

(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2015-506366

(P2015-506366A)

(43) 公表日 平成27年3月2日 (2015. 3. 2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006. 01)	A 6 1 K 39/00 A	4 C 0 7 6
A 6 1 P 37/04 (2006. 01)	A 6 1 P 37/04	4 C 0 8 4
A 6 1 K 47/48 (2006. 01)	A 6 1 K 47/48	4 C 0 8 5
A 6 1 K 38/00 (2006. 01)	A 6 1 K 37/02	4 H 0 4 5
C 0 7 K 19/00 (2006. 01)	C 0 7 K 19/00 Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-553585 (P2014-553585)	(71) 出願人	514188841
(86) (22) 出願日	平成24年7月31日 (2012. 7. 31)		バイオミューン テクノロジーズ インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成26年9月11日 (2014. 9. 11)		カナダ国 ヴィ8アール 1 ビー2 プリ
(86) 国際出願番号	PCT/CA2012/050519		ティッシュ コロンビア、ヴィクトリア、
(87) 国際公開番号	W02013/110163		オーク ベイ アベニュー 1 6 4 0、ス
(87) 国際公開日	平成25年8月1日 (2013. 8. 1)		イート 2 0 2
(31) 優先権主張番号	61/591, 415	(74) 代理人	110000855
(32) 優先日	平成24年1月27日 (2012. 1. 27)		特許業務法人浅村特許事務所
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	ジェフェリーズ、ウィルフレッド
(31) 優先権主張番号	61/594, 863		カナダ国、プリティッシュ コロンビア、
(32) 優先日	平成24年2月3日 (2012. 2. 3)		サリー、トウェンティサード アヴェニュー
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ー 1 2 5 9 6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫応答を調節する組成物及び方法

(57) 【要約】

樹状細胞においてMHC I エンドリソソーム交差提示を刺激するステップを含む、MHC I 媒介性免疫応答を刺激する組成物及び方法。MHC I エンドリソソーム交差提示の刺激は、樹状細胞におけるCD74の過剰発現及び／又は抗原のMHC I エンドリソソーム交差提示経路への標的化を含む。抗原又はその断片と、CD74エンドリソソーム標的化配列とを含む融合タンパク質も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

樹状細胞においてMHC I エンドリソソーム交差提示を刺激するステップを含む、MHC I 媒介性免疫応答を刺激する方法。

【請求項 2】

前記MHC I エンドリソソーム交差提示を刺激するステップが、樹状細胞においてCD74を過剰発現させるステップを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記MHC I エンドリソソーム交差提示を刺激するステップが、抗原を、前記MHC I エンドリソソーム交差提示経路に標的化させるステップを含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項 4】

抗原又はその断片と、CD74エンドリソソーム標的化配列とを含む融合タンパク質。

【請求項 5】

CD74依存性MHC I 交差提示経路のためのコンパートメント。

【請求項 6】

エンドリソソームである、請求項5に記載のコンパートメント。

【請求項 7】

一次免疫応答を刺激するための、カテプシン切断ペプチド及び前記ペプチドのコンカテマー。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫調節の分野、特にMHC I 媒介性免疫応答を調節する組成物及び方法に関する。

【背景技術】

【0002】

一次免疫応答の間、樹状細胞は、適応免疫応答を開始する、主要な抗原提示細胞（APC）である。樹状細胞は、死細胞及び抗原タンパク質を含有する細胞残屑を取込み、これらの外来抗原をMHC I に提示するためにプロセッシングする。このプロセッシングは、MHC I 交差提示と称される。このプロセッシングは、ウイルス、腫瘍、自己抗原及び同種移植片に対するCD8⁺T細胞媒介性応答に必須である。

30

【0003】

CD74は、樹状細胞内で働き、哺乳動物の一次免疫応答を制御する、細胞機構の重要な要素である。樹状細胞は、外部の脅威を感知し、次に応答することを可能にする、特殊な経路を保有している。現在までに、主要組織適合クラスI（Major Histocompatibility Class I）（MHC I）を、免疫系による病原体の基本的な提示及び認識をもたらす、外来の侵略者を見出し、「衝突」可能にする回路とつなぎ合わせることは誰もできなかった。

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、免疫応答を調節する組成物及び方法を提供することである。本発明の一態様に従って、樹状細胞においてMHC I エンドリソソーム交差提示を刺激するステップを含む、MHC I 媒介性免疫応答を刺激する方法を提供する。MHC I エンドリソソーム交差提示を刺激するステップは、CD74を樹状細胞において過剰発現させるステップ及び／又は抗原をMHC I エンドリソソーム交差提示経路に標的化させるステップを含み得る。

【課題を解決するための手段】

【0005】

50

本発明の別の態様に従って、抗原又はその断片と、CD74のエンドリソソーム標的化配列とを含む融合タンパク質を提供する。核酸分子、ベクター及び融合タンパク質を発現する細胞も提供する。

【0006】

本発明の別の態様に従って、CD74依存性MHC I交差提示経路のためのコンパートメントを提供する。このコンパートメントは、エンドリソソームであってよい。

【0007】

本発明の別の態様に従って、一次免疫応答を刺激するための、カテプシン切断ペプチド及び前記ペプチドのコンカテマーを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】Cd74^{-/-}マウスが、弱い抗ウイルス一次免疫応答を生じる図である。

図1aは、低力価のVSV（組織培養細胞単層又はマウスの50%が感染する 2×10^5 の用量）に感染6日後に単離し、その後5日間、VSVNP（52～59）を用いて刺激したCd74^{+/+}、Cd74^{-/-}及びTap1^{-/-}マウスの脾臓におけるVSVNP（52～59）特異的（H-2K^b-VSVNP）CD8⁺T細胞の発生を示す図である。象限の数値はそれぞれの場所の細胞百分率を示す。図1bは、a（n=3マウス/遺伝子型）において得られた細胞中のH-2K^b-VSVNP（52～59）特異的CD8⁺T細胞の頻度を示す図である。図1cは、aにおけるようなVSV感染及び*in vitro*追加免疫後に発生したCTLの標準的⁵¹Cr放出アッセイを示す図である。*P<0.05（スチューデントt検定）。データは、少なくとも3回の個別の実験の代表である（平均±s.d.）。

【図2】Cd74^{-/-}マウスの一次免疫応答誘発の欠損が、それらの抗原提示細胞に存在し、CD4⁺T細胞とは独立していることを示す図である。図2aは、VSV（50%の組織培養細胞単層又はマウスが感染する 1×10^5 の用量）を注射され、*in vitro*でVSVNP（52～59）を追加免疫されたキメラ（n=3）から得られた脾臓におけるVSVNP（52～59）特異的CD8⁺細胞の発生を示す図である。

図2bは、aにおけるような*in vitro*の追加免疫後に発生したCTLの細胞障害性アッセイを示す図である。表示がある場合は、標的細胞にVSVNP（52～59）をパルスしてあり、又は非特異的殺傷の対照として未標識のままである。図2cは、aにおけるようなVSV感染及び*in vitro*の追加免疫に続く、抗CD4（+Ab）の静脈内注射により、CD4⁺細胞が枯渇したCd74^{+/+}→Cd74^{-/-}及びCd74^{-/-}→Cd74^{+/+}キメラ（n=3）の脾臓における、H-2K^b-VSVNP（52～59）に特異的なCD8⁺T細胞の発生を示す図である。図2dは、cにおけるような*in vitro*追加免疫後に発生したCTLの、bにおけるような細胞障害性アッセイを示す図である。*P<0.05（スチューデントt検定）。データは、3実験（a）、少なくとも3実験（b）、2実験（c）又は3実験（d；平均及びs.d.）の代表である。

【図3】Cd74^{-/-}DCが、細胞関連抗原を*in vivo*で交差提示して、抗原特異性CD8⁺T細胞をプライミングできないことを示す図である。図3aは、プロトコルを示す図である：OVAタンパク質又はOVA（257～264）をパルスされたCd74^{-/-}又はCd74^{+/+}BMDCを、精製CFSE標識CD8⁺OT-I T細胞と共にBALB/cバックグラウンドのRag1^{-/-}マウスに注射し（左）、3日後、H-2K^b CD8⁺T細胞の増殖をアッセイした（枠で囲った領域、右）。

図3bは、aにおけるレシピエントマウス（n=3）の脾臓由来のOT-I T細胞の増殖（黒）及び非増殖（灰色）を示す図である。括弧付きの線の上の数字は、CFSE⁻（分裂）細胞のパーセントを示す。データは2実験の代表である。

【図4】交差提示及びクロスプライミングがCd74^{-/-}DCにおいて欠損していることを示す図である。図4aは、OVAと一緒に37℃（濃い灰色で影を付けた曲線）又は4℃（明るい灰色の線）においてインキュベーション後に、BMDCによるOV

10

20

30

40

50

A-Alexa Fluor 488の取込みを、フローサイトメトリーにより評価した図である。

図4bは、可溶性OVAと一緒に(+OVA)、又は可溶性OVAなしでインキュベーションした(-OVA)脾臓DCにおけるH-2K^b-OVA(257~264)複合体の形成(上)及び総H-2K^b(影を付けた曲線)、それより下位のバックグラウンド(灰色の線、下)を、フローサイトメトリーにより測定した図である。

図4cは、培地単独(-OVA)、OVA単独(+OVA)又はOVA及びインターフェロニン-γ(OVA+IFN-γ)と一緒にインキュベートしたBMDcにおける、フローサイトメトリーにより評価したCD80及びCD40の発現を示す図である。

図4dは、さまざまな濃度の可用性OVA(水平軸)と一緒に、細胞シグナル伝達分子であるGM-CSF単独(上)又はGM-CSF+TNF(中央)又はインターフェロニン-γ(下)の存在下でインキュベートした脾臓由来DCによるB3ZT細胞の活性化を、化学発光アッセイにより測定した示す図である。

図4eは、OVAと一緒に、TNFを伴い(下)又は伴わずに(上)インキュベートし、その後、H-2K^b-OVA(257~264)に対する抗体(赤)及び抗LAMP-1(緑)を用いて同時染色し、光学的に統合した画像として提示した、成熟した脾臓由来DCのICMを示す図である。スケールバー、5μm。

図4fは、TNFの存在下のH-2K^b-OVA(257~264)とLAMP-1⁺後期エンドソームとの共局在化定量分析(上)並びにTNF処理を行った、及び行わなかったCd74^{+/+}、Cd74^{-/-}及びTap1^{-/-}DC(>20/系統)の、標準化された総画素数に対する個別画素数として提示した蛍光発光(下)を示す図である。*P<0.05(スチューデントt検定)。データは、2実験(a~f)(エラーバー(f)、s.d.)の代表である又は同様の結果を有する3回の個別の実験の1実験代表(d;三連の試料の平均±s.d.)からである。

【図5】クロロキンを用いた処理による、DCにおけるMHCクラスIのCD74媒介性輸送の阻害を示す図である。

図5aは、未処理のまま(-CQ)又はクロロキンを用いて処理した(+CQ)BMDc、並びに培地単独(青)又は可溶性OVA(赤、上)又はOVAペプチド(赤、下)と一緒にインキュベートしたBMDcにおけるH-2K^b-OVA(257~264)複合体の形成を、フローサイトメトリーにより測定した図である。

図5bは、未処理のまま又はクロロキンを用いて処理されたBMDcにおける総H-2K^b(緑)を示す図である(青、バックグラウンド)。

図5cは、aのように処理されたBMDcにおける表面H-2K^b-OVA(257~264)複合体を、標準化された平均蛍光強度(MFI)として提示した図であり、100%は、未処理BMDcにおいて見出されたH-2K^b-OVA(257~264)複合体の量である。

図5dは、未処理のまま又はクロロキンを用いて処理され、その後、抗H-2K^b(赤)及び抗CD74(緑)を用いて同時染色した成熟BMDcのICMを、光学的に統合した画像として提示した図である。スケールバー、5μm。

図5eは、dにおけるH-2K^bとCD74との共局在化の定量化を、総画素数に対する標準化された画素数として提示した図である。

図5fは、完全長(+FL)CD74又はエンドリソーム輸送モチーフを欠いた(+Δ2-17)切断型CD74を用いて再構成されたCd74^{-/-}BMDcにより誘導され、可溶性OVAタンパク質又はOVA(257~264)と一緒にインキュベートされたCFSE-標識OT-I細胞の増殖を示す図である。枠で囲まれた領域の数値は、100%に設定されたCd74^{+/+}対照(一番左)に対するOT-I細胞(CD8⁺CFSE⁻)の増殖パーセントを示す。データは、2実験の代表である(エラーバー(c,e)、s.d.)。

【図6】CD74が、DCにおいて、ERからエンドリソームへのMHCクラスIの輸送を調節することを示す図である。

図6aは、抗H-2K^b(緑)+抗CD74(赤、上)又は抗LAMP-1(赤、下)を用いて染色された成熟脾臓DCのICMを示す図である。スケールバー、5μm。

図6bは、LAMP-1⁺コンパートメント(50DC/マウス系統)におけるMHCクラスIの定量化を、個別画素数/総画素数として提示した図である。

図6cは、抗I-A-I-E(I-A^b;左レーン)、抗CD74(中央レーン)又は抗H-2K^b(右レーン)を用いた、[³⁵S]メチオ

10

20

30

40

50

ニン標識 $CD74^{+}/+$ 、 $CD74^{-}/-$ 、 $Tap1^{-}/-$ 及び β_2 -ミクログロブリン-欠損 ($B2m^{-}/-$) BMDc の免疫沈降 (IP) を示す図である。矢印は、 $41-kDa$ (上) 及び $31-kDa$ (下) の $CD74$ のバンドを示す。

図 6 d は、抗 $I-A^b$ 、抗 $H-2K^b$ (立体配座依存性)、 $H-2K^b$ 細胞質ドメインに対する抗体 ($e-VII$; 立体配座独立性) 又はトランスフェリン受容体 (TFR) に対する抗体を用いた、 $CD74^{+}/+$ DC の溶解物由来タンパク質の免疫沈降、続く抗 $CD74$ を用いた免疫ブロット分析を示す図である。一番右 (WCL) は、全細胞溶解物 (対照) の免疫ブロット分析である。

図 6 e は、抗 $CD74$ を用いた DC の溶解物由来タンパク質の免疫沈降、続く未消化 (−) 又は $Endo\ H$ (+) による消化並びに抗 MHC クラス I を用いた免疫ブロット分析を示す図である。

