

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5270500号
(P5270500)

(45) 発行日 平成25年8月21日(2013.8.21)

(24) 登録日 平成25年5月17日(2013.5.17)

| | | | |
|---------------|-----------|---------------|-------|
| (51) Int.Cl. | | F I | |
| C 1 2 N 15/09 | (2006.01) | C 1 2 N 15/00 | A |
| C 0 7 K 14/32 | (2006.01) | C 0 7 K 14/32 | |
| C 0 7 K 19/00 | (2006.01) | C 0 7 K 19/00 | Z N A |
| C 1 2 Q 1/02 | (2006.01) | C 1 2 Q 1/02 | |
| A 6 1 K 38/00 | (2006.01) | A 6 1 K 37/02 | |

請求項の数 22 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-212567 (P2009-212567)
 (22) 出願日 平成21年9月14日(2009.9.14)
 (62) 分割の表示 特願2002-578420 (P2002-578420)
 の分割
 原出願日 平成14年3月28日(2002.3.28)
 (65) 公開番号 特開2010-42008 (P2010-42008A)
 (43) 公開日 平成22年2月25日(2010.2.25)
 審査請求日 平成21年9月14日(2009.9.14)
 (31) 優先権主張番号 60/279,366
 (32) 優先日 平成13年3月28日(2001.3.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 500491786
 プレジデント・アンド・フェローズ・オブ
 ・ハーバード・カレッジ
 アメリカ合衆国マサチューセッツ州021
 38, ケンブリッジ, マサチューセッツ・
 アベニュー 1350, ホルヨーク・セン
 ター, スイート 727
 (73) 特許権者 592017633
 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ
 ション
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 114, ボストン, フルーツ ストリ
 ート 55
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 外因性タンパク質をサイトゾルに運搬する方法およびその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

輸送因子と標的抗原とを含む、インピトロでのサイトカイン反応の生成に使用するためのキットであって、ここで、該輸送因子は、以下のアミノ酸配列：

【化1】

agg^hgdv gmhvkekekn kdenkrkdee

rnktqeehlk eimkhivkie vkgeavkke aaekllekvp sdvlemykai ggkiyivdgd

itkhisleal sedkkkikdi ygkdallheh yvyakegyep vlviqssedy ventekaln

yyeigkilsr dilskinppy qkfldvnti knasdsdgd llftnqlkeh ptdfsvefle

qnsnevqevf akafayyiep qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinlsl,

10

のうちの少なくとも150～253位のアミノ酸から成り、そして、B . a n t h r a c i s 由来の防御抗原(PA)は使用されない、キット。

【請求項2】

前記標的抗原が、細菌の標的抗原である、請求項1に記載のキット。

【請求項3】

前記細菌の標的抗原が、S . t y p h i またはマイコバクテリア由来のポリペプチドで

20

ある、請求項 2 に記載のキット。

【請求項 4】

前記マイコバクテリアが *M. tuberculosis* である、請求項 3 に記載のキット。

【請求項 5】

細胞において標的抗原に対する免疫応答を生成するための医薬組成物であって、輸送因子に結合された該標的抗原と、免疫アジュバント、サイトカイン、副刺激分子、該抗原または該輸送因子に共役させた非抗原性の高分子物質からなる群より選択される少なくとも 1 つの化合物とを含み、ここで、該輸送因子は、以下のアミノ酸配列：

【化 1 A】

agghgdv gmhvkekekn kdenkrkdee
 rnktqeehl k eimkhivkie vkgeeavkke aaekllekvp sdvlemykai ggkiyivdgd
 itkhisleal sedkkkikdi ygkdallheh vyvakegyep vlviqssedy ventekalnv
 yyeigkilsr dilskinppy qkfldvinti knasdsdgqd llftnqlkeh ptdfsvefle
 qnsnevqevf akafayyiep qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinlsl,

10

の少なくとも 150 ~ 253 位のアミノ酸から成り、そして、二量体エキソトキシン由来の防御抗原 (PA) は存在しない、医薬組成物。

20

【請求項 6】

前記の群からの少なくとも 2 つの化合物が使用される、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記輸送因子が、ヒト被験体における前記標的抗原に対する細胞性免疫 (CMI) 応答を生成するための免疫刺激組成物の製造に適している、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記輸送因子が、LF の N 末端断片 (LFn) であり、そして、以下のアミノ酸配列：

【化 2】

agghgdv gmhvkekekn kdenkrkdee
 rnktqeehl k eimkhivkie vkgeeavkke aaekllekvp sdvlemykai ggkiyivdgd
 itkhisleal sedkkkikdi ygkdallheh vyvakegyep vlviqssedy ventekalnv
 yyeigkilsr dilskinppy qkfldvinti knasdsdgqd llftnqlkeh ptdfsvefle
 qnsnevqevf akafayyiep qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinlsl,

30

から成る、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記免疫アジュバントが、ミョウバン、不完全フロイントアジュバント、CM-CSF、QS21、CpG、RIBI Detox からなる群より選択される、請求項 5 に記載の医薬組成物。

40

【請求項 10】

前記サイトカインが、IL-2、Ig-IL2、IL-12 および IL-4 からなる群より選択される、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記副刺激分子が、B7、ICAM、LFA からなる群より選択される、請求項 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

50

前記非抗原性の高分子物質が、デキストラン、ポリビニルピロリドン、多糖類、スターチ、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリ（アルキレンオキシド）、モノメトキシ-ポリエチレングリコールポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールのブロックコポリマー、ポリプロピレングリコールからなる群より選択される、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項13】

前記標的抗原が、ウイルス性抗原、細菌の抗原および腫瘍抗原からなる群より選択される、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項14】

前記細菌の標的抗原が、S . t y p h iまたはマイコバクテリア由来のポリペプチドである、請求項13に記載の医薬組成物。

10

【請求項15】

前記マイコバクテリアがM . t u b e r c u l o s i sである、請求項14に記載の医薬組成物。

【請求項16】

前記輸送因子が、化学結合によって前記標的抗原に結合される、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項17】

前記輸送因子が複数の抗原に結合する、請求項5に記載の医薬組成物。

【請求項18】

免疫原性量の前記組成物と、製薬上許容できる担体とを含む、請求項5に記載の医薬組成物。

20

【請求項19】

標的抗原に対する細胞性免疫応答を生成するための医薬組成物であって、輸送因子に結合された該標的抗原と、ミョウバンとを含み、ここで、二量体エキソトキシン由来の防御抗原（PA）は存在せず、そして、該輸送因子は、以下の配列：

【化4】

agghgdv gmhvkekekn kdenkrkdee

rnktqeehl k eimkhivkie vkgeavkke aaekllekvp sdvlemykai ggkiyivdgd

itkhisleal sedkkkikdi ygkdallheh yvyakegyep vlviqssedy ventekalnv

yyeigkilsr dilskinqpy qkfldvinti knasdsdgd llftnqlkeh ptdfsvefle

qnsnevqevf akafayyiep qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinlsl,

30

の少なくとも150～253位のアミノ酸から成る、医薬組成物。

【請求項20】

輸送因子を含む、疾患の処置のための組成物であって、該組成物は、細胞の細胞質に標的抗原を送達することを特徴とし、ここで、該輸送因子は、該標的抗原に結合され、そして、該輸送因子は、以下のアミノ酸配列：

40

【化5】

agghgdv gmhvkekekn kdenkrkdee

rnktqeehl k eimkhivkie vkgeavkke aaekllekvp sdvlemykai ggkiyivdgd

itkhisleal sedkkkikdi ygkdallheh yvyakegyep vlviqssedy ventekalnv

yyeigkilsr dilskinqpy qkfldvinti knasdsdgd llftnqlkeh ptdfsvefle

qnsnevqevf akafayyiep qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinlsl,

50

またはその少なくとも 150 ~ 253 位のアミノ酸の部分から成り、ここで、*B. anthracis* 由来の防御抗原 (PA) は使用されず、そして、該標的抗原は、B 型肝炎ウイルス抗原、C 型肝炎ウイルス抗原、エボラウイルス抗原、西ナイルウイルス抗原、単純ヘルペスウイルス 2 型抗原、HBV 抗原、HCV 抗原、HIV-2 抗原、HIV-1 抗原、および TB 抗原からなる群より選択される、組成物。

【請求項 21】

標的抗原と、*B. anthracis* 由来の輸送因子とを含む単離されたポリペプチドであって、該輸送因子は、以下のアミノ酸配列：

【化 7】

agghgdv gmhvkekekn kdenkrkdee
rnktqeehik eimkhivkie vkgeeavkke aaekllekvp sdvlemykai ggkiyivdgd
itkhisleal sedkkkikdi ygkdallheh yvyakegyep vlviqssedy ventekalnv
yyeigkilsr dilskinqpy qkfldvinti knasdsdgd llftnqlkeh ptdfsvefle
qnsnevqevf akafayyiep qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinls,

10

の少なくとも 150 ~ 253 位のアミノ酸から成り、そしてここで、該標的抗原は、*S. typhi* またはマイコバクテリア由来のポリペプチドである、単離されたポリペプチド。

20

【請求項 22】

前記マイコバクテリアが *M. tuberculosis* である、請求項 21 に記載の単離されたポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、国立医療研究所 (National Institutes of Health) の助成 AI47539 により支持されたものであり、米国政府は、特定の権利をそれに与えている。

30

【0002】

発明の分野

本願は、外因性タンパク質をサイトゾルへ運搬する方法、新規な融合タンパク質、および、その使用に向けられる。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

多くの注目が、免疫反応を発生させる方法に集中している。外因性の抗原に対する免疫反応の 1 つのクラスは、抗体生産であり、一般的に体液性免疫と呼ばれている。免疫反応の第二の形態は、抗原提示細胞 (APC) による抗原提示に起因する。このタイプの免疫反応は、概して、細胞性免疫 (CMI)、または T 細胞応答と呼ばれる。双方のタイプの免疫反応が重要であるにもかかわらず、近年、相当な労力が CMI におかれている。ヒト免疫不全ウイルス (HIV) により引き起こされる AIDS のような感染症を扱う際、ウイルスとその部分に対する抗体応答は、免疫性を論議するのに十分な程証明されていない。同様に、多くの悪性病変に関連する外因性タンパク質を扱う際も、抗体応答は、十分に証明されていない。従って、推測は、CMI 応答を発生させることに重点をおいている。

40

【0004】

CMI を発生させるために、抗原は、APC 表面上の主要組織適合複合体 (MHC) クラス I または II 分子に結合しなければならない。一般的にクラス I 分子は、外部的に抗

50

原（例えば内在性タンパク質、ウイルス感染から生じた抗原、および腫瘍抗原）を提示する。一般的に、病原体により誘導された（またはガン性の）ペプチドエピトープ（通常、8～10個のアミノ酸）が宿主クラスI MHCによりコードされた分子により提示される場合、抗原特異的T細胞は感染した標的細胞を認識する（7）。これらエピトープは、プロテオソームにより小さいペプチド断片に分割された細胞質のタンパク質から誘導される。次にこれらは、小胞体（ER）の内腔に輸送され、そこでそれらは新たに合成されたMHC-I分子と複合体を形成し、その後、細胞表面に輸送され、そこでT細胞による認識が起こる（8～13）。一般的に、細胞外の液体中の抗原（外因性の抗原）は、殆どの細胞において、この処理区画に接近しない。従って、ワクチンを用いてCMIを引き出すことに対する意義深いチャレンジは、MHCクラスI分子による提示のために、外因性の抗原をサイトゾルに運搬することである。HIVのような多種多様の感染症、同様に前立腺ガン、乳ガンおよび黒色腫のようなガンに対するワクチンを生成可能であることが望ましい。

10

【0005】

例えば、顕著になりつつある証拠によれば、HIV感染の制御においてCMIが主要な役割を有することが示される（Ogg et al., Science 279:2103-6 (1998); Schmitz et al., Science 283:857-60 (1999), Brodley et al., Nat. Med. 5:34-41 (1999)）。HIVに晒されたが未感染のままの個体は、しばしば抗ウイルス性CMIを起こすが、抗体応答は起こさない。一次感染のウイルス血症は、特異抗体の発達前のウイルス特異的な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の発達と分析されている（Letvin, Science 280:1875-96 (1998)）。これらデータは、HIV感染の制御においてCMIが果たす中心的な役割を説明する。

20

【0006】

多くの腫瘍は、特定のタンパク質の発現および/または特定のタンパク質の過剰発現に関連する。例えば、前立腺ガンは、前立腺特異的抗原（PSA）のようなタンパク質のレベルが上昇することに関連する。乳ガンは、Her-2、Muc-1、CEAなどのようなタンパク質の発現および/または過剰発現に関連する。従って、相当な労力が、免疫反応を発生させようとする試み、特にこのような悪性病変の治療においてこのような抗原に対するCMIを開発することに向けられている。

30

【0007】

細胞性免疫を感染症に対して開発するアプローチは、例えば、遺伝子操作した不活性化ウイルスを作成すること、または、不活性化感染因子を用いることによって、感染因子全体を用いることが含まれていた。他のアプローチは、サブユニットワクチンであり、これは、1またはそれ以上の抗原（ただしウイルス全体ではない）を被験者に提示する。

【0008】

CMIを発生させるために、抗原は、細胞内部に運搬されなければならない。外因性タンパク質は、細胞に吸収されにくい。従って、好ましい方法は、ウイルスベクター、リボソーム、裸のDNAのような方法、または類似のアプローチを用いることであった。しかしながら、このようなアプローチは、多くの不利益がある。例えば、多くの組換えウイルスは、繰り返しの投与でそれ自身が抗原反応を起こす。一般的に、免疫反応を発生させる標準的な形態は、初期注入（仕込み（prime）と呼ばれる）と、後続注入（ブーストと呼ばれる）とを良好な免疫性を達成させるために必要とするため、これは深刻な問題となり得る。その上、多くの労力がウイルスベクターの安全性を高めることに置かれてはいるが、ある程度の危険は常に存在する。例えば、HIV感染固体群のような標的個体群の多くは、弱まった免疫系を有する可能性がある。従って、多くの個体において完全に安全な特定のウイルスベクターは、これら個体にある程度の危険を与える可能性がある。現時点で、タンパク質を細胞に運搬する方法も、完全に満足行くほど解明されていない。従って、CMIを刺激するための、抗原をサイトゾルに運搬する新規で簡単な方法が必要である。

40

50

【 0 0 0 9 】

C M I 応答を開発する試みにおいて、これら応答を測定することの難しさに関する技術的な問題も存在する。

細胞性免疫反応を検出する現在利用可能な実験分析は、特に様々な臨床条件における大規模なワクチン効率試験に適用する場合に、深刻な短所がある。これは、当分野において、現在の技術を用いてC M Iを測定するのに必要な利用可能な器具と技術的サポートが、それらが必要とされる環境においてしばしば最小限であるためである。C T Lは、H I V - 1 感染の制御において重大な役割を有すると考えられており、多くのH T V - 1 ワクチン候補が、T細胞応答を刺激し、同様に抗体を中和するように設計される(1~6)。しかしながら、H I V - 特異的C T LのようなC M Iを検出するための標準的な実験方法は複雑で、時間がかかり、しばしば極めて特殊化された設備に制限される。T細胞応答を測定する改良方法は、全てのT細胞依存性ワクチンまたは免疫療法の開発に重要な効果を持ち得る。この方策は、C M I 応答が、病気の予防およびコントロールにおいて重要な役割を有することが知られているようなその他の研究分野に、適用可能であるかもしれない。

10

【 0 0 1 0 】

インビトロでC M I 応答を確実に検出することにおける一つの問題は、抗原提示に関する特有な必要性に起因する。上述したように、M H C クラス I 分子によりT細胞へ提示させるための、外因性タンパク質のサイトゾルへの運搬は、意義深いチャレンジを象徴する。この物理的なクラス I 経路の区画は、インビトロでT細胞応答を検出するための主要なバリアーであった。その結果として、C M I 測定における現在の実験方法の多くは、抗原をサイトゾルへ運搬するのに生きたウイルスベクターまたは細菌ベクターを利用しており、その際、ワクシニアウイルスのような組換えp o x が最も一般的に使用される。他のアプローチは、既知のC T L エピトープから誘導された合成ペプチド(10~20個のアミノ酸)と共に、M H C - I 分子を標的細胞の表面に外部的にローディングさせることである。これら方法は、一般的な臨床的使用において深刻な制限がある。組換えワクシニアウイルスのような生きたウイルスベクターの使用は、訓練を積み、かつ免疫された実験技師、加えて、予防面で安全な処置として最低限遮蔽された施設を必要とする。合成ペプチドは、法外に高価であるだけでなく、様々な個体群で様々なM H C - I 分子に適合する「ユニバーサル」ペプチドのプロファイル設計が極めて難しい。それゆえに、T細胞応答を測定する分析の開発に関するチャレンジは、生きた組換えウイルスベクターまたは細菌ベクターに頼ることなく大きな外因性の抗原をサイトゾルに運搬することである。

20

30

【 0 0 1 1 】

従って、インビトロでC M I を測定するのに使用可能なキットを有することが望ましい。H I V に対するワクチンのような多数のワクチン候補を試験する多くの提案があるアフリカ、インドおよびアジアのような遠隔地で容易に使用可能なキットを有することが、特に望ましい。

