyAベクターによる送達は、検出されたIFN- γ SFCの全体の増加をもたらすことができることが示された。しかしながら、CyAトキソイドの用量の更なる増加は、CyAトキソイドを可溶化するのに必要な溶液の高い尿素含有率によるものであるSFCの減少と関連していた(データは示されていない)。CFP-10に対応する10人の同様なドナーでは、CyA融合は、同様に用量応答曲線を左にシフトさせた。CyAトキソイドとして表された約10~20倍少ないCFP-10がネイティブ抗原と同じ応答を引き起こした(図5B)。かくして、ESAT-6又はCFP-10の量の10倍減少したCyA融合体がT細胞を再刺激するのに必要であった。更に、特にESAT-6について、検出されたIFN- γ SFCの全体の数を増加させる潜在力があつた。

【0102】

実施例8

低く応答する対象におけるIFN- γ SFCの検出はCyA送達により高められる

図5に示された結果に基づいて、500nMrESAT-6及びCyA-ESAT-6では50nM、及び250nMCFP-10及び25nMCyA-CFP-10を、同等な効力に基づいて、更なる実験のために選んだ。CyAによる送達(IFN- γ SFCの数を増強させるかどうかを決定するために、より大きいグループの患者及び健常な感作された対象を研究した。患者と健常な感作された対象との間にいかなる刺激に対する応答の頻度又は大きさにも差はなく、それゆえ結果を分析のために組み合わせた。68人のドナーのうち63人はrESAT-6に回答し(>10SFC/10⁶PBMC)(平均IFN- γ SFC/百万PBMCは107.7±16.2であった)、そして64人はCyA-ESAT-6に回答し(107.5±12.9);52人はrCFP-10に回答し(104.4±14.3)そして62人はCyA-CFP-10に回答した(94.9±11.3)。かくして、組換え体又はトキソイドによるPBMCの刺激の後のIFN- γ SFCの頻度間の全体の差は明白ではなかった。しかしながら、CFP-10に回答する対象の割合は76.4から91.1%に増加した。

【0103】

10

20

30

40

50

対象の応答が、組換え抗原に対するそれらの応答に従って、低い ($< 50 \text{ IFN} - \text{SFC} / 10^6 \text{ PBMC}$)、中間 ($> 50 < 100 \text{ IFN} - \text{SFC} / 10^6 \text{ PBMC}$) 又は高い応答者 ($> 100 \text{ SFC} / 10^6 \text{ PBMC}$) に分析されたとき、低い応答者のグループにおける明らかな増強が見られた。かくして、検出された $\text{IFN} - \text{SFC} /$ 百万の平均数は、 $\text{ESAT} - 6$ では 26.1 ± 2.7 から 48.2 ± 7.3 ($n = 27$ 、 $p = 0.009$) に増加し、 $\text{CFP} - 10$ の場合には 17.5 ± 2.6 から 36.8 ± 4.3 ($n = 34$ 、 $p = 0.0002$) に増加した (図6)。興味深いことに、 $r\text{CFP} - 10$ に応答しなかった10人のドナーの PBMC は $\text{CyA} - \text{CFP} - 10$ による刺激の後に $\text{IFN} -$ を産生した (平均 $\text{IFN} - \text{SFC} /$ 百万 37.8 ± 8.2)。これは、検出された $\text{CFP} - 10$ 特異的 $\text{IFN} - \text{SFC}$ の全体の数も、 $\text{ESAT} - 6$ について最初に見られていたとおり (図5) 増加させることができたことを示す。

10

【0104】

実施例9

$\text{CD}4^+$ 及び $\text{CD}8^+$ 応答は CyA 送達により高めることができる

CyA トキソイドを認識した T 細胞サブセットを規定するために、 PBMC からの $\text{CD}4^+$ 又は $\text{CD}8^+$ T 細胞を先に免疫磁性枯渇を行うことにより集団を濃縮した (enriched)。残りの細胞を ELISPOT アッセイにおいてセットアップし、そして $\text{ESAT} - 6$ 又は $\text{CFP} - 10$ 及び同じ抗原を組み込む解毒した CyA で一晩刺激した。8人のドナーを $\text{CyA} - \text{ESAT} - 6$ について試験し、5人のドナーを $\text{CyA} - \text{CFP} - 10$ について試験し、そして対応する組換え抗原について試験した。 $\text{CD}4^+$ 及び $\text{CD}8^+$ 応答の両方共組換え抗原に対して見られ、 $\text{CD}4^+$ が優勢であった (図7)。組換え抗原に対する応答と比較すると、 CyA トキソイドに対する応答は、3つの例で $\text{CD}4$ に向けてシフトし、2つの例で $\text{CD}8$ に向けてシフトしていた (図7)。残りの8つの場合には正味の変化はなかった。

20

【0105】

実施例10

$\text{IFN} - \text{SFC}$ の高められた検出は、 MHC を経由する提示のためにプロセッシングされなければならない CyA への抗原の共有結合会合 (covalent association) を必要とする

M. tuberculosis タンパク質が CyA に共有結合で連結されなければかどうかを決定するために、 $\text{ESAT} - 6$ をモック CyA トキソイドと混合することの効果を試験した。4人の対象からの PBMC を $\text{ESAT} - 6$ (500 nM)、 $\text{CyA} - \text{ESAT} - 6$ (50 nM) 又は $r\text{ESAT} - 6$ (500 nM) と CyA (50 nM) の混合物でセットアップした。これらの刺激剤についてのメディアン $\text{IFN} - \text{SFC} /$ 百万は、それぞれ、113、147及び58であり、これは増強が起こるためには、抗原と担体との共有結合連結が必要である (データは示されていない) ということを示している。事実、 $r\text{ESAT} - 6$ の CyA との単純な混合物は、 $r\text{ESAT} - 6$ に対する応答を実際には減少させたかも知れないと思われる。

30

【0106】

次に、 CyA トキソイドを認識した $\text{CD}4^+$ 及び $\text{CD}8^+$ T 細胞が MHC クラス I 又はクラス II 拘束性であるかどうかを決定した。 $\text{CD}4$ 又は $\text{CD}8$ を欠乏させた細胞を ELISPOT プレート上にセットアップし、そして $\text{CyA} - \text{ESAT} - 6$ (5人のドナー) 又は $\text{CyA} - \text{CFP} - 10$ (4人のドナー) で刺激した。抗 MHC クラス I ブロッキング抗体、抗 MHC クラス II ブロッキング抗体、又はアイソタイプコントロール (すべて $5 \mu\text{g/ml}$ で) を選ばれたウエルに加えそしてプレートを一晩インキュベーションした。 $\text{CyA} - \text{ESAT} - 6$ 及び $\text{CyA} - \text{CFP} - 10$ に応答する $\text{CD}4$ 枯渇した ($\text{CD}8$ と解釈される) T 細胞の $\text{IFN} -$ 応答はそれぞれ抗 MHC クラス I 抗体により 48% 及び 83% 阻害された (図8A及びC)。 $\text{CD}8$ 枯渇した ($\text{CD}4$ と解釈される) T 細胞応答は、抗 MHC クラス II 抗体により 62% 及び 88% 阻害された (図8B及びD)。アイソタイプコントロール抗体は認識に対する効果を持たなかった (データは示されていない)

40

50

）。更に、クロロキンは、CyaA - ESAT - 6及びCyaA - CFP - 10トキソイドに対するCD4応答をそれぞれ77%及び84%阻害した(図8B及びD)。これらのデータは、一緒になって、CyaAトキソイドとして送達されたM. tuberculosis抗原に対する応答は抗原プロセッシングを必要とすること、及び挿入されたM. tuberculosis分子のMHC認識は古典的拘束性である(classically restricted)ことを示す。

【0107】

実施例11

CyaA - CFP - 10に対する応答は、簡単な全血IFN - 産生アッセイにおいても高められる

全血培養物の上清中に分泌されたIFN - の検出は、より少ない血液を必要とし、そしてex - vivoIFN - ELISPOTアッセイよりも現場条件に潜在的により多く適用可能である。しかしながら、このような全血アッセイは、特異性を保持しているが、ELISPOT検出よりも感度が低いと思われる。ゆえに、ESAT - 6又はCFP - 10を有するCyaAトキソイドに対する高められた応答がこの欠陥を補償することができるかどうかを検査した。33人の患者及び健常な感作された対象を、IFN - 産生について2つのリードアウトアッセイ(read-out assay)を使用して並行して試験した。すべての33人のドナーはrESAT - 6に反応し、そして31人のドナーは、rCFP - 10に反応した。CyaA - ESAT - 6及びCyaA - CFP - 10に対するELISPOT及び全血IFN - 反応は正の相関があった($r =$ それぞれ、0.58及び0.64、両場合に $p < 0.001$ 、図9A)。ドナーは、全血アッセイにおいて、遊離抗原に対するそれらの反応に従って、低い(< 250 pg/ml IFN -)、中間($250 \sim 1000$ pg/ml IFN -)又は高い反応者(> 1000 pg/ml IFN -)に層別化される。結果は、ELISPOTアッセイにより見出されたとおり抗原認識に対するCyaA送達の同様な効果を示した。かくして、低く反応する対象では、CyaA - CFP - 10の存在下に産生されるIFN - の量は、遊離rCFP - 10の存在下におけるよりは平均して 27.7 ± 9.5 倍高かった($p = 0.021$ 、図9B)。CyaA - ESAT - 6に対する反応は同じ一般的傾向を示したが(平均 5.6 ± 3.2 倍)、この効果は統計的有意には達しなかった。

【0108】

実施例12

マイコバクテリアでプライミングされたT細胞のr - CyaA - ESAT - 6による特異的及び有効なin vitro刺激

M. tuberculosisのRD1染色体領域を安定に補充された、 1×10^6 又は 1×10^7 CFUのBCG株(BCG::RD1と呼ばれる)(Pym, 2002; Pym, 2003)で感染させた(皮下又は静脈内)C57BL/6マウスの脾細胞は、ESAT - 6:1~20ペプチド又はrCyaA - ESAT - 6構築物によりin vitro刺激すると十分なレベルのIFN - を産生した(図10)。産生されたこれらのIFN - レベルはM. tuberculosisの精製されたタンパク質誘導体(PPD)による刺激後に産生されたIFN - レベルに匹敵していたことは注目する価値がある。このT細胞反応の特異性は、(i)無関係のMal - E:40~54ペプチド又はr - CyaA - OVA:257~264ネガティブコントロールによるこれらの細胞の刺激はIFN - の放出を誘発しなかった及び(ii)コントロールBCGで感染したマウスの脾臓細胞(BCG::pYUB412)はESAT - 6:1~20又はr - CyaA - ESAT - 6によるin vitro刺激後に検出可能なIFN - を産生しなかったという観察により確立された(図10)。

【0109】

マウス、感染、免疫感作。雌の、特異的病原体を含まないBALB/c(H - 2^d)又はC57BL/6(H - 2^b)マウス(Iffa Credo, L'Arbresle, France)を6~12週齢で使用した。マウスを 1×10^6 又は 1×10^7 CFU/マウスのBCG::RD1で感

10

20

30

40

50

染させ、そしてPasteur Instituteの動物施設におけるA B L - 3 バイオハザード条件においてアイソレーターにおいて維持した。T細胞応答を感染の3～4週間後に調べた。r - C y a Aによるマウス免疫感作は、P B S中の適切なr - C y a A 10又は50 µgによる1回又は2回静脈内注射により行われた。T細胞応答を免疫感作の10～12週間後に調べた。

【0110】

T細胞増殖及びサイトカイン産生アッセイ。脾臓細胞又はリンパ節細胞の単一細胞懸濁液を、種々の濃度の合成ペプチド (Neosystems, Strasbourg, France) 又は1～10 µg/mlのr - C y a Aの存在下に、2mM - グルタミン、100 IUペニシリン/ml及び100 µgストレプトマイシン/mlを補充された合成HL - 1培地 (BioWhittaker, Walkersville, MD) 中で96ウエル平底プレート上にプレートした(1×10⁶細胞/ウエル)。リンパ増殖アッセイ (lymphoproliferation assays) のために、培養物を1 µCi [メチル - ³H] - チミジン (ICN, Orsay, France) で16時間パルスしそして細胞をcpm計数のために回収した。

10

【0111】

サイトカインアッセイのために、培養上清を、IL検出のため48時間に集めそして他のサイトカインのために72時間に集めた。標準CTL - 2バイオアッセイを使用してIL - 2を定量した。捕捉モノクローナル抗体として、それぞれ、BVD4 - 1D11、TRFK5及びR4 - 6A2並びにビオチン - コンジュゲートドBVD6 - 24G2、TRFK4及びXMG1.2モノクローナル抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA) を使用するサンドイッチELISAにより、IL - 4、IL - 5及びIFN - を定量した。組換えマウスサイトカイン (BD Pharmingen) により標準曲線を得た。

20

【0112】

実施例13

本発明の使用の範囲を証明するための物質及び方法

マウス。Iffa CREDO (L'Arbresle, France) からの雌のC57BL/6 (H - 2^b) マウスを6～10週齢で使用した。C57BL/6バックグラウンドへの雌のTAP1ノックアウトマウス (Van kaer, L., et al., 1992) はA.Bandeira (Institut Pasteur, Paris, France) からの寄贈品でありそして我々の動物施設において繁殖させた。

【0113】

ペプチド及びタンパク質。それぞれ、オボアルブミン残基257～264 (Bevan, M.J., 1976) を包含するCD8⁺T細胞エピトープ及びE . c o l i M a l Eタンパク質残基100～114 (REF) に相当するCD4⁺T細胞エピトープに相当する、合成ペプチドS I I N F E K L及びN G K L I A Y P I A V E A L SをNeosystem (Strasbourg, France) から購入した。M a l Eタンパク質は、親切にも、J.M.Clement (Institut Pasteur) により提供され、そしてオボアルブミンはSigma (Saint-Quentin Fallavier, France) から購入した。両者を1mg/mlでP B S中に溶解した。

30

【0114】

挿入されたCD4⁺M a l E及びCD8⁺O V Aエピトープを有する組換えC y a A毒素の構築、産生及び精製

40

M a l E及びO V Aエピトープを同時に有するC y a Aタンパク質をコードするハイブリッドC y a A対立遺伝子を構築するために、pT7CAT1由来のプラスミドの組にコードされそしてそれぞれCD4⁺M a l Eエピトープ (Loucka, J., et al) 又はCD8⁺O V Aエピトープ (Osicka, R., et al., 2000) をコードするオリゴヌクレオチドインサートを有するC y a A対立遺伝子の組換えのために、C y a A対立遺伝子に沿った適切な独特の制限部位を使用した。C y a A遺伝子における両オリゴヌクレオチドの挿入及び配向 (orientation) は、プラスミドの制限分析により立証され、対応する発現されたC y a Aタンパク質の長さは、7.5% SDS - PAGEにより立証された。この研究で使用された組換えC y a Aは、アミノ酸108と109の間にN G K L I A Y P I A V E A L S配列を有し (C y a A - M a l E)、アミノ酸336と337の間にS I I N F E K L