図 6 f は、抗 MHC クラス I を用いた、未処理のまま、又はクロロキン若しくは $Endo\ H$ を用いて処理された細胞の溶解物由来タンパク質の免疫沈降、続く、抗 $CD74$ を用いた免疫ブロット分析を示す図である。バンド強度を、 $Odysssey$ ソフトウェアを使用して定量化した。レーンの下の数値は、CQ 未処理試料に対して標準化されたバンド強度を示す。

図 6 g は、抗 $H-2K^b$ で標識された DC 中の MHC クラス I の内部移行をフローサイトメトリーにより継時的に評価し、 $4^{\circ}C$ においてインキュベートした対照 DC と比較した、 $37^{\circ}C$ においてインキュベートした DC の平均蛍光強度を増加パーセントとして提示した図である。* $P < 0.05$ (スチューデント t 検定)。データは、2 実験 (a)、2 実験 (b; 平均 $\pm$ s. d.)、5 実験 (c)、3 実験 (d)、3 実験 (e)、2 実験 (e) 又は 2 実験 (f; エラーバー、s. d.) の代表である。

【図 7】キメラマウスの末梢分析 (Peripheral Analysis) を示す図である。

【図 8】 $CD74^{-}/-$ マウスが、細胞関連抗原を *in vivo* で交差提示し、有効な一次免疫応答を発生することができないことを示す図である。

【図 9】 $CD74^{-}/-$ DC が脾臓に局在化することを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明は、MHC I 受容体を、免疫細胞内で侵入病原体を含有するコンパートメントに連結する、 $CD74$ によるガイド役の発見に基づく。この洗練された回路は、免疫細胞が体内の病原体の存在を認識し、シグナル伝達を可能にし、特殊化 T 免疫ファイト細胞に警告を与え、この細胞は分裂すること、及び感染細胞を攻撃することによって応答し、それによって病原体を破壊する。特に、本発明は、 $CD74$ が、外来性ペプチドを負荷するために、樹状細胞の小胞体からエンドリソソームコンパートメントへの MHC I の輸送を媒介し、したがって、 $CD74$ が、MHC I 媒介性 CTL 応答をプライミングするためのエンドリソソームの樹状細胞交差提示において重要な機能を有するという発見に基づく。したがって、本発明は、MHC I 媒介性免疫応答を調節する方法を提供する。

【0010】

ある実施形態において、 $CD74$ 依存性 MHC I エンドリソソーム樹状細胞交差提示を調節する化合物及び方法を提供する。ある実施形態において、免疫応答、例えば MHC I 媒介性 CTL 応答を、 $CD74$ 依存性 MHC I 樹状細胞交差提示を強化することによって刺激する方法を提供する。 $CD74$ 依存性 MHC I 交差提示経路は、例えば、樹状細胞における $CD74$ の発現を増加させることによって強化可能である。したがって、ある実施形態において、 $CD74$ の発現を強化する化合物及び方法を提供する。

【0011】

発現ベクターは、細胞において本発明の $CD74$ タンパク質を発現させるために使用可能である。発現ベクターの構築に使用できる適切な発現ベクターは、当業者には明らかであると思われる。このようなベクターが、個体に直接投与可能であることもまた、当業者には明らかであろう。又は、個体由来の細胞が、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド (DNA 又は RNA) を用いて、*ex vivo* で遺伝子操作可能であり、遺伝子操作された細胞は、その後、個体に提供される。このような方法は当分野において

10

20

30

40

50

周知である。

【0012】

さらに、ネズミCD74のアミノ酸配列は当分野において知られており（例えば、NCBI Protein database受託番号P04441.3を参照されたい）、以下に記載する。

```

1  mddqrdllisn heqlpilgnr prepercsrg alytg
vsvlv alllagqatt ayflyqqqgr
61 ldkltitsqn lqleslrmlkl pksakpvsqm rmat
p1lmrp msmdnml1lgp vknvtkygnm
121 tqdhvmhl1lt rsgpleypql kg t fpenlkh lkn
smdgvnw kifeswmkqw 1lfemsknsl
181 eekkp teapp kvltkcqeev shipavypga frp
kcdengn ylp1lqchgst gycwc vfpng
241 tevph tksrg rhncsepldm edlssglgvt rqe
lgqv t l

```

ヒトCD74のさまざまなアイソフォームのアミノ酸配列もまた、当分野において知られている（例えば、Genbank受託番号AAH18726.1；AAH24272.1；EAW61729.1；EAW61730.1及びEAW61731.1を参照されたい）。

【0013】

したがって、本発明のある実施形態において、CD74を発現するポリヌクレオチド及び発現ベクター並びにこのようなポリヌクレオチド及び発現ベクターを利用して、CD74又はこれらの活性断片の発現させる方法を提供する。ある実施形態において、本発明のポリヌクレオチド及び発現ベクターは、限定するものではないが、樹状細胞を含む細胞を、*in vivo*で遺伝的に操作するために使用される。ある他の実施形態において、本発明のポリヌクレオチド及び発現ベクターは、限定するものではないが、樹状細胞を含む細胞を、*ex vivo*で遺伝的に操作するために使用され、これらの遺伝子操作された細胞を、その後、個体に投与できる。したがって、ある実施形態において、CD74を過剰発現するように遺伝子操作された樹状細胞を提供する。ポリヌクレオチド、発現ベクター及び細胞は、医薬組成物として、医薬として許容される希釈剤及び担体と共に投与することができる。

【0014】

上記のように、エンドリソソームが、樹状細胞における交差提示のための主要なコンパートメントであることを示唆する証拠が存在する。本発明のある実施形態において、樹状細胞のエンドリソソームを提供する。ある実施形態において、樹状細胞のエンドリソソームコンパートメントにおいて発生する、MHC Iに提示するためのペプチドを提供する。これらのペプチドは、樹状細胞のエンドリソソームを特異的に標的としている、抗原及びこれらの断片からプロセッシングされたペプチドであってよい。

【0015】

抗原及びこれらの断片の樹状細胞のエンドリソソームコンパートメントへの標的化は、MHC Iの抗原プライミングを強化することができる。したがって、本発明のある実施形態において、樹状細胞のエンドリソソームに対する、抗原及びこれらの断片を含む分子を標的とする化合物及び方法を提供する。例えば、CD74のエンドソームの標的化シグナルは、抗原又はこれらの断片を、樹状細胞中のMHC I抗原プロセッシング経路に届けるために使用することができる。本発明のある実施形態において、対象となる抗原又はこれらの断片を含む融合タンパク質及びCD74エンドソーム標的化シグナルを提供する。ある実施形態において、標的化シグナルは、NCBI Protein database受託番号P04441（配列：ddqrdllisn heqlpil）に記載の配列のアミノ酸2から17を含む。

【0016】

10

20

30

40

50

本発明の融合タンパク質を発現する、ポリヌクレオチド、発現ベクター及び細胞（樹状細胞を含む）もまた提供する。上記のように、適切な発現ベクターは、当業者には明らかであると思われる。融合タンパク質を発現するポリヌクレオチド及び発現ベクターは、限定するものではないが樹状細胞を含む細胞を、*in vivo*で遺伝子操作するために使用でき、又は限定するものではないが樹状細胞を含む細胞を、*ex vivo*で遺伝的に操作するために使用でき、その後、これらの遺伝子操作された細胞を、患者に投与することができる。融合タンパク質、ポリヌクレオチド、発現ベクター及び細胞は、医薬組成物として、医薬として許容される希釈剤又は担体と共に投与することができる。

【0017】

MHC I 交差提示の強化は、免疫応答の強化をもたらし得る。特に、CD74 依存性 MHC I エンドリソソーム樹状細胞交差提示の強化は、MHC I 媒介性CTL 応答の刺激をもたらし得る。したがって、本発明のある実施形態において、MHC I 媒介性CTL 応答を、MHC I エンドリソソーム交差提示を強化するステップによって刺激する方法を提供する。上記のように、MHC I 交差提示の強化は、CD74 の過剰発現及び／又は抗原又はこれらの断片の、樹状細胞中のMHC I 抗原プロセッシング経路への標的化を介するものであってよい。これらの方法は、他の免疫刺激方法、例えば、限定するものではないがサイトカインを含む免疫刺激性化合物の投与と組み合わせて、免疫応答をさらに刺激することができる。本発明の化合物及び方法への使用に適切な他の免疫刺激方法及び化合物は、当業者には明らかであると思われる。

【0018】

当業者は、CTL 応答の刺激が、多数の疾患及び／又は病態の予防及び／又は治療に有用であり得ることを、容易に認識すると思われる。例えば、CTL 応答の刺激は、限定するものではないが、細菌、プラスモディウム属 (*plasmodium*) 及びウイルスを含む細胞内病原体により引き起こされる疾患の予防及び／又は治療、及び／又は癌の治療に有用であり得る。したがって、本発明のある実施形態において、MHC I 交差提示経路を刺激するステップによる、細胞内病原体により引き起こされる疾患の予防及び／又は治療の方法を提供する。他の実施形態において、MHC I 交差提示経路を刺激するステップによる、癌を治療する方法を提供する。

【0019】

ある実施形態において、限定するものではないがHIV 感染症を含むウイルス感染症の予防及び／又は治療の方法を提供する。ある実施形態において、細菌感染症、例えば、限定するものではないが、結核菌 (*M. tuberculosis*) 感染症を含むマイコバクテリア感染症の予防及び／又は治療の方法を提供する。ある実施形態において、限定するものではないが、マラリアの予防及び／又は治療を含む、プラスモディウム属感染症の予防及び／又は治療の方法を提供する。

【0020】

MHC I 抗原のプライミングを強化する化合物及び方法は、ワクチンの免疫原性及び有効性の改善に有用であり得る。したがって、本発明の化合物はアジュバント及び／又はワクチンとして使用可能である。例えば、CD74 を発現するポリヌクレオチド、発現ベクター及び／又は樹状細胞は、免疫応答を刺激するために使用可能である。加えて、MHC I 交差提示経路を標的とする融合タンパク質（並びに融合タンパク質を発現するポリヌクレオチド及び／又は発現ベクター）は、ワクチンに使用可能である。したがって、ある実施形態において、MHC I 交差提示経路を標的とするワクチンを提供する。

【0021】

ある実施形態において、ワクチンにおいて一次免疫応答を刺激するための、カテプシン切断ペプチド及びこれらのペプチドのコンカテマーを提供する。ある実施形態において、カテプシンはCathepsin Sである。

【0022】

ある実施形態において、ワクチンの性能を改善する化合物及び方法を提供する。ある実施形態において、癌ワクチンの性能を改善する化合物及び方法を提供する。ある実施形態

10

20

30

40

50

において、限定するものではないが、H I Vを含むウイルスに対するワクチンの性能を改善する化合物及び方法を提供する。ある実施形態において、細菌、例えば、限定するものではないが、結核菌を含むマイコバクテリア属に対するワクチンの性能を改善する化合物及び方法を提供する。ある実施形態において、限定するものではないが、熱帯夏マラリア原虫（*Plasmodium falciparum*）を含むプラスモディウム属に対するワクチンの性能を改善する化合物及び方法を提供する。

【0023】

C D 7 4 の役割に対する理解はさらに、将来的に個別化された医療選択肢に影響を与え得る、個体間の免疫応答の差を説明し始めることができる。したがって、ある実施形態において、個体のC D 7 4 依存性M H C I 交差提示経路に基づく、個別化されたワクチンの取り組みを開発する方法を提供する。

10

【0024】

M H C I 交差提示の阻害は、免疫応答の阻害をもたらし得る。例えば、C D 7 4 の発現の欠損は、M H C I 交差提示の低下をもたらすことができ、順にM H C I 媒介性C T L 応答を含むM H C I 媒介性免疫応答を低下させることができる。したがって、本発明のある実施形態において、M H C I 交差提示を阻害し、それによって、樹状細胞におけるC D 7 4 の発現及び／又は活性を阻害するステップによる、M H C I 媒介性免疫応答を阻害する方法を提供する。このような方法は、自己免疫疾患の治療及び／又は移植片拒絶反応の予防／阻害に有用であり得る。C D 7 4 の発現及び／又は活性を阻害する化合物としては、例えば、アンチセンス化合物及び／又は中和抗体が挙げられる。

20

【0025】

M H C I シグナル伝達は、T o l l 様受容体（T L R）の先天性炎症反応をもたらし得ることが示唆されている。特に、構成的に発現された膜M H C I が、T L R 誘発性先天性炎症反応を減弱させることが見出された（*Nature Immunology* 13 : 551-559）。したがって、本発明のある実施形態において、M H C I シグナル伝達を緩和することにより、先天性免疫応答を緩和する方法を提供する。

【0026】

免疫応答に対する本発明の化合物の効果は、*in vivo*で動物モデルにおいて試験することができる。例えば、免疫応答は、抗原提示細胞及びT細胞を、R A G - / - 免疫欠損マウスにおいて再構成することにより、*in vivo*で評価可能である。したがって、本発明のある実施形態において、マウスを樹状細胞及びC D 8 + T細胞により再構成するステップ、及びマウスにおいて免疫応答を分析するステップを含む、R A G - / - 免疫欠損マウスにおいて免疫モジュレーター及び／又はアジュバントをスクリーニングする方法を提供する。免疫モジュレーターの候補は、再構成後、マウスに直接投与可能である、並びに／或いはR A G - / - マウス内に注射する前に、樹状細胞及び／又はT細胞に直接投与可能である。

30

【0027】

C D 7 4 欠損のマウス及び／又は樹状細胞はまた、M H C I 交差提示経路を標的とするワクチンの開発に使用可能である。例えば、このようなマウス及び細胞は、M H C I により交差提示されるペプチドの同定に有用であり得、したがって、一次免疫応答の刺激に有用であり得る。本明細書に記載の本発明をさらに理解するために、以下に実施例を記載する。これらの実施例が、本発明の例示的な実施形態の記載を意図するものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではないことが理解されるだろう。

40

【実施例】

【0028】

C D 7 4 依存性M H C クラス I エンドリソソーム交差提示経路。

免疫応答は、外来性抗原を交差提示する樹状細胞（D C）により開始され、プライミングされる。シャペロンC D 7 4（インバリアント鎖）は、主要組織適合複合体（M H C）クラス I I との関連で、D C のプライミングを排他的に促進すると考えられる。しかし、本明細書において、D C 中のC D 7 4 依存性M H C クラス I 交差提示経路が、ウイルスタ