【 0 0 1 2 】

我々は、ここで、B a c i l l u s a n t h r a c i s のような二量体(b i p a r t i t e) タンパク質エキソトキシンのファミリーが、タンパク質のような外因性の抗原をサイトゾルに運搬するのに用いることができる断片を含むことを見出した。これらタンパク質からの1つの好ましいタンパク質断片は、防御抗原(P A) 結合ドメインを含むN末端部分から得られるが、それらの細胞に対して毒性となる部分からは得られない。より好ましくは、該断片は、P A に結合する特異的なドメインを除去するように改変されている。

40

【 0 0 1 3 】

B . a n t h r a c i s は、動物およびヒトにおける炭疽の原因物質である。B . a n t h r a c i s により生産される毒素は、2種の二量体タンパク質エキソトキシんと、致死性毒(L T) と、浮腫毒とからなる。L T は、防御抗原(P A) と致死因子(L F) とから成り、一方で浮腫毒は、P A と浮腫因子(E F) とからなる。これら3種の成分、P A 、L F 、およびE P のうちいずれも単独では毒性ではない。しかしながら、1度組み合

50

わさると、動物およびヒトにおいて、浮腫毒は浮腫を引き起こし、LTは全身性ショックによる死を引き起こす。双方の毒の形成におけるその重要な役割と一致して、PAは、炭疽に対するワクチンにおける防御成分として同定されている。目下、炭疽毒作用の分子メカニズムは、以下のように推測される：PAは、細胞性受容体により哺乳動物細胞の表面に結合する735個のアミノ酸ポリペプチドである。1度結合したら、PAは、細胞性プロテアーゼによる、標的細胞の細胞質膜におけるリング型7量体を形成することができる63kDa分子へのタンパク分解性の開裂によって活性化される(図1)(6,7)。次にPA7量体は、EFまたはLPのいずれかに結合し、エンドサイトーシスにより吸収される。エンドソーム酸性化の後、おそらくは7量体により形成された孔により、PAは、EFまたはLFをサイトゾルに入れさせることができる。サイトゾル内部で、EFはアデニレートシクラーゼとして作用し(8)、ATPをcAMPに変換させる。異常に上昇したcAMPレベルにより、細胞の代謝がかき乱される。

【0014】

サイトゾルにおけるLFの作用は、宿主細胞の死を招くが、そのメカニズムは十分に理解されていない。LFは、多数のリンフォカインの過剰生産を誘導し(9)、宿主動物において致命的な全身性ショックに寄与する。最近の研究はまた、LFが2種の酵素活性を有することを示している：LFは、亜鉛メタロプロテアーゼとして作用可能であり(10)、ミトジェン活性化タンパク質キナーゼを不活性化する(11)。LFのこれら2種の酵素活性がどのように関連しているのか未だははっきりしていないが、双方ともLP毒性に必要である。以前に、炭疽毒Bの一部が、PA存在下で免疫系により順番に抗体応答を引き出すエピトープ(epitope)を運搬するのに用いることができるということが報告されている(WO97/23236)。

【0015】

LFは、809個のアミノ酸からなるポリペプチドであり、双方の酵素活性に関する機能的ドメインはアミノ酸383と796との間に位置する(図2A)(12)。PAと混合され、培養マクロファージに添加された場合、または、動物に注入された場合、この触媒ドメインを含まないN末端平滑化LFは、いかなる毒作用も完全に欠如されている。しかしながら、LFは、実際上、PAに結合したままである。LFのPA結合ドメイン(LFn)は、アミノ酸1~255からなる(図2B)(12)。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0016】

発明の要約

本発明は、外因性の抗原をサイトゾルに運搬する方法、新規な融合タンパク質、およびその使用を提供する。

【0017】

我々は、現在、毒性ドメインを不活性化するように改変された致死因子である輸送因子、LFnおよびLFnの断片のようなその断片(これは例えば、輸送因子として該断片のカルボキシ部分を含み、抗原をサイトゾルに運搬するためのPAを用いずに標的抗原に融合した断片である)が使用可能であることをさらに見出した。好ましくは、輸送因子は、LFnまたはその断片である。1つの好ましい群は、PA結合ドメインを含まないLFn断片である。より好ましくは、輸送因子は、LFn断片である。例えば、LFnの60個のカルボキシ主成分アミノ酸は、輸送因子として用いることができる；さらにより好ましくは、80個のカルボキシ主成分アミノ酸である。また、他の断片を用いることもできる。例えば、毒素部分が不活性化されるのであれば、より多くの致死因子タンパク質を含む断片を用いることができる。好ましくは、輸送因子断片は、LFnの80個のカルボキシ主成分アミノ酸残基の部分を含み、毒性を含むその部分が除去されているのであれば、該断片の他の部分を含む。好ましくは、該断片は、350個またはそれ未満のアミノ酸であり、さらにより好ましくは300個またはそれ未満のアミノ酸であり、さらにより好ましくは250個またはそれ未満のアミノ酸である。1つの好ましい断片は、105個または

10

20

30

40

50

それ未満のアミノ酸である。より好ましい断片は、80個またはそれ未満のアミノ酸である。次にこの輸送因子は、サイトゾルへ運搬することが望まれる抗原に結合する。これは、当業界周知の技術によりなされ得る。例えば、抗原を含む融合タンパク質、または、細胞のサイトゾルへ運搬することが望まれる抗原を調製することができる。

【0018】

本発明の好ましい方法は、処理した動物において、細胞性免疫反応の形成が引き起こされる新規なポリペプチドによって特徴付けられる。

本発明は、本発明の新規な融合ポリペプチドをコードするDNA配列、当該DNA配列によって特徴付けられる組換えDNA分子、当該DNA配列および分子で形質転換された単細胞宿主、ならびに、新規なポリペプチドおよび本発明の望ましい抗原に対するCMI免疫反応を発生させるための、当該配列、分子および宿主を用いる方法を提供する。

10

【0019】

他の好ましい実施形態において、本発明は、1またはそれ以上の本発明の新規な融合ペプチドを含む医薬組成物を提供する。このような組成物は、細胞性免疫反応を引き起こすのに有効である。1つの好ましい実施形態において、該組成物は、ワクチンとして用いることができる。他の実施形態において、これら融合タンパク質は、生産細胞、好ましくは多種多様なタンパク質、特にこのような細胞で発現させることが困難であることが証明されているタンパク質の細菌の生産細胞を作成するのに用いることができる。

【0020】

他の好ましい実施形態において、本発明は、細胞性免疫反応を測定する方法を提供する。

20

さらに好ましい実施形態において、本発明は、インビトロで細胞性免疫反応を測定するキットを提供する。

【0021】

本発明は、例えば以下を提供する。

(項目1)

標的抗原を細胞のサイトゾルに運搬する方法であって、標的抗原を輸送因子に結合させることを含み、輸送因子は、細胞に対して毒性ではない二量体タンパク質エキソトキシンの断片を含み、防御抗原(PA)は用いられない、前記方法。

(項目2)

輸送因子が、配列番号2(LFn)またはその部分を含む、項目1に記載の方法。

30

(項目3)

輸送因子が、配列番号2のPAに結合する部分を含まない断片である、項目2に記載の方法。

(項目4)

輸送因子が、LFnの80個のカルボキシ主成分アミノ酸である、項目3に記載の方法。

(項目5)

輸送因子が、配列番号2のアミノ酸1~149を含まない、項目3に記載の方法。

(項目6)

輸送因子が、配列番号3によりコードされる、項目3に記載の方法。

40

(項目7)

輸送因子が、配列番号2と少なくとも80%のホモロジーを有する少なくとも80アミノ酸の断片である、項目1に記載の方法。

(項目8)

輸送因子が、350個またはそれ未満のアミノ酸の断片である、項目1に記載の方法。

(項目9)

輸送因子が、300個またはそれ未満のアミノ酸である、項目1に記載の方法。

(項目10)

50

輸送因子が、250個またはそれ未満のアミノ酸である、項目1に記載の方法。

(項目11)

輸送因子が、105個またはそれ未満のアミノ酸である、項目1に記載の方法。

(項目12)

輸送因子が、配列番号2の、150～253個またはそれ未満のアミノ酸である、請求項11に記載の方法。

(項目13)

標的抗原が、ウイルス性抗原、細菌の抗原、および腫瘍抗原からなる群より選択される、項目1に記載の方法。

(項目14)

ウイルス性抗原がHIV抗原である、項目13に記載の方法。

(項目15)

輸送因子が、融合ポリペプチドの発現により標的抗原に結合し、単一の核酸コーディング配列により輸送因子と標的抗原との双方がコードされる、項目1に記載の方法。

(項目16)

輸送因子が、化学結合により標的抗原に結合する、項目1に記載の方法。

(項目17)

輸送因子が、細胞に対して毒性ではない二量体タンパク質エキソトキシンの断片を含み、標的抗原を細胞のサイトゾルに運搬するように機能する、標的抗原と輸送因子とを含む単離されたポリペプチド。

(項目18)

輸送因子が、対応する防御抗原(PA)に結合するドメインを含まない、項目17に記載の単離されたポリペプチド。

(項目19)

項目18に記載のポリペプチドをコードする単離されたDNA。

(項目20)

ペプチドの発現のための少なくとも1つのプロモーター配列を含む5'-フランキング領域をさらに含む、項目16に記載の単離されたDNA。

(項目21)

項目20に記載の単離されたDNAを含むベクター。

(項目22)

標的抗原と輸送因子とを含む単離されたポリペプチドの免疫原性の量を含む医薬組成物であって、輸送因子は、細胞に対して毒性ではない二量体タンパク質エキソトキシンの断片を含み、標的抗原を細胞のサイトゾルに運搬するように機能し、対応する防御抗原が存在しない、前記医薬組成物。

(項目23)

アジュバントをさらに含む、項目22に記載の医薬組成物。

(項目24)

アジュバントがミョウバンである、項目23に記載の医薬組成物。

(項目25)

哺乳動物に項目22に記載の医薬組成物を投与することを含む、哺乳動物において細胞性免疫反応を発生させる方法。

(項目26)

医薬組成物が、皮下または筋肉内投与により投与される、項目25に記載の方法。

(項目27)

医薬組成物が、口での摂取により投与される、項目25に記載の方法。

(項目28)

項目18に記載の単離された核酸を細胞中で発現させることを含む、タンパク質を生産する方法。

(項目29)

10

20

30

40

50

細胞が、細菌の細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞からなる群より選択される、請求項 28 に記載の方法。

(項目 30)

細胞が細菌の細胞である、項目 29 に記載の方法。

(項目 31)

細胞性免疫反応分析において項目 17 に記載のポリペプチドを用いることを含む、細胞性免疫反応を測定する方法。

(項目 32)

細胞性免疫反応分析が、E l i s p o t 分析、および、フローに基づく細胞内のサイトカイン分析からなる群より選択される、項目 31 に記載の方法。

10

(項目 33)

項目 17 に記載の新規なポリペプチドを含む、インビトロでの細胞性免疫反応を測定するキット。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】エンドサイトーシスを介した細胞への L F n の P A 介在の侵入と、それに続く M H C クラス I 分子による提示とを描写する図面である。

【図2】様々な致死断片 (L F) ポリペプチドのアミノ酸配列を示す (配列番号 1) 。 図 2 A は、L F の全長アミノ酸配列を示す。図 2 B は、L F n の最初の 289 アミノ酸のアミノ酸配列を示す (配列番号 2) 。 図 2 C は、致死因子のアミノ酸 152 ~ 255 の配列 (場合によっては断片 3 と呼ばれる) を示す (配列番号 3) 。

20

【図3A】標的 L F n 提示が P A 非依存性であることを示すグラフである。標準的なクロム放出分析で、よく特徴付けられた C T L クロンの活性を、エフェクター：標的 (E : T) を 10 : 1 で試験した。標的は、P A の存在または非存在下で L F N で一晚感作した H L A - 適合 E B V - 形質転換細胞系であった。用いられたコントロールは、組換えワクシニアベクター (コントロールとして N Y C B H 、および、適切なクロンとして r V V - N e f または E n v ペプチド) であった。図 3 A は、N e f 組換えワクシニアベクター、P A および L F n N e f または L F n N e f 単独と共に一晚インキュベートした B 6 0 制限標的細胞に対する、N e f 特異的クローン (K M) の活性を試験したことを示す。各標的に関するバックグラウンド / コントロールが含まれる (コントロール , P A - L F n , L F n) 。

30

【図3B】標的 L F n 提示が P A 非依存性であることを示すグラフである。標準的なクロム放出分析で、よく特徴付けられた C T L クロンの活性を、エフェクター：標的 (E : T) を 10 : 1 で試験した。標的は、P A の存在または非存在下で L F N で一晚感作した H L A - 適合 E B V - 形質転換細胞系であった。用いられたコントロールは、組換えワクシニアベクター (コントロールとして N Y C B H 、および、適切なクロンとして r V V - N e f または E n v ペプチド) であった。図 3 B は、E n v 特異的 C T L クローン (S P 5 1 1) が L F n E n v で標識した標的を用量に依存して認識し、再び P A 非依存性であったことを示す。用いられたコントロールは、ペプチド E n v 106B (100 μ g / m l) であった。L F n 構築物の用量は、μ g / m l (L f n E n v 5 = 5 μ / m l の L f h E n v) として列挙される。

40

【図4A】L F n - H I V 認識が H L A で制限されることを示すグラフである。4 A は、H L A - B 14 制限 G a g クローン (A C 13) の活性を、L F n P 24 で感作した H L A 適合および非適合 B - L C L を用いて試験し、標準的なクロム放出分析で試験したことを示す。R v v - G a g は、コントロールとして用いられた。

【図4B】L F n - H I V 認識が H L A で制限されることを示すグラフである。2 B は、B 6 0 N e f クローン (K M) に対する H L A 制限は、L F n N e f で感作した H L A 適合および非適合標的を用いて示されたことを示す。T A P 欠失 (T 2) 、H L A - B 6 0 標的細胞を L F n N e f と最適な N e f ペプチドとで感作し、溶解に関して試験した。T

50

2 L F n N e f 標的細胞に関する活性の欠失は、プロテオソームプロセシングの必要性を示している。全てのクローンを E : T = 1 0 : 1 で用い、溶解レベルをバックグラウンドコントロールのレベルから引算した。N Y C B H を組換えワクシニアウイルスコントロールとして用い、L F n 単独を L F n P 2 4 および L F n N e f として用いた。ポジティブコントロールとしては、N e f ペプチド 1 8 0 および組換えワクシニアベクター G a g (r v v - G a g) が含まれる。

【図 5 A】L F n - H I V の内部移行とプロセシングとを示すグラフである。5 A は、プレフェルジン A、サイトカラシン B およびクロロキンの存在下での、L F n N e f で感作した H L A - 適合標的細胞の N e f 特異的クローン (K M) 溶解を、L F n N e f 単独と比較して示す。サイトカラシン B およびプレフェルジン A とのコ - インキュベーションにより、N e f 特異的クローンによる認識が失われたが、クロロキンでは失われなかった。

10

【図 5 B】L F n - H I V の内部移行とプロセシングとを示すグラフである。5 B は、N e f を発現する組換えワクシニアウイルスで一晩で感染させた標的、または、最適なエピトープペプチド N e f 1 8 0 単独で感作した標的を用いた、または、クロロキン、サイトカラシン B またはプレフェルジン A の存在下での、同じ N e f クローンの活性を示す。標的細胞と C T L クローンを、サイトカラシン B、クロロキンまたはプレフェルジン A の存在下でインキュベートした場合、活性の顕著な減少は見られなかった。示された溶解レベルを、1 0 % 未満のバックグラウンド溶解から引算する。

【図 6】E l i s p o t 分析における L F n - H I V 発現を示したグラフである。既知の H T V 特異的 C T L 活性またはエピトープを有する H T V - 1 感染個体からの凍結保存された P B M C を、組換えワクシニアウイルスまたは L F n - H I V を用いた E l i s p o t 分析で用いた。L F n 単独および N Y C B H は、コントロールとして用いられた。二連のウェルにおいて、ウェル当たり 1 0 0 K 個の細胞を用いた。結果を、S F C / 1 0 0 万 (1 0 0 万当たりのスポット形成細胞) として報告する。

20

【図 7】F A C S プロットであり、細胞内のフローに基づく分析において L F n - H I V 発現を示す。N e f 特異的クローンにおける細胞内の I F N - 生産 (K M) (A)、同様に、E n v 特異的 C T L 活性を有する血清陽性の個体 (A C 2) の P B M C からの細胞内の I F N - 生産 (K M) (B) である。刺激していない細胞をネガティブコントロールとして用い (1)、組換えワクシニアウイルスをポジティブコントロールとして用い (2)、L F n N e f と L f a E n v とをそれぞれ用いた (3)。

30

【図 8】L F n 融合タンパク質を描写する図面である。

【図 9】L F n 融合タンパク質を描写する一連の図面である。

【図 1 0 A B C D E F】L F n - G F P の C H O 細胞への細胞摂取を示す。C H O 細胞を、コラーゲン処理したチャンバースライドで 8 0 % の群集になるように培養し、続いて精製した L F n - G F P と共に 1 時間インキュベートし、続いて P B S、および、プロテアーゼを添加した P B S でよく洗浄し、膜結合タンパク質を除去した。次に、細胞を抗トランスフェリン抗体で染色し、パラホルムアルデヒドで固定した。そのスライドを共焦点顕微鏡法で、それぞれ緑色 (G F P、図 1 0 A ~ D で示される)、および、赤色 (抗トランスフェリン、図 1 0 E ~ H で示される) に関して試験した。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージと共に (図 1 0 I ~ L) 示される。その結果として、黄色のスポットは、G F P がトランスフェリンタンパク質と同じスポットにあることを示し、従って細胞内部の G F P の位置の参照を提供する。図 1 0 A ~ D で示したように、相当数の緑色のスポットが、L F n - G F P で標的化された細胞中で 1 時間で可視化され、これは L F n - G F P が実際に細胞に侵入できることを示す。