50

配列を有し (C y a A - O V A) を、又はそれらのそれぞれの挿入部位に両配列を有する (C y a A - M a l E - O V A) 。すべての構築物を残基 1 8 8 と 1 8 9 の間にジペプチド配列の挿入により遺伝子的に解毒された。

【 0 1 1 5 】

E . c o l i X L - 1 B l u e 株 (Stratagene) を、p T 7 C A C T 1 に由来しそして A C T (Osicka,R., et al.,2000) 翻訳後のアシル化のために必要なアクセサリ-遺伝子 c y a C を含有する構築されたプラスミドにより形質転換した。細胞を先に記載されたようにして成育させ (Osicka,R., et al.,2000) 、そして組換えタンパク質の発現を、1 mM I P T G の添加により誘発した。C y a A タンパク質を 8 M 尿素で抽出し (Sebo, P., et al., 1991) 、そして D E A E - セファロース及びフェニルセファロースクロマトグラフィーにより精製した (Karimova,G., et al., 1998) 。精製された毒素の均一性は、7 . 5 % S D S - P A G E により証明された。精製された組換え C y a A タンパク質濃度は、B r a d f o r d 法により決定された。

10

【 0 1 1 6 】

C y a A E 5、インサートなしの遺伝的に解毒された C y a A は、親切にも D.Ladant (Institut Pasteur) により提供され、そしてネガティブコントロールとして使用された。

【 0 1 1 7 】

培養培地。完全培地は、1 0 % ウシ胎児血清 (Valbiotech, Paris, France) 、2 - M E 5 × 1 0 ⁻⁵ M 及び抗生物質 (ペニシリン 1 0 0 U / ml、ストレプトマイシン 1 0 0 μ g / ml) を補充された L - アラニル - L - グルタミンジペプチドを含有する R P M I 1 6 4 0 からなっていた。

20

【 0 1 1 8 】

細胞系。E . c o l i から M a l E タンパク質の 1 0 0 ~ 1 1 4 配列に特異的な、H - 2 ^b 拘束性ハイブリドーマ C R M C 3 を、先に記載されたとおりに (Lo-Man, et al., 2 0 0 0) 我々の実験室で発生させ、そして C M 地に維持した。B 3 Z (karttunen, J., et al., 1992) 、K ^b 拘束性 O V A 2 5 7 - 2 6 4 ペプチドに特異的な C D 8 ⁺ T 細胞ハイブリドーマは、N.Shastri (University of California, Berkeley, CA) から寛大な贈与物であり、そして C M に G 4 1 8、1 mg/ml 及びヒグロマイシン B 4 0 0 μ g/ml を加えることにより維持された。E L - 4 5 t h y m o m a は、American Type Culture Collection (Manassas, Va) から得られそして C M 中に維持された。

30

【 0 1 1 9 】

B M D C 発生。B M D C s を先に記載されたとおりに (Inaba, K., et al., 1992) 骨髄前駆体から発生させた。簡単に言えば、C 5 7 B L / 6 又は T A P 1 ノックアウトマウスからの骨髄細胞を、回収し、洗浄しそして、G M C S F 含有上清 1 % を有する C M 中で 2 . 1 0 ⁵ 細胞 / ml で平板培養した。7 % C O ₂、3 7 ° で 3 日間の培養後に、培地をプレートに加えた。非接着性及び半接着性細胞を、P B S E D T A (5 mM) でプレートをフラッシュすることにより 7 日目又は 8 日目に回収し、そして使用前に洗浄した。回収された細胞は、通常、すべて C D 1 1 b を発現した C D 1 1 c ポジティブ細胞 6 0 ~ 7 0 % を含有していた。これらの B M D C s は C D 4 0 ⁺ 及び C D 8 6 ⁺ であった。

40

【 0 1 2 0 】

抗原提示アッセイ。C R M C 3 又は B 3 Z T 細胞ハイブリドーマ (1 0 ⁵ 細胞 / ウエル) の刺激を、9 6 ウエル培養プレートにおいて B M D C s (1 0 ⁵ 細胞 / ウエル) の存在下に 1 8 時間細胞培養物の上清中の I L - 2 放出をモニタリングした。大抵の実験において、B M D C s は種々の濃度のタンパク質又はペプチドで 4 ~ 5 時間パルスされ (pulsed) (図の説明参照) 、そして洗浄した後に C M 0 . 2 ml 中の 1 0 ⁵ T 細胞ハイブリドーマを加えた。薬物阻害アッセイでは、B M D C s を、パルスされた後に 0 . 0 5 % グルタルアルデヒド (Sigma) で固定し、洗浄し、次いでハイブリドーマを加えた。1 8 時間後に、培養上清を - 8 0 ° で少なくとも 2 時間凍結させた。次いで、I L - 2 依存性 C T L - L 細胞系 1 0 ⁴ 細胞 / ウエルをこれらの上清 1 0 0 μ l で培養した。4 8 時間後に、[³ -

50

H]チミジン(50 μ Ci/ml, ICN, Orsay, France)をウエルに加えそして細胞を自動化細胞回収器(automated cell harvester)(Skatron, Iier, Norway)で6時間後に回収した。組み込まれたチミジンをシンチレーション計数により検出した。すべての実験で、各点は二重に(in duplicate)行われた。

【0121】

阻害剤及び抗体。シクロヘキシミド(CHX、5 μ g/mlで使用した)、プレフェルジンA(BFA、5 μ g/ml)、サイトカラシンB(CCB、5 μ g/ml)、ロイペプチン(50 μ g/ml)、ペプスタチン(50 μ g/ml)、クロロキン(50及び150 μ M)、N-アセチル-L-ロイシナル-L-ノルロイシナル(LLnL、12 μ g/ml)及びN-アセチル-L-ロイシナル-L-メチオニナル(LLmL、12 μ g/ml)は、すべてSigma-Aldrich(Saint-Louis, MO)からのものであり、そして製造者の助言に従って適切な溶媒中に溶解した。ラクタシスチン(Biomol, research Labs., Inc., Plymouth Meeting PA)を1mg/mlで水に溶解しそして10 μ M最終で使用した。マウスCD11b(M1/70, rat IgG2b, K)に対して特異的な精製したmAbs及び対応するアイソタイプコントロールは、Pharmingen(Le Pont de Claix, France)から購入しそして10 μ g/mlで使用した。

10

【0122】

阻害の研究。阻害の研究のために、BMDCsを、最初に、7%CO₂、37°CでCM0.1ml中で1時間薬物又は抗体とインキュベーションした。次いでAggsを阻害剤の連続的存在下に、図の説明に示された最終濃度でCM0.1ml中に加えた。抗CD11b又はアイソタイプコントロール抗体を使用するアッセイにおいて、差細胞をAggs及び抗体の両方との5時間のインキュベーションの後に3回洗浄し、そして10⁵T細胞ハイブリドーマを加えた。薬物を使用するアッセイでは、細胞を5時間のインキュベーションの後に洗浄し、そして37°Cで2分間グルタルアルデヒド0.05%(Sigma)及びリシン0.2M(Sigma)を使用して固定した。3回洗浄した後、T細胞ハイブリドーマを0.2mlCM中にウエルに加えた。

20

【0123】

低張性ショック(hypotonic shock)の後のK⁺欠乏によるクラスリン媒介エンドサイトーシスの阻害のために、DC(10⁵/ウエル)を、5 \times 10⁻⁵M2-ME、100U/mlペニシリン及び100 μ g/mlストレプトマイシンを補充された血清を含まない合成OptiMEM培地(Life Technologies)中で30分間インキュベーションした。次いで、DCsを、低張性培地(OptiMEM培地及び超純粋H₂O、50/50)中で5分間、そして最後に、K⁺不含有(140mMNaCl、20mMHEPES-NaOH、1mMCaCl₂、1mMMgCl₂、1mg/mlグルコース及び0.5%BSA)又はK⁺含有(10mMKCl、130mMNaCl、20mMHEPES-NaOH、1mMCaCl₂、1mMMgCl₂、及び0.5%BSA)において30分間インキュベーションした。Aggsを図の説明に指示された濃度でウエルに加え、1時間後に、DCsをPBS中で洗浄し、そしてCMを4時間加えてAggプロセッシングを可能とした。DCsを洗浄し、先に記載されたようにして固定し、そしてT細胞ハイブリドーマを18時間ウエルに加えた。

30

【0124】

マウス免疫感作。C57BL/6マウスに、PBS0.1ml中に希釈されたCyA-OVA、CyA-MalE、CyA-MalE-OVA又はCyAE5、50 μ gを静脈内注射した。

40

【0125】

in vitro細胞傷害性アッセイ

免疫感作されたマウスからの脾臓細胞を、CyA注射の7日後に単離し、そして同系の照射されたナイーブ脾臓細胞の存在下に、OVA₂₅₇₋₂₆₄ペプチド(1 μ g/ml)により5日間in vitro再刺激した。細胞傷害性活性を、先に記載されたように(Fayolle, C., et al., 1996)5時間のin vitro [⁵¹Cr]-放出アッセイにおいて決定した。簡単に言えば、OVA₂₅₇₋₂₆₄ペプチド50 μ MをロードされたEL4(H-2^b

50

腫瘍細胞を H - 2^b エフェクター細胞のための標的細胞として使用した。種々のエフェクター対標的比を使用しそしてすべてのアッセイを二重に行った。各アッセイにおいて、ペプチドの不存在下にインキュベーションされた E L - 4 細胞を、非特異的溶解のためのコントロールとして使用した。各ウエルにおける [⁵¹Cr] - 放出を、マイクロベータトリラックス液体シンチレーションカウンター (MicroBeta Trilux liquid scintillation Counter) (Wallac, Turku, Finland) を使用して計数した。特異的溶解の百分率は、 $100 \times (\text{実験での放出} - \text{自然に起こる放出}) / (\text{最大放出} - \text{自然に起こる放出})$ として計算された。最大放出は、標的細胞に 10% Triton X - 405 を加えることにより得られ、そして自然に起こる放出は C M 中でインキュベーションされた標的細胞により決定された。

10

【0126】

サイトカイン E L I S A アッセイ。免疫感作されたマウスからの脾臓細胞を、M a l E₁₀₀₋₁₁₄ 又は O V A₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド 1 μg/ml の存在下又は不存在下に *in vitro* で再刺激し、そして培養上清を 72 時間後に回収した。次いで、I L - 4、I L - 5 及び I F N - 濃度を、標準サンドイッチ E L I S A によりこれらの上清において測定した。マキシソーププレート (Maxisorp plates) (Nunc, Roskilde, Demark) を、コンジュゲート化されていない (unconjugated) 抗 I L - 4、抗 I L - 5、又は抗 I F N - 捕捉抗体 (それぞれ、B V D 4 - 1 D 1 1、T R F K 5、R 4 - 6 A 2 クローン、Pharmingen) でコーティングし、そして対応するビオチニル化 m A b (B V D 6 - 2 4 G 2、T R F K 4、X M G 1. 2 クローン、Pharmingen) を使用して検出を行った。プレートをストレプトアビジン - H R P (Pharmingen) 及び基質として o - フェニレンジアミン (Sigma-Aldrich) を使用して展開した。すべての投与量を二重に行った。アッセイを組換えマウスサイトカイン (Pharmingen) で標準化し、そして結果を pg/ml で表す。

20

【0127】

実施例 14

C y a A - M a l E は、M H C クラス I I 提示経路への C D 4⁺ T 細胞エピトープ送達において M a l E タンパク質より有効である

レポーターとして M a l E C D 4⁺ T 細胞エピトープを使用して、組換え C y a A - M a l E は、脾臓細胞の M H C クラス I I 提示経路に N G K L I A Y P I A V E A L S M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチドを送達することが以前に示された (Loucka, J., et al., 2000) 。 M a l E タンパク質に比べてこの送達の有効性を次に評価した。C D 1 1 b ポジティブである (データは示されていない) B M D C s を使用して、位置 1 0 8 に M a l E N G K L I A Y P I A V E A L S C D 4⁺ T 細胞エピトープを有する C y a A の提示を M a l E タンパク質と比較した。A P C s を各タンパク質の段階希釈物とインキュベーションし、そしてそれらの表面における I - A^b - N G K L I A Y P I A V E A L S 複合体の出現を、C R M C 3、この M H C - ペプチド複合体に対して特異的な C D 4⁺ T 細胞ハイブリドーマ、によりモニタリングした (Lo-Man, R., et al., 2000)。予想されるとおり (図 1 1 A)、C y a A - M a l E とインキュベーションされた B M D C s は、C R M C 3 による I L - 2 分泌を有効に刺激した。更に、C y a A - M a l E と同じレベルの T 細胞ハイブリドーマ刺激に達するためには、1 0 0 倍高い濃度の M a l E タンパク質が必要であった。脾臓細胞で先に示されたとおり (Loucka, J., et al., 2002)、C y a A - M a l E とインキュベーションされた B M D C s はまた、C R M C 3 を刺激することにおいて、遊離 M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチドをロードされた B M D C s よりも 1 0 倍有効でもあった。

30

40

【0128】

この増強は、C y a A 又は C y a A 組成物中のある成分の非特異的刺激効果によるものであることを排除するために、B M D C s を、一定濃度の C y a A E 5 又は C y a A - O V A 及び種々の濃度の M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド又は M a l E タンパク質とインキュベーションした。次いで C R M C 3 への I - A^b - N G K L I A Y P I A V E A L S 複合体提示の有効性をモニタリングした。図 1 B に示されたとおり、M a l E 1 0 0 - 1 1 4 ペ

50

チド又はM a l Eタンパク質提示の増強は、C y a A E 5又はC y a A - O V Aの存在下では観察されなかった。これらの結果は、C y a Aにより送達されたC D 4 + T細胞エピトープのM H CクラスI I拘束された提示の増強は、C y a A又は汚染物によるB M D C活性化よるものではないことを確認する。

【0129】

実施例15

C y a A - M a l E - O V Aは、M H CクラスI及びI I提示のためのモデルC D 4 +及びC D 8 + T細胞エピトープを同時に送達する