50

ンパク質抗原及び細胞関連抗原に対する、MHCクラスI拘束性の、細胞溶解性Tリンパ球（CTL）応答の発生において主要な役割を有しことを実証する。CD74は、DCの小胞体においてMHCクラスIと会合し、外来性ペプチドを負荷するために、エンドリソソームコンパートメントへMHCクラスIの輸送を媒介する。CD74が、MHCクラスI媒介性CTL応答をプライミングするためのエンドリソソームDC交差提示において、今まで発見されていなかった生理学的機能を有することが結論付けられる。

【0029】

一次免疫応答の間に、樹状細胞（DC）は、主に交差提示及びT細胞のクロスプライミングを介して適応免疫応答を開始する、主要な抗原提示細胞である。これは、細胞外抗原の取込み、細胞関連抗原断片の消化及び主要組織適合複合体（MHC）クラスI及びMHCクラスII分子両方に関するタンパク質分解ペプチド産物の提示を伴う¹。MHCクラスIに関して、どのようにこの過程が起こるかを説明可能な2つの中心的経路：in vitroで機能することが説得力を持って示されるサイトゾル経路^{2～5}及び特定の抗原に対してin vivoで主要な役割を有することが示される液胞経路がこれまで記載されている^{6～8}。交差提示の「phago-ER」（小胞体媒介性食作用）モデルは、交差提示の優勢な経路と考えられた⁹。その後のデータによって、その結論が議論された¹⁰。この論争に寄与した1つの要因は、多くの場合、排他的ではなく、動的な細胞小器官の生合成及び分配の間に単に濃縮される細胞内タンパク質を、特定の細胞小器官に限定的なマーカーとして指定した、データの過剰解釈であると思われる。さらに、外来性抗原の異なる形態の研究から、及び長期DC細胞系の研究と新たに単離されたDCとの研究を対比することにおいて、対照的な結論が推論できる。

【0030】

液胞経路において、cathepsin Sは、ペプチド受容性MHCクラスI分子に負荷される抗原ペプチドを発生するプロテアーゼとして同定されている¹¹。さらに、細胞内膜の融合の間のドナーとアクセプターとの係留及びドッキングを調節する膜及びサイトゾルのSNAREタンパク質もまた、交差提示事象において基本的な役割を有すると思われる¹²。しかし、クロスプライミングコンパートメントにおけるMHCクラスIの供給源、その輸送の機序及びペプチド負荷の部位は、依然として活発な研究領域である^{8, 13}。

【0031】

リサイクリングMHCクラスIのエンドソーム内への自発的な内部移行が実証されている^{14, 15}。公表された結果は、MHCクラスIの、細胞膜からエンドリソソーム負荷コンパートメントへのリサイクリングが、MHCクラスIの細胞質尾部において見出されるチロシン内部移行シグナルの認識によって容易にされるモデルを裏付ける^{8, 13}。したがって、細胞膜からリサイクルされるMHCクラスI分子は、交差提示への参加を定められた、外来性抗原を負荷するためのMHCクラスIの一供給源である^{8, 13}。同様に、MHCクラスIの、小胞体（ER）からエンドサイトーシスコンパートメントへの運搬もまた提唱されている。これは、ファゴソームとERとの融合を伴う機序により起こり得る⁹。代替の、補足的な仮説候補は、ERにおいてMHCクラスIIと関連があり、それによってペプチドの早期結合を防止し、CD74細胞質尾部に存在する局在化シグナルにより、エンドサイトーシス経路への輸送を媒介すること^{1, 16}が公知であるシャペロンCD74（インバリアント鎖）が、MHCクラスIと結合し、一部のMHCクラスIを液胞エンドサイトーシスコンパートメントへ送達し、交差提示において機能できることである^{17, 18}。この機序は、ペプチド受容性MHCクラスIを、外来性抗原及びMHCクラスII分子と同じコンパートメント（又は類似のコンパートメント）であるMIICコンパートメントに同時に配置し¹⁹、抗原ペプチドのMHCクラスI分子への負荷及び結合を容易にする。CD74がMHCクラスIの外来性提示のサイトゾルルートに関与するとは考えにくいので、この経路は、MHCクラスIの液胞経路への運搬と連結していると思われる^{20, 21}。

【0032】

MHCクラスIとCD74との相互作用及びそれらの同じコンパートメント中の同時局在化が、ヒト細胞系において実証されている^{17~19}。長年の例に基づき、MHCクラスI-CD74相互作用が、おそらく、MHCクラスIのエンドソームへの運搬の運命を生理学的条件下で調節しない²²ことが結論付けられたが、他の対照的な研究は、CD74を発現するようにトランスフェクトされた細胞が、多様な対立遺伝子によりコードされたMHCクラスIを、より多く表面に発現することを実証しており、このことは、MHCクラスI-CD74相互作用が機能的な重要性を有し得ることを示唆している²³。MHCクラスIとCD74との*in vivo*の相互作用の免疫学的妥当性を以下において調査し、外来性抗原の交差提示におけるCD74の明確で重要な役割及びその後のDCによるクロスプライミングを記載する。

10

【0033】

結果

CD74は、一次抗ウイルス応答を必要とする。

DCは、直接感染させることができ、したがって、MHCクラスIによる古典的提示を使用し、ナイーブなCD8⁺T細胞を活性化できる。しかし、低力価でウイルスに感染する際、DCの直接感染は考えにくく、DCの交差提示は、CD8⁺T細胞応答の発生に与する優勢な経路である^{8, 24}。一次抗ウイルス免疫応答を発生させる交差提示におけるCD74の役割に対処するために、野生型(Cd74^{+/+})マウス及びCD74欠損(Cd74^{-/-})マウスを、低用量の水疱性口内炎ウイルス(VSV)に感染させた。本発明者らは、同様に、運搬体TAPが欠損したマウス(Tap1^{-/-}マウス)を感染させ、このマウスは、MHCクラスIの構築及び細胞内運搬が損なわれ、したがって、陰性対照として、不適切な胸腺選択が原因でCD8⁺T細胞を欠いている²⁵(図1及び図7a)。この感染において、VSVに対するCD8⁺T細胞の一次応答及びメモリー応答が、CD4⁺T細胞の不在下で発生し得る^{26, 27}。このようにして、交差提示におけるCD74の役割を、CD4⁺T細胞応答におけるその役割とは関係なく評価可能である。VSV感染後にMHCクラスIに提示される免疫優勢エピトープであるVSV核タンパク質のアミノ酸52~59(VSVNP(52~59))(H-2K^b)に対する応答において発生するCD8⁺T細胞の頻度を評価した。Cd74^{-/-}マウスは、抗原特異的CD8⁺T細胞を発生する能力がCd74^{+/+}マウスより有意に低い(5.0%対19.0%; 図1a、b)。これによって、細胞障害性Tリンパ球(CTL)の殺傷能力が低い免疫応答がもたらされた(図1c)。

20

30

【0034】

骨髓キメラを構築し、VSV感染モデルにおいてクロスプライミングにおけるヘルパーT細胞に関する役割の可能性をさらに排除した^{26, 27}。さらに、キメラを使用して、免疫応答の発生欠損が、造血細胞由来DCの、抗原を交差提示し、T細胞をプライミングする能力に依存するかどうかを確認した。Cd74^{+/+}骨髓(Cd74^{+/+}→Cd74^{+/+})又はCd74^{-/-}骨髓(Cd74^{-/-}→Cd74^{+/+})を有するこのCd74^{+/+}マウス及び再構成されたCd74^{-/-}マウスを、Cd74^{+/+}骨髓(Cd74^{+/+}→Cd74^{-/-})又はCd74^{-/-}骨髓(Cd74^{-/-}→Cd74^{-/-})により再構成した。正常な量のCD8⁺T細胞及びCD4⁺T細胞が、Cd74^{+/+}→Cd74^{+/+}及びCd74^{-/-}→Cd74^{+/+}マウスの末梢において見出された。しかし、少数のCD4⁺T細胞及びいくらか多いCD8⁺T細胞が、Cd74^{-/-}→Cd74^{-/-}及びCd74^{+/+}→Cd74^{-/-}マウスにおいて見出された(図7b、c)。これは、Cd74^{-/-}胸腺上皮においてMHCクラスIIがあまり豊富でないため、レシピエントCd74^{-/-}マウスにおいて正の選択が損なわれたことを示していた。

40

【0035】

抗ウイルス応答を検査するために、キメラマウスを、低力価のVSVに感染させ、VSVNP(52~59)特異的CD8⁺T細胞の発生を、四量体分析及びCTLキリングアッセイ(killing assay)により評価した(図2)。CD4⁺T細胞数が少

50

ない $CD4^{+}/^{+} \rightarrow CD4^{-}/^{-}$ マウスは、VSVNP (52~59) 特異的 $CD8^{+}$ T細胞を、野生型 $CD4^{+}/^{+} \rightarrow CD4^{+}/^{+}$ キメラと同様に産生でき (1.1% 対 1.2%; 図2a)、同様の殺傷能力を有する免疫応答をもたらした (16.8% 対 1.9%; 図2b)。しかし、 $CD4^{-}/^{-} \rightarrow CD4^{+}/^{+}$ マウスは、正常な $CD4^{+}$ T細胞を有するにもかかわらず、VSVNP (52~59) 特異的 $CD8^{+}$ T細胞の発生が大いに損なわれ (0.2%; 図2a)、より低いCTLの殺傷応答をもたらした (18.0% 対 4.5%; 図2b)。このことは、VSV特異的CTL応答の発生が、 $CD4^{+}$ T細胞の数とは独立していたことを示唆した。明白に $CD74$ を発現する骨髓由来抗原提示細胞が要求され、 $CD4^{-}/^{-}$ マウスに、 $CD4^{+}/^{+}$ マウスの抗ウイルス免疫応答と同様の、強固な抗ウイルス免疫応答を生じさせた。

10

【0036】

$CD4^{+}$ 細胞の枯渇は、抗VSV応答に影響を与えない。

次に、 $CD4^{-}/^{-}$ マウスにおける正の選択の機能障害からもたらされる、 $CD4^{+}/^{+} \rightarrow CD4^{-}/^{-}$ キメラ中の残存 $CD4^{+}$ T細胞が、それらの抗ウイルス免疫応答の効率に寄与する可能性を除外した。感染の過程の間、 $CD4^{+}/^{+} \rightarrow CD4^{-}/^{-}$ キメラを、 $CD4$ に対するGK1.5抗体 (抗 $CD4$) をそれらに注射することによって、 $CD4^{+}$ 細胞を枯渇させた。 $CD4^{+}$ 細胞は、バックグラウンドに対してほぼ完全に検出不可能であるが、 $CD4^{+}$ 細胞が枯渇した $CD4^{+}/^{+} \rightarrow CD4^{-}/^{-}$ キメラは、VSVNP (52~59) に特異的な $CD8^{+}$ T細胞を、 $CD4^{-}/^{-} \rightarrow CD4^{+}/^{+}$ キメラより有意に多く産生し (13.5% 対 4.1%; 図2c)、より溶解作用の高い免疫応答をもたらした (14.0% 対 4.9%; 図2d)。これらのデータをまとめると、 $CD4^{+}/^{+} \rightarrow CD4^{-}/^{-}$ キメラが、 $CD4^{-}/^{-} \rightarrow CD4^{+}/^{+}$ キメラよりも、より強力な抗VSV応答を備えていたことが確認された。これは、 $CD4^{+}$ T細胞とは独立しているが、その代わりに、抗ウイルス $CD8^{+}$ T細胞応答を完全にプライミングできる野生型DCによる $CD4^{-}/^{-}$ マウスの再構成が原因であった。

20

【0037】

細胞関連抗原のクロスプライミングは、 $CD74$ 依存性である。

細胞関連抗原に対する一次免疫応答における $CD74$ の役割を調査するために、致死的な放射能を浴びたオボアルブミン (OVA) をパルスされたDC又は細胞関連抗原の供給源としてOVAをパルスされた宿主と不一致のMHCクラスIを有するDCを、CTLを活性化するために、 $CD4^{+}/^{+}$ マウス、 $CD4^{+}$ 細胞を枯渇させた $CD4^{+}/^{+}$ マウス及び $CD4^{-}/^{-}$ マウス並びに再構成されたマウスキメラに使用した。細胞関連OVAを初回免疫された野生型免疫系を有するマウスは、OT-Iトランスジェニックマウス由来の $CD8^{+}$ T細胞の増殖を誘導できたか (図8)、又はOVAアミノ酸257~264 (OVA (257~264)) をパルスされた標的細胞の殺傷において効率の良い内在性CTLを活性化できた (データ示さず)。しかし、細胞関連OVAの同じ初回免疫により、 $CD74$ を欠損した造血系を有するマウスは、OT-I $CD8^{+}$ T細胞の増殖をあまり刺激できず、内在性CTLを産生が少なく、これが殺傷能力の低下に寄与した (図8及びデータ示さず)。

30

【0038】

$CD74$ 依存性クロスプライミングは、 $CD4^{+}$ T細胞とは独立している。

DCクロスプライミングの欠陥に焦点を合わせ、 $CD4^{+}$ ヘルパーT細胞の要求を含む外来因子の寄与を除外するために、 $CD4^{-}/^{-}$ 及び $CD4^{+}/^{+}$ DCを、OVAタンパク質又はOVA (257~264) ペプチドと一緒にインキュベートし、それらの細胞を、サイトゾル染料のCFSEで標識された、精製OT-I $CD8^{+}$ T細胞と併せて、BALB/cバックグラウンドのT細胞欠損組換え活性化遺伝子1欠損 ($Rag1^{-}/^{-}$) マウスに注射した。OT-I T細胞をクロスプライミングする、DCの能力を評価した (図3a)。 $CD4^{-}/^{-}$ DCは、OVAタンパク質と一緒にインキュベートした場合、OT-Iの増殖の誘導は $CD4^{+}/^{+}$ DCよりかなり少なかった (18% 対 48%; 図3b)。しかし、DCに、直接提示の陽性対照としてOVA (257~264) ペ

40

50

プチドをパルスした場合、 $CD74^{-/-}$ DCは、 $CD8^{+}$ OT-I T細胞の活性化において、 $CD74^{+/+}$ DCと同等の能力があった（59.5%対60.0%；図3b）。