40

【図 1 0 G H I J K L】L F n - G F P の C H O 細胞への細胞摂取を示す。C H O 細胞を、コラーゲン処理したチャンバースライドで 8 0 % の群集になるように培養し、続いて精製した L F n - G F P と共に 1 時間インキュベートし、続いて P B S、および、プロテアーゼを添加した P B S でよく洗浄し、膜結合タンパク質を除去した。次に、細胞を抗トランスフェリン抗体で染色し、パラホルムアルデヒドで固定した。そのスライドを共焦点顕

50

微鏡法で、それぞれ緑色（GFP、図10A～Dで示される）、および、赤色（抗トランスフェリン、図10E～Hで示される）に関して試験した。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージと共に（図10I～L）示される。その結果として、黄色のスポットは、GFPがトランスフェリンタンパク質と同じスポットにあることを示し、従って細胞内部のGFPの位置の参照を提供する。図10A～Dで示したように、相当数の緑色のスポットが、LFn-GFPで標的化された細胞中で1時間で可視化され、これはLFn-GFPが実際に細胞に侵入できることを示す。

【図11ABCDE】図10で説明した条件を用いた、GFPのCHO細胞への細胞摂取を示す。図11A、D、およびGは、CHO細胞をGFPと共に1時間インキュベートした結果を示す；図11B～C、E～F、およびH～Iは、CHO細胞をGFPと共に2時間インキュベートした結果を示す。図11A～Cは、緑色（GFP）に関して共焦点顕微鏡法で試験された細胞のフィールドを示す；図11D～Fは、それぞれ赤色（抗トランスフェリン）に対応する、共焦点顕微鏡法で試験されたフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図11G～I）と共に示される。GFP処理細胞において、緑色のスポットはほとんど示されなかった（図11）。

10

【図11FGHI】図10で説明した条件を用いた、GFPのCHO細胞への細胞摂取を示す。図11A、D、およびGは、CHO細胞をGFPと共に1時間インキュベートした結果を示す；図11B～C、E～F、およびH～Iは、CHO細胞をGFPと共に2時間インキュベートした結果を示す。図11A～Cは、緑色（GFP）に関して共焦点顕微鏡法で試験された細胞のフィールドを示す；図11D～Fは、それぞれ赤色（抗トランスフェリン）に対応する、共焦点顕微鏡法で試験されたフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図11G～I）と共に示される。GFP処理細胞において、緑色のスポットはほとんど示されなかった（図11）。

20

【図12ABCDEF】図10で上述したのと同じの実験方法を用いて、GFPの共存（co-localization）、および、リソソームを示すLAMP-2免疫蛍光を示す。図12A～Dは、赤色（LAMP-2）に関して共焦点顕微鏡法で試験された細胞のフィールドを示す；図12E～Hは、を示す緑色（LN-GFP）に関して共焦点顕微鏡法で試験された対応するフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図12I～L）と共に示される。

30

【図12GHIJKL】図10で上述したのと同じの実験方法を用いて、GFPの共存（co-localization）、および、リソソームを示すLAMP-2免疫蛍光を示す。図12A～Dは、赤色（LAMP-2）に関して共焦点顕微鏡法で試験された細胞のフィールドを示す；図12E～Hは、を示す緑色（LN-GFP）に関して共焦点顕微鏡法で試験された対応するフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図12I～L）と共に示される。

40

【図13ABCDEF】図10で上述したのと同じの実験方法を用いて、GFPの共存、および、エンドソームを示すEEA-1に対する免疫蛍光を示す。図13A～Dは、共焦点顕微鏡法で試験された赤色（EEA-1）に関する細胞のフィールドを示す；図13E～Hは、共焦点顕微鏡法で試験されたに於いて緑色（LN-GFP）対応するフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図13I～L）と共に示される。

【図13GHIJKL】図10で上述したのと同じの実験方法を用いて、GFPの共存、および、エンドソームを示すEEA-1に対する免疫蛍光を示す。図13A～Dは、共焦点顕微鏡法で試験された赤色（EEA-1）に関する細胞のフィールドを示す；図13E～Hは、共焦点顕微鏡法で試験されたに於いて緑色（LN-GFP）対応するフィール

50

ドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図13I～L）と共に示される。

【図14ABC】図10で上述したのと同じの実験方法を用いた、GFPと抗ゴルジ抗体との共存を示す。図14A-Bは、共焦点顕微鏡法で試験された赤色（抗ゴルジ抗体）に関する細胞のフィールドを示す；図14C～Dは、共焦点顕微鏡法で試験された緑色（LN-GFP）に関して対応するフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図14E～F）と共に示される。

【図14DEF】図10で上述したのと同じの実験方法を用いた、GFPと抗ゴルジ抗体との共存を示す。図14A-Bは、共焦点顕微鏡法で試験された赤色（抗ゴルジ抗体）に関する細胞のフィールドを示す；図14C～Dは、共焦点顕微鏡法で試験された緑色（LN-GFP）に関して対応するフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図14E～F）と共に示される。

【図15ABCDEFGH】プロテオソームを示すGFPの共存、および、抗20s免疫蛍光を示す。HeLa細胞を40μg/mlのLN-gfpと共に2時間インキュベートしたことを除いては、図10で用いられた条件と類似の条件を用いた。図15A～Dは、共焦点顕微鏡法で試験された赤色（抗20s抗体）に関する細胞のフィールドを示す；図15E～Hは、それぞれ共焦点顕微鏡法で試験された緑色（LN-GFP）に関して対応するフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図15I～L）と共に示される。図12～15の異なるイメージを比較することにより、最も黄色のスポットを含む過剰露出したイメージは図15で示したイメージであって、それにおいて、細胞内のLFn-GFPを示す緑色のスポットが、細胞性プロテオソームを示す赤色のスポットと顕著にオーバーラップしている。

【図15GHIJKL】プロテオソームを示すGFPの共存、および、抗20s免疫蛍光を示す。HeLa細胞を40μg/mlのLN-gfpと共に2時間インキュベートしたことを除いては、図10で用いられた条件と類似の条件を用いた。図15A～Dは、共焦点顕微鏡法で試験された赤色（抗20s抗体）に関する細胞のフィールドを示す；図15E～Hは、それぞれ共焦点顕微鏡法で試験された緑色（LN-GFP）に関して対応するフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図15I～L）と共に示される。図12～15の異なるイメージを比較することにより、最も黄色のスポットを含む過剰露出したイメージは図15で示したイメージであって、それにおいて、細胞内のLFn-GFPを示す緑色のスポットが、細胞性プロテオソームを示す赤色のスポットと顕著にオーバーラップしている。

【図16ABCDEFGH】図15で用いた条件と類似した条件下でPA添加しても、細胞内部の緑色のスポットの数がPA非存在下での数と比較して増加しなかったことを示す。図16A～Fは、PA非存在下での、LN-GFPを伴うHeLa細胞のインキュベーションを示す；図16G～Lは、PA存在下でHeLa細胞のインキュベーションを示す。図16A～BおよびG～Hは、赤色（抗20s抗体）に関して共焦点顕微鏡法で試験された細胞のフィールドを示す；図16C～DおよびI～Jは、それぞれ緑色（LN-GFP）に関して共焦点顕微鏡法で試験された対応するフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ（図16E～PおよびK～L）と共に示される。

【図16GHIJKL】図15で用いた条件と類似した条件下でPA添加しても、細胞内部の緑色のスポットの数がPA非存在下での数と比較して増加しなかったことを示す。図16A～Fは、PA非存在下での、LN-GFPを伴うHeLa細胞のインキュベーションを示す；図16G～Lは、PA存在下でHeLa細胞のインキュベーションを示す。図16A～BおよびG～Hは、赤色（抗20s抗体）に関して共焦点顕微鏡法で試験された

10

20

30

40

50

細胞のフィールドを示す；図16C～DおよびI～Jは、それぞれ緑色(LN-GFP)に関して共焦点顕微鏡法で試験された対応するフィールドを示す。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージ(図16E～PおよびK～L)と共に示される。

【図17】BALB/cマウスの3つのグループ(各グループ中4匹)を、それぞれ異なる抗原配合(15μgのLFn-p24+4μgのPA、15μgのLPn-p24+4μgのPA+ミョウバン、15LFn-p24単独+ミョウバン)で腹腔内に免疫した。免疫化後1週間で、免疫化BALB/cマウスの脾臓の単核細胞を、CTL源として用いた。脾臓培養物中のCTLを、非免疫化動物のガンマ放射したペプチドパルスBALB/c脾細胞と培養することによりインビトロで活性化した。37℃のCO₂インキュベーターで6日培養した後、成熟CTL(エフェクター細胞)を、⁵¹Cr標識化P20ペプチドパルスP815細胞(ポジティブ標的)または⁵¹Cr標識化媒体パルス細胞(ネガティブ標的)のいずれかを溶解させるそれらの能力に関して試験した。示された溶解の割合を、ネガティブ標的のバックグラウンド溶解から引算し、各グループの平均として示した。

10

【図18】BALB/cマウスの3つのグループ(各グループ中4匹)を、それぞれ15μgのLFn-p24、15μgのMLFn-p24、および15μgのp24で腹腔内に免疫した。脾臓組織中のCTLを、免疫化の後連続して試験した。

【発明を実施するための形態】

【0023】

20

発明の詳細な説明

我々は、ここで、防御抗原(PA)の非存在下で、標的抗原(例えばタンパク質)を二量体タンパク質エキソトキシンの断片を含む輸送因子に結合させることによって、外因性タンパク質をサイトゾルに運搬する方法を見出した。好ましくは、該標的抗原は、輸送因子に融合される。好ましくは、該輸送因子は、アミノ酸1～288からなる(配列番号2)B.anthraxisからの致死因子の防御抗原結合ドメインであるか、または、カルボキシ部分のようなPA結合ドメインを含まないその断片である。例えば、輸送因子に関するアミノ酸LFn1アミノ酸断片の好ましい群の、約80個のカルボキシ主成分アミノ酸の断片は、デフォルト設定におけるBlastで配列番号2に少なくとも80%のホモロジーを示す少なくとも80アミノ酸を含む。さらにより好ましくは、該断片は、それに対して少なくとも90%のホモロジーを有し、さらにより好ましくは、それに対して少なくとも95%のホモロジーを有する。好ましくは、上記断片は、PA結合ドメインを含まない。好ましい輸送因子は、LFn断片またはその部分である。より好ましくは、該輸送因子は、少なくともLFnの60個のカルボキシ主成分アミノ酸を含むが、PA結合ドメインは含まない。1つの好ましい断片は、配列番号2のカルボキシ部分からの約105個またはそれ未満のアミノ酸を含む。

30

【0024】

該標的抗原としては、CMI応答を引き出すのに望ましいと思われる全ての分子が可能であり、例えばウイルス性抗原および腫瘍抗原である。

本発明の一実施形態は、発生させるための新規な融合ポリペプチドを含む組成物を提供する。本発明の他の実施形態は、外因性タンパク質をサイトゾルに運搬することによってCMI応答を測定するための分析を含む。好ましい実施形態は、CMI応答を測定するためのキットを提供する。

40

【0025】

本発明の新規な融合ポリペプチドは、標的抗原に結合した輸送因子を含む。該輸送因子は、いかなる毒性の断片も含まない、防御抗原の非存在下でタンパク質をサイトゾルに運搬するいかなる二量体タンパク質エキソトキシンの断片を含み得る。この輸送方法は、PA関連経路に非依存性であり、従って、PAは不必要である。好ましいエキソトキシンは、B.anthraxisの致死因子(LF)である(配列番号1)(図2A)。LFのPA結合ドメインは、細胞膜を貫通可能なLFnの部分またはその断片であり、アミノ酸

50

1 ~ 255 (図2B) からなる。LF_nのいかなる断片も、輸送因子として用いることができる。好ましくは、それが、PA結合ドメイン(LF_nのN末端の半分(アミノ酸1 ~ 149)に存在する)を含まない。1つの好ましい断片は、配列番号2のカルボキシ部分からの105個またはそれ未満のアミノ酸を含む。好ましくは、60個のカルボキシ主成分アミノ酸であり、さらにより好ましくは、80個のカルボキシ主成分アミノ酸である。好ましい輸送因子は、断片3である(配列番号3)(図2C)。

【0026】

輸送因子として他の断片を用いることもできる。該輸送因子は、好ましくは350個またはそれ未満のアミノ酸であり、さらにより好ましくは300個またはそれ未満のアミノ酸であり、さらにより好ましくは250個またはそれ未満のアミノ酸である。

10

【0027】

輸送因子として好ましいその他の断片は、LF_nの断片3に対して少なくとも55%のホモロジーを有する(配列番号3)(図2C)。例えば、B. anthracisの浮腫因子の断片は、デフォルト設定におけるBlastを用いて、断片3_gに対して約57%のホモロジーを有する。より好ましくは、それに対して少なくとも65%のホモロジーを有し；さらにより好ましくは、それに対して少なくとも75%のホモロジーを有し；さらにより好ましくは、それに対して少なくとも80%のホモロジーを有し；さらにより好ましくは、それに対して少なくとも90%のホモロジーを有し；さらにより好ましくは、それに対して少なくとも95%のホモロジーを有する。

【0028】

20

該輸送因子は、サイトゾルへの運搬が望まれるいかなる抗原に結合させることができる。好ましくは、結合は、融合タンパク質の形態である。しかしながら、当業界既知のその他のリンカーを生成することができる。例えば、リンカーユニットは、次に化学的に標的抗原に結合できる輸送体の部分であり得る。好ましい抗原としては、ウイルス抗原、細菌の抗原、寄生虫の抗原、および腫瘍関連抗原が挙げられる。好ましいウイルス性抗原としては、細胞性免疫反応が望ましい場合、いずれのウイルスからのタンパク質が挙げられる。特に好ましいウイルスとしては、HIV-1、HTV-2、肝炎ウイルス(肝炎BおよびCを含む)、エボラウイルス、西ナイルウイルス、およびHSV-2のようなヘルペスウイルスが挙げられる。好ましい細菌の抗原としては、S. typhiおよびマイコバクテリア(M. tuberculosis)からの抗原が挙げられる。好ましい寄生虫の抗原としては、Plasmodium(P. falciparumを含む)からの抗原が挙げられる。

30

【0029】

好ましい腫瘍抗原としては、T細胞応答の誘発において認識されるエピトープが挙げられ、例えば、これらに限定されないが、以下が挙げられる：前立腺ガン抗原(例えばPSA、PSMAなど)、乳ガン抗原(例えばHER2/neu、mini-MUC、MUC-1、HER2受容体、mammoglobin、labyrinthine、SCP-1、NY-ESO-1、SSX-2、N末端がブロックされた可溶性サイトケラチン、43kDのヒトガン抗原、PRAT、TUAN、Lb抗原、癌胎児性抗原、ポリアデニル酸ポリメラーゼ、p53、mdm-2、p21、CA15-3、オンコプロテイン18/スタスミン、およびヒト腺性カリクレイン)、黒色腫抗原などである。

40

【0030】

好ましくは、被験者において免疫反応を発生させようと試みる場合に免疫アジュバントを用いてもよい。アジュバントは当業界既知であり、サイトカイン、例えばIL-2、Ig-IL-2、CM-CSF、CpG、RIBL Detox(Ribi Immunochemical)、QS21(Cambridge Biotech)、不完全フロイントアジュバントなどが挙げられる。我々は、意外にも、実際にミョウバンがCTL誘導を阻害することができるが、本システムにおいて、特異的なCTLを刺激するのにミョウバンが好ましいことを見出した。

【0031】

50

本発明の方法はまた、以下で説明するように、輸送因子と融合した腫瘍抗原のライブラリーをCMI分析と併せて作成することによって追加のガン抗原を同定するのに用いることができる。

【0032】

標的抗原のサイズは、サイトゾルへの運搬が可能であればどのようなサイズでもよい。好ましくは、標的抗原は、750個未満のアミノ酸、さらにより好ましくは、600個未満のアミノ酸、さらにより好ましくは、500個未満のアミノ酸である。本発明の新規な融合ポリペプチドは、単一の融合タンパク質の部分として、単一の標的抗原、または、複数の標的抗原を含み得る。好ましい融合ポリペプチドとしては、いくつかのHIV-1タンパク質の断片、例えばGagおよびNefが挙げられる(図8、9)。

10

【0033】

また、HIVのような感染性ウイルスの複数の系を用いてエピトープを作成することもできる(図9を参照)。

新規な融合ポリペプチドは、組換えにより製造される、または、化学的に合成される大きい多量体分子の部分でもよい。このような多量体はまた、脂質および炭水化物などのアミノ酸以外の成分に融合または結合したポリペプチドでもよい。