先のレポートにおいて、3つの異なるC D 8 + T細胞エピトープを有するC y a Aは、これらのエピトープに対してi n v i v o保護C T L応答を同時に誘発することが示された(Fayolle, C., et al., 2001)。ゆえに、C y a Aは、B M D C sにC D 4 +及びC D 8 + T細胞エピトープの両方を送達して、特異的T細胞ハイブリドーマにA g提示することができるかどうかを決定した。ゆえに、C y a A - M a l E - O V A、即ち、M a l E(クラスI I拘束性)及びO V A(クラスI拘束性)エピトープの両方を有する組換えC y a Aを、提示アッセイにおいてC y a A - M a l E及びC y a A - O V Aと比較した。この比較を可能とするために、M a l E C D 4 + T細胞エピトープを、C y a A - M a l E及びC y a A - M a l E - O V Aのアミノ酸108と109の間に挿入した。O V A C D 8 + T細胞エピトープを、C y a A - O V A及びC y a A - M a l E - O V Aのアミノ酸336と337の間に挿入した。B M D C s上のK^b-S I I N F E K L複合体の存在を検出するために、B 3 Z、O V A₂₅₇₋₂₆₇ペプチドに対して特異的なC D 8 + T細胞ハイブリドーマ(Karttunen., J., et al., 2002)を使用した。図11A及び11Cに示されたとおり、C y a A - M a l E - O V AとインキュベーションされたB M D C sは、C R M C 3及びB 3 Z T細胞ハイブリドーマの両方を刺激した。更に、C y a A - M a l E - O V Aは、M H CクラスI I提示経路へのM a l E₁₀₀₋₁₁₄ペプチド送達においてC y a A - M a l Eと同じく有効であった。C y a A - M a l E - O V A又はC y a A - O V AのB M D C sとのインキュベーションの後の、B 3 Zへの同等なK^b-S I I N F E K L複合体提示も観察された。これらの結果は、C y a Aは、そのA Cドメインに挿入されたエピトープをM H C I及びI I分子に同時に送達すること、及び1つのエピトープの送達の有効性がC y a AのA Cドメインへの他のエピトープの挿入により影響されないことを確認する。特に、M H CクラスI I提示の増強は、O V A及びM a l Eエピトープの両方を有するC y a Aで依然として観察された。

10

20

30

【0130】

実施例16

C y a AとB M D C s上のC D 11bとの相互作用は、レポーターC D 4 + T細胞エピトープの送達の増強のために必要である

C y a A送達におけるM H CクラスI I拘束性提示の増強は、このタンパク質と、B M D C s上に発現されているそのC D 11b受容体(Guermonprez, P., et al., 2001)との特異的相互作用により説明することができる。この仮説を検定するために、B M D C sを最初に10 µg/ml抗C D 11b m A b s又は同じ濃度のアイソタイプコントロールm A b sとインキュベーションした。図2Aに示されたとおり、A P C sと抗C D 11b m A b sとの予備インキュベーションは、C y a A - M a l E - O V A送達後のC R M C 3へのM a l E₁₀₀₋₁₁₄ペプチドの提示を完全に且つ特異的に妨害した。予想されるとおり、B M D C sとm A b sとの予備インキュベーションは、ハイブリドーマへのM a l Eタンパク質の提示に影響を与えなかった。抗C D 11bとのB M D C sインキュベーションは、B 3 Zへの遊離O V A₂₅₇₋₂₆₄ペプチド提示に影響を与えることなく、C y a A - O V A - M a l EからのK^b-S I I N F E K L複合体の発生を阻止することも確認された(図12B)。これらの結果は、C y a AがM H CクラスI及びクラスI I経路の両方に送達される高い有効性がC y a A - C D 11b特異的相互作用に依存していることを示す。

40

【0131】

50

実施例 17

Cy a A - M a l E - O V A による M H C クラス I I 提示経路への M a l E ペプチド送達
は、プロテアソーム活性も T A P トランスポーターも必要としない

先の研究は、C D 1 1 b との C y a A の相互作用は、標的細胞の細胞質ゾルへの直接の
A C ドメイントランスロケーションをもたらすことを証明した。このドメインをその後
にプロセッシングして M H C クラス I 拘束性提示のためのペプチドを発生させることは、
プロテアソームを必要としそして T A P トランスポーターに依存する (Guermonprez, P., e
t al., 1999)。ある内因性 A g s は、プロテアソーム及びカルパインを必要とする別の
経路による M H C クラス I I 提示のために細胞質ゾルにおいてプロセッシングされること
が報告された (Ilich., J.D., et al., 2000)。次いで、細胞質ゾル中に放出されたペプ
チドは、あまり理解されていない機構に沿ってエンドサイトーシス区画に輸送される。ゆ
えに、C R M C 3 への M H C クラス I I 拘束性 M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド提示のための C
y a A - M a l E - O V A のプロテアソーム要求を試験した。B M D C s を、ラクタシス
チン、20S プロテアソーム阻害剤 (fenteany, G., et al., 1995; Craiu, A., et al.,
1997) と 1 時間インキュベーションし、次いで A g s を加えた。

【0132】

図 1 3 A に示されたとおり、プロテアソーム活性の阻害は、I - A^b - M a l E₁₀₀₋₁₁₄
複合体形成及び C R M C 3 への提示を妨げなかった。予測されるとおり、遊離ペプチド及
び M a l E タンパク質は、ラクタシスチンで処理された B M D C s により依然として提示
された。対照的に、C y a A - M a l E - O V A 送達による O V A₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド提示
は、ラクタシスチンにより完全に妨げられた (図 1 3 B)。

【0133】

次いで、B M D C s による C R M C 3 への M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド提示に対する L L
n L (カテプシン及びプロテアソーム阻害剤) 及び L L m L (カテプシン阻害剤) に対す
る効果を比較した。図 1 3 に示されたとおり、両阻害剤は、C y a A - M a l E - O V A
送達による M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド提示を阻止した。これは、このプロセッシング経路
におけるカテプシン L 又は B に対する要求を証明した。コントロールとして、L L n L は
C y a A - M a l E - O V A 送達後に B 3 Z への O V A ペプチド提示を阻止したが、L
L m L は阻止しなかった。かくして、B M D C へのそのエンター後、C y a A A C ド
メインは、プロテアソーム活性を必要としないが、エンドサイトーシス経路の 2 つのシス
테인プロテアーゼであるカテプシン L 又は B に依存する機構により、プロセッシングさ
れて M H C クラス I I 拘束性提示のためのペプチドを発生する。

【0134】

A C ドメインからのクラス I 及び I I エピトープのプロセッシングが、A P C s への A
C ドメイン送達後に異なる経路をたどることを更に確認するために、M H C クラス I I 分
子による C y a A 提示のための T A P 要求を試験した。B M D C s を T A P 1 ノックアウ
トマウスから発生させそして C R M C 3 への提示アッセイに使用した。図 1 3 C に示され
たとおり、C y a A - M a l E - O V A は、W T 及び T A P 1 ノックアウト B M D C s の
M H C クラス I I 提示経路に M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチドを有効に送達した (Van kaer, L.,
et al.)。予測されるとおり、M H C クラス I I 分子への M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド送達
もまた、M a l E タンパク質又は M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチドが A g s として使用されると
き、T A P トランスポーターに依存しなかった。先に公表されたとおり (Guermonprez, P.,
et al.)、B M D C s M H C クラス I 提示経路への C y a A - M a l E - O V A 送達は
、A P C s において T A P 1 トランスポーターの存在を必要とすることが示された (図 1
3 D)。これらの結果は、C y a A A C ドメインからの M H C クラス I 及びクラス I I ペ
プチドの発生は、2 つの異なる経路をたどることを更に確認する。更に、C y a A - M a
l E - O V A 送達に対する M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド提示のためのカテプシン活性の要求
は、プロセッシングのエンドサイトーシス経路が C y a A 分解及び M H C クラス I I 提示
経路へのエンターの責任を有するかも知れないことを示唆する。

【0135】

10

20

30

40

50

実施例 18

MHC II 提示のための Cy a A - M a l E - O V A プロセッシングは、エンドソームプロテアーゼ及び液胞酸性化を必要とする

外因性可溶性 Ag のインターナリゼーション後に、MHC クラス II 提示のためのペプチドリガンドは、逐次に活性化されるプロテアーゼの組によるタンパク質のタンパク質分解によりエンドソーム及びリソソームにおいて発生される (V i l l a d a n g o s , J . 2001) 。 Cy a A - M a l E - O V A 送達後に M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド提示を発生させるのにカテプシン活性が必要であるので、他のエンドサイトーシスプロテアーゼが I - A^b - M a l E₁₀₀₋₁₁₄ 複合体形成のために必要であるかどうかを試験した。ロイペプチン (Umezawa, H. 1976) 、セリン及びシステインプロテアーゼの阻害剤は、Cy a A - M a l E - O V A が Ag として使用されるとき、C R M C 3 への M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド提示を完全にブロックしたが、遊離ペプチドの提示に影響を与えなかった (図 14 A) 。セリンプロテアーゼは M a l E エピトープの N - 末端を発生させるのに実際に必要でありうるということが言及されるべきである。ペプスタチン (Umezawa, H. 1976; Mizuochi, T., et al., 1994) 、アスパラギン酸プロテアーゼの阻害剤、も、Cy a A - M a l E - O V A 送達後の M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド提示を部分的に阻害した。遊離 M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド提示は、薬物の存在下に影響を受けないままであった。これらの結果は、エンドサイトーシスプロテアーゼが MHC クラス II ペプチド発生のための A C ドメイン分解に関与していることを示す。ゆえに、これらの結果は、Cy a A A C ドメインが古典的エンドサイトーシス経路に達してプロテアーゼによりプロセッシングされることを示す。

【0136】

液胞酸性化は、エンドサイトーシスプロテアーゼの逐次的活性化を制御する重要なファクターである。ゆえに、クロロキン、エンドサイトーシス小胞酸性化の阻害剤、を使用して、Cy a A 送達による M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド提示がエンドサイトーシスプロセッシング後に起こることを確認した。図 14 A に示されたとおり、クロロキンは、Cy a A - M a l E - O V A 及び M a l E タンパク質送達後の M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチドの提示を強く減少させるが、これに対して遊離ペプチド提示は影響を受けないままである。しかしながら、O V A₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド提示は、Cy a A - M a l E - O V A が Ag として使用されるとき、液胞酸性化に依存しないことが確認される (Guermonprez, P., et al., 2000a, b) 。これらの結果は、MHC クラス II 拘束性ペプチドを発生させるための B M D C s への A C ドメインプロセッシングは、液胞酸性化及びエンドサイトーシスプロテアーゼに依存していることを証明する。それらはまた、Cy a A A C ドメインが、B M D C s 細胞質ゾルに同時にトランスロケーションされることができて、プロテアソームにより更にプロセッシングされ、そして、小胞に捕捉されることができ、小胞はプロセッシングのエンドサイトーシス経路たどることも示唆する。あるいは、C D 11 b に結合した後に、Cy a A はエンドサイトーシスされ、次いで細胞質ゾルにトランスロケーションされることが可能である。

【0137】

実施例 19

Cy a A - M a l E - O V A による M a l E エピトープ送達は、プレフェルジン A によるゴルジ障害及びシクロヘキシミドによるタンパク質合成阻害に対して感受性である

A P C 表面における MHC クラス II ペプチド複合体の提示は、外因性 Ag の分解を必要とし、しかも発生したペプチドの MHC クラス II 分子との会合も必要とする (Gordon, S.V., et al., 1999) 。古典的エンドサイトーシス経路では、新たに合成された MHC クラス II 分子が必要である。これらの分子は、ゴルジをとって E R を去りそしてトランスゴルジ網 (T G N) に達し、それによりそれらはエンドサイトーシス経路に向けて送られる。

【0138】

Cy a A - M a l E - O V A 送達後の I - A^b - M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド複合体発生が新生 MHC クラス II 分子を必要とするかどうかを決定するために、シクロヘキシミド (

C H X)、タンパク質合成の阻害剤、を使用した。図 1 5 A に示されたとおり、C y a A - M a l E - O V A 又は M a l E タンパク質の添加前に C H X と予備インキュベーションされた B M D C s は、C R M C 3 による I L - 2 分泌を刺激しなかった。予測されるとおり、C H X は、T 細胞ハイブリドーマへの遊離ペプチドの提示を阻害しなかった。更に、C y a A - M a l E - O V A 送達に続く B 3 Z への O V A₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド提示もまた C H X により完全に妨害された (図 1 5 B)。かくして、新規に合成されたタンパク質が、C y a A A C ドメインに挿入された M a l E レポーター T 細胞エピトープの M H C クラス I I 拘束性提示のために必要である。

【 0 1 3 9 】

M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチドを提示する M H C クラス I I 分子がゴルジに向けてエンドソームより先に及び後で達するかどうかを決定するために、プレフェルジン A (B F A)、ゴルジ輸送の阻害剤 (Doms, R.W., et al., 1989; Pelham, H.R. 1991) を使用した。ここでも、C y a A - M a l E - O V A 又は M a l E タンパク質による B M D C s へのその送達後の M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチドの提示は、A P C s が B F A で処理されたとき完全に妨害された (図 1 5 A)。遊離ペプチドの提示は影響を受けなかった。これらの実験から、M H C クラス I I 分子の新規合成は、B M D C s が C y a A - M a l E - O V A により送達された M a l E エピトープを提示するために必要であること及びゴルジを通過して T G N に向けてのトラフィッキングは、これらの新規に合成された分子がエンドサイトーシス経路に達することを可能とすることは明らかである。

【 0 1 4 0 】

実施例 2 0

C y a A - M a l E - O V A による M a l E エピトープ送達は、アクチンフィラメント重合に依存しないがクラスリン被覆小孔を必要とする

C y a A のインターナリゼーション及びその A C ドメインに挿入された O V A ペプチドのその後の M H C クラス I 拘束性提示は、ファゴサイトーシスに依存しないことが既に示されている (Guermonprez, P., et al., 2000a, b)。しかしながら、C y a A のいくつかの分子は、他の分子が古典的外因性 A g として捕捉されそしてプロセッシングされて M H C クラス I I 拘束性ペプチドを生じようと、その A C ドメインを A P C s 細胞質中にトランスロケーションさせることは排除できない。アクチン依存性捕捉が、有効な M H C クラス I I 拘束性提示のための M a l E エピトープ送達に関係しているかどうかを最初に試験した。この実験では、サイトカラシン B (C C B)、アクチンフィラメント重合を阻止しそしてマクロピノサイトーシス、ファゴサイトーシス及びカベオレ媒介エンドサイトーシスを害する薬物 (Gottlieb, T.A., et al., 1993)、を使用した。図 1 6 に示されたとおり、C C B は、C y a A - M a l E - O V A 送達後の M a l E 又は O V A₂₅₇₋₂₆₄ ペプチドのそれぞれの特異的 T 細胞ハイブリドーマへの M a l E の提示も O V A₂₅₇₋₂₆₄ ペプチドの提示も阻害しなかった。予測されるとおり、M a l E タンパク質の提示は阻害剤により完全に妨害されたが、これに対して遊離 M a l E₁₀₀₋₁₁₄ ペプチドは依然として C R M C 3 に提示された。これらの結果は、M H C クラス I 及び M H C クラス I I 分子への A C ドメイン送達が、B M D C s による C y a A ファゴサイトーシス、マクロピノサイトーシス又はカベオレ媒介エンドサイトーシスを必要としないことを示す。

【 0 1 4 1 】

C y a A は A P C 細胞表面の C D 1 1 b と相互作用するので、C y a A がクラスリン依存性プロセスによりエンドサイトーシスされるかどうかを試験した。低張性ショック後の K⁺ 枯渇 (Larkin, J. M., et al., 1983; Madshus, I.H., et al., 1987; Bayer, N., et al., 2001) を使用して、C y a A - M a l E - O V A の M H C クラス I 及びクラス I I 提示のためにクラスリン被覆小孔が必用であるかどうかを試験した。低張性ショック後の K⁺ 枯渇を低張性媒体への B M D C s 暴露により行い、次いで細胞外カリウムの不在下にインキュベーションした。この処理は、形質膜からのクラスリン被覆の解離及び細胞質中のクラスリンケージ (clathrin cages) の非生産性センブリー (nonproductive assembly) をもたらず。ゆえに、細胞質アミノ酸配列を介して A P 2 クラスリンアダプター