【0039】

脾臓への注射部位からの、DCの運動性及びホーミングにおけるCD74の交絡的役割の可能性に対処するために²⁸、静脈内注射後のCFSE標識DCの局在化²⁹を評価した（図3b及び図9）。Rag1^{-/-}マウスに静脈内注射された $CD74^{+/+}$ 及び $CD74^{-/-}$ DCは、同等に脾臓に局在化した。したがって、T細胞増殖を誘導する $CD74^{-/-}$ DCの能力の低さは、DCの遊走の差が原因ではないが、抗原をプロセッシング及び提示する能力の低さが原因であった。CD74が、MHCクラスIによる細胞関連抗原の交差提示及び*in vivo*の $CD8^{+}$ T細胞のプライミングにおいて重要な役割を有し、 $CD4^{+}$ ヘルパーT細胞又はDCのCD74媒介性運動性とは関係が無いことが結論付けられた。

【0040】

CD74欠損DCは、クロスプライミング能力が損なわれた。

H-2K^b拘束性オボアルブミンエピトープOVA（257～264）を*in vitro*で交差提示する、さまざまなマウス系統の脾臓由来DCの能力を評価した。DCを、可溶性OVAと一緒に、サイトカインを伴い、又は伴わずにインキュベートし、細胞をH-2K^b-OVA（257～264）複合体に特異的な抗体で染色するか、又は細胞を、H-2K^bと会合したOVA（257～264）を認識後活性化されるT細胞ハイブリドーマであるB3Zと一緒に培養するかのいずれかに供した³⁰。 $CD74^{+/+}$ 及び $CD74^{-/-}$ DCは、OVAの内部移行に対して同様の能力を有し、同様のMHCクラスIの総表面発現を有した（図4a、b）。しかし、OVAと一緒にインキュベーション後、 $CD74^{-/-}$ DCは、 $CD74^{+/+}$ DCより非常に少ないH-2K^b-OVA（257～264）複合体を有した（図4b）。DCのクロスプライミング能力が、共刺激の上方制御及びMHC分子を誘導し、エンドサイトーシスを減少させる炎症性メディエーターにより、増大されることが示されている^{31, 32}。これは、T細胞のプライミングに関するより高い能力をもたらすが、可溶性抗原を捕捉し、提示する、DCの能力が縮小される。共刺激を伴う、*in vivo*条件に似た状況におけるT細胞の活性化を評価するために、OVAをパルスされたDCを、B3Z T細胞と一緒に、サイトカインを伴い、又は伴わずにインキュベートした。腫瘍壊死因子（TNF）及びインターフェロン- γ の存在下で、 $CD74^{+/+}$ 及び $CD74^{-/-}$ DCは、共刺激分子であるCD80、CD86及びCD40を上方制御する同等の能力を有したが（図4c及びデータ示さず）、 $CD74^{-/-}$ DCは、B3Z T細胞を、 $CD74^{+/+}$ DCほど活性化できなかった（図4d）。予想通り、細胞を、Tap1^{-/-}マウス由来の、OVAをパルスされたDCと一緒に、サイトカインの存在下でインキュベートした後、T細胞の活性化は検出されなかった。これらのデータは、CD74がT細胞クロスプライミングにおいて役割を有し、共刺激分子の発現に影響を与えないという結論を裏付けた。

【0041】

CD74は、エンドリソソームのMHCクラスI負荷を媒介する。

分子レベルにおいて、交差提示及びプライミング欠損の機序をより理解するために、比較免疫蛍光共焦点顕微鏡法（ICM）を使用して、TNFを伴う、又は伴わない $CD74^{+/+}$ 及び $CD74^{-/-}$ DCにおけるOVA（257～264）負荷MHCクラスIの細胞内局在化、輸送及び分布を評価した。細胞を、OVAタンパク質と一緒にインキュベートし、H-2K^b-OVA（257～264）に対する抗体及び後期エンドソームマーカーのLAMP-1に対する抗体を用いて、細胞を細胞内染色した。LAMP-1の共局在化は、TNFを培養液に加えなかった場合、H-2K^b-OVA（257～264）複合体が染色された、多くの $CD74^{+/+}$ 脾臓DCにおいて検出可能であった（図4e、f）。 $CD74^{-/-}$ 及びTap1^{-/-} DC中の一部のH-2K^b-OVA（257～264）複合体を同定したが、後期エンドソームの共局在化は最小であった（図4e、f

10

20

30

40

50

）。T a p 1^{-/-} DC中の負荷されたMHCクラスIの不在は、先に仮定された機序である、交差提示におけるT A Pの役割と一致した^{2 4, 3 3}。T N Fを用いた処理後、C d 7 4^{+/+} DCは、H-2 K^b-O V A（2 5 7～2 6 4）複合体とL A M P-1との有意に多い共局在化を有したが（図4 e、f）、E RマーカーのG R P 7 8又はゴルジマーカーのギアンチン（g i a n t i n）とは有意に多い共局在化を有さなかった（データ示さず）。対照的に、C d 7 4^{-/-} DC中の後期エンドソームコンパートメントにおいてH-2 K^b-O V A（2 5 7～2 6 4）複合体はほとんど観察されず、これは、後期エンドソームにおいてH-2 K^b-O V A（2 5 7～2 6 4）複合体の形成が少ないことを示していた（図4 f）。I C Mデータの比較により、T N Fの存在下で、C d 7 4^{-/-} 由来のDCが、後期エンドソームにおいて、C d 7 4^{+/+} DCより有意に少ないO V A（2 5 7～2 6 4）負荷H-2 K^bを有したことが示された（6 2 %対3 2 %；図4 f）。これらのデータは、DCにおいて、外来性抗原の交差提示を要求する、C D 7 4依存性MHCクラスI抗原プロセッシング経路が存在することを示唆した。

【0042】

C D 7 4は、MHCクラスIをERからエンドリソソームへ指向させる。

C D 7 4の欠損が、後期エンドソームコンパートメントにおいてH-2 K^b-O V A（2 5 7～2 6 4）複合体を減少させたという発見は、C D 7 4が、MHCクラスIをERからエンドリソソーム経路に標的化させることを示唆した。そこで、C D 7 4はおそらく分解され、MHCクラスIに外来性抗原ペプチドが負荷される。このことをより詳細に検査するために、エンドソームの酸性化を、クロロキンを用いてブロックし、C D 7 4媒介性MHCクラスI交差提示経路を評価した。クロロキンを用いて処理された骨髓由来DC（B M D C）が、未処理の対照の表面発現と同等のMHCクラスIの表面発現を有し、O V A（2 5 7～2 6 4）ペプチドをパルスした場合、H-2 K^b-O V A（2 5 7～2 6 4）をディスプレイしたが、可溶性O V Aと一緒にインキュベートした場合、クロロキン処理DCは、未処理DCよりはるかに少ない表面H-2 K^b-O V A（2 5 7～2 6 4）を有したことが見出された（図5 a～c）。I C M分析により、B M D Cが、クロロキンを用いた処理後、H-2 K^bとC D 7 4とのより多くの共局在化を有したことが示された（図5 d、e）。このことは、クロロキンを用いた処理が、おそらくMHCクラスI I経路に関して報告された様式と同様の様式で、エンドリソソームにおいてMHCクラスIとC D 7 4との解離がブロックされ^{3 4}、リサイクリングMHCクラスIの分解が阻害されたことにより、より多くのエンドリソソームMHCクラスI分子がもたらされたことを示していた。最終結果は、MHCクラスIへの外来性抗原の負荷の減少及びその後の表面H-2 K^b-O V A（2 5 7～2 6 4）の減少であった。C D 7 4が、MHCクラスIをエンドリソソームコンパートメントに指向させるという発見を確認し、C D 7 4がMHCクラスI輸送を媒介することを明確に実証するために、C D 7 4欠損B M D Cに、完全長C D 7 4又はサイトゾル輸送ドメインを欠いたC D 7 4に関する発現ベクターをトランスフェクトし、O V Aタンパク質又はプロセッシングの必要性を回避した陽性対照であるO V A（2 5 7～2 6 4）ペプチドを提示する、それらの能力を評価した。C d 7 4^{-/-} DCは、クロスプライミング能力が損なわれ、O T-I T細胞の増殖の誘導がC d 7 4^{+/+} DCよりもはるかに少なかった（図5 f）。予想通り、クロスプライミング能力は、完全長C D 7 4を用いて再構成されたC d 7 4^{-/-} DCにおいて復元され、DCは、O T-I T細胞増殖を、野生型DCと同様の能力で誘導できた。しかし、本発明者らが、エンドソーム輸送モチーフを欠いたC D 7 4をC d 7 4^{-/-} DCに再導入した場合、クロスプライミング能力は損なわれたままであり（図5 f）、これは、C D 7 4の不在下で、エンドリソソームに指向されるMHCクラスIが少なく、O T-I T細胞のクロスプライミングが少なかったことを実証している。これらのデータをまとめると、C D 7 4が、外来性抗原の効率的な提示が起こるクロスプライミングコンパートメントへの、MHCクラスIの輸送に影響を与えたことを示していた。

【0043】

C D 7 4とMHCクラスI分子とは、DCにおいて複合体を形成する。

10

20

30

40

50

MHCクラスIのクロスプライミングコンパートメントへの標的化のための必要条件として、DCにおけるCD74とMHCクラスIとの相互作用を、分子レベルで調査した。Cd74^{+/+}及びCd74^{-/-}マウスの脾臓由来のDCを、ICMによる分析のために単離した。DCを、抗H-2K^b及び抗CD74で染色し、見出されたH-2K^b分子は、細胞表面及び細胞質に分布し、その場所でH-2K^b分子は主に小胞様コンパートメントに局在化していた。CD74分子は、Cd74^{+/+}DC中のこれらの細胞内コンパートメントで相当に共局在化していた(図6a)。しかし、本発明者らは、Tap1^{-/-}DCにおいてH-2K^bとCD74との共局在化が少ないことを観察し、おそらく、H-2K^bの全体の利用能が高速されたことが原因であると思われる(図6a)。

【0044】

これらの分子が共局在化するコンパートメントを同定するために、脾臓DCを、抗H-2K^b及び抗LAMP-1(後期エンドソームを検出するために)を用いて染色した。相当な割合の後期エンドソームが、Cd74^{+/+}DCにおいてH-2K^bを含有し(図6a)、これにより、相当量のMHCクラスI分子がエンドサイトーシスコンパートメントに存在することが確認された^{8, 21}。対照的にごくわずかなH-2K^bが、Cd74^{-/-}DCにおいて、後期エンドソームと共局在化していた(図6a)。この結果は、ICM画像の定量化により確認され、このことは、Cd74^{-/-}DCにおいて、Cd74^{+/+}DCよりも極めて少ないMHCクラスI分子がエンドリソソームコンパートメントを標的としていたことが示していた(73%対47%;図6b)。共局在化は、Tap1^{-/-}DCにおいてもさらに低いことが明らかであり、おそらく、H-2K^b分子のエンドリソソームへの標的化がTAPの不在で損なわれたことが原因であると思われる。これらのデータは、かなりのMHCクラスI分子がCD74と相互作用して、おそらくERからDCのエンドリソソームコンパートメントへのそれらの運搬を容易にしていたことを示唆した。

【0045】

DCにおけるMHCクラスIとCD74との間の直接分子相互作用の実証は、これが、DCにおける抗原提示の未だ述べられていない経路であるという議論をさらに強固にした。このことを実証するために、BMDcを、さまざまなノックアウトマウス及び野生型マウスから得て、この細胞を、³⁵Sを用いて標識し、その後、MHCクラスI(H-2K^b)、MHCクラスII(I-A^b)又はCD74に結合した複合体を免疫共沈降させ、これらの複合体中のタンパク質を、それらの見かけの分子量に基づき同定した。MHCクラスIIに対する抗体は、Cd74^{+/+}DC中のCD74の41-kDa(41-kDa)及び31-kDaのアイソフォームを大量に免疫沈降させた(図6c)。抗H-2K^bもまた、それらの同じCD74アイソフォームを沈降させ(図6c)、このことは、常に、CD74が、DC中のMHCクラスI分子の全プールの一部に結合していることを示唆した。分子サイズ41及び31kDaで検出された2種の顕著なタンパク質は、MHCクラスI負荷又は運搬複体の成分であったと思われる。それらのサイズは、MHCクラスII負荷においてシャペロンとして作用するH-2DM又はH-2DOのサイズと一致するが、それらの同一性は、最終的には未だ決定されていない。CD74の41及び31-kDa型は、Cd74^{-/-}DCには存在せず(図6c)、このことは、CD74の41及び31-kDa型が実際に、MHCクラスI及びMHCクラスII分子と一緒に免疫沈降されたことが示されているCD74の報告されたアイソフォームであったことを示していた^{17~19, 23}。さらに、41及び31-kDaのCD74アイソフォームは、Tap1^{-/-}DC中のH-2K^bと一緒に免疫沈降され(図6c)、このことは、CD74とMHCクラスIとの結合が、TAPのペプチド運搬体機能に依存していなかったことを示唆した。最終的に、CD74のアイソフォームは、β₂-ミクログロブリン欠損DC由来のMHCクラスIと一緒に免疫沈降され(図6c)、このことは、CD74が、フォールディングされたβ₂-ミクログロブリン会合MHCクラスI複合体及びβ₂-ミクログロブリン非含有MHCクラスI複合体と結合可能であることを示唆した。

【0046】

その後免疫ブロット分析を使用して、MHCクラスI分子に結合したCD74アイソフォームの同一性を確認した。タンパク質を、抗I-A^b、抗H-2K^b及びエクソン8によりコードされるMHCクラスI分子の領域に対する抗体並びに無関係なトランスフェリン受容体に対する抗体を用いて免疫沈降させ、その後、抗CD74を用いて免疫ブロット分析を行った(図6d)。予想通り、CD74は、MHCクラスII(I-A^b)と会合したが、無関係なタンパク質のトランスフェリン受容体とは会合しなかった(図6d)。CD74は、MHCクラスIと会合することが決定的に同定され(図6d)、このことにより、この相互作用が検出可能であり、この免疫沈降手順において使用された条件下で安定であったことが確認された。

【0047】

MHCクラスI-CD74複合体は、プレ-ゴルジ(pre-Golgi)コンパートメントにおいて形成する。

次に、MHCクラスIとCD74との間の相互作用の動態及び起源を明確に実証するために、生化学的手段を使用して、この相互作用が起こる細胞内コンパートメントをさらに推定する。分泌経路中のタンパク質は、ゴルジコンパートメントを介してERから輸送し、ゴルジコンパートメントで、それらはマンノシダーゼIIにより切断されるので、それらはエンドグリコシダーゼ(Endo H)に対する耐性を獲得する^{3 5}。Endo Hに対する感受性が、タンパク質が、ER又はERとシス-ゴルジとの間の「移行領域」に局在することの表れとして作用することは広く受け入れられている。Cd74^{+/+}BMD-20