【0034】

好ましくは、多量体タンパク質は、同じ分子内で、ランダムに、または、間にスペーサー(アミノ酸など)を含んで繰り返される複数のT細胞エピトープからなる。

これら新規な融合タンパク質をコードするDNA配列は、容易に製造することができる。例えば、LFnをコードする配列は周知であり、既知の技術によって改変することができる。例えば望ましくない領域(例えば可変ループ)を除き、追加の望ましいコーディング配列(例えばリンカーセグメント)のいずれかを挿入することによって改変することができる。様々な標的抗原をコードする配列も当業界既知である。加えて、様々なアミノ酸残基に関するコドンが知られており、標準的な技術により代替りのコーディング配列を容易に調製することができる。

20

【0035】

新規な融合タンパク質を発現させるために、DNA配列を各種動物で用いることができ、それにより、以下で説明するワクチン組成物やCMI分析などの多種多様な用途に用いることができる。

30

【0036】

新規な融合タンパク質をコードするDNA配列は、多種多様の宿主/ベクターの組み合わせで発現させることができる。ベクターとしては、WO93/04701で説明されているような化学的な共役(これはターゲティング部分(例えば細胞表面受容体に対するリガンド)および核酸結合部分(例えばポリリシン)を有する)、ウイルスベクター(例えばDNAまたはRNAウイルスベクター)、プラスミド、ファージなどが挙げられる。該ベクターは、染色体系、非染色体系または合成であり得る。

【0037】

真核性宿主に有用な発現ベクターとしては、例えば、SV40、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、サイトメガロウイルスおよびレトロウイルスからの発現コントロール配列を含むベクターが挙げられる。細菌の宿主に有用な発現ベクターとしては、細菌のプラスミド、例えばE. coliからのプラスミド、例えばpBluescript、pGEX-2T、pUCベクター、colE1、pCR1、pBR322、pMB9およびそれらの誘導體、幅広い宿主範囲のプラスミド、例えばRP4、ファージDNA類、例えば多数のファージラムダ誘導體、例えばラムダ.GT10およびラムダ.GT11、ならびにその他のファージが挙げられる。酵母細胞に有用な発現ベクターとしては、2ミクロン、プラスミドおよびその誘導體が挙げられる。昆虫細胞に有用なベクターとしては、pVL941が挙げられる。

40

【0038】

好ましいベクターとしては、ウイルスベクター、融合タンパク質、および、化学的な共

50

役が挙げられる。レトロウイルスベクターとしては、モロニー Maus 白血病ウイルス、および、HIV ベースのウイルスが挙げられる。1つの好ましい HIV ベースのウイルスベクターは、少なくとも2つのベクターを含み、ここで gag および pol 遺伝子が HIV ゲノム由来であり、env 遺伝子が他のウイルス由来である。DNA ウイルスベクターが好ましい。これらベクターとしては、ヘルペスウイルスベクター、例えば単純ヘルペス I ウイルス (HSV) ベクター (Geller, A. I. et al., J. Neurochem 64: 487, 1995; Lim, F. et al., in DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed., Oxford Univ. Press, Oxford England, 199); Geller, A. I., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7603, 1993; Geller, A. I., I Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 1149, 1990)、アデノウイルスベクター (Legal LaSalle et al., Science 259: 988, 1993; Davidson, et al., Nat. Genet 3: 219, 1993; Yang, et al., J. Virol 69: 2004, 1995)、およびアデノ随伴ウイルスベクター (Kaplit, M. G., et al., Nat. Genet 8: 148, 1994) が挙げられる。DNA 配列は、宿主細胞中での発現を可能にするプロモーターに実施可能に結合している。このようなプロモーターは当業界で周知であり、容易に選択することができる。

10

【0039】

多種多様の単細胞宿主細胞が、本発明の DNA 配列を発現させるのに有用である。これら宿主としては、周知の真核および原核宿主、例えば E. coli 系、Pseudomonas 系、Bacillus 系、Streptomyces 系、菌類、酵母、昆虫細胞、例えば Spodoptera frugiperda (SF9)、動物細胞、例えば CHO および マウス細胞、アフリカミドリザル細胞、例えば COS1、COS7、BSC1、BSC40、および BMT10、ならびに、ヒト細胞、同様に、組織培養における植物細胞が挙げられる。本発明の分子は、各種生産細胞を作成するのに用いることができる。これは特に、細胞中で大量に発現させることが目下困難な特定のタンパク質に関して有用である。

20

【0040】

本発明の DNA 配列でコードされる新規な融合ポリペプチドを含む分子を、多種多様な通常の方法のいずれかを用いて発酵または細胞培養物から単離し、精製することができる。該方法としては、：液体クロマトグラフィー (例えば HPLC、FPLC などを用いた、通常の方法の液体クロマトグラフィーまたは逆相液体クロマトグラフィー); アフィニティークロマトグラフィー (例えば無機リガンドまたはモノクローナル抗体を用いたもの); サイズ排除クロマトグラフィー; 固定化金属キレートクロマトグラフィー; ゲル電気泳動; などが挙げられる。当業者であれば、本発明の範囲から逸脱することなく最も適切な単離と精製技術とを選択することができる。

30

【0041】

これら新規な融合タンパク質の安定型を、例えば、ポリ(アルキレンオキシド)の共役のような共役により、容易に作成することができる。共役は、好ましくは、ポリ(アルキレンオキシド)のヒドロキシル末端と、そのコンフォメーションに影響を及ぼすことのない融合タンパク質の部分中の遊離アミノ基とを共有結合させることにより形成される。その他の当業界で認められた、これら材料を共役させる方法としては、アミドまたはエステル結合が挙げられる。共有結合、同様に、親油性または親水性相互作用のような非共有結合の共役も用いることができる。

40

【0042】

共役は、非抗原性の高分子物質、例えばデキストラン、ポリビニルピロリドン、多糖類、スターチ、ポリビニルアルコール、ポリアクリルアミド、または、その他の実質的に非免疫原性 (immunogenic) のポリマーで構成することができる。ポリエチレングリコール (PEG) が好ましい。その他のポリ(アルキレンオキシド)としては、モノメトキシ-

50

ポリエチレングリコールポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコールのブロックコポリマー、およびポリプロピレングリコールなどが挙げられる。該ポリマーはまた、モノメトキシ基の代わりにC 1 ~ 4 のアルキルで末端をキャップすることができる。用いられるポリ(アルキレンオキシド)は、室温で、液体に可溶性でなければならない。従って、それらは、好ましくは、約200 ~ 約20,000ダルトン、より好ましくは約2,000 ~ 約10,000、さらにより好ましくは約5,000の分子量を有する。

【0043】

当業界で標準的な技術を有するものであれば、多種多様な可能な成分が結果生じる本発明の新規な融合タンパク質にカップリングされ得ることを理解できるだろう。例えば、“Conjugate Vaccines”, Contributions to Microbiology and Immunology, J.M. Cruse and R.E. Lewis, Jr (eds.), Carger Press, New York, 1989が参照され、その全内容は引用により本発明に加入される。

【0044】

カップリングは、新規な融合タンパク質と他の成分とがそれらそれぞれの活性が保持されさえすれば、2種の分子を結合させ得るいかなる化学反応によって達成することができる。この結合としては、多くの化学的メカニズム、例えば共有結合、親和性結合、相互作用、配位結合および錯化が挙げられる。しかしながら、好ましい結合は共有結合である。共有結合は、存在する側鎖の直接の縮合、または、外部の架橋分子の組み込みのいずれかにより達成することができる。多くの二価または多価リンキング剤が、本発明の抗体のようなタンパク質分子を他の分子にカップリングするのに有用である。例えば、代表的なカップリング剤としては、有機化合物、例えばチオエステル、カルボジイミド、スクシンイミドエステル、ジイソシアネート(disocyanates)、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼン、および、ヘキサメチレンジアミンが挙げられる。この列挙は、当業界既知のカップリング剤の様々なクラスを包括することを意図しているのではなく、むしろ、より一般的なカップリング剤の例である(Killen and Lmdstrom, J. Immunol. 133: 1335-2549, 1984; Jansen, F.K., et al., Imm. Rev. 62: 185-216, 1982; および Vitetta et al. (上述した通り)を参照)。

【0045】

好ましいリンカーが文献で説明されている。例えば、Ramakrishnan, S., et al., Cancer Res. 44: 201-208 (1984) (MBS (M-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)の使用を説明する)を参照。また、Umamoto et al., 米国特許第5,030,719号(オリゴペプチドリンカーにより抗体に結合したハロゲン化アセチルヒドラジド誘導体の使用を説明する)を参照。特に好ましいリンカーとしては、(i) EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノ-プロピル)カルボジイミド塩酸塩; (ii) SMP T (4-スクシンイミジルオキシカルボニル-アルファ-メチル-アルファ-(2-ピリジル-ジチオ)-トルエン (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G)); (iii) SPDP (スクシンイミジル-6[3-(2-ピリジルジチオ)プロピロンアミド]ヘキサノエート (Pierce Chem. Co., Cat # 216510)); (iv) スルホ-LC-SPDP (スルホスクシンイミジル6[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート (Pierce Chem. Co. Cat. # 2165-G)); および (v) EDCに共役したスルホ-NHS (N-ヒドロキシスルホ-スクシンイミド: Pierce Chem. Co., Cat. # 24510)が挙げられる。

【0046】

上述のリンカーは、異なる特性を有する成分を含み、それにより異なる生理化学的な特性を有する共役を得る。例えば、アルキルカルボキシレートのスルホ-NHSエステルは、芳香族カルボキシレートのスルホ-NHSエステルより安定である。NHS-エステル含有リンカーは、スルホ-NHSエステルより可溶性が低い。さらに、リンカーSMP T

10

20

30

40

50

は、立体的に込み合ったジスルフィド結合を含み、共役を形成し安定性を増加させることができる。ジスルフィド結合は、一般的に、他の結合に比べて不安定であり、なぜなら、ジスルフィド結合はインビトロで開裂し、利用可能な共役がわずかしか生じないためである。スルホ-NHSは、特に、カルボジイミド(carbodimide)カップリングの安定性を増強することができる。カルボジイミド(carbodimide)カップリング(例えばEDC)は、スルホ-NHSと併用される場合、カルボジイミド(carbodimide)カップリング反応単独よりも加水分解に対して耐性なエステルを形成する。

【0047】

本発明の新規な融合タンパク質は、安定なタンパク質発現のために用いることができる。例えば、特定のタンパク質は、特定の発現系、例えば細菌の発現系において発現させることが難しい。LFnのような輸送因子への融合により、特定のこのようなタンパク質を安定化することができる。我々は、輸送因子が、好ましくは250個またはそれ未満のアミノ酸、さらにより好ましくは150個またはそれ未満のアミノ酸、より好ましくは105個またはそれ未満のアミノ酸、さらにより好ましくは80個またはそれ未満のアミノ酸であることを見出した。

10

【0048】

本発明の新規な融合タンパク質は、免疫反応を発生させるのに用いることができる。例えば、ワクチンとしてである。

代表的な医薬組成物は、治療上有効な量の新規な融合タンパク質であり、該融合タンパク質は、免疫反応を誘導することができ、それにより予防の免疫原として作用し、必要に応じて製薬上許容でき、かつ適合可能な担体に含ませる。本明細書で用いられ、以下でより詳細に説明される「製薬上許容でき、かつ適合可能な担体」という用語は、(i)ヒトまたは他の動物への投与に適切な、1またはそれ以上の適合可能な固体または液体、充填剤、希釈剤または封入物質、および/または(ii)分子を標的細胞に運搬することができるシステム、を含む。従って、本発明において「担体」という用語は、有機または無機成分、天然または合成を示し、適用を容易にするために本発明の分子はそれらと結合する。「治療上有効な量」という用語は、治療しようとする特定の状態において望ましい結果が生じる、または望ましい影響を働かせる本発明の医薬組成物の量である。例えば、免疫反応を発生させるのに必要な量は、予防的な保護を提供することができる。一般的に、本組成物が予防の免疫原として用いようとする場合、少なくとも1つの「ブースト」が、第1回目の投与の後、定期的な間隔で投与され得る。同じ成分を含む組成物を調製する際に、様々な濃度を用いることができ、治療しようとする患者の年齢、状態の重症度、治療期間および投与様式におけるバリエーションを提供する。

20

30

【0049】

好ましい実施形態において、免疫原性ポリペプチドでもある本発明の新規な融合ポリペプチドは、その他の免疫原性ポリペプチドを含み得る多成分ワクチンに含ませる。多成分ワクチンは、T細胞応答を引き出す本発明の新規な融合タンパク質、同様にB細胞応答を引き出すその他の抗原を含み得る。

【0050】

一つの好ましい免疫化方法において、新規な融合タンパク質を提供し、次に異なる新規な融合タンパク質で追加免疫する。

40

また、多種多様な異なる新規な融合タンパク質を含むカクテルを提供し、多種多様な異なる新規な融合タンパク質または複数の抗原を含む融合タンパク質のいずれかで追加免疫してもよい(図8、9)。

【0051】

新規な融合タンパク質は、多種多様な抗原(例えば異なるHTV系からの抗原)を認識し、相互作用する各種T細胞を発生させるのに用いることができる。新規な融合タンパク質をコードするDNA配列もまた、サブユニットワクチンとして用いることができる。

【0052】

例えばワクチン組成物を用いて免疫反応を発生させる試みにおいて、アジュバントを用

50

いることも好ましい。アジュバントとしては、これらに限定されないが、ミョウバン、RIBI Detox (Ribi Immunochemical)、QS21 (Cambridge Biotech)、および不完全フロイントアジュバントが挙げられる。ミョウバンは好ましいアジュバントである。アジュバントのその他のグループとしては、免疫促進物質、例えばIL-12、IL-4のようなサイトカイン、および、B7のような副刺激分子が挙げられる。免疫促進効果を有する様々な分子が知られており、例えばICAMおよびLFAのようなアクセサリ分子である。好ましい実施形態において、GM-CSFは、第1回目の免疫投与の前に患者に投与される。GM-CSFは、医薬製剤中のウイルスベクターまたは単離タンパク質を用いて投与され得る。アジュバントのみ合わせ（例えばCM-CSF、ICAMおよびLFA）を用いることができる。一般的に感染症抗原に対して強い免疫反応が発生する一方で、一般的に腫瘍関連抗原に対してはより弱い免疫反応が発生する。従って、上述したような免疫促進物質は、それらと共に用いられることが好ましい。上述したように、ミョウバンが好ましいアジュバントである。

10

【0053】

本発明の免疫刺激組成物は、他の治療の処方計画 (regiment) を用いて有利に使用できる。例えば、該システムは、ガンのための従来の治療選択肢 (手術、放射線療法、化学療法およびホルモン療法など) と併せて用いることができる。例えば、新規な本発明の融合タンパク質を含む乳ガンワクチンは、エストロゲン活性に干渉するクエン酸タモキシフェンと併用することができる。該システムはまた、例えばHerceptin (TM) (trastuzumab)、HER2受容体をブロックするように開発された抗HER2ヒト化モノクローナル抗体を用いた免疫療法；骨髄移植と併用することもでき；および、末梢血液幹細胞療法も用いることができる。本発明の組成物と併用できる他の好ましい治療の処方計画 (regiment) としては、血管新生、阻害剤および細胞毒性の薬剤が挙げられる。

20

【0054】

「適合可能な (compatible)」という用語は、本明細書で用いられるように、医薬組成物の成分が、本発明の小さい分子、核酸および/またはポリペプチドを、互いに望ましい医薬的な効果を実質的に損なわないような方法で混合することができる、ということの意味する。

【0055】

本発明の医薬組成物の用量は、被験者および用いられる特定の投与経路に応じて変更することができる。投与量は、1日当たり0.1~100,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、より好ましくは1~10,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲であり得る。本組成物の好ましい用量は、好ましくは少なくとも2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。単に例として、例えば、約1 μg ~ 約300 μg の全用量の範囲が、ヒト用途で用いることができる。この用量は、本組成物に基づき、定期的な間隔で運搬することができる。例えば、少なくとも2回の別々の機会において、約4週間の間隔をあけることが好ましい。その他の化合物を毎日投与してもよい。本発明の医薬組成物はまた、多種多様なその他のよく特徴付けられたプロトコールに従って被験者に投与することもできる。例えば、特定の現在容認された免疫化の処方計画は、以下のものを含んでよい：(i) 投与時間は、選択された日程に第1回の用量；第1回の用量から1ヶ月後に第2回の用量；および、それに続く日程、例えば第2回の用量から5ヶ月後に第三の用量、である。製品情報、Physician's Desk Reference, Merck Sharp & Dohme (1990), at 1442-43を参照 (例えば肝炎Bワクチン型プロトコール)；(ii) 例えば他のワクチンに関して、子供の推奨投与は、選択された日程に第1回の用量 (6週齢またはそれ以上)；第1回の用量から4~8週間後に第2回の用量；第2回の用量から4~8週間後に第三の用量；第三の用量から6~12ヶ月後に第4回の用量；4~6歳で第5回の用量；および、最後の用量から10年ごとにさらなる追加免疫、である。製品情報、Physician's Desk Reference, Merck Sharp & Dohme (1990), at 879 (例えばジフテリア、破傷風および百日咳型ワクチンプロトコール) を参照。特定の組