複合体と相互作用する膜タンパク質のインターナリゼーションは損なわれる。図16に示されたとおり、CyaA-MalE-OVA送達後のMalE₁₀₀₋₁₁₄及びOVA₂₅₇₋₂₆₄ペプチドのそれぞれのT細胞ハイブリドーマへの提示の両方ともK⁺枯渇により完全に妨害されたが、MalEタンパク質又は遊離ペプチド提示は阻害されなかった。

【0142】

これらの結果は、CyaA-MalE-OVAクラスリン媒介エンドサイトーシスは、クラスI及びクラスII拘束性提示の両方のために必用であることを証明する。これは、驚くべきことである。何故ならば、CyaAは、エンドサイトーシスされることなく、そのACドメインを形質細胞膜から細胞質ゾルに直接トランスロケーションさせると考えられたからである。その代わりに、これらの結果は、CyaAACドメインがクラスリン被覆小胞から、そのエンドサイトーシス後にトランスロケーションされることを示唆する。

10

【0143】

実施例21

CyaA-MalE-OVAは、*in vivo*でのOVA特異的CD8⁺T細胞応答及びMalE特異的CD4⁺T細胞応答を誘発する

種々のCD8⁺T細胞エピートープに対するCTL応答 (Fayolle, C., et al. 2001) 及びMalE CD4⁺T細胞エピートープに対する増殖応答 (Loucka, J., et al., 2002) を誘発するためのCyaAの高い有効性は既に証明されている。CyaAがAg提示のためにBMDCsにCD4⁺及びCD8⁺T細胞エピートープの両方を送達するための効力のあるピークルであることを証明する*in vitro*研究の後、これらのエピートープの同時の*in vivo*送達におけるCyaA-MalE-OVAの有効性を試験した。マウスを、アジュバントなしで、CyaA-MalE、CyaA-OVA、CyaA-MalE-OVA、又はCyaAE5、50 µgにより静脈内経路により免疫感作させた。T細胞応答を注射の7日後にモニタリングした。

20

【0144】

CD8⁺T細胞応答のリードアウトとして、OVA₂₅₇₋₂₆₄ペプチドをロードされた標的細胞に対する免疫感作されたマウスからの脾臓細胞の細胞傷害性活性を試験した。図17Aに示されたとおり、CyaA-MalE-OVA及びCyaA-OVAの両方ともOVAエピートープに対する特異的CTL応答を誘発した。予測されるとおり、マウスがCyaA-MalE又はCyaAE5を受け取ったとき応答は検出されなかった。CyaAでブラッキングされたT細胞によるサイトカイン分泌も分析した。免疫感作されたマウスからの脾臓細胞を対応するペプチドで再刺激するか又は対応するペプチドなしで再刺激し、そして72時間培養上清中のIFN- γ 及びIL-5特異的分泌をELISAによりモニタリングした。LCMVエピートープについて先に報告されたとおり (Dadaglio, G., et al., 2000)、CyaA-OVAは、強いIFN- γ 産生により特徴付けられた、IL-5分泌のない、Th-1様分極化されたOVA特異的T細胞応答 (Th1-like polarized OVA-specific T cell response) を誘発した (図17C)。IL-4及びIL-10はこれらの培養上清中で検出されなかった。これらの結果は、CyaA-MalE-OVAは、Th-1分極化されたCD8⁺T細胞応答の*in vivo*誘発のためにCyaA-OVAと同じく免疫原性であることを示す。

30

40

【0145】

CyaA-OVAと比較してCyaA-MalE-OVAにより誘発されたCD4⁺T細胞応答も分析した。リードアウトとして、MalE₁₀₀₋₁₁₄ペプチドで*in vitro*再刺激された脾臓細胞のサイトカイン分泌をモニタリングした。図17Bに示されたとおり、CyaA-MalE-OVA又はCyaA-MalEの両方共免疫脾臓細胞による特異的IFN- γ 分泌を誘発した。IL-5分泌も、4つの実験のうち3つの実験で検出されたが、そのレベルは非常に低く (図17B参照)、これは、CyaAにより誘発されたCD4⁺T細胞応答は、主としてCD8⁺T細胞応答と同様にTh-1分極化されていることを示す。ここでも、IL-10又はIL-4は上清中に検出できなかった。

50

【0146】

これらの結果は、*in vivo* T細胞プライミングのためのクラスI及びクラスIIエピトープの両方を同時に送達するためのCyaAの能力を更に確認する。更に、このような同時送達の有効性は単一エピトープ送達と同様であり、そしてCD4⁺及びCD8⁺T細胞応答の両方共、Th1分極化されていると思われる。

【0147】

更に、ESAT-6 (Rv3875、95アミノ酸)又はCFP-10 (Rv3874、100アミノ酸) M. tuberculosisゲノム配列は、CyaAにより送達されることができ、そしてCyaAはM. tuberculosis特異的IFN- γ 産生細胞の用量-応答又は検出頻度に影響を与え、これはTBの免疫診断を高める。

10

【0148】

参考文献

下記の参考文献を本明細書で引用する。各参考文献の全体の開示は、本明細書で頼りとされ、そして本明細書に引用により組み込まれる。

【0149】

【表 4】

1. 2000. Control and prevention of tuberculosis in the United Kingdom: code of practice 2000. Joint Tuberculosis Committee of the British Thoracic Society. *Thorax* 55:887-901.
2. Arend, S.M., Andersen, P., van Meijgaarden, K.E., Skjot, R.L., Subronto, Y.W., van Dissel, J.T., and Ottenhoff, T.H. 2000. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early- secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *J Infect Dis* 181:1850-1854. 10
3. Arend, S.M., van Meijgaarden, K.E., de Boer, K., de Palou, E.C., van Soolingen, D., Ottenhoff, T.H., and van Dissel, J.T. 2002. Tuberculin skin testing and in vitro T cell responses to ESAT-6 and culture filtrate protein 10 after infection with *Mycobacterium marinum* or *M. kansasii*. *J Infect Dis* 186:1797-1807. 20
4. Ballard, J. D., R. J. Collier, and M. N. Starnbach. 1996. Anthrax toxin-mediated delivery of a cytotoxic T-cell epitope in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93:12531.
5. Bayer, N., D. Schober, M. Hutterer, D. Blaas, and R. Fuchs. 2001. Inhibition of clathrin-dependent endocytosis has multiple effects on human rhinovirus serotype 2 cell entry. *J Biol Chem* 276:3952. 30
6. Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., and Small, P.M. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284:1520-1523.
7. Berthet, F.X., Rasmussen, P.B., Rosenkrands, I., Andersen, P., and Gicquel, B. 1998. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a 40

novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 144:3195-3203.

8. Bevan, M. J. 1976. Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol* 117:2233.

9. Bona, C. A., S. Casares, and T. D. Brumeanu. 1998. Towards development of T-cell vaccines. *Immunology Today*. 19:126.

10. Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y. J. Liu, and A. O'Garra. 2003. Flexibility of Mouse Classical and Plasmacytoid-derived Dendritic Cells in Directing T Helper Type 1 and 2 Cell Development: Dependency on Antigen Dose and Differential Toll-like Receptor Ligation. *J Exp Med*. 197:1.

11. Brock, I., Munk, M.E., Kok-Jensen, A., and Andersen, P. 2001. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis* 5:462-467.

12. Buddle, B. M., N. A. Parlane, et al. (1999). "Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG-vaccinated and *M. bovis*-infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens." *Clin Diagn Lab Immunol* 6(1): 1-5.

13. Cockle, P.J., Gordon, S.V., Lalvani, A., Buddle, B.M., Hewinson, R.G., and Vordermeier, H.M. 2002. Identification of novel *Mycobacterium tuberculosis* antigens with potential as diagnostic reagents or subunit vaccine candidates by comparative genomics. *Infect Immun* 70:6996-7003.

14. Craiu, A., M. Gaczynska, T. Akopian, C. F. Gramm, G. Fenteany, A. L. Goldberg, and K. L. Rock. 1997. Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein

10

20

30

40

degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* 272:13437.

15. Dadaglio, G., Moukrim, Z., Lo-Man, R., Sheshko, V., Sebo, P., and Leclerc, C. 2000. Induction of a polarized Th1 response by insertion of multiple copies of a viral T-cell epitope into adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 68:3867-3872. 10

16. Doms, R. W., G. Russ, and J. W. Yewdell. 1989. Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 109:61.

17. El Azami El Idrissi, M., D. Ladant, and C. Leclerc. 2002. The adenylate cyclase of *Bordetella pertussis*: a vector to target antigen presenting cells. *Toxicon.* 40:1661. 20

18. Ewer, K., Deeks, J., Alvarez, L., Bryant, G., Waller, S., Andersen, P., Monk, P., and Lalvani, A. 2003. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 361:1168-1173. 30

19. Fayolle, C., A. Osickova, R. Osicka, T. Henry, M. J. Rojas, M. F. Saron, P. Sebo, and C. Leclerc. 2001. Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* induces protective anti-viral immunity. *J Virol* 75:7330.

20. Fayolle, C., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1999. Therapy of murine tumors with recombinant *Bordetella pertussis* adenylate cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope. *J Immunol.* 162:4157. 40

21. Fayolle, C., P. Sebo, D. Ladant, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1996. In vivo induction of CTL responses by recombinant adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* carrying viral CD8+ T cell epitopes. *J Immunol.* 156:4697-4706.
22. Fenteany, G., R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, and S. L. Schreiber. 1995. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science.* 268:726. 10
23. Germain, R. N. 1994. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell.* 76:287.
24. Goletz, T. J., K. R. Klimpel, S. H. Leppla, J. M. Keith, and J. A. Berzofsky. 1997. Delivery of antigens to the MHC class I pathway using bacterial toxins. *Human Immunol.* 54:129. 20
25. Gordon, S.V., Brosch, R., Billault, A., Garnier, T., Eiglmeier, K., Cole, S.T. 1999. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol.* 32: 643-655.
26. Gottlieb, T. A., I. E. Ivanov, M. Adesnik, and D. D. Sabatini. 1993. Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 120:695. 30
27. Gueronprez, P., C. Fayolle, G. Karimova, A. Ullmann, C. Leclerc, and D. Ladant. 2000. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin: a vehicle to deliver CD8- positive T-cell epitopes into antigen-presenting cells. *Methods Enzymol.* 326:527. 40
28. Gueronprez, P., Fayolle, C., Rojas, M.J., Rescigno, M., Ladant, D., and Leclerc, C. 2002. In vivo receptor-mediated delivery of a recombinant invasive bacterial toxoid to CD11c + CD8 alpha -CD11bhigh dendritic cells. *Eur J Immunol* 32:3071-3081.

29. Guermonprez, P., D. Ladant, et al. (1999). "Direct delivery of the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway." *J Immunol* 162(4): 1910-6.
30. Guermonprez, P., D. Ladant, G. Karimova, A. Ullmann, and C. Leclerc. 1999. Direct delivery of the Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin to the MHC class I antigen presentation pathway. *J Immunol.* 162:1910. 10
31. Guermonprez, P., Fayolle, C., Karimova, G., Ullmann, A., Leclerc, C., and Ladant, D. 2000. Bordetella pertussis adenylate cyclase toxin: a vehicle to deliver CD8- positive T-cell epitopes into antigen-presenting cells. *Methods Enzymol* 326:527-542.
32. Guermonprez, P., C. Fayolle, M. J. Rojas, M. Rescigno, D. Ladant, and C. Leclerc. 2002. In vivo receptor-mediated delivery of a recombinant invasive bacterial toxoid to CD11c + CD8 alpha -CD11bhigh dendritic cells. *Eur J Immunol.* 32:3071-3081. 20
33. Guermonprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., and Leclerc, C. 2001. The Adenylate Cyclase Toxin of Bordetella pertussis Binds to Target Cells via the alpha(M)beta(2) Integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 193:1035-1044. 30
34. Guilloux, Y., Lucas, S., Brichard, V. G., Van Pel, A., Viret, C., De Plaen, E., Brasseur, F., Lethe, B., Jotereau, F., and Boon, T. 1996. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N- acetylglucosaminyltransferase V gene. *J Exp Med* 183:1173. 40
35. Haicheur, N., E. Bismuth, S. Bosset, O. Adotevi, G. Warnier, V. Lacabanne, A. Regnault, C. Desaymard, S. Amigorena, P. Ricciardi-Castagnoli, B.

Goud, W. H. Fridman, L. Johannes, and E. Tartour. 2000. The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J Immunol.* 165:3301.

36. Heath, W. R., and F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 19:47. 10

37. Hewinson, R. G., H. M. Vordermeier, et al. (2003). "Use of the bovine model of tuberculosis for the development of improved vaccines and diagnostics." *Tuberculosis* 83: 119-130.

38. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 176:1693. 20

39. Johnson, J.L., Nyole, S., Okwera, A., Whalen, C.C., Nsubuga, P., Pekovic, V., Huebner, R., Wallis, R.S., Mugenyi, P.N., Mugerwa, R.D., et al. 1998. Instability of tuberculin and Candida skin test reactivity in HIV-infected Ugandans. The Uganda-Case Western Reserve University Research Collaboration. *Am J Respir Crit Care Med* 158:1790-1796. 30

40. Jondal, M., R. Schirmbeck, and J. Reimann. 1996. MHC class I-restricted CTL responses to exogenous antigens. *Immunity.* 5:295.

41. Jurcevic, S., Hills, A., Pasvol, G., Davidson, R.N., Ivanyi, J., and Wilkinson, R.J. 1996. T cell responses to a mixture of Mycobacterium tuberculosis peptides with complementary HLA-DR binding profiles. *Clin Exp Immunol* 105:416-421. 40

42. Kamath, A. T., J. Pooley, M. A. O'Keeffe, D. Vremec, Y. Zhan, A. M. Lew, A. D'Amico, L. Wu, D. F. Tough, and K. Shortman. 2000. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. *J Immunol.* 165:6762.

43. Karimova, G., C. Fayolle, S. Gmira, A. Ullmann, C. Leclerc, and D. Ladant. 1998. Charge-dependent translocation of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin into eukaryotic cells: implication for the in vivo delivery of CD8(+) T cell epitopes into antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:12532. 10

44. Karttunen, J., S. Sanderson, and N. Shastri. 1992. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:6020. 20

45. Kern, D. E., J. P. Klarinet, M. C. Jensen, and P. D. Greenberg. 1986. Requirement for recognition of class II molecules and processed tumor antigen for optimal generation of syngeneic tumor-specific class I- restricted CTL. *J Immunol.* 136:4303.

46. Khelef, N., Gounon, P., and Guiso, N. 2001. Internalization of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase-haemolysin into endocytic vesicles contributes to macrophage cytotoxicity. *Cell Microbiol* 3:721-730. 30

47. Krebs, J. R. (1997). Bovine Tuberculosis in cattle and badgers. London, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food Publications, London, UK.