C由来のCD74結合MHCクラスIは、抗CD74又は抗MHCクラスIを用いて免疫沈降され、免疫沈殿物をEndo Hで処理し、その後、抗MHCクラスI又は抗CD74を用いた免疫ブロット分析を行い、MHCクラスI-CD74複合体のEndo Hに対する感受性を可視化した。本発明者らは、MHCクラスI会合CD74が、Endo H-30

【0048】

CD74は、MHCクラスIの内部移行に影響を与えない。

最終的に、CD74と結合したMHCクラスIの供給源を決定するために、本発明者らは、細胞膜からのMHCクラスIのCD74媒介性輸送の役割を調査した。CD74が、表面受容体のリサイクリングにおいて機能するかどうかを決定するために、Cd74^{+/+}及びCd74^{-/-}DCにおけるMHCクラスIの内部移行をモニターした。BMD-40

【0049】

考察

MHCクラスII分子による外来性ペプチドの提示対MHCクラスI分子によるサイトゾルペプチドのディスプレイの二分法が見直されている^{6, 8, 36, 37}。MHCクラスI交差提示は、この分割のばやけを実証するだけでなく、特定の細胞型、例えばDCに

10

20

30

40

50

として、この現象が、*in vivo*の一次免疫応答の発生において主要な役割を果たすことを示す⁸。さらに、MHCクラスII分子における内在性ペプチドの提示は、MHCクラスI及びクラスII経路がおそらく交差して、それらが同じ抗原負荷コンパートメントを共有可能なことを実証している³⁸。CD74が、MHCクラスIIによる提示において主要なシャペロンとして古典的に認識されるが、CD74及びMHCクラスIもまた相互作用することが示されている^{17, 18, 39, 40}。しかし、CD74の、MHCクラスI媒介性免疫応答に対する*in vivo*の生理学的寄与は調査されておらず、MHCクラスI-CD74相互作用の同定は、生理学的好奇心としてかなり軽視されている。ここで、CD74が、DCにおいて、MHCクラスI交差提示経路に大きく寄与したことが実証されている。これらの研究は、ウイルス抗原及び細胞関連抗原に対する応答の発生における、CD74依存性クロスプライミングに関する主要な役割を同定している。

10

【0050】

DC交差提示を介して発生されたCD4⁺T細胞独立性CTL応答を評価するために、低用量のVSVに感染したモデルを使用した。低ウイルス用量は、大部分のDCが推定上感染を免れ、他の感染細胞が抗原ペプチドドナーとして作用する生理学的状況を模倣し、この状況は、直接又は内在性の提示対交差提示の描写を可能にする。CD74を欠いたマウスが、特に、クロスプライミングが、DCによる直接プライミングよりおそらく優勢である低ウイルス用量に対して、MHCクラスI拘束性CTL応答を発生するそれらの能力を相当に損なうという観察は、MHCクラスI交差提示が、抗ウイルスCD8⁺T細胞媒介性免疫が、生理学的条件下で*in vivo*で発生される主要機序であるという結論を裏付けた^{8, 41}。本発明者らは、他の研究者らの研究もまた確認し、VSVなどのウイルスに対する、CTLの応答が、CD4⁺T細胞独立性であり^{26, 27}、したがって、MHCクラスII-CD74複合体の機能とは独立していることを実証した。

20

【0051】

骨髄キメラの作製は、野生型宿主バックグラウンドのCd74^{-/-}骨髄細胞由来DCの活性の研究を可能にする。それらの研究は、CD74のプライミングの欠陥がDCの起源の欠陥であり、この欠陥がDC交差提示のレベルであったことを示したという結論を導いた。さらに、CD74の不在が、50%を超えて低い抗VSV CTLをもたらしただので、CD74依存性クロスプライミングは、重要なMHCクラスI抗原提示経路として同定された。さらに、マウスキメラにより得られた発見は、CD74の欠陥が、CD4⁺T細胞が少ないこととは独立して、VSVに対する一次免疫応答の発生を損なうという観察を裏付けた^{26, 42}。このことは、ある場合において、CD4⁺T細胞が、二次CTL集団拡大にとって必要であるが、一次集団の拡大には必要でないことを実証する、他の公表されたデータと一致する⁴³。T細胞抗原受容体の刺激と一緒に、B7分子によるCD8⁺CTLの同時刺激は、ヘルパーT細胞なしにCD8⁺CTLを誘発するために十分であり得る²⁶。又は、CD8⁺CTL前駆体の2種の異なる系統が存在し、それによって、CD4⁺T細胞独立性集団が、さまざまなウイルスに対する優勢な応答を提供し、CTL機能を、CD4⁺T細胞の不在下で喪失させないことが完全に可能である⁴²。

30

【0052】

エンドソーム標的化シグナルを欠いたCD74の形態の発現が、DC交差提示及びT細胞のプライミングを補足できなかったことが見出された。しかし、機能性エンドソーム標的化シグナルを含有する野生型CD74分子による再構成がクロスプライミングを復元し、このことは、MHCクラスIが、ERからエンドリソームへCD74により運搬される機序の提唱を裏付けた。さらに、CD4⁺T細胞を完全に欠いたRag1^{-/-}マウス中のCd74^{-/-}DCによるCD8⁺T細胞の不十分な活性化は、DCクロスプライミング機能の欠陥は、CD74の不在が原因であったことを明確に実証した。本発明者らの研究において、CD74は、DCのホーミング及び運動性において*in vivo*で役割を有するとは思われなかったが、DCによるCD8⁺T細胞のCD74依存性MHCクラスIクロスプライミングの生理学的に重要な経路を媒介していると思われた。

40

【0053】

50

本発明者らの研究はまた、生理学的条件下でDCにおけるMHCクラスI分子とCD74との間の会合の証拠を提供している。それらは、エンドリソソームにおけるMHCクラスI-CD74複合体の解離後、MHCクラスIの重鎖及び β_2 -ミクログロブリンと抗原ペプチドとの再構築が、その後、エンドリソソームコンパートメントにおいて起こることをさらに示唆した^{4, 4}。これに関連して、MHCクラスI-CD74複合体が、依然として後期エンドソームとして同定された液胞様コンパートメントにおいて構築されることを直接実証した。さらに、CD74が、エンドリソソームにおけるMHCクラスIの存在に影響を与えることが確立され、これにより、MHCクラスI-CD74の相互作用が、MHCクラスI分子のサブクラスをエンドリソソーム経路に標的化させるという公表された観察が確認された^{1, 7}。

10

【0054】

先に記載されたMHCクラスI細胞質尾部中のチロシン内部移行シグナルは^{8, 13, 45}、リサイクリングMHCクラスIをクロスプライミングコンパートメントに標的化させる。この機序とは対照的に、DCにおけるCD74の不在が、MHCクラスIの内部移行に影響を与えるとは思われなかったので、CD74とMHCクラスI分子との間の安定な相互作用が細胞膜において起こり、リサイクリングMHCクラスIを指向させるとは考えにくい。本発明者らの結果は、細胞質ドメイン中のチロシン内部移行シグナルにより指向される、MHCクラスIの細胞膜からのリサイクリング、及びMHCクラスIのERから、CD74シャペロンとの結合を介した輸送の両方が、エンドリソソーム経路におけるペプチド受容性MHCクラスIのプールに寄与するモデルを裏付ける。したがって、MHCクラスII分子により使用される様式と類似の様式で、MHCクラスI-CD74複合体はERで形成され、クロスプライミングコンパートメントへ移行するペプチド結合をマスクする立体構造の中に保持され得る。実際に2つの独立した研究が、コアのMHCクラスIIに会合したCD74ペプチドCLIP (MRMATPLLM) (MHCクラスII結合溝に結合したCD74の一部) に由来する小型のペプチドを含むCD74ペプチドが、MHCクラスI分子から溶離可能であることを示している^{46, 47}。したがって、このようなペプチドは、CLIPのMHCクラスI等価物の強力な候補である。このCLIP由来ペプチドは、MHCクラスIIの状況と類似の早期ペプチド結合を防止できる^{46, 48}。このモデルにおいて、CD74の消化及び除去後、MHCクラスIは、高親和性のcathepsin S由来外来性ペプチドを負荷でき¹¹、細胞表面に進行でき、そこで活性化されるように、CD8⁺T細胞前駆体を効率的にプライミングできる。

20

30

【0055】

要約すると、本明細書の本発明者らの結果及び他の公表されたデータ^{8, 49}は、DCにおける交差提示の基本コンパートメントとしてのエンドリソソームの重要性を強調し、本明細書の本発明者らの調査は、MHCクラスI分子の細胞内経路指定及びDCのクロスプライミング機能に関する、MHCクラスI-CD74相互作用の構造的及び機能的関連性を正式に確立した。本発明者らの観察は、免疫応答のプライミングのための未知の経路を定義し、今後の研究は、この過程を完全に解明するべきである。本発明者らの結果は、かなり臨床的に関連があり、DCのエンドリソソームを標的とするワクチン候補が、MHCクラスI及びMHCクラスIIの両方の抗原のプライミングを強化し、それによって、ワクチンの免疫原性及び有効性を改善することを示唆している。

40

【0056】

方法

マウス。Cd74^{+/+} (H-2K^b) マウスはCharles Riverから入手した。 β_2 -ミクログロブリン欠損B2m^{-/-}、Tap1^{-/-}、OT-I (H-2K^b) 及びRag1^{-/-} (H-2K^d) マウスは、Jackson Laboratoryから入手した。Cd74^{-/-} (H-2K^b) マウスは、D. Mathisから贈呈された。キメラマウスに関しては、ドナー骨髄を、抗Thy-1 (MRC OX-7; Abcam) を用いて成熟T細胞を枯渇させ、亜致死的に放射線照射されたレシピエント (1, 200 rad) に注射した (1×10⁷ 細胞)。末梢T細胞のサブセットを、抗CD8

50

(53-6.7; BD Pharmingen) 及び抗CD4 (GK1.5, BD Pharmingen) で染色後、フローサイトメトリーにより分析した。CD4⁺細胞の枯渇に関して、免疫化前及びT細胞評価の48時間前に、マウスに100 µgの抗CD4 (GK1.5) を注射した⁵⁰。すべての研究は、British Columbia大学の動物管理委員会 (Animal Care Committee) 及びカナダ動物管理協会 (the Canadian Council on Animal Care) により設定されたガイドラインに従った。

【0057】

ウイルス感染。VSVを腹腔内注射した (50%の組織培養細胞単層が感染する 1×10^5 から 2×10^5 の用量である)。注射6日後において、脾臓細胞を、抗CD8 (53-6.7) 及びH-2K^b-VSVNP (52~59) 又はH-2K^b-OVA (257~264) iTA g四量体 (immunomics-Beckman Coulter) を用いて染色し、FACS Calibur (Becton Dickinson) 及びFlowJoソフトウェアを用いて分析した。脾臓細胞を、1 µMのOVA (257~264) (SIINFELK) 又はVSVNP (52~59) (RGYVYQGL) と一緒にさらに5日間培養し、その後、上記のように四量体染色した。細胞障害性アッセイを、記載のように実施した⁸。

【0058】

取込みアッセイ。BMDCを、記載のように発生させた⁸。細胞を、30分間、4℃又は37℃において、OVA-Alexa Fluor 488 (30 µg/ml; Invitrogen) と一緒にインキュベートした。OVAの取込みを、フローサイトメトリーにより分析した。

【0059】

交差提示アッセイ。BMDCを記載のように発生させるか⁸、又は脾臓DCを、CD11c⁺磁気ビーズ (Miltenyi Biotec) を用いて単離した。DCを、15時間、OVA (Worthington) と一緒に、指示がある場合は100 µMのクロロキンと共にインキュベートした。DCを、Fc Block (Pharmingen) を用いて染色し、その後、抗H-2K^b (AF.6-88.5)、抗CD80 (16-10A1)、抗CD86 (GL1)、抗CD40 (3/23) (すべてBD Pharmingenから入手) 又は抗H-2K^b-OVA (257~264) (25.D1.16; J. Yewdellから贈呈された) を用いて染色し、フローサイトメトリーにより分析した。クロスプライミングアッセイに関しては、DCを、OVA、GM-CSF (顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子; 15 ng/ml; Sigma) 及びTNF (10 ng/ml) 又はインターフェロン-γ (R&D Systems) と一緒にインキュベートした。B3Z T細胞 (N. Shastriから贈呈された) の活性化を、記載のように評価した⁸。

【0060】

in vivo研究に関して、Cd74^{+/+}及びCd74^{-/-} BMDCを、2時間、OVA又はOVA (257~264) (各10 mg/ml) と一緒にインキュベートし、Rag1^{-/-} BALB/cマウスに静脈内注射した (1×10^7 細胞)。24時間後、OT-I T細胞を、2.5 µMのCFSE (カルボキシフルオレセインジアセタートスクシンイミジルエステル; Molecular Probes) を用いて標識し、マウスに静脈内注射した (5×10^6 細胞)。脾臓におけるOT-I T細胞の増殖を、フローサイトメトリーにより、CFSE希釈の3日後に評価した。脾臓への局在化を確認するために、CFSE標識DCを、Rag1^{-/-} BALB/cマウスに静脈内注射した。2時間後、脾臓におけるCFSE⁺細胞の存在を、フローサイトメトリーを用いて評価した。

【0061】

共焦点顕微鏡法。脾臓由来DCを単離し、固定し、記載のように透過性にした⁸。交差提示の分析のために、DCを、10時間、OVA (5 mg/ml) と一緒に、TNF (1

10

20

30

40

50

0 ng/ml) を伴い、又伴わずにインキュベートした。必要に応じて、DC を、50 μ M のクロロキンで72時間処理し、その後プロセッシングした^{3,4}。細胞を、抗H-2K^b (AF. 6-88. 5)、抗CD74 (In-1; Fitzgerald)、抗LAMP-1 (N19; Santa Cruz Biotechnology) 又は抗H-2K^b-OVA (257~264) (25. D1. 16) を用いて染色した。Alexa Fluor 488-若しくはAlexa Fluor 568-標識ウサギ抗マウス (A-11029、A-11031; Molecular Probes)、Alexa Fluor 488-若しくはAlexa Fluor 568-標識ウサギ抗ヤギ (A-11078、A-11079; Molecular Probes) 又はAlexa Fluor 488-標識ヤギ抗マウス (A-11001; Molecular Probes) を、二次抗体として使用した。画像を、Nikon-C1、TE2000-U ICM及びEZ-C1ソフトウェアを用いて得た。データを、ImageJ. 1、Open/ab及びAdobe Photoshopを用いて分析した。個々の色の蛍光強度を、総蛍光強度の百分率として表した。