30

40

50

成物の複数の用量を運搬するのに望ましい時間間隔は、たんに慣例的な実験法を実施できる当業界の通常のスキルを有するものにより、決定することができる。

【 0 0 5 6 】

本発明の新規な融合タンパク質はまた、それ自体で（そのものの（n e a t））、または、製薬上許容できる塩の形態で投与することができる。医薬で用いる場合、該塩は、製薬上許容できるものであるべきだが、製薬上許容できない塩も製薬上許容できるその塩を調製するのに都合よく用いることができ、本発明の範囲から排除されない。このような製薬上許容できる塩としては、これらに限定されないが、以下の酸から調製される塩が挙げられる：塩酸、臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、マレイン酸、酢酸、サリチル酸、p - トルエン - スルホン酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、ギ酸、マロン酸、コハク酸、ナフタレン - 2 - スルホン酸、およびベンゼンスルホン酸。また、製薬上許容できる塩は、アルカリ金属またはアルカリ土類塩として調製することができ、例えばカルボン酸基のナトリウム、カリウムまたはカルシウム塩である。従って、本発明はまた、医薬的な使用のための医薬組成物を提供し、該医薬組成物は、1またはそれ以上の製薬上許容できるその担体、および、必要に応じてその他のいかなる治療成分と共に、本発明の核酸および/またはポリペプチドを含む。

10

【 0 0 5 7 】

該組成物としては、全て本発明の材料を用いる投与経路として用いることが可能な、口、直腸、腔内、局所的、鼻、眼、または、非経口投与に適切な組成物が挙げられる。その他の適切な投与経路としては、脊髄液に直接のクモ膜下投与（C S P）、動脈表面への直接注入、および、器官の標的領域へ直接の実質内注入が挙げられる。非経口投与に適切な組成物が好ましい。「非経口の」という用語は、皮下注入、静脈内、筋肉内、胸骨内注入または点滴技術を含む。筋肉内投与が好ましい。

20

【 0 0 5 8 】

該組成物は、都合よく単位供与量形態で存在させることができ、薬学分野で周知の方法のいずれかによって調製することができる。一般的に、方法は、本発明の活性成分を1またはそれ以上の補助的な成分で構成される担体と結合させる工程を含む。

【 0 0 5 9 】

経口投与に適切な本発明の組成物は、カプセル、カシェ剤、錠剤またはロゼンジのような個別のユニットとして提供でき、それぞれ予め決められた量の本発明の核酸および/またはポリペプチドを、リポソーム中に含むか、または、シロップ、エリキシル、または乳濁液のような水性の水剤または非水性の液体中の懸濁液として含む。

30

【 0 0 6 0 】

非経口投与に適切な好ましい組成物は、好ましくはレシipientの血液と等張な本発明の分子の滅菌水性製剤を都合よく含む。この水性調製は、既知の方法に従って、適切な分散剤または湿潤剤および懸濁化剤を用いて配合することができる。滅菌注射用製剤はまた、非毒性の非経口的に許容できる希釈剤または溶媒中の滅菌注射用溶液または懸濁液であり得る（例えば1, 3 - ブタンジオール溶液）。使用され得る許容できる賦形剤および溶媒としては、水、リンガー液および等張塩化ナトリウム溶液が挙げられる。加えて、滅菌した不揮発性油が溶媒または懸濁媒体として慣例的に用いられる。この目的において、合成モノまたはジグリセリドなどの無刺激の不揮発性油のいずれかをを用いることができる。加えて、注射可能な製剤において、オレイン酸のような脂肪酸の使用が見出されている。

40

【 0 0 6 1 】

さらに改良するために、本発明により提供されるような細胞媒介応答、本発明のヌクレオチド配列によりコードされたポリペプチドのアミノ酸配列を発生させる可能性が、受容体結合に関連する可能性のある望ましいアミノ酸配列の部分をもとに分析される。例えば、ポリペプチド配列は、このような部位をもとに分析するために、コンピューター分析にかけることができる。

【 0 0 6 2 】

本発明の分子と形成される複合体は、C M I分析（以下で説明する）のような適切な分

50

析、および、その他の通常のタイプの免疫分析により、検出することができる。

本発明は、インビトロで細胞性免疫反応を測定するための分析を提供する。CMI応答を検出する現在利用可能な実験分析は、特に様々な臨床条件における大規模なワクチン効率試験に適用する場合に、深刻な短所がある。これは、利用可能な器具と技術的サポートが最小限であるためである。上述したように、HTV-1感染の制御においてCTLが重要な役割を有するという確信において、多くのHIV-1ワクチン候補が、T細胞応答を刺激し、同様に抗体を中和するように設計される(1~6)。

【0063】

本発明のT細胞応答を測定する方法は、全てのT細胞依存性ワクチンまたは免疫療法の開発において、顕著な効果を有する。この方策は、病気の予防および制御においてCMI応答が重要な役割を有するような他の研究分野に適用可能である。

10

【0064】

好ましい実施形態において、本発明は、Elispot分析における新規な融合ポリペプチドの使用を提供する。Elispot分析の主な利点は、大勢のヒトにおいて多数のCTL応答が効果的かつ効率的に評価できる点である(例えば、Lalvani et al., J. Exp. Med. 186: 859-65 (1997)を参照)。Elispot分析は、いかなる標準的な細胞、例えば凍結保存されたPBMC、同様にCD8+CTL細胞が使用可能である。例えば、HIV-1陽性個体からのCD8+CTLクローンである。

【0065】

他の好ましい実施形態は、フローに基づく細胞内サイトカイン分析における新規な融合ポリペプチドの使用を提供する。フローサイトメトリーに基づく分析は、インビトロでの抗原特異的T細胞を刺激した後のサイトカイン細胞内の集積を検出する。CTLは、抗原で刺激され、プレフェルジンA(これは、タンパク質輸送し、サイトカインのような新たに合成されたタンパク質を細胞内に集積させる)とインキュベートする。表面マーカー(CD8, CD3)およびIFN- γ およびCD69の細胞内の染色により、特徴付けられていないMHCバックグラウンドに照らした、抗原性のエピトープに対して特異的な細胞群の検出および定量が可能になる。

20

【0066】

本発明の新規な融合ポリペプチドを用いたCMI分析を、多様なウイルス性抗原、細菌の抗原、および腫瘍抗原に対する細胞性免疫反応を評価するのに用いることができる。該分析を、ワクチン効率を評価すること、または、感染性病原体による感染の像(status)を阻止することのいずれかにおいて用いることができる。

30

【0067】

本発明の新規な融合ポリペプチドを用いたCMI分析はまた、ガン抗原を検出するための初期診断キットとして用いることができる。

本発明はまた、CMI応答を検出するためのキットを提供する。1つの好ましいキットは、これらチューブ、ウェル等の中に新規な融合タンパク質を含む。該キットは、好ましくは、インビトロでCMI応答を検出するためのウイルスまたは腫瘍含有試薬を含む。好ましくは、該キットは、血液のような生物学的な検体を採取するための装置を含む。好ましい実施形態において、該キットは、CMI応答を検出するための使用説明書を含む。好ましくは、該キットは、新規な融合タンパク質を凍結乾燥形態でを含む。

40

【0068】

好ましいキットは新規な融合タンパク質を含み、該タンパク質は、凍結乾燥され、血液回収に用いられたチューブの内部にコーティングされる。それにより、血液を個体から直接チューブに引き込み、数時間(例えば4時間)インキュベートし、続いて固定することができる。このような固定化サンプルは、長時間(例えば2週間)のCMI分析で使用しても安定である。該キットは、例えば一般的に遠隔地で行われるワクチン効率試験の際に、現地でサンプルを回収するのに特に有用である。同様に、他の好ましい実施形態は、少量の生物学的な検体の添加が可能なディッシュ、ウェル、またはチューブのようないずれ

50

かの表面にコーティングされた、凍結乾燥されたタンパク質を含む。好ましい生物学的な検体としては、血液、尿、痰、便、脳脊髄液の上清、および細胞サンプルが挙げられる。

【0069】

特定の実施例において、上述のしたようなLFnのカルボキシ部分のみを含むLFn融合タンパク質は、PA非存在下でCTL標的細胞を、MHC-I制限した方法で感作させることができる。この、外因性タンパク質抗原をMHC-I経路に提示させる新規な方法において、抗原のサイトゾルへの運搬は、生きたウイルスベクターまたは細菌ベクターを頼ることなく、細胞内の抗原プロセッシングに関連する機能的輸送に依存する。これらLFn断片は、サイトゾルからMHC-I経路に入る新しいタンパク質クラスの一例である。例えば、LFnがPA非存在下でHIV-1抗原をサイトゾルに運搬することができるという事実は、炭疽の致死性の毒がどのように働くかという現在の仮説に反する(32)。通常の場合において、LF(炭疽致死因子)は、その毒作用を働かせるために、PAに依存し、場合によってはLFの毒性ドメインは細胞の侵入を防ぐ未知の機能を有する可能性がある。

10

【0070】

加えて、LFn-HIVのような融合タンパク質は、ワクチン試験においてT細胞応答を検出する方法を洗練し、簡便化するためのツールとして用いることができる。この方法はまた、ウイルス性肝炎、TB、およびマラリアのような、他の細胞内のウイルスの病気または細菌の病気の研究に有用でもある。本発明は、現在のCMI分析における生きた組換えワクシニアウイルスを用いる必要性を回避することができる。本発明はまた、高価な上に、HLA-I多様性を有する異なる個体群のそれらの理論上の範囲が未だ証明されていないオーバーラップする合成ペプチドに対して、いくつかの利点を有する。新規な抗原の運搬は、現場使用に広く適用可能な簡易化したCMI分析を提供する。その上、これらLFn融合タンパク質は、E.coliで容易に生産され、比較的簡単な方法で精製され、さらに安定である。

20

【0071】

本発明で提供される全ての新規な融合ポリペプチド、およびそれをコードするDNA配列は、B.anthraxisの防御抗原またはその断片を実質的に含ないので、宿主への故意でないダメージの危険なく、多種多様な用途で安全に用いることができる。従って、本発明の新規な融合ポリペプチドは、多様な標的抗原への細胞性応答を発生させる組成物および方法において特に有利である。

30

【実施例】

【0072】

以下の実施例は、本発明を説明するために提供され、本発明を制限することはいかなる方法によっても意図されない。

実施例1

材料および方法

LFn-HIV融合タンパク質

HIV-HXBからのenv gp120、gag p24をコードするDNA断片をPCRで増幅し、LFn発現プラスミドpET15bLFnにクローニングし、LFnとHIVコーディング配列との間のインフレーム融合を検証するために配列解析する。Nefコーディング配列をHIV-ELLから増幅した。LFnのタンパク質発現ベクターおよびその融合誘導体は、pET15bプラスミド(Novagen; Madison, WI)である。このベクター系の主要な特徴は、誘導性T7プロモーター、タンパク質精製のための内部のHis-Tag、および複数のクローニング部位が挙げられる。組換えLFnは、そのN末端に6個のタンデムヒスチジン残基を有する細胞内の可溶性タンパク質としてE.coliで発現される(14)。10リットルのBioflow 2000 bench top bioreactor(New Brunswick Scientific, NJ)で細菌を培養した。His標識タンパク質を、市販のキットを用いて製造者プロトコールに従って精製した(Novagen)。LFnの断片は、LFnコー

40

50

ディング領域を既知の技術により改変することにより作製できる。

【0073】

試薬

Applied Biosystems社のペプチドシンセサイザー(モデル430A)で合成ペプチドを合成した。用いられた組換えワクシニアウイルスは、コントロールワクシニアベクターとしてNYCHを含む、vAbT141(Gag)、vAbT299(Env)、およびNef(15)であった。プレフェルジンA、サイトカラシンBおよびクロロキン(Sigma, St Louis, MO)を、細胞培養物に2時間加え、2回洗浄した後、細胞に添加し返した。フロー分析用の抗体をBecton-Dickinson(San Jose, CA)から得た。

10

【0074】

フローに基づく細胞内のサイトカイン染色

凍結保存されたPBMCを、LFN-HIV(30 µg/ml)、組換えワクシニアベクター(MOI3~5)またはペプチド(10 µg/ml)と共に、37 °Cで、5%CO₂で、一晚インキュベートした。自己由来B-LCLを、最適なペプチド(10 µg/ml)、LFN-HIV(10 µg/ml)または組換えワクシニアウイルス(MOI3~5)と共に、一晚インキュベートし、2回洗浄し、副刺激の抗CD28および抗CD49d(1 µg/ml, Becton-Dickinson, San Jose, CA)の存在下でE:T比が10:1でエフェクター細胞に加えた。その後、プレフェルジンA(10 µg/ml)を加え、細胞培養物を37 °Cで6時間インキュベートし、アイソタイプコントロール(APC, PE, PerCPに対してはIgG1、および、FITCに対してはIgG2b)またはアロフィコシアニン(APC)標識CD3モノクローナル抗体(Mab)、フィコエリトリン(PE)標識抗CD3 Mab(Becton Dickinson)の飽和溶液で染色した。暗所で4 °Cで20分間インキュベートした後、細胞をFACS洗剤で2回洗浄した。100 µlの試薬A(Fix and Perm kit, Caltag Laboratories, Austria)を加え、暗所で室温(RT)で20分間インキュベートした後、細胞をFACS洗剤で2回洗浄した。次に、100 µlの試薬B(Fix and Perm kit)を加え、細胞をRTで5分間インキュベートした。FITC-IFNγおよびペリディニククロフィルタンパク質(PerCP)共役CD69 Mab(CD69 perCP)抗体を加え、暗所で4 °Cでインキュベートした後、その細胞をFACS洗剤で2回洗浄し、Becton Dickinson社製のFACS caliberフローサイトメーターで、Cell Questソフトウェアを用いて分析した。

20

30

【0075】

FACS Caliburフローサイトメーター(Becton Dickinson)とCellquestソフトウェア(Becton Dickinson)を用いた4色染色でサンプルを分析した。用いられたネガティブおよびポジティブコントロールは、刺激していない細胞、同様に、それぞれマイトジェンフェマトヘマグルチニン(phytohemagglutinin)PHA(0.25 µg/ml, Murex Biotech)で刺激した細胞であった。

40

【0076】

細胞系および培養条件

自己由来エプスタイン-バーウイルス(EBV)形質転換Bリンパ芽球様細胞系、同様にT1およびT2(HLA-B60)細胞系を抗原提示細胞(APC)として用いた。標的細胞を適切なインデックスペプチドまたはLFN-HIV構築物でパルスするか、または、一晚組換えワクシニアウイルスに感染させた。AC13(HLA B14制限p24 [DRFYKTLRA])およびKM(HLV B60制限Nef [KEKGGLEGL])は、GagおよびNef特異的クローン(それぞれ)、および、AC2(HLA B44制限gp120 [AENLWVTVY])である。全て、HIV感染個体(該固体のCTL応答はよく特徴付けられている)(Rosenberg, personal co

50

mmunication) から得られ、および、Env 特異クローン (SP511) は血清陽性のウガンダ人から生成された (16)。Elispot 研究で用いられた PMBC は、セネガルおよびウガンダからの HTV-1 感染個体であった (15, 16)。Lfn-HIV の MHC クラス I 制限提示におけるプレフェルジン A、サイトカラシン B またはクロロキンの効果を調べるために、APC をタンパク質構築物で標識し、RPMI 1640 m10% FCS で培養し、各試薬と共に 1 時間共培養し、続いて洗浄し、標準的なクロム放出分析で試験した。

【0077】

Elispot

凍結保存された PMBC で Elispot 分析を行った。96-ウェルニトロセルロスプレート (Millititer, Millipore Corp., Bedford, MA) を、0.5 mg/ml のモノクローナル抗体 1-D1K (Mabtech, Stockholm, Sweden) で 4 で一晚プレコーティングした。次にそのプレートをリン酸緩衝食塩水 (PBS) で 6 回洗浄し、PMBC を、それぞれ二連のウェルに加え、50,000 細胞/ウェルおよび 25,000 細胞/ウェルにした。そのプレートを、5% CO₂ で、37 で一晚インキュベートし、続いてビオチン化モノクローナル抗体の抗 IFN- γ Mab (Mabtech) を 0.5 mg/ml で加え (100 分間)、続いてストレプトアビジン-ALP (Mabtech) を室温で加えた (1 時間)。そのプレートを PBS で 3 回洗浄し、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸塩およびニトロブルー (Sigma) を加えて反応を進行させた。15 分後に Tap water を加えて反応を止めた。個々のサイトカイン生産細胞が黒いスポットとして検出され、黒いスポットは可視化され、SFC/ウェル (スポット形成コロニー/ウェル) として定量された。CTL 頻度 (CTLp) を、コントロールウェルから差し引きされ、4 つのウェルを平均したスポット数から計算した。最終的な CTLp を 10⁶ 細胞あたりの平均頻度として報告した。SFC がコントロールの少なくとも 2 倍であれば、応答を陽性とみなした。バックグラウンド SFC は、平均して 15/ウェル未満であった。

【0078】

クロム放出分析：

CD8+CTL クローンを、組換え IL-2 の存在下で、抗 CD3 モノクローナル抗体 (12F6) で刺激し、7 日以内に活性を試験した。自己由来 B-LCL または HLA 適合 APC を含む標的細胞を、HTV-1 遺伝子産物を発現する組換えワクシニアウイルス (感染多重度は 3~5) または Lfn タンパク質 (5~30 μ g/ml) で一晚感染させ、放射性クロム (⁵¹Cr) で標識した。二連のウェルで行われた全ての分析に関して、最終容量 200 μ l 中、エフェクター：標的細胞の比 (E:T) は 10:1 であった。4 時間後に上清液を回収し、特異的な溶解のパーセントを、式：100 × [(実験での放出 - 自発的放出) / (最大放出 - 自発的放出)] により決定した。HIV-特異的 CTL 活性を、バックグラウンド/コントロールを超えて 10% と定義した。全ての分析に関して、自発的な放出は最大放出の < 30% であった。