48. Krizanova, O., F. Ciampor, and P. Veber. 1982. Influence of chlorpromazine on the replication of influenza virus in chick embryo cells. *Acta Virol* 26:209. 40

49. Ladant, D., and A. Ullmann. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends Microbiol* 7:172.

50. Lalvani, A., Brookes, R., Wilkinson, R.J., Malin, A.S., Pathan, A.A., Andersen, P., Dockrell, H.M., Pasvol, G., and Hill, A.V.S. 1998. Human cytolytic and Interferon-g secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Nat Acad Sci USA* 95:270-275.

51. Lalvani, A., Pathan, A.A., McShane, H., Wilkinson, R.J., Latif, M., Conlon, C.P., Pasvol, G., and Hill, A.V. 2001. Rapid detection of *M. tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. *Am J Resp Crit Care Med* 15:824-828.

52. Larkin, J. M., M. S. Brown, J. L. Goldstein, and R. G. Anderson. 1983. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 33:273.

53. Lich, J. D., J. F. Elliott, and J. S. Blum. 2000. Cytoplasmic Processing Is a Prerequisite for Presentation of an Endogenous Antigen by Major Histocompatibility Complex Class II Proteins. *J Exp Med.* 191:1513.

54. Lo-Man, R., J. P. Langeveld, E. Deriaud, M. Jehanno, M. Rojas, J. M. Clement, R. H. Melen, M. Hofnung, and C. Leclerc. 2000. Extending the CD4(+) T-cell epitope specificity of the Th1 immune response to an antigen using a *Salmonella enterica* serovar typhimurium delivery vehicle. *Infect Immun.* 68:3079.

55. Loucka, J., Schlecht, G., Vodolanova, J., Leclerc, C., and Sebo, P. 2002. Delivery of a MalE CD4(+)-T-cell epitope into the major histocompatibility complex class II antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase. *Infect Immun.* 70:1002-1005.

56. Madshus, I. H., K. Sandvig, S. Olsnes, and B. van Deurs. 1987. Effect of reduced endocytosis induced by hypotonic shock and potassium depletion on the infection of Hep 2 cells by picornaviruses. *J Cell Physiol* 131:14.

10

20

30

40

57. Mahairas, G.G., Sabo, P.J., Hickey, M.J., Singh, D.C., and Stover, C.K. 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* 178:1274-1282.
58. Manickasingham, S. P., A. D. Edwards, O. Schultz, and C. Reis e Sousa. 2003. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur J Immunol.* 33:101. 10
59. Mizuochi, T., S. T. Yee, M. Kasai, T. Kakiuchi, D. Muno, and E. Kominami. 1994. Both cathepsin B and cathepsin D are necessary for processing of ovalbumin as well as for degradation of class II MHC invariant chain. *Immunol Lett* 43:189.
60. Moron, G., P. Rueda, I. Casal, and C. Leclerc. 2002. CD8alpha-CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J Exp Med* 195:1233. 20
61. Mukherjee, P., A. Dani, S. Bhatia, N. Singh, A. Y. Rudensky, A. George, V. Bal, S. Mayor, and S. Rath. 2001. Efficient presentation of both cytosolic and endogenous transmembrane protein antigens on MHC class II is dependent on cytoplasmic proteolysis. *J Immunol.* 167:2632. 30
62. Osicka, R., Osickova, A., Basar, T., Guernonprez, P., Rojas, M., Leclerc, C., and Sebo, P. 2000. Delivery of CD8(+) T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect Immun* 68:247-256. 40
63. Osicka, R., A. Osickova, T. Basar, P. Guernonprez, M. Rojas, C. Leclerc, and P. Sebo. 1999. Delivery of CD8⁺ T cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation pathway by *Bordetella*

pertussis adenylate cyclase: delineation of cell invasive structures and permissive insertion sites. *Infect. Immun.* 68:247-256.

64. Pardoll, D. M., and S. L. Topalian. 1998. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Current Opinion in Immunology.* 10:588.

65. Pelham, H. R. 1991. Multiple targets for brefeldin A. *Cell* 67:449.

66. Pollock, J. M., D. A. Pollock, et al. (1996). "Dynamic changes in circulating and antigen-responsive T-cell subpopulations post-*Mycobacterium bovis* infection in cattle." *Immunology* 87(2): 236-41.

67. Pym, A.S., P. Brodin, R. Brosch, M. Huerre, and S.T. Cole. 2002. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol. Microbiol.* 46:709.

68. Pym, A.S., P. Brodin, L. Majlessi, R.. Brosch, C. Demangel, A. Rawkins, M. Huerre, C. Leclerc and S.T. Cole. 2003. A recombinant BCG vaccine exporting ESAT-6 via a dedicated secretion apparatus confers enhanced protection against tuberculosis in animal models. *Nat Med.* 14:533.

69. Reimann, J., and R. Schirmbeck. 1999. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol Rev.* 172:131.

70. Rock, K. L., and A. L. Goldberg. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol.* 17:739.

71. Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761.

10

20

30

40

72. Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, S. C. Hong, A. Barlow, and C. A. Janeway, Jr. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature*. 353:622.

73. Ruedl, C., and M. F. Bachmann. 1999. CTL priming by CD8(+) and CD8(-) dendritic cells in vivo. *Eur J Immunol*. 29:3762.

74. Saron, M.F., Fayolle, C., Sebo, P., Ladant, D., Ullmann, A., and Leclerc, C. 1997. Anti-viral protection conferred by recombinant adenylate cyclase toxins from *Bordetella pertussis* carrying a CD8+ T cell epitope from lymphocytic choriomeningitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3314-3319.

75. Schlecht, G., C. Leclerc, and G. Dadaglio. 2001. Induction of CTL and nonpolarized Th cell responses by CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *J Immunol*. 167:4215.

76. Schnell, S., J. W. Young, A. N. Houghton, and M. Sadelain. 2000. Retrovirally transduced mouse dendritic cells require CD4+ T cell help to elicit antitumor immunity: implications for the clinical use of dendritic cells. *J Immunol*. 164:1243.

77. Sebo, P., P. Glaser, H. Sakamoto, and A. Ullmann. 1991. High-level synthesis of active adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in a reconstructed *Escherichia coli* system. *Gene*. 104:19.

78. Sebo, P., Fayolle, C., d'Andria, O., Ladant, D., Leclerc, C., and Ullmann, A. 1995. Cell-invasive activity of epitope-tagged adenylate cyclase of *Bordetella pertussis* allows in vitro presentation of a foreign epitope to CD8+ cytotoxic T cells. *Infect Immun* 63:3851-3857.

79. Skipper, J. C., Hendrickson, R. C., Gulden, P. H., Brichard, V., Van Pel, A., Chen, Y., Shabanowitz, J., Wolfel, T., Slingluff, C. L., Jr., Boon, T., Hunt, D.

10

20

30

40

50

F., and Engelhard, V. H. 1996. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183:527.

80. Sorensen, A.L., Nagai, S., Houen, G., Andersen, P., and Andersen, A.B. 1995. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63:1710-1717. 10

81. Toes, R. E., F. Ossendorp, R. Offringa, and C. J. Melief. 1999. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med*. 189:753.

82. Umezawa, H. 1976. Structures and activities of protease inhibitors of microbial origin. *Methods Enzymol* 45:678. 20

83. Van Kaer, L., P. G. Ashton-Rickardt, H. L. Ploegh, and S. Tonegawa. 1992. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell*. 71:1205.

84. Villadangos, J. 2001. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Molecular Immunology*. 38:329.

85. Vordermeier, H. M., A. Whelan, et al. (2001). "Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle." *Clin Diagn Lab Immunol* 8(3): 571-8. 30

86. Vordermeier, H. M., M. A. Chambers, et al. (2002). "Correlation of ESAT-6-specific gamma interferon production with pathology in cattle following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination against experimental bovine tuberculosis." *Infect Immun* 70(6): 3026-32. 40

87. Vordermeier, H. M., P. C. Cockle, et al. (1999). "Development of diagnostic reagents to differentiate between *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and *M. bovis* infection in cattle." *Clin Diagn Lab Immunol* 6(5): 675-82.

88. Vordermeier, H. M., P. J. Cockle, et al. (2000). "Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test."

Vaccine 19(9-10): 1246-55.

89. Wang, L. H., K. G. Rothberg, and R. G. Anderson. 1993. Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation.

J Cell Biol 123:1107.

90. Weinrich Olsen, A., van Pinxteren, L.A., Meng Okkels, L., Birk Rasmussen, P., and Andersen, P. 2001. Protection of mice with a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Infect Immun*

69:2773-2778.

91. Wilkinson, K.A., Belisle, J.T., Mincek, M., Wilkinson, R.J., and Toossi, Z. 2000. Enhancement of the human T cell response to culture filtrate fractions of *Mycobacterium tuberculosis* by microspheres. *J Immunol Methods* 235:1-9.

92. Wilkinson, K.A., Hudecz, F., Vordermeier, H.M., Ivanyi, J., and Wilkinson, R.J. 1999. Enhancement of the T cell response to a mycobacterial peptide by conjugation to synthetic branched polypeptide. *Eur J Immunol* 29:2788-2796.

93. Wilkinson, R.J., Zhu, X., Wilkinson, K.A., Lalvani, A., Ivanyi, J., Pasvol, G., and Vordermeier, H.M. 1998. 38000 MW Antigen specific MHC Class I restricted Interferon-g secreting CD8+ T cells in healthy contacts of tuberculosis. *Immunology* 95:585-590.

94. Wolfel, T., Van Pel, A., Brichard, V., Schneider, J., Seliger, B., Meyer zum Buschenfelde, K. H., and Boon, T. 1994. Two tyrosinase nonapeptides

10

20

30

40

recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 24:759.

95. Wong, P., and E. G. Pamer. 2003. CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol.* 21:29.

96. Wood, P. R. and J. S. Rothel (1994). "In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis." *Vet. Microbiol.* 40: 125 - 135. 10

97. Zajac, A. J., K. Murali-Krishna, J. N. Blattman, and R. Ahmed. 1998. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4+ and CD8+ T cells. [Review] [53 refs]. *Current Opinion in Immunology.* 10:444.

98. Dadaglio G. et al, 2003, Recombinant adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* induces cytotoxic T lymphocyte responses against HLA*0201-restricted melanoma epitopes, *International Immunology*, vol. 15, No. 12, pp. 1423-1430. 20

【図面の簡単な説明】

【0150】

【図1】CFP10（四角形）及びCyaA-CFP10（三角形）による刺激の後の *in vitro* IFN- γ 産生の用量応答関係を示す。リードアウトシステムはIFN- γ ELISPOTアッセイであった。培地のみを有する培養物からのスポット形成細胞（SFC）数をすべての値から減じ、そしてCyaAのみとのインキュベーションの後のスポットの数を、CyaA-CFP10刺激により誘発されたSFCから減じた。M. bovis感染した仔ウシから単離された 2×10^5 PBMC / ウエルにより二重に（*in duplicate*）試験を行った。水平線は、CyaA-CFP10（a）及びCFP10（b）による刺激の後に誘発された最大SFC数（ピーク値）を示す。線cはCFP10刺激後に誘発された半最大SFC（50%最大値）を示す。垂線は、CFP10で誘発されたピーク応答の50%を誘発するのに必要なCyaA-CFP10（d）及びCFP10（e）濃度（50%最大濃度）を示す。 30 40

【図2】M. bovis感染ウシからのPBMCによる *in vitro* IFN- γ 産生を刺激するためのCyaA融合タンパク質及び組換えタンパク質の有効性の比較を示す。パネルA：図1に示されたとおりに決定された50%最大濃度。パネルB：図1に示されたとおりに決定されたピーク値を示す。リードアウトシステム：IFN- γ ELISPOTアッセイ。培地のみを有する培養物からのSFC数をすべての値から減じた。更に、CyaAのみとのインキュベーションの後のスポットの数を、CyaA-CFP10刺激により誘発されたSFCから減じた。試験を、 2×10^5 PBMC / ウエルにより二重に行った。*は、 $p < 0.05$ を示す（両側ウイルコクソン符号付順位マッチドペアー検定（two-tailed Wilcoxon signed rank matched pairs test））

【図3】CyaA-CFP10の認識におけるCD11bの関与を示す。培養は、2つの 50

CD11b 特異的 IgG1 mAb (ILA15 及び CC94) の存在下に行った。リードアウトシステムは、IFN-ELISPOT アッセイであった。培地のみを有する培養物からの SFC 数をすべての値から減じた。試験を、1 頭の感染した仔ウシから単離された 2×10^5 PBMC / ウエルにより二重に行った。応答は、一側ウイルコクスン順位マッチドペア検定 (one-tailed Wilcoxon rank matched pairs test) により決定して、最も低い濃度を除いて試験した各濃度について有意差があった ($p < 0.02$)。

【図 4】全血 BOVIGAM IFN-アッセイにおける CyA 融合タンパク質及び組換え ESA T-6 及び CFP-10 の性能を示す。8 頭の M. bovis 感染仔ウシからのヘパリンを加えた血液を、4 nM、「(4)」と命名された、及び 20 nM、「(20)」と命名された、試験濃度で抗原とインキュベーションした。血漿培養上清中の IFN-を ELISA により決定した。結果を OD450 単位 ($OD450 \times 1000$) として表す。水平線は、ポジビティビティー (positivity) についてのカットオフ (100 OD450 単位) を示す。培養を 96 ウエル平底プレート中で二重に行った。両側ウイルコクスン符号付順位マッチドペア検定により決定して、* は $p < 0.05$ を示し、** は $p < 0.01$ を示す。 TB 感染を有するヒト個体

10

【図 5 A】T 細胞を再刺激するのに必要な抗原の投与量が CyA 送達により 10 ~ 20 倍減少されることを示す。IFN-スポット形成細胞 (SFC) の数は、ESA T-6、CFP-10 又はそれらの CyA トキソイド同等物の存在下にオーバナイト ELISPOT アッセイにおいて数えた。示された濃度は、M. tuberculosis 抗原の濃度を表す。パネル A: 9 頭の健常な TST+ve 応答性ドナーにおいて、組換え ESA T-6 の認識は 500 nM で最適であったが、これに対して同様な認識が 10 倍少ない CyA-ESA T-6 の存在下に起こった。パネル B: ネイティブな CFP-10 に応答した 10 頭の同様なドナーにおいて、CyA 送達は、やはり投与量応答曲線を左にシフトさせた。CyA-CFP-10 トキソイドとして発現された約 10 ~ 20 倍少ない CFP-10 が同じ応答を誘発した。

20

【図 5 B】T 細胞を再刺激するのに必要な抗原の投与量が CyA 送達により 10 ~ 20 倍減少されることを示す。IFN-スポット形成細胞 (SFC) の数は、ESA T-6、CFP-10 又はそれらの CyA トキソイド同等物の存在下にオーバナイト ELISPOT アッセイにおいて数えた。示された濃度は、M. tuberculosis 抗原の濃度を表す。パネル A: 9 頭の健常な TST+ve 応答性ドナーにおいて、組換え ESA T-6 の認識は 500 nM で最適であったが、これに対して同様な認識が 10 倍少ない CyA-ESA T-6 の存在下に起こった。パネル B: ネイティブな CFP-10 に応答した 10 頭の同様なドナーにおいて、CyA 送達は、やはり投与量応答曲線を左にシフトさせた。CyA-CFP-10 トキソイドとして発現された約 10 ~ 20 倍少ない CFP-10 が同じ応答を誘発した。