【0062】

増殖アッセイ。C3H/Heマウス (H-2K^k) 由来のBMDCを、15時間、OVA (10 mg/ml) と一緒にインキュベートし、マウスに腹腔内注射した (5×10^6 細胞)。OT-I T細胞を標識し、上記のように静脈内注射した。OT-I T細胞の増殖を、3日後に、フローサイトメトリーによりCFSE希釈液として評価した。

【0063】

トランスフェクション。未熟なBMDCに、完全長マウスCD74 (p31 アイソフォーム) 又はアミノ酸2~17を欠いたCD74を含有するpBabeベクター (I. S. Hacharから贈呈された) を、Amara Mouse Dendritic Cell Nucleofectorキットの使用を介してトランスフェクトした。エレクトロポレーションの1日後、DCを、8時間、OVA (20 mg/ml) 又はOVA (257~264) (1 μ M) と一緒にインキュベートし、その後、3日間、CFSE標識OT-I CD8⁺ T細胞と一緒にインキュベートした。CFSE希釈液を、フローサイトメトリーにより評価した。

【0064】

免疫沈降法。BMDCを、1時間、メチオニン及びシステイン非含有培地においてインキュベートし、その後、30分間、[³⁵S]メチオニン (300 μ Ci/ml) をパルスし、その後、プロテアーゼ阻害剤の「カクテル」(Roche) 及びPMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド; 40 μ g/ml) を含有するバッファー (120 mM のNaCl、4 mMのMgCl₂ 及び20 mMのTris-HCl、pH7.6) 中0.5% (vol/vol) のNonidet P-40で溶解した。指示があれば、DCを、100 μ Mのクロロキンと一緒に一晩インキュベートし、その後溶解した。細胞溶解物を、正常ウサギ血清及びprotein A-Sepharose (Pharmacia) と一緒に一晩インキュベートすることにより、予備清澄化した。すべてのMHCクラスIを認識する、エクソン8によりコードされる配列に対する抗体 (D. Williams and B. Barberから入手) である、完全にフォールディングしたMHCクラスIを認識する抗H-2K^b (AF6. 88. 5; BD Pharmingen)、抗I-A-I-E (M5/114. 15. 2; Becton Dickinson)、抗CD74 (In-1; Fitzgerald) 及びトランスフェリン受容体に対する抗体 (H68. 4; Invitrogen) を、免疫沈降法に使用した。試料を、10~12%のSDS-PAGEにより分離した。ゲルを固定し、Amplify (Amersham Biosciences) を用いて強化し、乾燥させ、Kodak XMRオートラジオグラフィフィルムに感光させた。又は、試料を、ニトロセルロース膜に転写し、抗CD74 (In-1; Fitzgerald) 又は抗MHCクラスI (KH95; Santa Cruz Biotechnology) を用いた免疫プロットにより分析した。試料を、エンドグリコシダーゼH_fで製造業者のプロトコル (New England Bio

10

20

30

40

50

labs) に従って消化した。全細胞溶解物を、陽性対照として免疫ブロットにより分析した。マウス免疫グロブリンGに対するロバ抗体(926-32212; Li-Cor Biosciences)及びマウスラット免疫グロブリンGに対するヤギ抗体(A21096; Invitrogen)を、二次抗体として使用した。ブロットを、Odyssey Infrared Imagingを用いて可視化した。

【0065】

MHCクラスIの内部移行。BMDcを、Fc Block (BD Pharmingen)を用いて染色し、その後、30分間、0℃において、ビオチン化抗H-2K^b (AF6-88.5; BD Pharmingen)を用いて標識した。試料を、37℃又は0℃においてインキュベートした。適切な時間に、DCを、2% (vol/vol) のパラホルムアルデヒドで固定し、ストレプトアビジン-フィコエリトリンを用いて標識し、その後、フローサイトメトリーにより検査した。データを、FlowJoソフトウェアを用いて分析し、内部移行されたMHCクラスIの量を計算した。

【0066】

統計的分析。スチューデントt検定を使用して、集団間の差を比較した。P値が0.05未満であった場合、差は、統計的に有意であったと考えられる(両側)。

【0067】

参考文献

1. Guagliardi, L. E. et al. Co-localization of molecules involved in antigen processing and presentation in an early endocytic compartment. *Nature* 343, 133-139 (1990).
2. Kovacsics-Bankowski, M. & Rock, K. L. A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-246 (1995).
3. Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 12889-12894 (2003).
4. Guermonprez, P. et al. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402 (2003).
5. Houde, M. et al. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406 (2003).
6. Pfeifer, J. D. et al. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* 361, 359-362 (1993).
7. Song, R. & Harding, C. V. 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. *J. Immunol.* 156, 4182-4190 (1996).

96).

8. Lizee, G. et al. Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat. Immunol.* 4, 1065-1073 (2003).

9. Gagnon, E. et al. Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-131 (2002).

10

10. Touret, N. et al. Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157-170 (2005).

11. Shen, L., Sigal, L. J., Boes, M. & Rock, K. L. Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155-165 (2004).

12. Cebrian, I. et al. Sec22b regulates phagosomal maturation and antigen crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 147, 1355-1368 (2011).

20

13. Basha, G. et al. MHC class I endosomal and lysosomal trafficking coincides with exogenous antigen loading in dendritic cells. *PLoS ONE* 3, e3247 (2008).

14. Chiu, I., Davis, D. M. & Strominger, J. L. Trafficking of spontaneously endocytosed MHC proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13944-13949 (1999).

30

15. Reid, P. A. & Watts, C. Cycling of cell-surface MHC glycoproteins through primaquine-sensitive intracellular compartments. *Nature* 346, 655-657 (1990).

16. Bakke, O. & Dobberstein, B. MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments. *Cell* 63, 707-716 (1990).

17. Sugita, M. & Brenner, M. B. Association of the invariant chain with major histocompatibility complex class I molecules directs trafficking to endocytic compartments. *J. Biol. Chem.* 270, 1443-1448 (1995).

40

18. Vigna, J. L., Smith, K. D. & Lutz, C. T. Invariant chain association with MHC class I: preference for HLA class I/β2-microglobulin heterodimers, specificity, and influence of the MHC peptide-binding groove.

J. Immunol. 157, 4503-4510 (1996).

50

19. Kleijmeer, M. J. et al. Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. *Traffic* 2, 124–137 (2001).
20. Zwickey, H. L. & Potter, T. A. Antigen secreted from noncytosolic *Listeria monocytogenes* is processed by the classical MHC class I processing pathway. *J. Immunol.* 162, 6341–6350 (1999).
21. MacAry, P. A. et al. Mobilization of MHC class I molecules from late endosomes to the cell surface following activation of CD34-derived human Langerhans cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 3982–3987 (2001). 10
22. Tourne, S. et al. Biosynthesis of major histocompatibility complex molecules and generation of T cells in Ii TAP1 double-mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1464–1469 (1996).
23. Reber, A. J., Turnquist, H. R., Thomas, H. J., Lutz, C. T. & Solheim, J. C. Expression of invariant chain can cause an allele-dependent increase in the surface expression of MHC class I molecules. *Immunogenetics* 54, 74–81 (2002). 20
24. Vitalis, T. Z. et al. Using the TAP component of the antigen-processing machinery as a molecular adjuvant. *PLoS Pathog.* 1, e36 (2005).
25. van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Ploegh, H. L. & Tonegawa, S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4⁺8⁺ T cells. *Cell* 71, 1205–1214 (1992). 30
26. McAdam, A. J., Farkash, E. A., Gewurz, B. E. & Sharpe, A. H. B7 costimulation is critical for antibody class switching and CD8⁺ cytotoxic T-lymphocyte generation in the host response to vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 74, 203–208 (2000). 40
27. Marzo, A. L. et al. Fully functional memory CD8 T cells in the absence of CD4 T cells. *J. Immunol.* 173, 969–975 (2004).
28. Faure-Andre, G. et al. Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain. *Science* 322, 1705–1710 (2008).
29. Benvenuti, F. et al. Requirement of Rac1 and Rac2 expression by mature dendritic cells for T cell priming. *Science* 305 50

, 1150-1153 (2004).

30. Shastri, N. & Gonzalez, F. Endogenous generation and presentation of the ovalbumin peptide/Kb complex to T cells. *J. Immunol.* 150, 2724-2736 (1993).

31. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182, 389-400 (1995).

32. Brossart, P. & Bevan, M. J. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 90, 1594-1599 (1997).

33. Merzougui, N., Kratzer, R., Saveanu, L. & van Ender, P. A proteasome-dependent, TAP-independent pathway for cross-presentation of phagocytosed antigen. *EMBO Rep.* 12, 1257-64 doi:10.1038/embor.2011.203 (2011).

34. Loss, G. E. Jr. & Sant, A. J. Invariant chain retains MHC class II molecules in the endocytic pathway. *J. Immunol.* 150, 3187-3197 (1993).

35. Kornfeld, R. & Kornfeld, S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* 54, 631-664 10.1146/annurev.bi.54.070185.003215 (1985).

36. Rock, K. L., Gamble, S. & Rothstein, L. Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules. *Science* 249, 918-921 (1990).

37. van Lith, M., van Ham, M. & Neefjes, J. Stable expression of MHC class I heavy chain/HLA-DO complexes at the plasma membrane. *Eur. J. Immunol.* 33, 1145-1151 (2003).

38. Nuchtern, J. G., Biddison, W. E. & Klausner, R. D. Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature* 343, 74-76 10.1038/343074a0 (1990).

39. Cerundolo, V., Elliott, T., Elvin, J., Bastin, J. & Townsend, A. Association of the human invariant chain with H-2 Db class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 22, 2243-2248 (

10

20

30

40

50

1992).

40. Powis, S. J. CLIP-region mediated interaction of Invariant chain with MHC class I molecules. FEBS Lett 580, 3112-3116 (2006).

41. Sigal, L. J. & Rock, K. L. Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and -independent pathways of antigen presentation. J. Exp. Med. 192, 1143-1150 (2000).

42. Buller, R. M., Holmes, K. L., Hugin, A., Frederickson, T. N. & Morse, H. C., III. Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells. Nature 328, 77-79 10.1038/328077a0 (1987).

43. Janssen, E. M. et al. CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. Nature 421, 852-856 (2003).

44. Machold, R. P. & Ploegh, H. L. Intermediates in the assembly and degradation of class I major histocompatibility complex (MHC) molecules probed with free heavy chain-specific monoclonal antibodies. J. Exp. Med. 184, 2251-2259 (1996).

45. Reinicke, A. T., Omilusik, K. D., Basha, G. & Jefferies, W. A. Dendritic cell cross-priming is essential for immune responses to *Listeria monocytogenes*. PLoS ONE 4, e7210 10.1371/journal.pone.0007210 (2009).

46. Luckey, C. J. et al. Differences in the expression of human class I MHC alleles and their associated peptides in the presence of proteasome inhibitors. J. Immunol. 167, 1212-1221 (2001).

47. Kruger, T. et al. Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy. Cancer Immunol. Immunother. 54, 826-836 (2005).

48. Busch, R., Cloutier, I., Sekaly, R. P. & Hammerling, G. J. Invariant chain protects class II histocompatibility antigens from binding intact polypeptides in the endoplasmic reticulum. EMBO J. 15, 418-428 (1996).