【0079】

Lfn-HIV 介在 HTV-1 抗原侵入および PA なしのプロセッシング：

Lfn-HIV が細胞表面で MHC-I 分子と結合するための能力を評価するために、リンパ芽球様 B 細胞系 (B-LCL) を PA の存在または非存在下で Lfn-HIV で感作し、いくつかのよく特徴付けられた HIV-特異的 CTL クローンをを用いて標準的なクロム放出分析で試験した (図 3)。我々は、CTL が、PA の存在または非存在下で同等に Lfn-HIV で感作した標的細胞を認識することを見出した。溶解レベルは、用量依存性であり、B-LCL を同じ HTV 抗原を発現する組換えワクシニアウイルスで感染させた場合のポジティブコントロールに匹敵するレベルを達成した。HTV-特異的 CTL 活性は、標的が Lfn-HIV とより長い時間 (1 時間に対して 8 時間) インキュベーションされる場合のみ明らかであり (データは示さず)、これは、表面抗原の出現における遅れと、細胞内プロセッシングの必要性とを示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 0 】

L F n - H I V は、典型的な M H C - I 経路において提示される

次に我々は、これら構築物の C T L による認識が H L A - I 制限であることを実証することによって、L F n - H I V が典型的な M H C - I 経路により提示されることを確認した(図 4)。2つの N e f - (K M) および G a g 特異的(A C 1 3) クローン(それぞれ H L A B 6 0 制限および B 1 4 制限)を、L F n N e f または L F n - p 2 4 を提示する H L A 適合および非適合標的で試験した。H L A - 適合標的のみが顕著な溶解を示し、L F n - H I V の M H C - I 提示が確かめられた。

【 0 0 8 1 】

我々は、L F n - H I V の摂取およびプロセシングの可能性のあるメカニズムをさらに試験した。表面での L F n - H T V の内部移行が活発に処理されるかどうかを調べるために、我々は、B - L C L を、1 0 0 μ M のサイトカラシン B (1 7 , 1 8)、食細胞活動阻害剤と共にプレインキュベーションし、その後、L F n - H I V 抗原を加えた。C T L 認識はサイトカラシン B の存在下で失われたことから、エンドサイトーシス介在内部移行による処理が示された。

【 0 0 8 2 】

外因性 L F n 融合タンパク質が導入され、その後サイトゾルで処理される場合、T A P タンパク質(抗原プロセシングに関連する輸送体)は、M H C - I に結合させるためにペプチドを E R 内腔に輸送する必要がある(1 9 ~ 2 1)。エンドサイトーシス後に抗原によるプロセシングが必要かどうかを評価するために、我々は、B 6 0 発現細胞系 T 1 および T 2 を感作し、C T L により溶解させる L F n - H I V 融合タンパク質の能力を試験した。T 2 細胞(2 2 ~ 2 4) は、M H C - I に結合させるためにペプチドをプロテオソームから E R 内腔へ輸送する T A P 機能を欠く T 1 細胞誘導体である(1 9 , 2 0)。T 2 細胞での認識は失われ(図 4 B)、これは、プロセシング後にエピトープを輸送する必要性を示す。同じクローンによるこの T A P 欠失標的の認識は、細胞内プロセシングの必要性を通過して細胞が最適なエピトープペプチドで表面が「空の」M H C - I 分子に直接パルスされた場合、維持される。

【 0 0 8 3 】

外因性タンパク質の M H C クラス I 経路への侵入メカニズムをさらに検証するために、標的細胞をプレフェルジン A (E R およびゴルジ体からのタンパク質のエキソサイトーシスを阻害し、新しく構築されたペプチド - M H C 複合体が細胞表面に達することを防ぐ)で処理した(2 5)。標的細胞を L F n - H I V で提示させる前のプレフェルジン A 添加は、効果的に C T L による認識をブロックする(図 5)。この発見は、H L A 制限および T A P 必要性に関する上記の実証と共に、M H C クラス I 経路で L F n - H I V が処理され、B - L C L により提示されることが確かめられた。

【 0 0 8 4 】

L F n - H I V のプロセシングはクロロキン非感受性である

M H C - I 分子上での多くの外因性の抗原の提示は、細胞内区画でのタンパク質分解を伴い(2 6 ~ 2 8)、その後、ペプチドはサイトゾルに接近し、そこで M H C クラス I 経路に侵入する。L F n 介在抗原提示が酸性ベシクルでのタンパク質分解を必要とするかどうかを調べるために、我々は、L F n - H I V へ曝す際に、B - L C L をクロロキンで処理した(図 5)。クロロキンは、エンドソーム区画およびリソソーム区画で p H を高め、それにより、活性のために酸性環境が必要なカテプシンによるタンパク質加水分解を抑制することが知られている(2 9 , 3 0)。我々の発見によれば、漏れやすい性質を有するファゴソームが、L F n - H I V のサイトゾルへの侵入に必要ないということが示される。

【 0 0 8 5 】

標的がその表面で最適な 8 - m e r エピトープでパルスされた場合、サイトカラシン B、プレフェルジン A またはクロロキンのいずれかを添加しても標的細胞の認識および溶解に影響を及ぼさなかったが、これは、これら試薬が C T L 機能にも標的の生存能力にも影響を及ぼさなかったことを示す(図 5)。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 6 】

様々なCMI分析におけるLFn-HIVと組換えワクシニアウイルスとの比較

MHC-I分子を用いて細胞表面でCTLエピトープを提示するLFn-HIVの能力を実証したことから、我々は、酵素結合スポット(Elispot)分析やフローに基づく細胞内インターフェロン分析などの様々なCMI分析におけるLFn融合タンパク質の適応性の試験を続行した。これら分析は、より簡単でより迅速なT細胞応答の推測を提供し、理論上より大規模な臨床試験に(特にワクチン研究に関する)適している。Elispot分析の主な利点は、HIV-特異的CTL応答が効果的に評価でき、大勢のヒトでも効率的に評価できることである(31)。目下、HIV抗原を発現する組換えワクシニアウイルスまたはオーバーラッピング合成ペプチドなどの様々な抗原刺激がこの分析で用いられている。凍結保存されたPBMC、同様にいくつかのHTV-1陽性個体からのCD8+CTLクローンを、Elispot分析で、LFn-gp120に対してLFn-p24、LFnNefを用いて、同じ抗原を発現する組換えワクシニアウイルスと並行して試験した。比較のスポット形成コロニーがLFn-HIVに関して観察され、いくつかの例において、明らかにバックグラウンドスポットが組換えワクシニアウイルスの場合より少なかった(図6)。

10

【 0 0 8 7 】

インビトロで抗原特異的T細胞を刺激した後に細胞内のサイトカイン集積が、フローサイトメトリーに基づく分析で検出される。CTLを抗原で刺激し、でプレフェルジンA(タンパク質輸送を阻害し、新しく合成されたサイトカイン(例えばIFN-)を細胞内に集積させる)でインキュベートする。表面マーカー(CD8, CD3)およびIFN-およびCD69の細胞内の染色により、特徴付けられていないHLA-Iバックグラウンドに対して抗原性のエピトープに特異的なT細胞群を検出することができる。Nef特異的クローン(KM)をLFnNefで刺激し、その後、細胞内でのインターフェロン生産をフロー分析により評価した(図7A)。Nef特異的応答がLFnNefを用いて検出され、同様にCD8+の細胞群でNefを発現する組換えワクシニアウイルスが検出された。既知のgp120エピトープを有する個体(AC2)からの、新しく単離した刺激していないPBMCを、LFn-Envで、同様にEnvを発現する組換えワクシニアウイルス(rVV-Env)で感作した。CD8+細胞群における細胞内のIFN-のパーセンテージは、LFn-Envに晒された細胞において、rVV-Envと共にインキュベートした細胞より高かった(図7B)。

20

30

【 0 0 8 8 】

実施例2

PA非存在下のLPn融合タンパク質はまた、MHCが制限された方法で、CTL標的細胞を感作することができる。このLFn融合タンパク質のサイトゾル運搬は、抗原提示細胞内部の細胞内の抗原プロセッシングに関連する機能的輸送に依存する(Cao H, Agrawal D, Kushner N, Touzjian N, Essex M、および、Lu Y. J. Infect Dis. 185: 244-251 (2002))。目下我々は、LFnに融合した緑色蛍光タンパク質(GFP)がPA非存在下で細胞に侵入できることを実証し、我々はさらに、この、外因性GFPのPA非依存性LFn運搬は、細胞性プロテオソームに関連すると考えられることを示し、これはこれまでの観察と一致する。

40

【 0 0 8 9 】

LFn-GFPおよびGFPの構築および精製

pEGFP-C1(Clontech)からのGFPオープンリーディングフレームをLFn発現ベクターに挿入することによって、LFn-GFP融合タンパク質を構築した(過去の研究で説明される)(Lu, Y., Ret al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8027-32 (2000))。

【 0 0 9 0 】

融合タンパク質は、細菌の細胞抽出物中に可溶性であり、一工程のアフィニティークロ

50

マトグラフィーで精製できる。精製した融合タンパク質は、約 55 kD の分子量であり、その溶液は明るい緑色である（データは示さず）。実験に適切なコントロールを得るために、発現、精製、ならびに GFP および LFn-GFP の使用における唯一の違いが GFP での LFn 配列の欠失であるように GFP 単独と同じ細菌発現ベクター（pET15b）に構築した。

【0091】

LFn-GFP は CHO 細胞に侵入するが、一方で GFP は侵入できない

CHO 細胞をコラーゲン処理したチャンバースライドで 80% の群集になるように培養し、続いて精製 LFn-GFP と共に 1 または 2 時間インキュベートし、続いて PBS、および、プロテアーゼを添加した PBS でよく洗浄し、膜結合タンパク質を除去した。次に、細胞を抗トランスフェリン抗体で染色し、パラホルムアルデヒドで固定した。そのスライドを、共焦点顕微鏡法でそれぞれ緑色（GFP）および赤色（抗トランスフェリン）に関して試験した。第三のイメージは、各フィールドに対して、過剰露出した緑色のイメージにより、同じ細胞の赤色のイメージと共に示される。その結果として、黄色のスポットは、GFP がトランスフェリンタンパク質と同じスポットにあることを示し、従って細胞内部の GFP の位置の参照を提供することを示す。図 10 で示したように、相当数の緑色のスポットが、LFn-GFP で標的化された細胞中で 1 時間で可視化され、これは LFn-GFP が実際に細胞に侵入できることを示す。まったく同じ実験条件で、GFP 処理細胞において、緑色のスポットはほとんど示されなかった（図 11）。

【0092】

標的細胞内部の LFn-GFP の位置

図 10 ~ 11 で上述したのと同じの実験方法を用いて、我々は、抗トランスフェリン抗体を、それぞれ抗リソソーム抗体（図 12）、抗エンドソーム抗体（図 13）、抗ゴルジ抗体（図 14）、および抗プロテオソーム抗体（図 15）で置き換えた。これら様々なイメージを比較すると、最も黄色のスポットを含む過剰に露出したイメージは、図 15 で示されるイメージであり、それにおいて、緑色のスポットは、細胞性プロテオソームを示す赤色のスポットと顕著にオーバーラップした細胞内の LFn-GFP を示す。

【0093】

PA の存在は LFn-GFP の細胞摂取を増強しない

我々は、さらに、PA の存在が、図 10 ~ 15 に関して用いられた実験条件で LFn-GFP 摂取を増強するかどうかを試験した。図 16 に示すように、PA 添加は、PA 非存在下でのスポットの数と比較して、細胞内部の緑色のスポットの数を増加させなかった。その上、PA の存在は、黄色のスポットの量を減少させたように見える。明らかに、これらの条件下で、これら黄色のスポットはそれでも PA 非依存性の LFn-GFP 侵入を示している。

【0094】

実施例 3

LFn の N 末端の半分の欠失、および LFn 免疫化におけるミョウバンのアジュバント効果

追加の動物免疫化データは、LFn の N 末端の半分（PA 結合ドメインを含む）は、抗原運搬に否定的な影響を与えることなく欠失させることができることを示す。まったく意外にも、我々は、ミョウバン添加により、LFn 融合タンパク質による CTL 誘導を顕著に増強させ得ることを見出した。

【0095】

過去 2 年間、多く試みが不成功であったが、我々は、免疫化 BALB/c マウスにおいて、PA 存在下での LFn-p24 が CTL を刺激できることを示すことができなかった。以前の研究は、LFn-V3、LFn-LLO、および LFn-OVA のような LFn 融合タンパク質は、マウスで、特異的な CTL を刺激することができることを示している（Lu, Y., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 8027-32 (2000); Ballard, J. D. et al., Proc. Natl

10

20

30

40

50

. Acad. Sci. USA 93, 12531-12534 (1996); Ballard, J. D., et al., Infect. Immun. 66, 615-619 (1998)). これら融合タンパク質は、わずか12~33個のアミノ酸しか有さないが、一方でLFn-p24は約230個のアミノ酸を有する。従って、挿入された抗原の大きさは、相違を成し得る。我々は、免疫アジュバントの添加によりLFn-p24の免疫原性を改善できるかどうかを試験することに決めた。我々が試験した試薬は、組換えIL2, Ig-IL2, CpG、ミョウバンなどである。意外にも、ミョウバンが最良のアジュバント活性を示した。QS21およびPCPPのような特定の試験アジュバントは細胞性免疫反応を増強させるが、一方で、ミョウバンはCTL誘導を実際には阻害することが広く信じられている (Schiembeck, R., et al., J. Immunol. 152:1110-1119 (1994); Barouch, D. H. et al., Science 290:486 (2000); Davis, H. L. et al., J. Immunol. 160:870-876 (1998); Payne, L. G. et al., Dev. Biol. Stand. 92:79-87 (1998))。

10

【0096】

図17において、BALB/cマウスの3つのグループ(各グループ中4匹)を、それぞれ異なる抗原配合(15 μ gのLFn-p24+4 μ gのPA、15 μ gのLFn-p24+4 μ gのPA+ミョウバン、15LFn-p24単独+ミョウバン)で腹腔内に免疫した。免疫化後1週間で、免疫化BALB/cマウスの脾臓の単核細胞を、CTL源として用いた。脾臓培養物中のCTLを、非免疫化動物のガンマ放射したペプチドパルスBALB/c脾細胞と培養することによりインビトロで活性化した。37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーターで6日培養した後、成熟CTL(エフェクター細胞)を、⁵¹Cr標識化P20ペプチドパルスP815細胞(ポジティブ標的)または⁵¹Cr標識化媒体パルス細胞(ネガティブ標的)のいずれかを溶解させるそれらの能力に関して試験した。示された溶解の割合を、ネガティブ標的のバックグラウンド溶解から引算し、各グループの平均として示した。

20

【0097】

図17で示すように、ミョウバン添加に関して、我々は、免疫化マウスで、LFn-p24が、PAの存在または非存在下で特異的なCTLを刺激できることを示すことができた。これら結果は、PAの存在はインビボでの抗原運搬に必要なでないことをさらに示す。

30

【0098】

LFnのN末端の半分が欠失したLFn融合タンパク質はそれでも活性であるマウスで、LFn-p24がPA非存在下でCTLを引き出すことができることを確かめるために、我々は、PAに結合するその能力を失わせるためにLFnのN末端の半分(1~149)を欠失させた変異LFn融合タンパク質(MLFn-p24)を構築した。我々は、PA依存性の膜移動を試験するために特別に設計された実験方法を用いてこれを確認した。簡単に言えば、トリプシンでニックを入れたPAをCHO-K1細胞と共に4で2時間インキュベートした。次にその細胞を冷PBSで洗浄し、³⁵S標識LFN-NGまたはLFn-ENVで4で2時間インキュベートした。その細胞をよく洗浄し、MES/グルコナート緩衝液(pH4.8)に37 $^{\circ}$ Cで2分間晒した。次にプロナーゼEまたは緩衝液を加えて、吸収されていないLFn融合タンパク質を結合させた表面を消化した。次に、その細胞を再び洗浄し、溶解し、計数した。PAで移動したタンパク質の割合を以下の式に従って計算した。割合 = $100 \times (\text{PA存在下でのカウントおよびプロナーゼ処理細胞} - \text{PA非存在下でのカウントおよびプロナーゼ処理細胞}) / (\text{PAおよびmock処理細胞存在下でのカウント} - \text{PAおよびmock処理細胞非存在下でのカウント})$ 。この特定の分析において、PAは、72%もの膜結合型LFnを細胞に移動させ、一方でPAにより移動したMLFnの量は検出されなかった。

40

【0099】

続いて我々は、免疫化マウスで、LFn-p24によるCTL誘導と、MLFn-p24によるCTL誘導とを比較した。図18において、BALB/cマウスの3つのグルー

50

プ（各グループ中4匹）を、それぞれ15 μ gのLFn-p24、15 μ gのMLFn-p24、および15 μ gのp24で腹腔内に免疫した。脾臓組織中のCTLを、免疫化の後連続して試験した。

【0100】

図18で示すように、LFn-p24とMLFn-p24との双方が、たった1回の免疫化の後で、顕著にCTL活性を刺激した。実際に、我々は、改善されたMLFn-p24によるCTL誘導をLFn-p24で誘導されたCTL誘導と比較して、繰り返して観察した。

【0101】

この実験はまた、抗原（p24）からのMLFn配列の欠失により有効なCTL誘導が失われているため、LFnのC末端の半分（150～253）が、細胞内の抗原運搬に実際に関与することを示す。

【0102】

参考文献

【0103】

【表 1】

REFERENCES

1. Anderson, K. S., J. Alexander, M. Wei, and P. Cresswell 1993. Intracellular transport of class I MHC molecules in antigen processing mutant cell lines *Journal of Immunology*. 151:3407-19.
2. Androlewicz, M. J., K. S. Anderson, and P. Cresswell 1993. Evidence that transporters associated with antigen processing translocate a major histocompatibility complex class I-binding peptide into the endoplasmic reticulum in an ATP-dependent manner *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90:9130-4. 10
3. Ballard, J. D., A. M. Doling, K. Beauregard, R. J. Collier, and M. N. Starnbach 1998. Anthrax toxin-mediated delivery in vivo and in vitro of a cytotoxic T-lymphocyte epitope from ovalbumin *Infection & Immunity*. 66:615-9. 20
4. Borrow, P., H. Lewicki, B. H. Hahn, G. M. Shaw, and M. B. A. Oldstone 1994. Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection *J. Virol*. 68:6103-6110.
5. Borrow, P., H. Lewicki, X. Wei, M. S. Horwitz, N. Peffer, H. Meyers, J. A. Nelson, J. E. Gairin, B. Hahn, M. B. Oldstone, and G. M. Shaw 1997. Antiviral pressure exerted by HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs) during primary infection demonstrated by rapid selection of CTL escape virus *Nature Medicine*. 3:205-211. 30
6. Cao, H., P. Kanki, J.-L. Sankale, A. Dieng-Sarr, G. P. Mazzara, S. A. Kalams, B. Korber, S. MBoup, and B. D. Walker 1997. Cytotoxic T-lymphocyte 40

【 0 1 0 4 】

【表 2】

cross-reactivity among different human immunodeficiency virus type 1 clades:

implication for vaccine development *J. Virol.* 71:8615-23.