30

【図 6 A】低応答対象における IFN-SFC の検出が CyA 送達により高められることを示す。ネイティブ ESA T-6 (パネル A) 及び / 又は CFP-10 (パネル B) に応答した対象は、組換え抗原に対するそれらの応答の大きさにより低 (< 50 IFN-SFC / 10^6 PBMC)、中間 (50 ~ 100) 及び高 (> 100) 応答者に層別化された。CyA 送達は、特に低応答対象の IFN-SFC 検出を有意に増加させた。

40

【図 6 B】低応答対象における IFN-SFC の検出が CyA 送達により高められることを示す。ネイティブ ESA T-6 (パネル A) 及び / 又は CFP-10 (パネル B) に応答した対象は、組換え抗原に対するそれらの応答の大きさにより低 (< 50 IFN-SFC / 10^6 PBMC)、中間 (50 ~ 100) 及び高 (> 100) 応答者に層別化された。CyA 送達は、特に低応答対象の IFN-SFC 検出を有意に増加させた。

【図 7】CD4⁺ 及び CD8⁺ 応答は、CyA 送達により高めることができることを証明する。PBMC からの CD4⁺ 又は CD8⁺ T 細胞の免疫磁氣的枯渇化 (immunomagnetic depletion) を行いそして CyA トキソイドに対する残りの細胞の応答をアッセイした。CD4⁺ 枯渇 PBMC の応答は CD8 として解釈されそしてその逆も成り立つ。次いで CD8 枯渇した PBMC の抗原刺激された IFN-SFC (CD4) を CD4 枯渇した P

50

BMCのIFN- γ SFC (CD8)で割って、CD4/CD8比を得た。個々のドナーの応答は線により連結して示されている。組換え抗原に対する優勢な応答はCD4であり、そしてCyA送達はCD4又はCD8応答のいずれも高めることができた。

【図8】CyAトキソイドに対するCD4⁺及びCD8⁺T細胞応答は、MHCクラスI及びクラスII分子により拘束されることを示す。CD4又はCD8枯渇したPBMCのCyAトキソイドに対する応答を、阻害剤の存在下又は不存在下にアッセイした。パネルA及びC：CD8⁺T細胞応答はMHCクラスIIに対する抗体により部分的にブロックされうる。パネルB及びD：CD4⁺T細胞は、抗MHCクラスII又はクロロキン(10mM)による阻害に対して感受性であった。

【図9A】パネルAにおいてIFN- γ ELISPOTと全血アッセイとの相関を示す。CyA-CFP-10で一晩刺激されたIFN- γ ELISPOT応答を、31人の結核感作したドナーにおいて1/10に希釈した全血中のIFN- γ の72時間の産生と比較した。10SFC/10⁶PBMCのELISPOTカットオフ及び10pg/mlのELISAカットオフを使用して、81%応答は合致した。応答はまた、スピアマン相関係数(Spearman correlation coefficient)(ここで、 $r = 0.64$ 、 $p = 0.0002$ である)を使用して、有意に相関付けられた。パネルBは、M.tuberculosis CFP-10を有するCyAにより刺激された全血中のIFN- γ 分泌の増強を示す。72時間全血アッセイにおいてこれらの抗原を取り込むESAT-6()、CyA-ESAT-6()、CFP-10()、CyA-CFP-10()トキソイドにより誘発されたM.tuberculosis Ag特異的IFN- γ を決定した。次いで、ドナーを、ネイティブ抗原に対するそれらの応答により、高い(>1000 IFN- γ pg/ml)、中(250~1000 IFN- γ pg/ml)及び低い(<250 IFN- γ pg/ml)応答者に層別化した。低く応答するドナーの応答のみを示す。CFP-10のCyA送達によるM.tuberculosis特異的全血応答の増強は、白円(open circles)と黒円(closed circles)の分布の差により証明されたとおり、CFP-10に対して低い応答者として分類された対象において有意であった($p = 0.021$)。 10

【図9B】パネルAにおいてIFN- γ ELISPOTと全血アッセイとの相関を示す。CyA-CFP-10で一晩刺激されたIFN- γ ELISPOT応答を、31人の結核感作したドナーにおいて1/10に希釈した全血中のIFN- γ の72時間の産生と比較した。10SFC/10⁶PBMCのELISPOTカットオフ及び10pg/mlのELISAカットオフを使用して、81%応答は合致した。応答はまた、スピアマン相関係数(Spearman correlation coefficient)(ここで、 $r = 0.64$ 、 $p = 0.0002$ である)を使用して、有意に相関付けられた。パネルBは、M.tuberculosis CFP-10を有するCyAにより刺激された全血中のIFN- γ 分泌の増強を示す。72時間全血アッセイにおいてこれらの抗原を取り込むESAT-6()、CyA-ESAT-6()、CFP-10()、CyA-CFP-10()トキソイドにより誘発されたM.tuberculosis Ag特異的IFN- γ を決定した。次いで、ドナーを、ネイティブ抗原に対するそれらの応答により、高い(>1000 IFN- γ pg/ml)、中(250~1000 IFN- γ pg/ml)及び低い(<250 IFN- γ pg/ml)応答者に層別化した。低く応答するドナーの応答のみを示す。CFP-10のCyA送達によるM.tuberculosis特異的全血応答の増強は、白円(open circles)と黒円(closed circles)の分布の差により証明されたとおり、CFP-10に対して低い応答者として分類された対象において有意であった($p = 0.021$)。 30

【図10】r-CyA-ESAT-6は、ESAT-6を発現しているマイコバクテリアで感染させたマウスからのT細胞をin vitroで特異的に且つ有効に刺激することができることを示す。種々のペプチド10 μ g/ml、PPD10 μ g/ml又はr-CyA 2.5 μ g/mlによるin vitro刺激に反応して 1×10^6 又は 1×10^7 CFUのBCG::RD1又はBCG::pYUB412コントロールで皮下で免疫感作されたC57BL/6マウスの脾臓細胞により産生されたIFN- γ の濃度。結果を二重培養ウエル(duplicate culture wells)の平均及び標準偏差として示す。 40

ラベル「E S A T - 6 (1 - 2 0)」は、E S A T - 6のアミノ酸1 ~ 2 0に対応するペプチド(免疫優勢C D 4⁺T細胞エピトープ)を示す。ラベル「M a l E (1 0 - 5 4)」は、E . c o l iからのM a l Eタンパク質のアミノ酸1 0 ~ 5 4に対応するペプチドを示す。ラベル「r C y a A - O V A / : 2 5 7」はO V A C T Lエピトープを有するC y a Aを示す。

【図11A】C y a A - M a l E - O V Aの送達は、M H CクラスI及びクラスII経路の両方によるものであることを証明する。パネルA及びBにおいて証明されるとおり、C 5 7 B L / 6マウスからのB M D C sを、種々の濃度のC y a A - M a l E、C y a A - O V A、C y a A - M a l E - O V A、C y a A E 5、M a l Eタンパク質、M a l E₁₀₀₋₁₁₄又はO V A₂₅₇₋₂₆₄ペプチドと5時間インキュベーションした。インキュベーションの後に、B M D C sを洗浄しそしてC R M C 3(パネルA及びB)又はB 3 Z T細胞ハイブリドーマ(パネルC)をウエルに加えた。パネルBでは、B M D C sを、7.5 nMのC y a A E 5又はC y a A - O V A及び種々の濃度のM a l E₁₀₀₋₁₁₄ペプチド又はタンパク質と同時にインキュベーションした。5時間後に、細胞を洗浄しそして10⁵C R M C 3 T細胞ハイブリドーマをウエルに加えた。培養上清を回収し、そして18時間後に凍結させた。培養期間中C R M C 3又はB 3 Z T細胞ハイブリドーマにより分泌されたI L - 2の量を、実施例14に記載のとおりI L - 2依存性C T L - L細胞系でモニタリングした。結果をc p mで表す。各パネルは少なくとも2つの実験の結果を表す。

【図11B】C y a A - M a l E - O V Aの送達は、M H CクラスI及びクラスII経路の両方によるものであることを証明する。パネルA及びBにおいて証明されるとおり、C 5 7 B L / 6マウスからのB M D C sを、種々の濃度のC y a A - M a l E、C y a A - O V A、C y a A - M a l E - O V A、C y a A E 5、M a l Eタンパク質、M a l E₁₀₀₋₁₁₄又はO V A₂₅₇₋₂₆₄ペプチドと5時間インキュベーションした。インキュベーションの後に、B M D C sを洗浄しそしてC R M C 3(パネルA及びB)又はB 3 Z T細胞ハイブリドーマ(パネルC)をウエルに加えた。パネルBでは、B M D C sを、7.5 nMのC y a A E 5又はC y a A - O V A及び種々の濃度のM a l E₁₀₀₋₁₁₄ペプチド又はタンパク質と同時にインキュベーションした。5時間後に、細胞を洗浄しそして10⁵C R M C 3 T細胞ハイブリドーマをウエルに加えた。培養上清を回収し、そして18時間後に凍結させた。培養期間中C R M C 3又はB 3 Z T細胞ハイブリドーマにより分泌されたI L - 2の量を、実施例14に記載のとおりI L - 2依存性C T L - L細胞系でモニタリングした。結果をc p mで表す。各パネルは少なくとも2つの実験の結果を表す。

【図11C】C y a A - M a l E - O V Aの送達は、M H CクラスI及びクラスII経路の両方によるものであることを証明する。パネルA及びBにおいて証明されるとおり、C 5 7 B L / 6マウスからのB M D C sを、種々の濃度のC y a A - M a l E、C y a A - O V A、C y a A - M a l E - O V A、C y a A E 5、M a l Eタンパク質、M a l E₁₀₀₋₁₁₄又はO V A₂₅₇₋₂₆₄ペプチドと5時間インキュベーションした。インキュベーションの後に、B M D C sを洗浄しそしてC R M C 3(パネルA及びB)又はB 3 Z T細胞ハイブリドーマ(パネルC)をウエルに加えた。パネルBでは、B M D C sを、7.5 nMのC y a A E 5又はC y a A - O V A及び種々の濃度のM a l E₁₀₀₋₁₁₄ペプチド又はタンパク質と同時にインキュベーションした。5時間後に、細胞を洗浄しそして10⁵C R M C 3 T細胞ハイブリドーマをウエルに加えた。培養上清を回収し、そして18時間後に凍結させた。培養期間中C R M C 3又はB 3 Z T細胞ハイブリドーマにより分泌されたI L - 2の量を、実施例14に記載のとおりI L - 2依存性C T L - L細胞系でモニタリングした。結果をc p mで表す。各パネルは少なくとも2つの実験の結果を表す。

【図12】抗C D 1 1 b m A b sはM H CクラスI及びクラスII分子へのC y a A - M a l E - O V Aの送達をブロックすることを証明する。B M D C sを、10 µg/ml抗C D 1 1 b m A b s又は同じ濃度のアイソタイプコントロールm A b sと1時間インキュベーションした。次いでタンパク質又はペプチド(7.5 nMのC y a A - M a l E - O V A及びO V A p 2 5 7 - 2 6 4ペプチド及び750 nMのM a l Eタンパク質)をm A b sの常に存在下にB M D C sに加えた。A P C sをA g sとの4 ~ 5時間のインキュベーション

10

20

30

40

50

の後に洗浄し、そしてCRM C 3 (パネルA)又はB 3 Z (パネルB) T細胞ハイブリドーマを18時間加えた。上清を、CTL-L細胞系によりIL-2含有率について試験した。結果は、cpmで表しそして4つの実験を表す。

【図13A】MHCクラスII経路へのCy a A - M a l E - O V A送達はプロテアソーム活性もTAP輸送体も必要としないことを証明する。パネルA及びB: BMDCsを、3 µg/mlのラクタシスチン又は12 µg/mlのLLnL又はLLmLと1時間インキュベーションした。次いで、Ag sを加え、そして5時間後に、BMDCsを洗浄しそして固定した。次いで、10⁵ CRM C 3 (パネルA)及びB 3 Z (パネルB) T細胞ハイブリドーマをウエルに加え、そして培養を18時間後に停止した。培養上清地のIL-2含有率をCTL-L細胞で決定した。結果を、阻害剤なしで得られた応答と比較して阻害剤の存在下に残留T細胞活性化の百分率として表し、そして2つの実験を表す。パネルC及びD。TAP輸送体に対する要求を、TAP1ノックアウトマウスから発生したBMDCsで決定した。BMDCsを種々の濃度のAg sとインキュベーションしそしてCRM C 3 (パネルC)又はB 3 Z (パネルD) T細胞ハイブリドーマと培養した。CRM C 3によるIL-2産生を先に所望されたとおりに決定した。結果をcpmで表しそして2つの実験を表す。

10

【図13B】MHCクラスII経路へのCy a A - M a l E - O V A送達はプロテアソーム活性もTAP輸送体も必要としないことを証明する。パネルA及びB: BMDCsを、3 µg/mlのラクタシスチン又は12 µg/mlのLLnL又はLLmLと1時間インキュベーションした。次いで、Ag sを加え、そして5時間後に、BMDCsを洗浄しそして固定した。次いで、10⁵ CRM C 3 (パネルA)及びB 3 Z (パネルB) T細胞ハイブリドーマをウエルに加え、そして培養を18時間後に停止した。培養上清地のIL-2含有率をCTL-L細胞で決定した。結果を、阻害剤なしで得られた応答と比較して阻害剤の存在下に残留T細胞活性化の百分率として表し、そして2つの実験を表す。パネルC及びD。TAP輸送体に対する要求を、TAP1ノックアウトマウスから発生したBMDCsで決定した。BMDCsを種々の濃度のAg sとインキュベーションしそしてCRM C 3 (パネルC)又はB 3 Z (パネルD) T細胞ハイブリドーマと培養した。CRM C 3によるIL-2産生を先に所望されたとおりに決定した。結果をcpmで表しそして2つの実験を表す。

20

【図13C】MHCクラスII経路へのCy a A - M a l E - O V A送達はプロテアソーム活性もTAP輸送体も必要としないことを証明する。パネルA及びB: BMDCsを、3 µg/mlのラクタシスチン又は12 µg/mlのLLnL又はLLmLと1時間インキュベーションした。次いで、Ag sを加え、そして5時間後に、BMDCsを洗浄しそして固定した。次いで、10⁵ CRM C 3 (パネルA)及びB 3 Z (パネルB) T細胞ハイブリドーマをウエルに加え、そして培養を18時間後に停止した。培養上清地のIL-2含有率をCTL-L細胞で決定した。結果を、阻害剤なしで得られた応答と比較して阻害剤の存在下に残留T細胞活性化の百分率として表し、そして2つの実験を表す。パネルC及びD。TAP輸送体に対する要求を、TAP1ノックアウトマウスから発生したBMDCsで決定した。BMDCsを種々の濃度のAg sとインキュベーションしそしてCRM C 3 (パネルC)又はB 3 Z (パネルD) T細胞ハイブリドーマと培養した。CRM C 3によるIL-2産生を先に所望されたとおりに決定した。結果をcpmで表しそして2つの実験を表す。