10

20

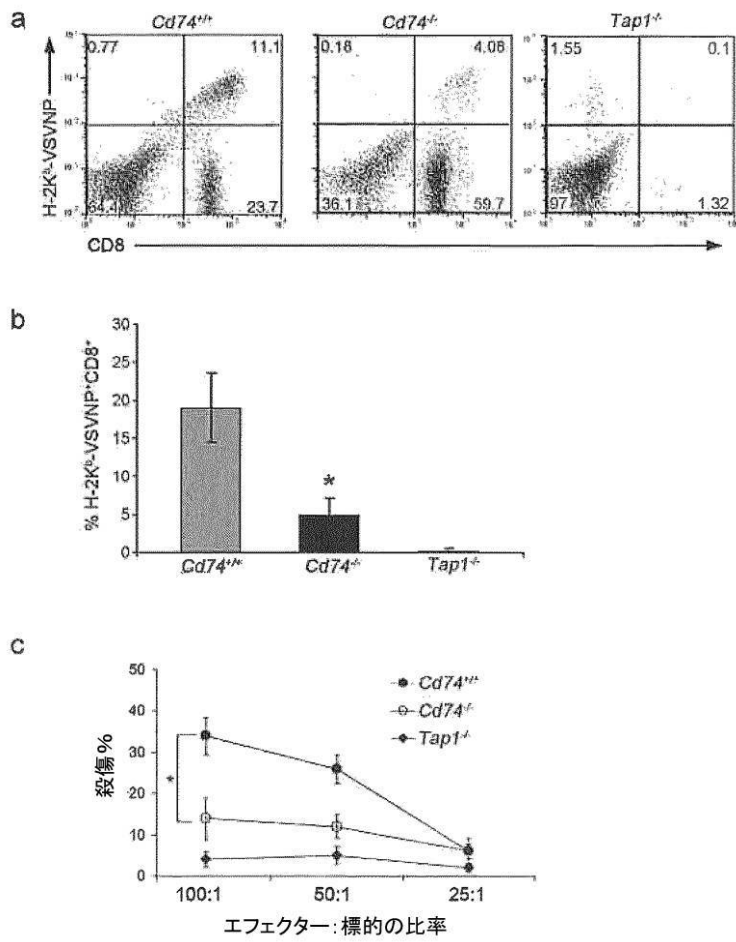
30

40

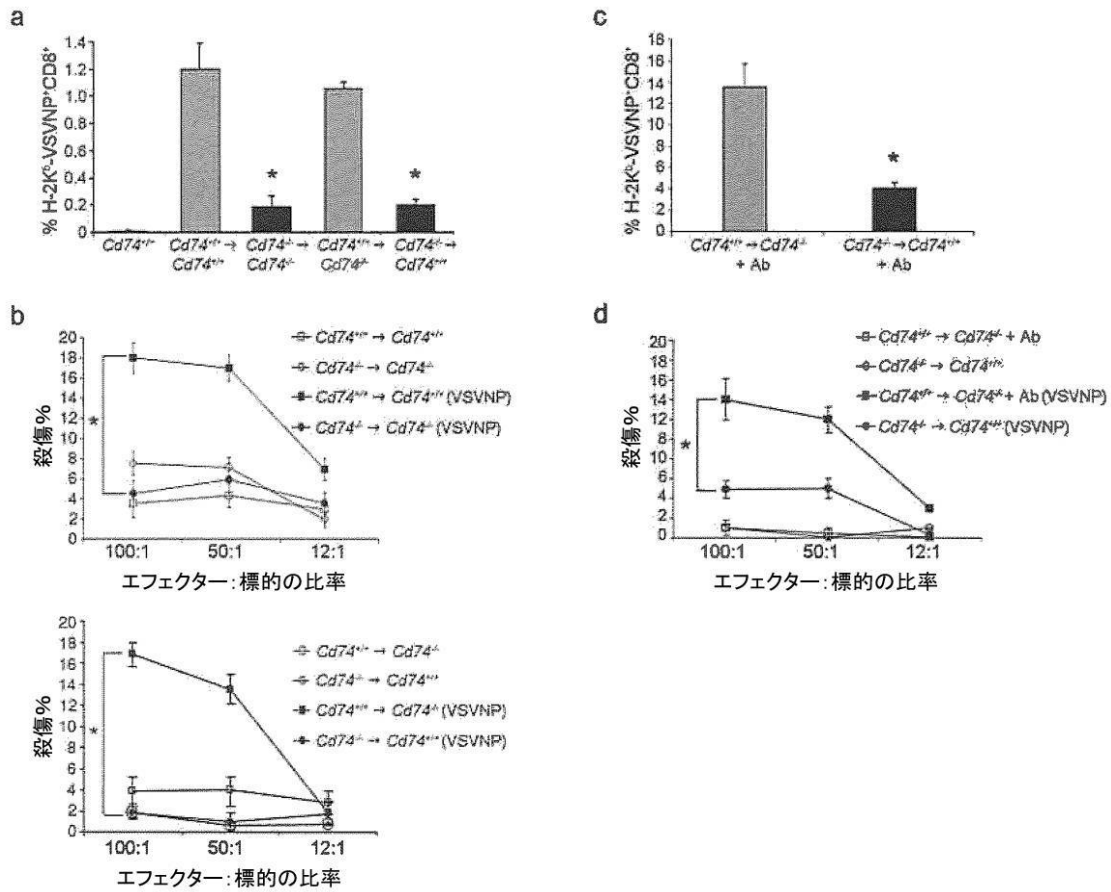
50

49. Savina, A. et al. NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* 126, 205–218 (2006).
50. Rashid, A., Auchincloss, H. Jr. & Sharon, J. Comparison of GK1.5 and chimeric rat/mouse GK1.5 anti-CD4 antibodies for prolongation of skin allograft survival and suppression of alloantibody production in mice. *J. Immunol.* 148, 1382–1388 (1992).