7. Cao, H., I. Mani, R. Vincent, R. Mugerwa, P. Mugenyi, P. Kanki, J.

Ellner, and B. D. Walker 2000. Cellular immunity to HIV-1 Clades: relevance to

HIV-1 vaccine trials in Uganda *J. Infect Dis.* 182:1350-56.

10

8. Doling, A. M., J. D. Ballard, H. Shen, K. M. Krishna, R. Ahmed, R. J.

Collier, and M. N. Starnbach 1999. Cytotoxic T-lymphocyte epitopes fused to anthrax

toxin induce protective antiviral immunity *Infection & Immunity.* 67:3290-6.

9. Falk, K., O. Rötchke, K. Deres, J. Metzger, G. Jung, and H.-G.

Rammensee 1991. Identification of naturally processed viral nonapeptides allows

their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope,

forecast. *J. Exp. Med.* 174:425-434.

20

10. Finbloom, D. S., J. Martin, and R. K. Gordon 1987. Endocytosis of

particulate and soluble IgG immune complexes: differential effects of cytoskeletal

modulating agents *Clinical & Experimental Immunology.* 67:205-10.

11. Geisow, M. J., P. D'Arcy Hart, and M. R. Young 1981. Temporal

changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in

macrophages: studies by fluorescence spectroscopy *Journal of Cell Biology.* 89:645-

52.

30

12. Goldberg, A. L., and K. L. Rock 1992. Proteolysis, proteasomes and

antigen presentation *Nature.* 357:375-9.

【 0 1 0 5 】

【表 3】

13. Hanna, P. C., D. Acosta, and R. J. Collier 1993. On the role of macrophages in anthrax Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 90:10198-201.
14. Harding, C. V., and R. Song 1994. Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules Journal of Immunology. 153:4925-33. 10
15. Howard, J. C. 1995. Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules Current Opinion in Immunology. 7:69-76.
16. Klaus, G. G. 1973. Cytochalasin B. Dissociation of pinocytosis and phagocytosis by peritoneal macrophages Experimental Eye Research. 79:73-8.
17. Koup, R. A., J. T. Safrit, Y. Cao, C. A. Andrews, G. McLeod, W. Borkowsky, C. Farthing, and D. D. Ho 1994. Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome J. Virol. 68:4650-4655. 20
18. Lalvani, A., R. Brookes, S. Hambleton, W. J. Britton, A. V. Hill, and A. J. McMichael 1997. Rapid effector function in CD8+ memory T cells Journal of Experimental Medicine. 186:859-65. 30
19. Lu, Y., R. Friedman, N. Kushner, A. Doling, L. Thomas, N. Touzjian, M. Starnbach, and J. Lieberman 2000. Genetically modified anthrax lethal toxin safely delivers whole HIV protein antigens into the cytosol to induce T cell immunity Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97:8027-32.

【 0 1 0 6 】

40

【表 4】

20. Man, S., R. D. Salter, and V. H. Engelhard 1992. Role of endogenous peptide in human alloreactive cytotoxic T cell responses *International Immunology*. 4:367-75.
21. Neefjes, J., F. Momberg, and G. Hammerling 1993. Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science*. 261:769-771. 10
22. Ogg, G. S., X. Jin, S. Bonhoeffer, P. R. Dunbar, M. A. Nowak, S. Monard, J. P. Segal, Y. Cao, S. L. Rowland-Jones, v. Cerundolo, A. Hurley, M. Markowitz, D. D. Ho, D. F. Nixon, and A. J. McMichael 1998. Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA *Science*. 279:2103-6. 20
23. Ohkuma, S., and B. Poole 1978. Fluorescence probe measurement of the intralysosomal pH in living cells and the perturbation of pH by various agents *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75:3327-31.
24. Ortmann, B., M. J. Androlewicz, and P. Cresswell 1994. MHC class I/beta 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding *Nature*. 368:864-7. 30
25. Pfeifer, J. D., M. J. Wick, R. L. Roberts, K. Findlay, S. J. Normark, and C. V. Harding 1993. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells *Nature*. 361:359-62.
26. Pinto, L. A., J. Sullivan, J. A. Berzofsky, M. Clerici, H. A. Kessler, A. L. Landay, and G. M. Shearer 1995. ENV-specific cytotoxic T lymphocyte responses 40

【 0 1 0 7 】

【 表 5 】

in HIV seronegative health care workers occupationally exposed to HIV-contaminated body fluids *J. Clin. Invest.* 96:867-76.

27. Powis, S. J. 1997. Major histocompatibility complex class I molecules interact with both subunits of the transporter associated with antigen processing, TAP1 and TAP2 *European Journal of Immunology.* 27:2744-7.

10

28. Rowland-Jones, S., J. Sutton, K. Ariyoshi, T. Dong, F. Gotch, S. McAdam, D. Whitby, S. Sabally, A. Gallimore, T. Corrah, M. Takiguchi, T. Schultz, A. McMichael, and H. Whittle 1994. Resistance to HIV-1 infection- HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-exposed but uninfected Gambian women *Nature Medicine.* in Press.

29. Sadasivan, B., P. J. Lehner, B. Ortman, T. Spies, and P. Cresswell 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP *Immunity.* 5:103-14.

20

30. Solheim, J. C., M. R. Harris, C. S. Kindle, and T. H. Hansen 1997. Prominence of beta 2-microglobulin, class I heavy chain conformation, and tapasin in the interactions of class I heavy chain with calreticulin and the transporter associated with antigen processing *Journal of Immunology.* 158:2236-41.

30

31. Song, R., and C. V. Harding 1996. Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway *Journal of Immunology.* 156:4182-90.

【 0 1 0 8 】

【表 6】

- 32. Suh, W. K., M. F. Cohen-Doyle, K. Fruh, K. Wang, P. A. Peterson, and D. B. Williams 1994. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing Science. 264:1322-6.
- 33. Wei, M. L., and P. Cresswell 1992. HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. Nature. 356:443-6.
- 34. Yewdell, J. W., and J. R. Bennink 1989. Brefeldin A specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes Science. 244:1072-5.

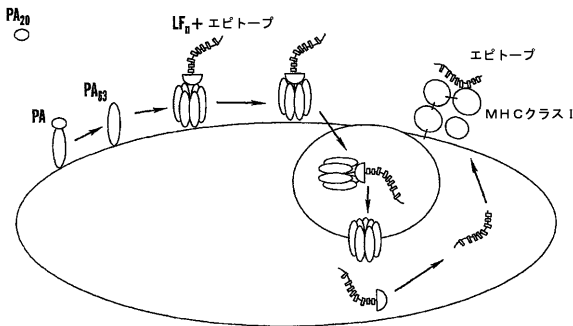
10

【001】 All references described herein are incorporated herein by reference.

20

[0 0 1] 本明細書に記載された全ての参考文献は、引用により本明細書に加入される。

【図 1】



【図 2】

LF

```

1 mnkkkffkv ismsclvtai tlgpvpfip vggagghgdv gmhvkekekn kdenkrkdee
61 rnkqtgeehk eimkhivkie vkgeevkve aeekilekvp sdvlemykai ggkiyivdgd
121 itkhisleal sedkkkikdi ygdallheh vvyakegyep vlvigssedy ventekaln
181 yyeigkilsr dilskinqpy qkfldvnti knasdsdgd liftnqlkeh ptdfsvefle
241 qnsnevqevf akafayyip qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinlsle elkdqrmisr
301 yekwakiqh yqhsdsise egrgllkklq lpipekkdai ihsisqeeke lkriqidss
361 dflsteekef lkkqidird slsөөekell nriqvdsnp lsekekefik kkkldiqpyd
421 inqrlqdtgg lidspsnld vrkqykrdiq nidallhqs i gstlynkyl yenmninlt
481 atlgadivds tdntkinrgi fnefkknfky sissnymivd inerpaldne rikwrialsp
541 dtrayleng kilqrnigi eikdvqiiq sokoyirida kvvpkskidt kiqeaqinin
601 qawnkalgp kytklittfv hnryasnive sayilnewk nniqsdlkk vtnyivdng
661 rvftditlp niaeythqd eiyaqvhskg lypesrsil lhgspskevel rndsegfihe
721 fghavdyag yldknqsd vtnskfdidi fkeegsnlts ygrneaeff aeafrlmhst
781 dhaerlkvqk napktqfin dqikfiins

```

FIG. 2A

LFn

```

1 mnkkkffkv ismsclvtai tlgpvpfip vggagghgdv gmhvkekekn kdenkrkdee
61 rnkqtgeehk eimkhivkie vkgeevkve aeekilekvp sdvlemykai ggkiyivdgd
121 itkhisleal sedkkkikdi ygdallheh vvyakegyep vlvigssedy ventekaln
181 yyeigkilsr dilskinqpy qkfldvnti knasdsdgd liftnqlkeh ptdfsvefle
241 qnsnevqevf akafayyipqhrdvlqlya peafnymdkf neqeinls

```

FIG. 2B

断片 3

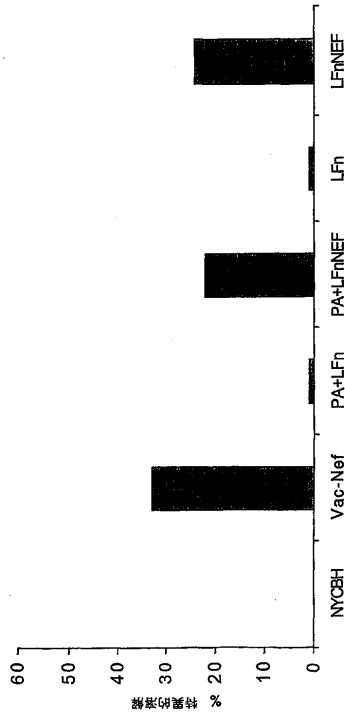
```

gkilsr dilskinqpy qkfldvnti knasdsdgd liftnqlkeh ptdfsvefle qnsnevqevf
akafayyip qhrdvlqlya peafnymdkf neqeinls

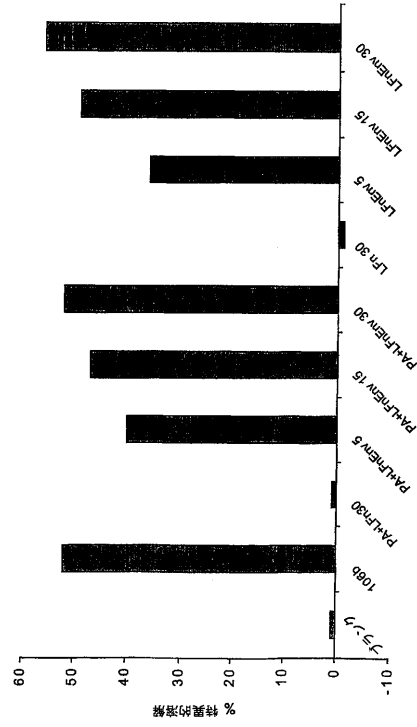
```

FIG. 2C

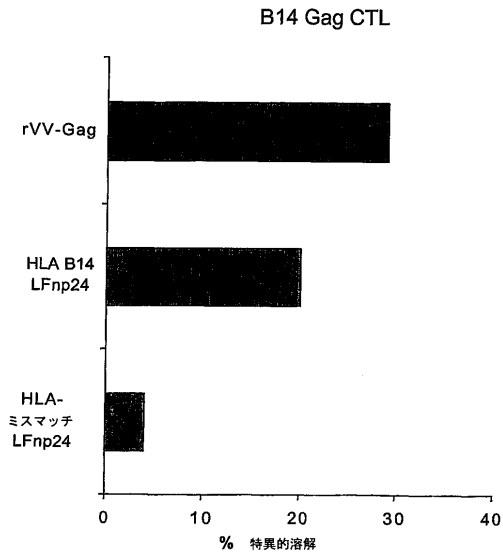
【 図 3 A 】



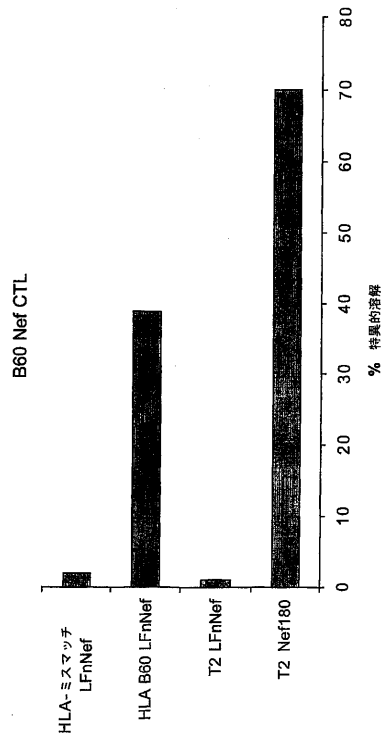
【 図 3 B 】



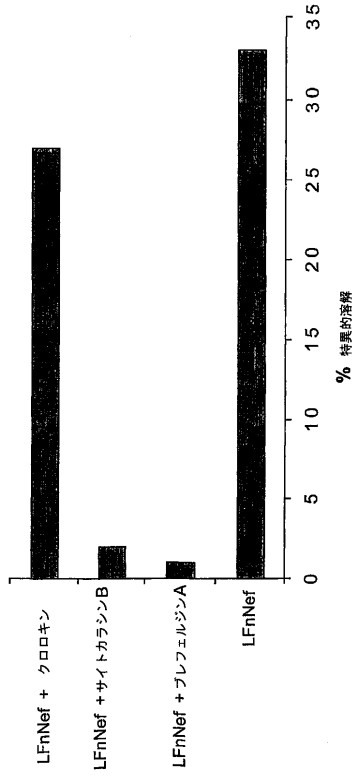
【 図 4 A 】



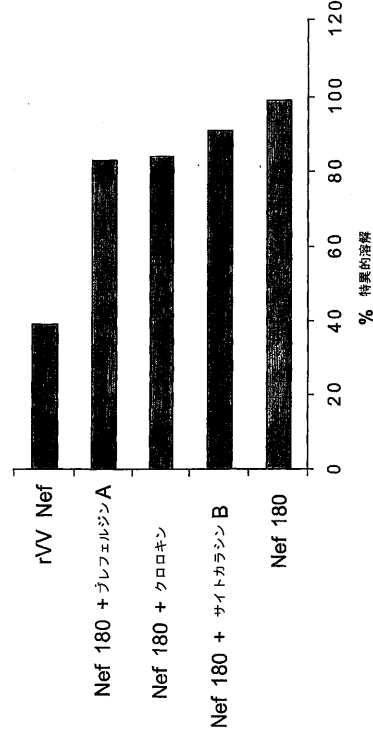
【 図 4 B 】



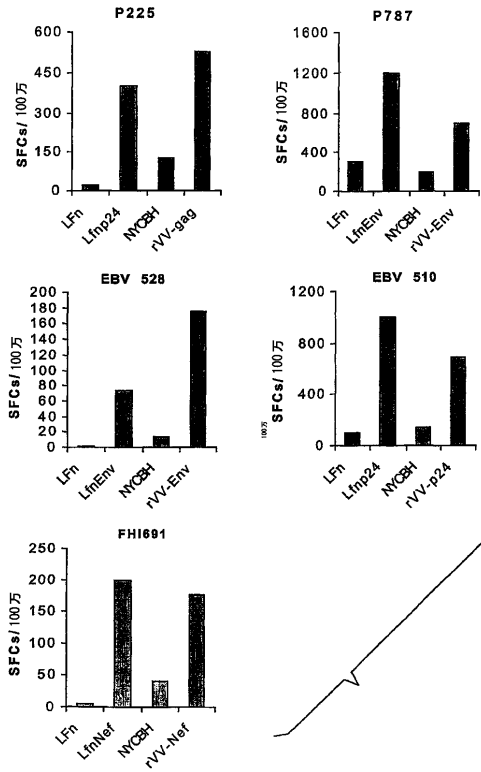
【 図 5 A 】



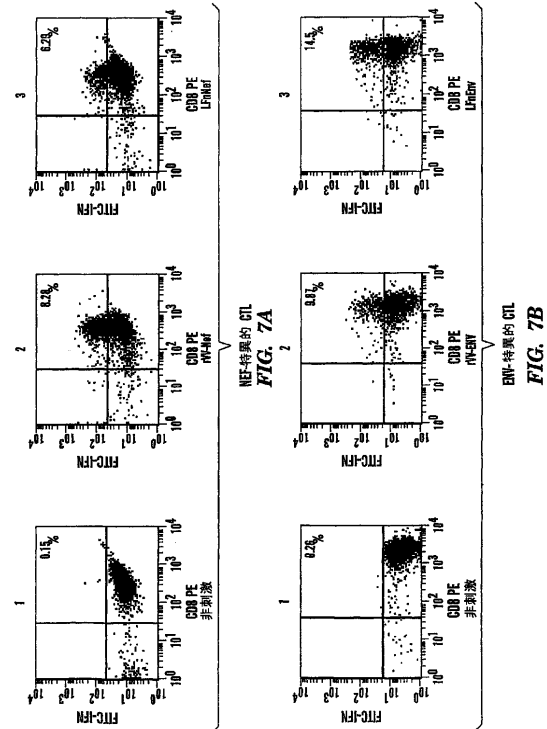
【 図 5 B 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