30

40

【図13D】MHCクラスII経路へのCy a A - M a l E - O V A送達はプロテアソーム活性もTAP輸送体も必要としないことを証明する。パネルA及びB: BMDCsを、3 µg/mlのラクタシスチン又は12 µg/mlのLLnL又はLLmLと1時間インキュベーションした。次いで、Ag sを加え、そして5時間後に、BMDCsを洗浄しそして固定した。次いで、10⁵ CRM C 3 (パネルA)及びB 3 Z (パネルB) T細胞ハイブリドーマをウエルに加え、そして培養を18時間後に停止した。培養上清地のIL-2含有率をCTL-L細胞で決定した。結果を、阻害剤なしで得られた応答と比較して阻害剤の存在下に残留T細胞活性化の百分率として表し、そして2つの実験を表す。パネルC及びD

50

。TAP輸送体に対する要求を、TAP1ノックアウトマウスから発生したBMDCsで決定した。BMDCsを種々の濃度のAg sとインキュベーションしそしてCRM C 3 (パネルC)又はB3Z (パネルD) T細胞ハイブリドーマと培養した。CRM C 3によるIL-2産生を先に所望されたとおりに決定した。結果をcpmで表しそして2つの実験を表す。

【図14A】MHCクラスII経路へのCy a A - M a l E - O V A送達はエンドサイトーシスプロテアーゼ活性及び液胞酸性化を必要とすることを証明する。BMDCsを、ロイペプチン、ペプスタチン、又は等級を付けた濃度のクロロキン(C C Q)と1時間インキュベーションし、次いでAg sを最適濃度(Cy a A - M a l E - O V Aについて7.5 nM、M a l E₁₀₀₋₁₁₄ペプチド及びタンパク質について750 nM、O V A₂₅₇₋₂₆₄ペプチドについて750 nM)でウエルに加えた。BMDCsの洗浄及び固定化後に、CRM C 3 (パネルA)又はB3Z (パネルB) T細胞ハイブリドーマを加えた。培養上清を18時間後に回収しそしてそれらのIL-2含有率をCTL-Lで決定した。結果を、阻害剤の不存在下に行われた培養と比べて残留T細胞活性化の百分率として表す。それらは2~5の実験を表す。

10

【図14B】MHCクラスII経路へのCy a A - M a l E - O V A送達はエンドサイトーシスプロテアーゼ活性及び液胞酸性化を必要とすることを証明する。BMDCsを、ロイペプチン、ペプスタチン、又は等級を付けた濃度のクロロキン(C C Q)と1時間インキュベーションし、次いでAg sを最適濃度(Cy a A - M a l E - O V Aについて7.5 nM、M a l E₁₀₀₋₁₁₄ペプチド及びタンパク質について750 nM、O V A₂₅₇₋₂₆₄ペプチドについて750 nM)でウエルに加えた。BMDCsの洗浄及び固定化後に、CRM C 3 (パネルA)又はB3Z (パネルB) T細胞ハイブリドーマを加えた。培養上清を18時間後に回収しそしてそれらのIL-2含有率をCTL-Lで決定した。結果を、阻害剤の不存在下に行われた培養と比べて残留T細胞活性化の百分率として表す。それらは2~5の実験を表す。

20

【図15A】MHCクラスI及びクラスIIへのCy a A - M a l E - O V A送達はタンパク質新規合成及びゴルジ輸送を必要とすることを証明する。BMDCsを、シクロヘキシミド(CHX)又はブレフェルジンA(BFA)と1時間インキュベーションした。次いで、Ag sを加えた(M a l Eタンパク質及びペプチドについて750 nM又はCy a A - M a l E - O V Aについて7.5 nM)。5時間後に、細胞を洗浄しそして実施例18に記載のとおり固定した。CRM C 3 (パネルA)又はB3Z (パネルB) T細胞ハイブリドーマをウエルに加えそして18時間培養上清中のIL-2含有率をCTL-L細胞系でモニタリングした。結果は、阻害剤なしに行われた培養と比較して阻害剤の存在下に残留T細胞活性化の%で表し、そして4つの実験を代表する。

30

【図15B】MHCクラスI及びクラスIIへのCy a A - M a l E - O V A送達はタンパク質新規合成及びゴルジ輸送を必要とすることを証明する。BMDCsを、シクロヘキシミド(CHX)又はブレフェルジンA(BFA)と1時間インキュベーションした。次いで、Ag sを加えた(M a l Eタンパク質及びペプチドについて750 nM又はCy a A - M a l E - O V Aについて7.5 nM)。5時間後に、細胞を洗浄しそして実施例18に記載のとおり固定した。CRM C 3 (パネルA)又はB3Z (パネルB) T細胞ハイブリドーマをウエルに加えそして18時間培養上清中のIL-2含有率をCTL-L細胞系でモニタリングした。結果は、阻害剤なしに行われた培養と比較して阻害剤の存在下に残留T細胞活性化の%で表し、そして4つの実験を代表する。

40

【図16A】Cy a A - M a l E - O V AによるMHCクラスIIエピトープ送達は、ファゴサイトーシスを必要としないが液胞酸性化に依存することを証明する。アクチン依存性機構阻害について、BMDCsを10 µg/mlサイトカラシンと37 °Cで1時間インキュベーションし、そしてAg sを最適濃度(7.5 nMのCy a A - M a l E - O V A、O V A₂₅₇₋₂₆₄及びM a l E₁₀₀₋₁₁₄ペプチド、750 nMのM a l Eタンパク質)で加えた。5時間のインキュベーション後に、BMDCsを3回洗浄しそして実施例20に詳説されたとおりグルタルアルデヒドで固定した。カリウム枯渇について、血清を含まない培地中で

50

細胞をインキュベーションし、低張性ショックを受けさせ、次いで実施例 20 に詳説されたとおり K^+ イオンの不存在下に 45 分間 A g s とインキュベーションし、次いで A g s を洗浄しそして細胞を C M 中で更に 4 時間インキュベーションしそして固定した。3 回の洗浄後に、C R M C 3 (パネル A) 又は B 3 Z (パネル B) T 細胞ハイブリドーマを、 10^5 細胞 / ウエルで 18 時間加えた。上清を C T L - L 細胞系で I L - 2 について試験した。各 A g s について、阻害剤の不存在下の C T L - L 増殖のレベルは、T 細胞活性化 100 % とみなした。結果は、薬物の存在下に残留 T 細胞活性化の百分率を示す。結果は 2 ~ 4 実験を代表する。

【図 16 B】C y a A - M a l E - O V A による M H C クラス I I エピトープ送達は、ファゴサイトーシスを必要としないが液胞酸性化に依存することを証明する。アクチン依存性機構阻害について、B M D C s を $10 \mu\text{g/ml}$ サイトカラシンと 37 で 1 時間インキュベーションし、そして A g s を最適濃度 (7.5 nM の C y a A - M a l E - O V A、O V A ₂₅₇₋₂₆₄ 及び M a l E ₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド、 750 nM の M a l E タンパク質) で加えた。5 時間のインキュベーション後に、B M D C s を 3 回洗浄しそして実施例 20 に詳説されたとおりグルタルアルデヒドで固定した。カリウム枯渇について、血清を含まない培地中で細胞をインキュベーションし、低張性ショックを受けさせ、次いで実施例 20 に詳説されたとおり K^+ イオンの不存在下に 45 分間 A g s とインキュベーションし、次いで A g s を洗浄しそして細胞を C M 中で更に 4 時間インキュベーションしそして固定した。3 回の洗浄後に、C R M C 3 (パネル A) 又は B 3 Z (パネル B) T 細胞ハイブリドーマを、 10^5 細胞 / ウエルで 18 時間加えた。上清を C T L - L 細胞系で I L - 2 について試験した。各 A g s について、阻害剤の不存在下の C T L - L 増殖のレベルは、T 細胞活性化 100 % とみなした。結果は、薬物の存在下に残留 T 細胞活性化の百分率を示す。結果は 2 ~ 4 実験を一晩 E L I S P O T 。

【図 17 A】C y a A - M a l E - O V A による免疫感作は $C D 4^+$ 及び $C D 8^+$ T 細胞応答の両方を誘発することを証明する。 $50 \mu\text{g}$ の C y a A - M a l E、C y a A - O V A、C y a A - M a l E - O V A 又は C y a A E 5 を静脈内注射された C 5 7 B L / 6 マウスの脾臓細胞を免疫感作の 1 週間後に回収した。(A) 免疫マウスからの脾臓細胞を O V A ₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド $1 \mu\text{g/ml}$ の存在下に 5 日間刺激し、そして同じペプチドと共に又は同じペプチドなしでインキュベーションされた ^{51}Cr 標識された E L - 4 標的細胞に対する C T L 活性について試験した。自然に起こる細胞 ^{51}Cr 放出は、培地のみの中でインキュベーションされた E L - 4 で得られた。各曲線は、4 つの異なる実験において試験された 4 (C y a A E 5) ~ 8 マウス (C y a A - M a l E、C y a A - O V A、C y a A - M a l E - O V A) を代表する単一のマウスについて得られた C T L 応答を表す。(B、C) 免疫マウスからの脾臓細胞を M a l E ₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド (B) $10 \mu\text{g/ml}$ 又は O V A ₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド (C) $1 \mu\text{g/ml}$ の存在下又は不存在下に 72 時間刺激した。培養上清を E L I S A アッセイにおいて I L - 5 及び I F N - 含有率について試験した。結果は、 pg/ml で表しそしてペプチドの存在下及び不存在下にサイトカイン濃度間の差を表す。結果は 4 実験を代表する。

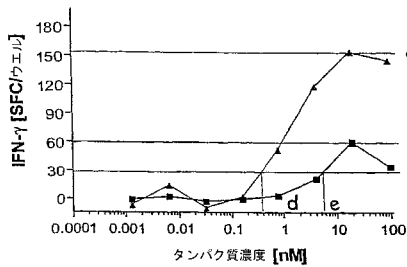
【図 17 B】C y a A - M a l E - O V A による免疫感作は $C D 4^+$ 及び $C D 8^+$ T 細胞応答の両方を誘発することを証明する。 $50 \mu\text{g}$ の C y a A - M a l E、C y a A - O V A、C y a A - M a l E - O V A 又は C y a A E 5 を静脈内注射された C 5 7 B L / 6 マウスの脾臓細胞を免疫感作の 1 週間後に回収した。(A) 免疫マウスからの脾臓細胞を O V A ₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド $1 \mu\text{g/ml}$ の存在下に 5 日間刺激し、そして同じペプチドと共に又は同じペプチドなしでインキュベーションされた ^{51}Cr 標識された E L - 4 標的細胞に対する C T L 活性について試験した。自然に起こる細胞 ^{51}Cr 放出は、培地のみの中でインキュベーションされた E L - 4 で得られた。各曲線は、4 つの異なる実験において試験された 4 (C y a A E 5) ~ 8 マウス (C y a A - M a l E、C y a A - O V A、C y a A - M a l E - O V A) を代表する単一のマウスについて得られた C T L 応答を表す。(B、C) 免疫マウスからの脾臓細胞を M a l E ₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド (B) $10 \mu\text{g/ml}$ 又は O V A ₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド (C) $1 \mu\text{g/ml}$ の存在下又は不存在下に 72 時間刺激した。培養上清を E L

I S A アッセイにおいて I L - 5 及び I F N - 含有率について試験した。結果は、pg/m l で表しそしてペプチドの存在下及び不存在下にサイトカイン濃度間の差を表す。結果は 4 実験を代表する。

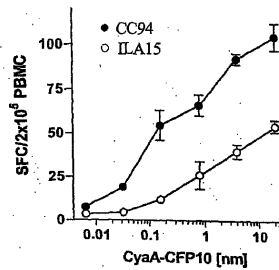
【図 1 7 C】 C y a A - M a l E - O V A による免疫感作は C D 4 + 及び C D 8 + T 細胞応答の両方を誘発することを証明する。 5 0 μg の C y a A - M a l E 、 C y a A - O V A 、 C y a A - M a l E - O V A 又は C y a A E 5 を静脈内注射された C 5 7 B L / 6 マウスの脾臓細胞を免疫感作の 1 週間後に回収した。(A) 免疫マウスからの脾臓細胞を O V A ₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド 1 μg/ml の存在下に 5 日間刺激し、そして同じペプチドと共に又は同じペプチドなしでインキュベーションされた ⁵¹ C r 標識された E L - 4 標的細胞に対する C T L 活性について試験した。自然に起こる細胞 ⁵¹ C r 放出は、培地のみの中でインキュベーションされた E L - 4 で得られた。各曲線は、 4 つの異なる実験において試験された 4 (C y a A E 5) ~ 8 マウス (C y a A - M a l E 、 C y a A - O V A 、 C y a A - M a l E - O V A) を代表する単一のマウスについて得られた C T L 応答を表す。(B 、 C) 免疫マウスからの脾臓細胞を M a l E ₁₀₀₋₁₁₄ ペプチド (B) 1 0 μg/ml 又は O V A ₂₅₇₋₂₆₄ ペプチド (C) 1 μg/ml の存在下又は不存在下に 7 2 時間刺激した。培養上清を E L I S A アッセイにおいて I L - 5 及び I F N - 含有率について試験した。結果は、pg/m l で表しそしてペプチドの存在下及び不存在下にサイトカイン濃度間の差を表す。結果は 4 実験を表す。

10

【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】

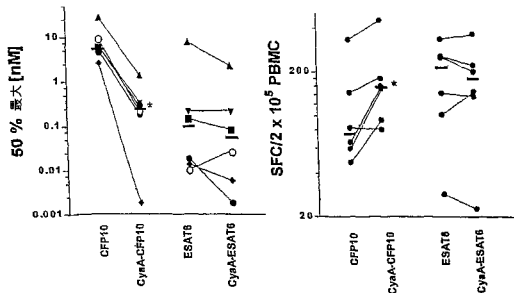


FIGURE 3

【 図 4 】

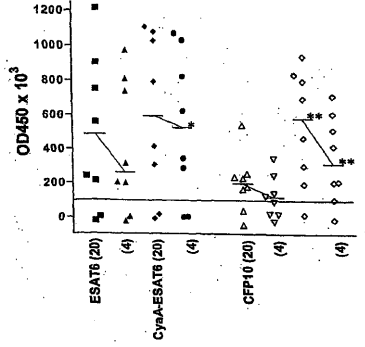
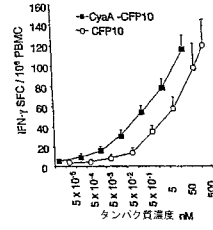
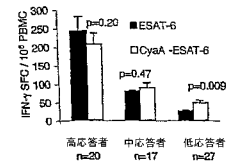