【図 1】

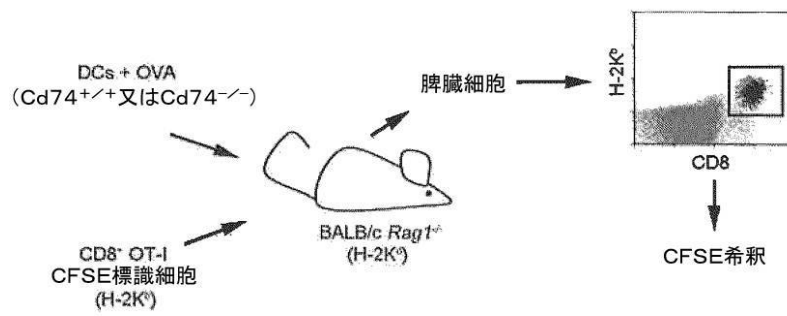


【図2】

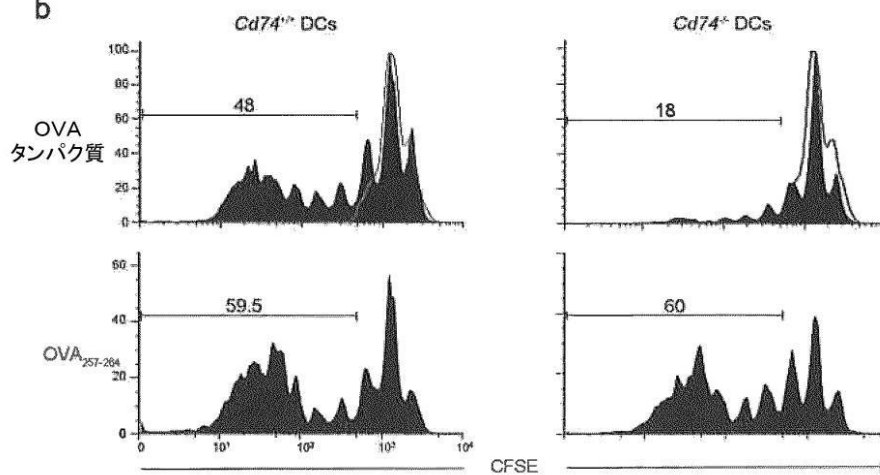


【図 3】

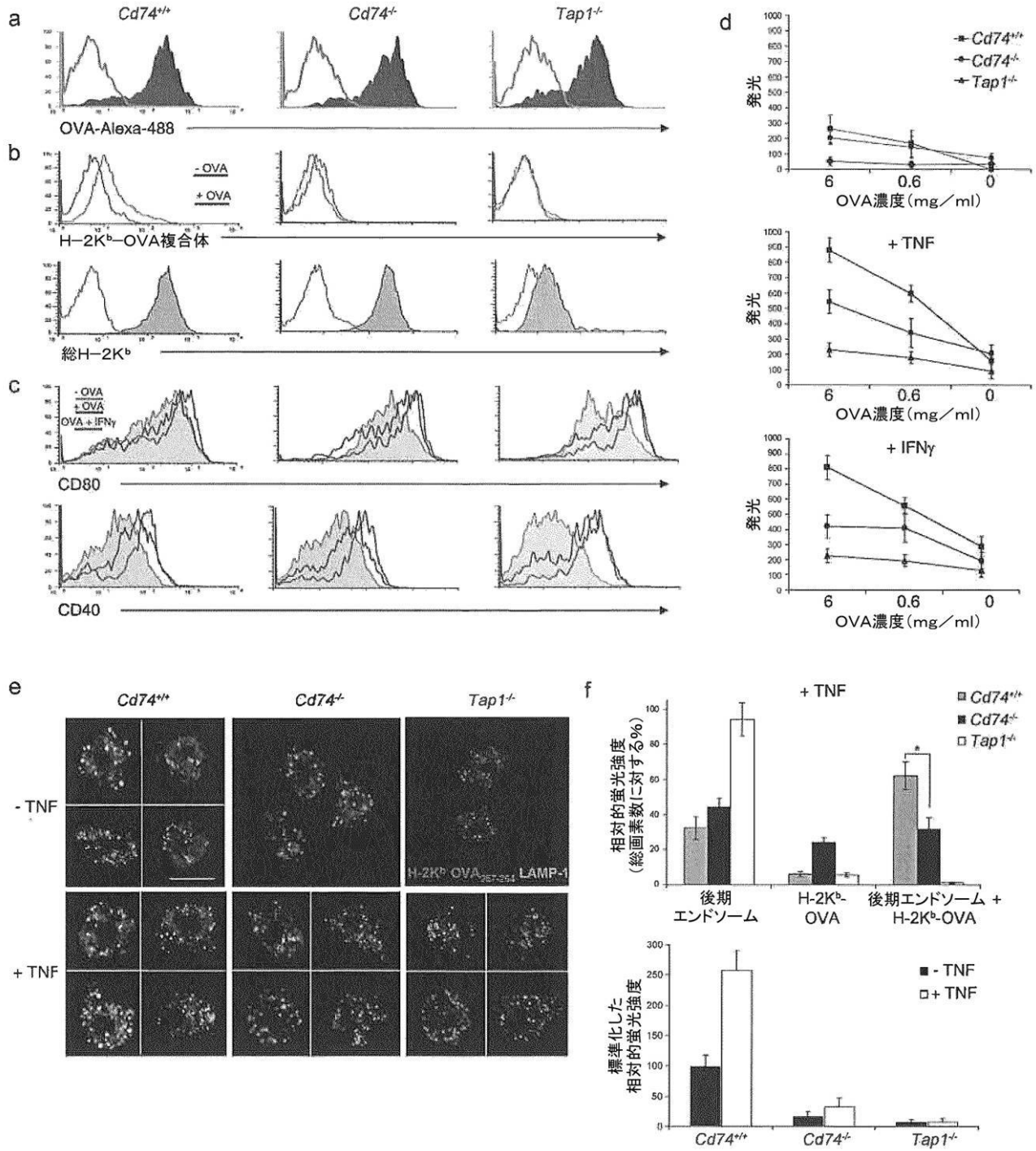
a



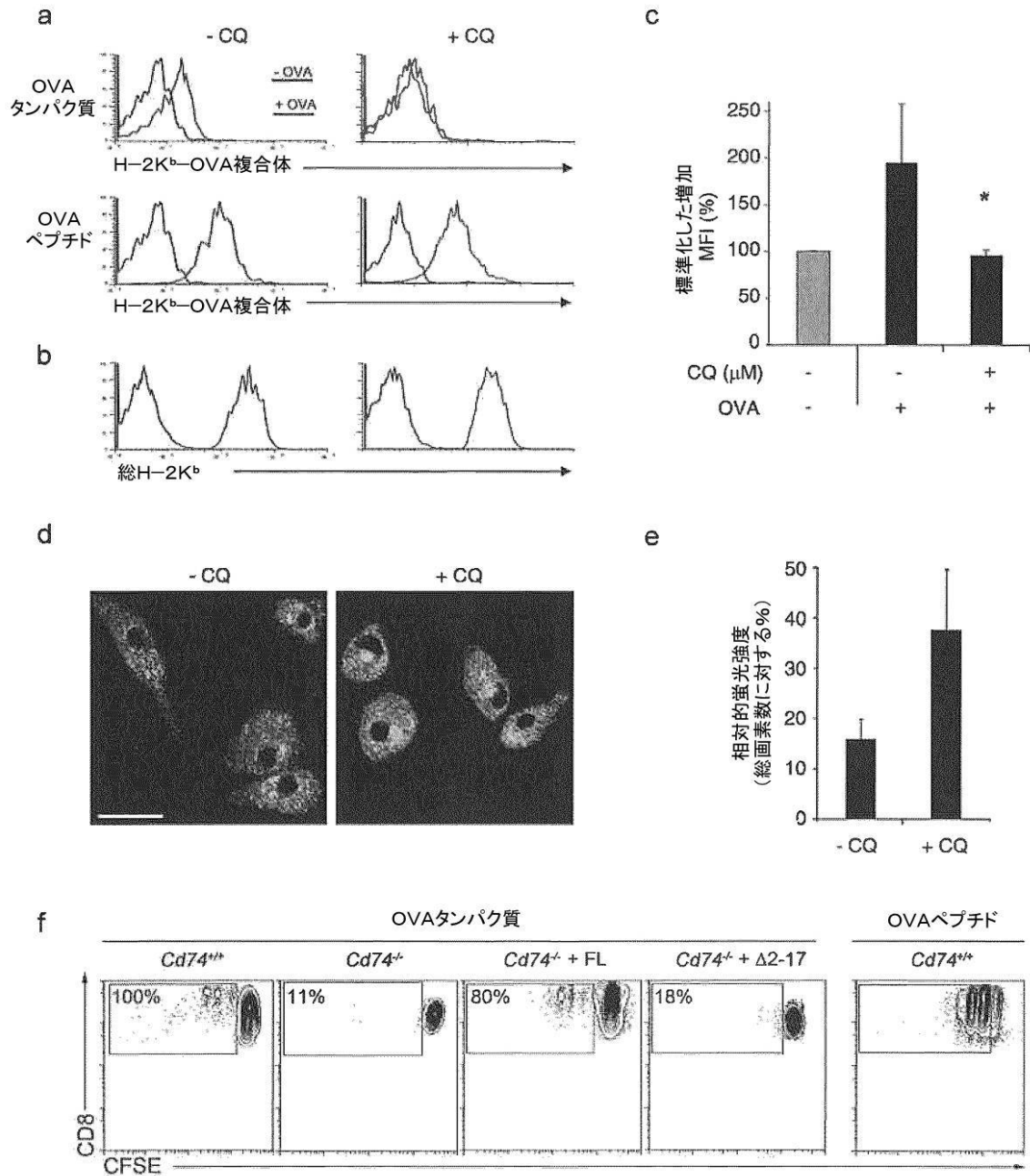
b



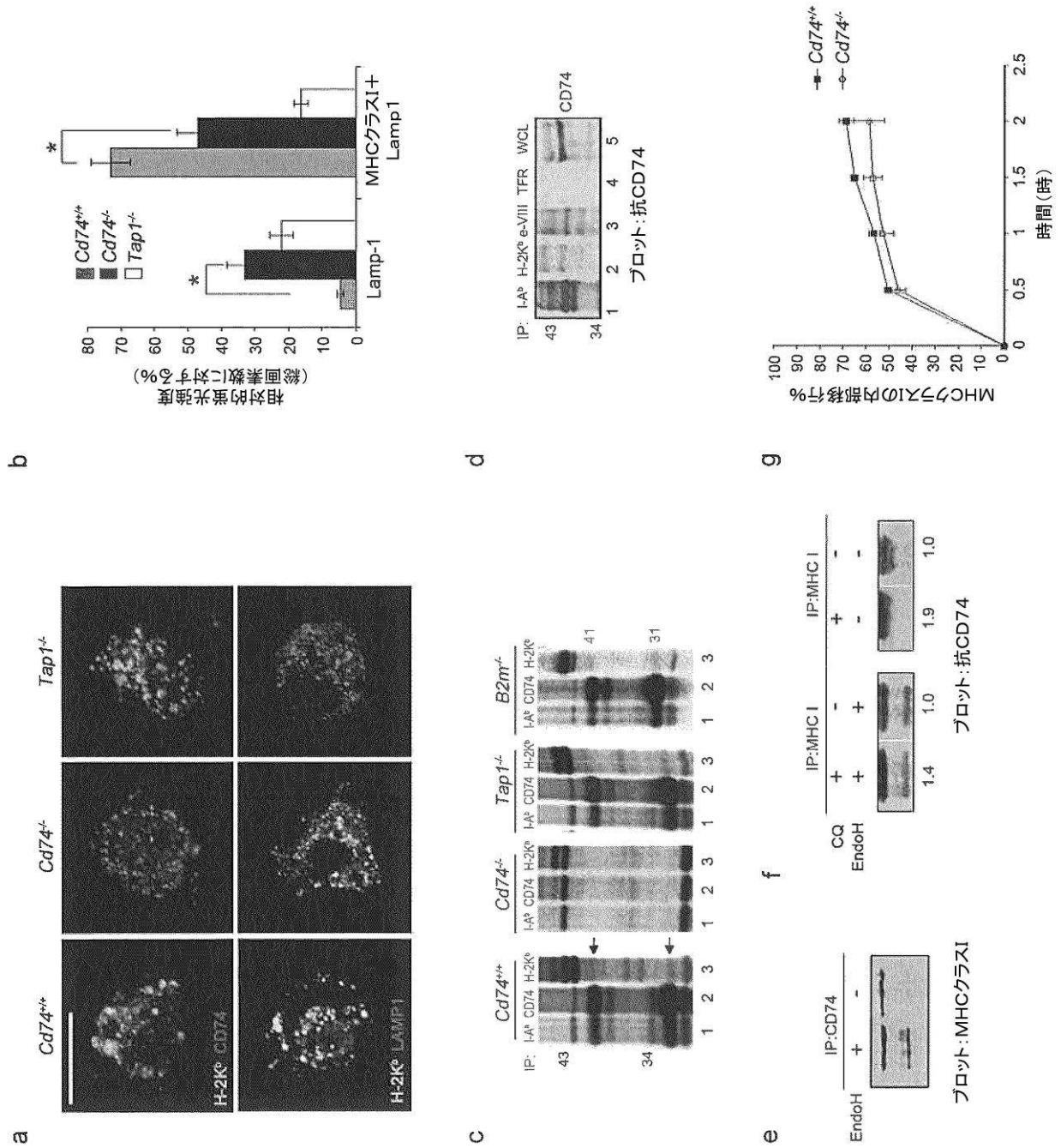
【図4】



【図 5】



【図6】



【図 7】

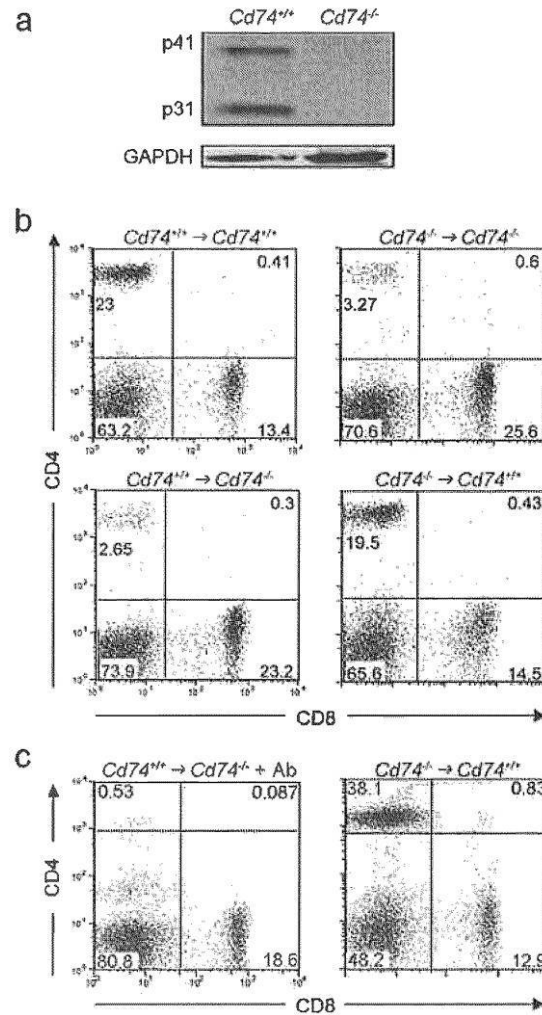
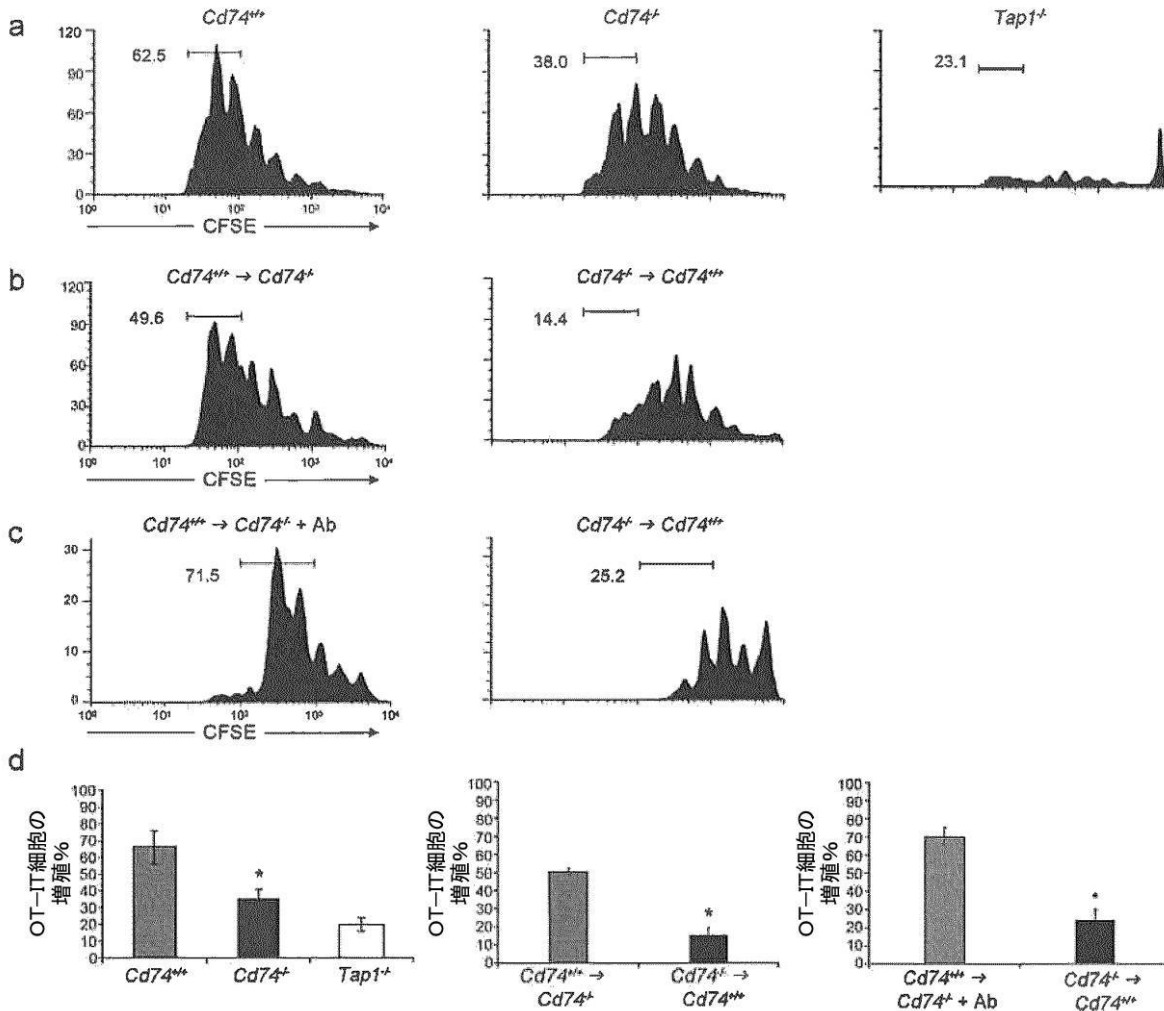


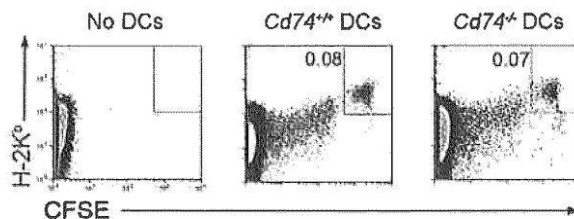
図7 キメラマウスの末梢分析。(a) $Cd74^{+/+}$ 及び $Cd74^{-/-}$ BMDCの免疫ブロッティングを、 $CD74$ 抗体を使用して実施した。 $GAPDH$ を、負荷対照として検出した。(b)再構成3か月後の、骨髓キメラマウスの血液中の $CD8^{+}CD4^{+}$ プロファイルを示した。(c) $Cd74^{+/+} \rightarrow Cd74^{-/-}$ キメラの $CD4^{+}$ 細胞を、 $CD4$ 抗体(GK1.5)のiv注射により枯渇させた。代表的 $CD4^{+}CD8^{+}$ フローサイトメトリープロファイルを示す。

【図 8】



補足図8 $Cd74^{-/-}$ マウスは、細胞関連抗原をin vivoで交差提示し、有効な一次免疫応答を発生することができない。(a, b) マウス及びキメラに、OVAをパルスされたC3H由来BMDC (H-2K^bハプロタイプ)を注射し(ip)、その後、OT-IトランスジェニックCFSE標識T細胞を注射した(iv)。脾臓由来のCD8⁺集団のCFSE希釈を検査した。データは、表示の代表的マウス又はキメラの脾臓由来の、OT-I由来T細胞の増殖を表す(n=3)。(c) $Cd74^{+/+} \rightarrow Cd74^{-/-}$ キメラのCD4⁺細胞を、細胞関連OVAによる免疫化の間に、CD4抗体(GK1.5; +Ab)のiv注射により枯渇させ、その後、CFSE標識された、養子移入OT-I由来T細胞を活性化させるそれらの能力を評価した。(d) OT-I細胞増殖の平均百分率(±SD)を示す。* $P < 0.05$ 。

【図 9】



補足図9 $Cd74^{-/-}$ DCは、脾臓に局在化する。 $Cd74^{+/+}$ 又は $Cd74^{-/-}$ 脾臓DCをCFSE標識し、BALB/cバックグラウンドのRag1^{-/-}マウスにiv注射した。2時間後、DCの脾臓への局在化を評価した。

【配列表】

2015506366000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CA2012/050519
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: <i>C07K 19/00</i> (2006.01), <i>A61K 38/01</i> (2006.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61K 39/385</i> (2006.01), <i>A61P 37/04</i> (2006.01), <i>C07K 14/705</i> (2006.01) (more IPCs on the last page) 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: <i>C07K 19/00</i> (2006.01), <i>A61K 38/01</i> (2006.01), <i>A61K 39/00</i> (2006.01), <i>A61K 39/385</i> (2006.01), <i>A61P 37/04</i> (2006.01), <i>C07K 14/705</i> (2006.01), <i>C07K 17/04</i> (2006.01), <i>C12N 5/07</i> (2010.01), <i>C12N 5/0784</i> (2010.01), <i>C12Q 1/00</i> (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used) Databases: NCBI, SCOPUS, TotalPatent, Canadian Patent Database, Google Scholar, Keywords: major histocompatibility complex I, MHC I, antigen presenting cell, APC, dendritic, cross-presentation, cross-prim*, CD74, invariant chain, li, (Continued on Extra		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	BASHA, G. et al. A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. <i>Nature Immunology</i> . 5 February 2012 (05-02-2012), Vol. 13, No. 3, pages 237-245, ISSN 1529-2908. * entire document *	1-7
X	BASHA, G. et al. MHC Class I Endosomal and Lysosomal Trafficking Coincides with Exogenous Antigen Loading in Dendritic Cells. <i>PLoS ONE</i> . 19 September 2008 (19-09-2008), Vol. 3, No. 9, page e3247, ISSN 1932-6203. * entire document, especially Abstract and Figure 7 *	1, 3 and 5-7
X	LIZÉE, G. et al. Control of Dendritic Cell Cross-Presentation by the Major Histocompatibility Complex Class I Cytoplasmic Domain. <i>Nature Immunology</i> . November 2003 (11-2003), Vol. 4, No. 11, pages 1065-1073, ISSN 1529-2908. * entire document *	1, 3, 5 and 6
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
01 October 2012 (01-10-2012)		22 November 2012 (22-11-2012)
Name and mailing address of the ISA/CA Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476		Authorized officer Neena Kushwaha (819) 934-7928

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2012/050519

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAKKE, O. et al. MHC Class II-Associated Invariant Chain Contains a Sorting Signal for Endosomal Compartments. <i>Cell</i> . 16 November 1990 (16-11-1990), Vol. 63, No. 4, pages 707-716, ISSN 0092-8674. * abstract; Figures 3, 4 and 6 *	4-6
X	SHEN, L. et al. Important Role of Cathepsin S in Generating Peptides for TAP-Independent MHC Class I Crosspresentation In Vivo. <i>Immunity</i> . August 2004 (08-2004), Vol. 21, No. 2, pages 155-165, ISSN 1074-7613. * abstract *	7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2012/050519

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. ☒ Claim Nos. : 1-3
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 1-3 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search under Rule 39.1(iv). However, this Authority has carried out a search based on the alleged effect or purpose/use of the product defined in said claims.
2. ☐ Claim Nos. :
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :
3. ☐ Claim Nos. :
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/CA2012/050519
--

Continuation of Box A - Classification of Subject Matter - IPC:

C07K 17/04 (2006.01), *C12N 5/07* (2010.01), *C12N 5/0784* (2010.01), *C12Q 1/00* (2006.01)

Continuation of Box B - Fields Searched.

Keywords continued: endosome, lysosome, endolysosome, cathepsin S

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
C O 7 K 14/705 (2006.01) C O 7 K 14/705

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

(72)発明者 バーシャ、ジェンク
カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、ヴァンクーヴァー、ウェスト フォーティーンズ アヴェニュー ナンバー 404-518

(72)発明者 オミルシク、カイラ
カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、ヴァンクーヴァー、イースト フォース アヴェニュー 407-237

(72)発明者 シャベス — ステンボック、アナ
カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、ヴァンクーヴァー、ウェスト ファースト アヴェニュー 1808

F ターム(参考) 4C076 CC07 EE41 EE59 FF02
4C084 AA01 AA02 BA44 NA14 ZB092
4C085 AA02 EE01 GG01
4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA15 BA17 BA41 CA42 DA86 EA22
FA16 FA70 FA74