本報告で用いられた LFn 融合タンパク質

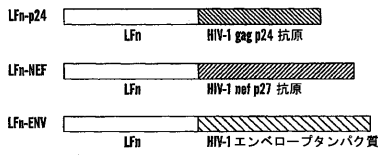


FIG. 8A

市販用途のために提案された LFn 融合タンパク質

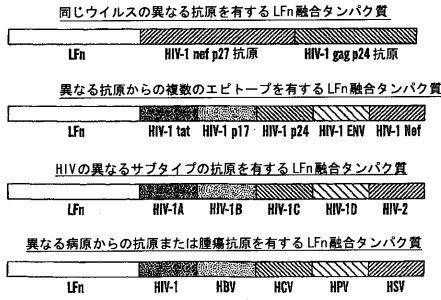
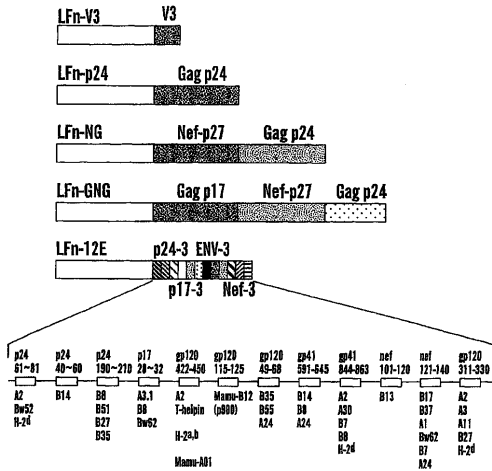


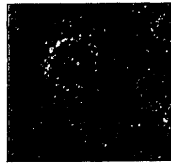
FIG. 8B

【 図 9 】

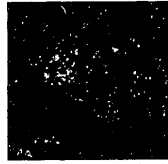


| Ag | E ^p | ヒト | マウス | サル |
|-------|----------------|-----------------------------------|------------|--------------------|
| p24 | 3 | A2, B8, B14, B27, B35, B51, Bw52, | H-2d | 0 |
| p17 | 1 | A3.1, B8, Bw62 | 0 | 0 |
| gp120 | 4 | A2, A24, A3, A11, B35, B55, B27, | H-2d, H-2d | Mamu-A01, Mamu-B12 |
| gp41 | 2 | A2, A24, A30, B7, B8, B14, | H-2d | 0 |
| nef | 2 | A1, A24, B7, B12, B17, B37, Bw62, | 0 | 0 |

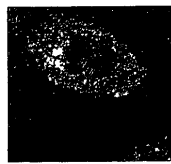
【 図 10 A B C D E F 】



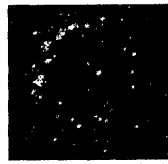
LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10A



LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10B



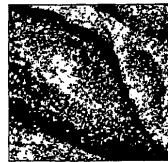
LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10C



LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10D

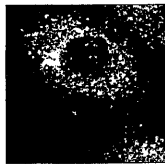


LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10E

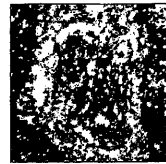


LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10F

【 図 10 G H I J K L 】



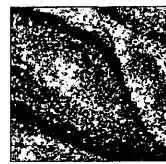
LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10G



LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10H



LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10I



LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10J



LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10K



LN-GFP (37°Cで1時間)
FIG. 10L

【図 11 A B C D E】

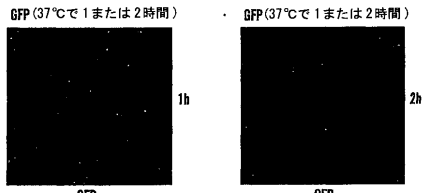


FIG. 11A

FIG. 11B

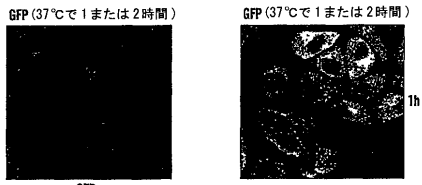


FIG. 11C

FIG. 11D

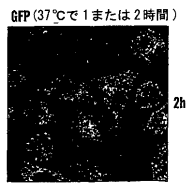


FIG. 11E

【図 11 F G H I】

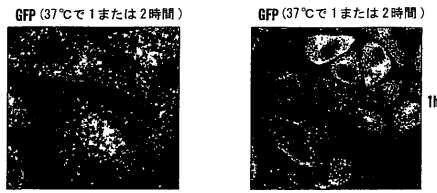


FIG. 11F

FIG. 11G

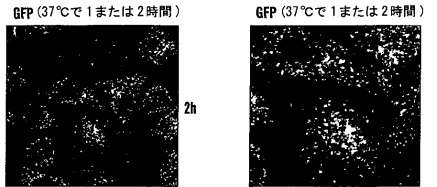


FIG. 11H

FIG. 11I

【図 12 A B C D E F】

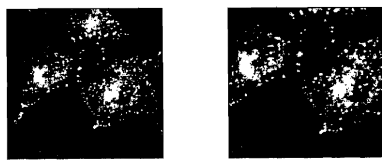


FIG. 12A

FIG. 12B

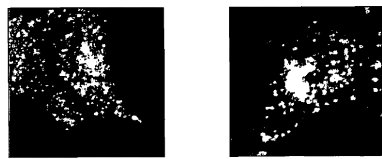


FIG. 12C

FIG. 12D

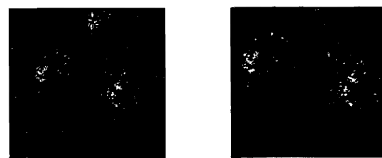


FIG. 12E

FIG. 12F

【図 12 G H I J K L】



FIG. 12G

FIG. 12H

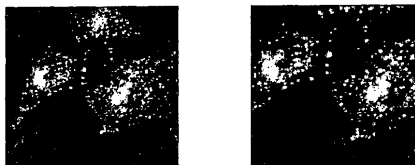


FIG. 12I

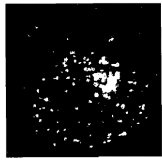
FIG. 12J



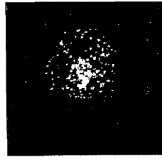
FIG. 12K

FIG. 12L

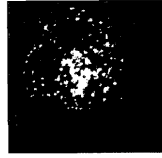
【図 13 A B C D E F】



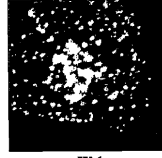
EEA-1
FIG. 13A



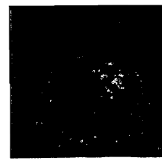
EEA-1
FIG. 13B



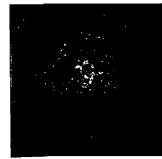
EEA-1
FIG. 13C



EEA-1
FIG. 13D



LN-GFP
FIG. 13E

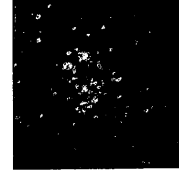


LN-GFP
FIG. 13F

【図 13 G H I J K L】



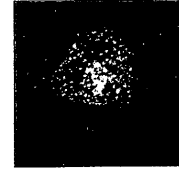
LN-GFP
FIG. 13G



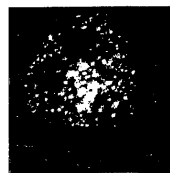
LN-GFP
FIG. 13H



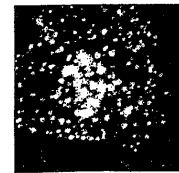
組み合わせ
FIG. 13I



組み合わせ
FIG. 13J

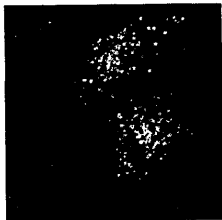


組み合わせ
FIG. 13K

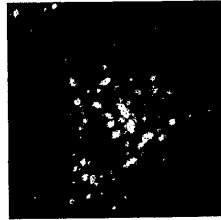


組み合わせ
FIG. 13L

【図 14 A B C】



ゴルジ
FIG. 14A



ゴルジ
FIG. 14B



LN-GFP
FIG. 14C

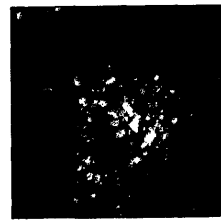
【図 14 D E F】



LN-GFP
FIG. 14D



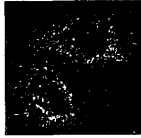
組み合わせ
FIG. 14E



組み合わせ
FIG. 14F

【 15 A B C D E F】

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



LNgfp
FIG. 15A

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



LNgfp
FIG. 15B

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



LNgfp
FIG. 15C

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



LNgfp
FIG. 15D

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



20S
FIG. 15E

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



20S
FIG. 15F

【 15 G H I J K L】

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



20S
FIG. 15G

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



20S
FIG. 15H

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



Merge
FIG. 15I

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



Merge
FIG. 15J

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



組み合わせ
FIG. 15K

HeLa細胞を40µg/mlのLNgfpと37で2時間インキュベートし、固定し、抗20Sプロテオソームポリクローナル抗体 (CaB10ochan) で染色した。



組み合わせ
FIG. 15L

【 16 A B C D E F】

2時間
LfnGFP
W/O PA

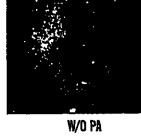


FIG. 16A

2時間
LfnGFP
W/O PA

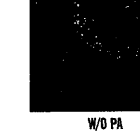


FIG. 16B

2時間
20S
W/O PA

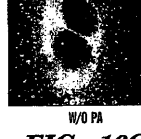


FIG. 16C

2時間
20S
W/O PA

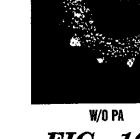


FIG. 16D

2時間
組み合わせ
W/O PA



FIG. 16E

2時間
組み合わせ
W/O PA

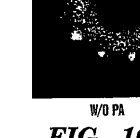


FIG. 16F

【 16 G H I J K L】

2時間
LfnGFP
PAと共に



FIG. 16G

2時間
LfnGFP
PAと共に



FIG. 16H

2時間
20S
PAと共に



FIG. 16I

2時間
20S
PAと共に



FIG. 16J

2時間
組み合わせ
PAと共に



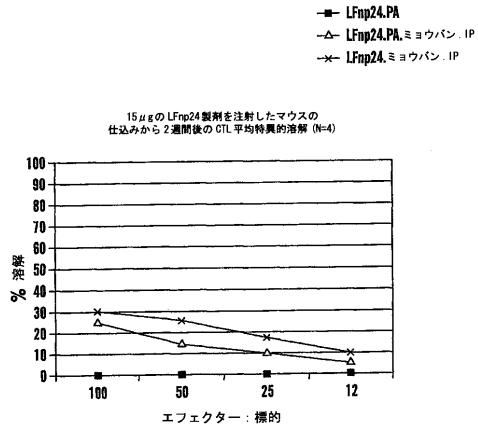
FIG. 16K

2時間
組み合わせ
PAと共に

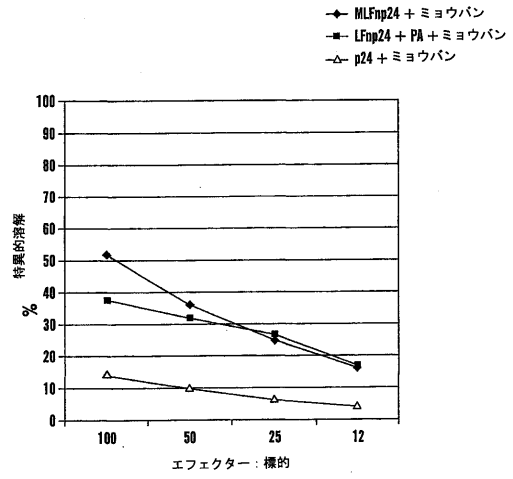


FIG. 16L

【 図 17 】



【 図 18 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 K 39/39 (2006.01) A 6 1 K 39/39
A 6 1 P 37/04 (2006.01) A 6 1 P 37/04
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 P

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 イチエン ル

アメリカ合衆国マサチューセッツ州 0 2 1 8 1 , ウェルズリー , サウス・ウッドサイド 1 5

(72)発明者 フエン カオ

アメリカ合衆国カリフォルニア州 9 4 1 1 2 , サンフランシスコ , イーストウッド・ドライブ 4
4

審査官 三原 健治

(56)参考文献 Y. Lu., et al., PNAS, 97(14), 2000, pp.8027-8032

H. Barth, et al., Infection and Immunity, 66(4), 1998, pp.1364-1369

H. Stenmark, et al., The Journal of Cell Biology, 113(5), 1991, pp.1025-1032

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 将外源蛋白质转运至胞质溶胶的方法及其用途 | | |
| 公开(公告)号 | JP5270500B2 | 公开(公告)日 | 2013-08-21 |
| 申请号 | JP2009212567 | 申请日 | 2009-09-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 哈佛大学校长及研究员协会 总医院集团 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 哈佛大学校董委员会 总医院集团 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 哈佛大学校董委员会 总医院集团 | | |
| [标]发明人 | イチエンル フエンカオ | | |
| 发明人 | イチエンル フエンカオ | | |
| IPC分类号 | C12N15/09 C07K14/32 C07K19/00 C12Q1/02 A61K38/00 A61K39/39 A61P37/04 G01N33/53 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K39/21 A61K39/385 A61K47/42 A61K47/48 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 C07H21/04 C07K14/195 C07K14/47 C12N1/21 C12N15/74 C12N15/87 C12P21/02 C12P21/04 G01N33/554 G01N33/569 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | C12N15/87 A61K38/00 A61K39/12 A61K39/21 A61K39/385 A61K2039/525 A61K2039/55505 A61K2039/57 A61K2039/6037 A61K2039/6068 C07K14/32 C07K2319/00 C07K2319/01 C12N2740/16134 C12N2740/16234 C12N2740/16334 G01N33/6863 Y02A50/394 Y02A50/484 | | |
| FI分类号 | C12N15/00.A C07K14/32 C07K19/00.ZNA C12Q1/02 A61K37/02 A61K39/39 A61P37/04 G01N33/53.P A61K38/00 C12N15/87.P C12N15/87.Z C12N5/00.101 C12N5/10 C12P21/02.Z | | |
| F-TERM分类号 | 4B024/AA01 4B024/AA14 4B024/AA20 4B024/BA35 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR48 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01 4B064/AG31 4B064/CA19 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA15 4B065/AA91X 4B065/AA94X 4B065/AA97Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/MA52 4C084/MA63 4C084/NA14 4C084/ZB091 4C084/ZB092 4C085/AA38 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG08 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA05 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA22 4H045/EA53 4H045/FA74 4H045/GA26 | | |
| 代理人(译) | 夏木森下 | | |
| 审查员(译) | 三原贤治 | | |
| 优先权 | 60/279366 2001-03-28 US | | |
| 其他公开文献 | JP2010042008A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，将外源抗原传递给胞质溶胶，一种新的融合蛋白和蛋白质的用途。解决方案：通过将靶抗原与含有二分蛋白质外毒素片段但不含相应保护性抗原的转运因子结合，从而将外源蛋白质转运至胞质溶胶来解决该问题。优选地，靶抗原

与转运因子融合。优选的转运因子包括来自炭疽芽孢杆菌的致死因子 (LF_B) 的保护性抗原结合结构域，由氨基酸1-255组成，优选至少80个氨基酸的片段，其与LFn显示至少80%的同源性，和片段来自羧基部分的约105个氨基酸，其不结合PA。靶抗原可包括任何需要引发CMI应答的分子，包括病毒抗原和肿瘤抗原。