FIGURE 4

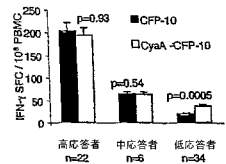
【 図 5 B 】



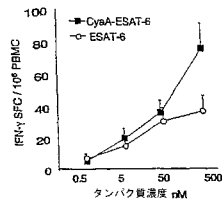
【 図 6 A 】



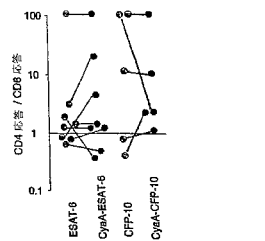
【 図 6 B 】



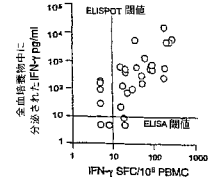
【 図 5 A 】



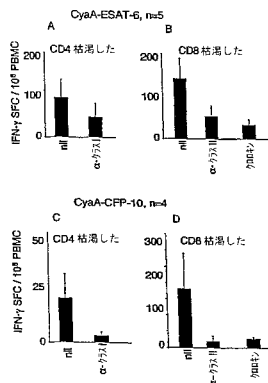
【 図 7 】



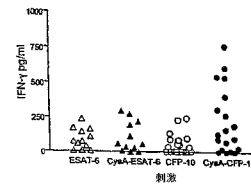
【 図 9 A 】



【 図 8 】



【 図 9 B 】



【 図 1 0 】

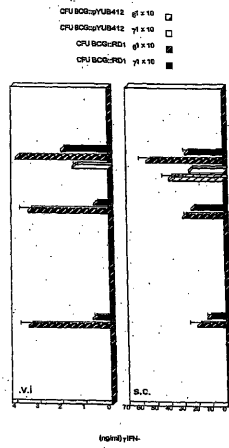
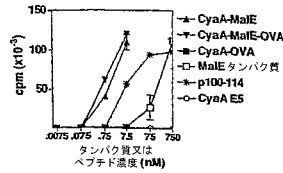
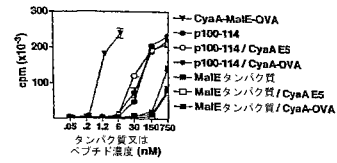


FIGURE 10

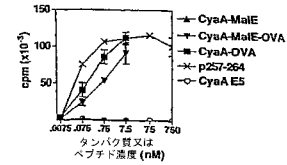
【 図 1 1 A 】



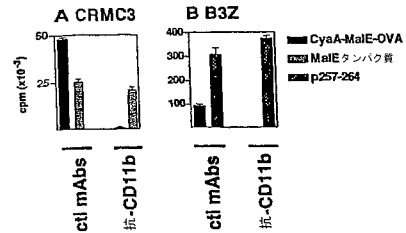
【 図 1 1 B 】



【 図 1 1 C 】



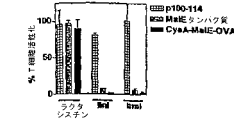
【 図 1 2 】



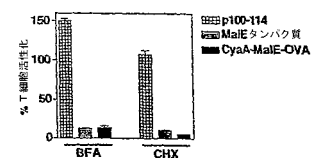
【 図 1 3 B 】



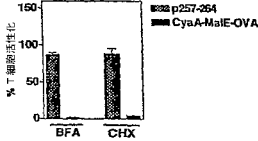
【 図 1 3 A 】



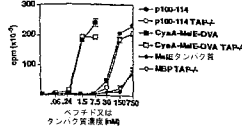
【 図 1 5 A 】



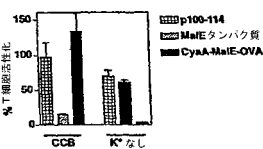
【 図 1 5 B 】



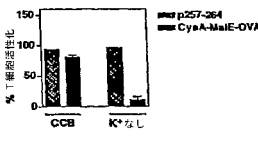
【 図 1 3 C 】



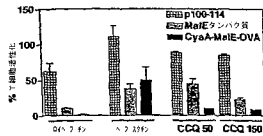
【 図 1 6 A 】



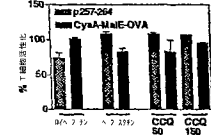
【 図 1 6 B 】



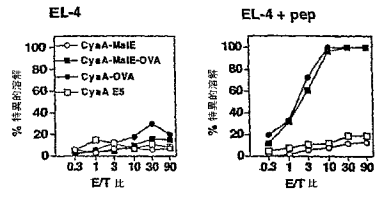
【 図 1 4 A 】



【 図 1 4 B 】

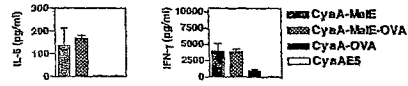


【 図 1 7 A 】



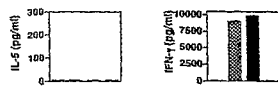
【 図 1 7 B 】

MaIE 特異的応答



【 図 1 7 C 】

OVA 特異的応答



【 配列表 】

2007514415000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP2004/014087

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/50 G01N33/569		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FAYOLLE C ET AL: "Therapy of murine tumors with recombinant Bordetella pertussis Adenylate Cyclase carrying a cytotoxic T cell epitope" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 162, 1999, pages 4157-4162, XP002169918 ISSN: 0022-1767 cited in the application abstract page 4157, column 2, paragraph 4 - page 4158, column 1, paragraph 3 ----- -/--	1-7,9, 13-17, 19-27, 29, 33-36, 38,39
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 1 April 2005		Date of mailing of the international search report 26/04/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Thumb, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l Application No
 PCT/EP2004/014087

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>OSICKA ET AL: "Delivery of CD8+ T-cell epitopes into major histocompatibility complex class I antigen presentation" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 68, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 247-256, XP002263297 ISSN: 0019-9567 cited in the application the whole document in particular Figure 1; page 249, col. 2, paragraph 2.</p>	1-7,9, 14-27, 29,34-39
X	<p>FAYOLLE C ET AL: "Delivery of multiple epitopes by recombinant detoxified adenylate cyclase of Bordetella pertussis induces protective antiviral immunity" JOURNAL OF VIROLOGY, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, US, vol. 75, no. 16, August 2001 (2001-08), pages 7330-7338, XP002209814 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document in particular page 7331, col. 1, paragraph 5 - col. 2, paragraph 3.</p>	1-7,9, 14-27, 29,34-39
P,X	<p>VORDERMEIER H MARTIN ET AL: "Recognition of mycobacterial antigens delivered by genetically detoxified Bordetella pertussis adenylate cyclase by T cells from cattle with bovine tuberculosis." INFECTION AND IMMUNITY, NOV 2004, vol. 72, no. 11, November 2004 (2004-11), pages 6255-6261, XP009045798 ISSN: 0019-9567 the whole document</p>	1-45
X	<p>US 2003/092899 A1 (GICQUEL BRIGITTE ET AL) 15 May 2003 (2003-05-15)</p> <p>abstract paragraphs '0052!, '0068!, '0069!, '0229! - '0235!</p>	1-7, 9-12, 14-27, 29-32, 34-39
Y	<p>WO 03/093307 A (THE SECRETARY OF STATE FOR ENVIRONMENT,; COCKLE, PAUL, JASON; VORDERME) 13 November 2003 (2003-11-13) the whole document</p>	1-45
Y	<p>US 5 679 784 A (LADANT ET AL) 21 October 1997 (1997-10-21) the whole document</p>	1-45

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In:	nal Application No
	PCT/JP2004/014087

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003092899 A1	15-05-2003	US 6436409 B1	20-08-2002
		AU 8123898 A	10-02-1999
		CA 2296419 A1	28-01-1999
		EP 1003870 A1	31-05-2000
		WO 9904005 A1	28-01-1999
WO 03093307 A	13-11-2003	AU 2003224313 A1	17-11-2003
		WO 03093307 A2	13-11-2003
US 5679784 A	21-10-1997	US 5503829 A	02-04-1996
		CA 2133999 A1	28-10-1993
		WO 9321324 A1	28-10-1993
		EP 0637335 A1	08-02-1995
		US 5935580 A	10-08-1999

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 9/88 (2006.01)	C 0 7 K	14/35	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N	9/88	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02	
	C 0 7 K	14/195	

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

(71) 出願人 500366598
 インセルム(アンスティチュ・ナショナル・ドゥ・ラ・サンテ・エ・ドゥ・ラ・ルシエルシュ・メディカル)
 INSERM(INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE)
 フランス国、エフ - 7 5 6 5 4 パリ・セデックス 13、リュ・ドゥ・トルビアック、101

(71) 出願人 506173282
 インスティチュート・オブ・マイクロバイオロジー・オブ・ザ・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・チェッコ・リパブリック
 Institute of Microbiology of the Academy of Sciences of the Czech Republic
 チェッコ国、142 20 プラハ 4、ヴィデンスカ 1083

(71) 出願人 506173215
 ベタリナリー・ラボラトリーズ・エージェンシー - ヴェーブブリッジ
 VETERINARY LABORATORIES AGENCY - WEYBRIDGE(BR)
 イギリス国、サリー ケーティー15 3エヌビー、アドルストーン、ニュー・ハウ

(71) 出願人 506172296
 インペリアル・カレッジ・ロンドン
 IMPERIAL COLLEGE LONDON
 イギリス国、ロンドン エスタブリュー7 2エイゼット、エキジビション・ロード

(74) 代理人 100078662
 弁理士 津国 肇

(74) 代理人 100075225
 弁理士 篠田 文雄

(72) 発明者 ルクレール, クロード
 フランス国、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ・ドゥ・ラミラル・ルーサン 13

(72) 発明者 マジレッシ, ラレ
 フランス国、エフ - 7 8 1 8 0 モンティニー・ル・ブルトヌー、ブルヴァール・デカルト 12

(72) 発明者 ルーフ, ジェラルディン
 フランス国、エフ - 9 4 2 3 0 カシャン、アヴニュー・クーザン・ドゥ・メリクール 2

- (72)発明者 セボ, ピーター
チェッコ国、142 00 プラハ 4、ズボドフスカ 762 / 5
- (72)発明者 シムソーヴァ, マルセラ
チェッコ国、735 81 ボフミン、ベツルコヴァ 1145
- (72)発明者 ボーダーマイアー, マーティン
イギリス国、サリー ケーティー15 3エヌビー、アドルストーン、ニュー・ハウ、ウッドハム・レーン、ティービー・リサーチ・グループ、ブイエルエー・ウェイブリッジ
- (72)発明者 ウィルキンソン, ロバート
イギリス国、ケンジントン エスタブリュ7 4エイチエス、エンペラーズ・ゲート 24、アパートメント 13
- (72)発明者 シェールヴィンク, エリザベス
オランダ国、エンエル - 9712 ベーピー・フローニンゲン、トゥルフトレンストラート 10
- (72)発明者 ルーカ, イジナ
チェッコ国、27201 クラドノ、ノルスカ 2491
- F ターム(参考) 4B024 AA11 AA12 BA07 CA04 CA05 CA06 CA07 DA06 EA04 FA02
FA10 HA03 HA08 HA14
4B050 CC03 DD02 LL03
4B063 QA01 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR69 QR77 QS10 QS12 QS24
QS28 QS33 QS36 QX02
4B065 AA01Y AA26X AA36Y AB01 AC14 BA02 BA24 CA24 CA27 CA46
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA41 CA11 DA86 DA89 EA50 EA52
FA72 FA74

- (54)【発明の名称】診断及び免疫モニタリングに使用するための *Bordetella sp.* の組換えアデニル酸シクラーゼ、該組換えアデニル酸シクラーゼを使用する診断方法又は免疫モニタリング方法、並びに該組換えアデニル酸シクラーゼを含む診断又は免疫モニタリング用キット

专利名称(译)	Bordetellasp的重组腺苷酸环化酶。用于诊断和免疫监测，使用所述重组腺苷酸环化酶的诊断方法或免疫监测方法，以及包含所述重组腺苷酸环化酶的用于诊断或免疫监测的试剂盒		
公开(公告)号	JP2007514415A	公开(公告)日	2007-06-07
申请号	JP2006540414	申请日	2004-11-19
[标]申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所 在细胞研究所孟菊国家德比Rasante埃杜拉尔壳邦医疗 法国国家健康医学研究院 捷克共和国SCI学院微生物学研究 固体烹饪实验室机构Weserblick桥 兽医实验室代理韦布里奇		
申请(专利权)人(译)	巴斯德研究所 Inserumu (Ansutichu国家德拉桑特等德拉RECHERCHE医疗) 的切科共和国科学院微生物研究所 Betarinari实验室机构 - Weserblick桥 英国伦敦帝国学院		
[标]发明人	ルクレールクロード マジレッシラレ ルーフジェラルデン セボピーター シムソーヴァマルセラ ボーダーマイアーマーティン ウィルキンソンロバート シェールヴィンクエリザベス ルーカイジナ		
发明人	ルクレール, クロード マジレッシ, ラレ ルーフ, ジェラルデン セボ, ピーター シムソーヴァ, マルセラ ボーダーマイアー, マーティン ウィルキンソン, ロバート シェールヴィンク, エリザベス ルーカ, イジナ		
IPC分类号	C12N15/09 G01N33/53 G01N33/574 C07K19/00 C07K14/35 C12N9/88 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12Q1/02 C07K14/195 G01N33/50 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5695 C12Q1/527 G01N33/505 G01N33/6893 G01N2333/235 G01N2333/988		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A G01N33/53.D G01N33/53.Q G01N33/574.A C07K19/00 C07K14/35 C12N9/88 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12Q1/02 C07K14/195		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA12 4B024/BA07 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B050/CC03 4B050/DD02 4B050/LL03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA01Y 4B065/AA26X 4B065/AA36Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA24 4B065/CA24 4B065/CA27 4B065/CA46 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA11 4H045/DA86 4H045/DA89 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74		

代理人(译)

津国 肇
筱田文雄

优先权

60/523704 2003-11-21 US

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

诊断测试和使用免疫学监测基因脱毒的作为递送系统百日咳博德特氏菌的CyaA，例如，任何免疫反应，诸如通过感染性和非感染性疾病或疫苗接种有效跟踪产生的免疫应答它是。给定抗原前刺激的T细胞可以在体外通过的CyaA是或已经是或化学偶联融合到其片段的相同抗原来再刺激。本发明中，一个结核分枝杆菌免疫的蛋白质ESAT-6和CFP-10，人细胞和非人类动物的细胞，例如，牛细胞，诊断测试或结核通过提供可以被递送到递送系统包括免疫监测。此外，和的CyaA癌抗原，癌之间的融合蛋白，例如，被提供作为诊断测试和黑素瘤的免疫监视系统。

プライマー	配列
Esat6-I	5'-GATGT <u>GTAC</u> ACATGACAGAGCAGCAGTGG-3'
Esat6-II	5'-GATGT <u>GTAC</u> ACTGAGCGAACATCCCAGTGACG-3'
Cfp10-I	5'-CATGT <u>GTAC</u> ACATGGCAGAGATGAAGACC-3'
Cfp10-II	5'-CATGT <u>GTAC</u> ACTGAAGCCCATTTGCGAGGA-3'