(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4541538号
(P4541538)

(45)発行日　平成22年9月8日(2010.9.8)　(24)登録日　平成22年7月2日(2010.7.2)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
A61P 37/04	(2006.01)	A61P	37/04	
A61P 37/06	(2006.01)	A61P	37/06	
C07K 14/705	(2006.01)	C07K	14/705	

請求項の数 23　(全 17 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2000-503103 (P2000-503103)
(86)(22)出願日　平成10年7月17日 (1998.7.17)
(65)公表番号　特表2001-510030 (P2001-510030A)
(43)公表日　平成13年7月31日 (2001.7.31)
(86)国際出願番号　PCT/FR1998/001573
(87)国際公開番号　WO1999/003881
(87)国際公開日　平成11年1月28日 (1999.1.28)
審査請求日　平成17年7月15日 (2005.7.15)
(31)優先権主張番号　97/09185
(32)優先日　平成9年7月18日 (1997.7.18)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

前置審査

(73)特許権者　500026533
アンスティテュ・キュリ
ＩＮＳＴＩＴＵＴ　ＣＵＲＩＥ
フランス国　０５　セデクス　パリー　リュ　ドゥルム　２６
(73)特許権者　595040744
サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・ルシェルシュ・シャンティフィク
ＣＥＮＴＲＥ　ＮＡＴＩＯＮＡＬ　ＤＥ　ＬＡ　ＲＥＣＨＥＲＣＨＥ　ＳＣＩＥＮＴＩＦＩＱＵＥ
フランス国、７５７９４　パリ・セデックス　１６、リュ・ミシェル・アンジュ　３
(74)代理人　100078662
弁理士　津国　肇

最終頁に続く

(54)【発明の名称】志賀毒素のＢフラグメント及び治療向けペプチドを含むキメラポリペプチド

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
式Ｂ－Ｘ（式中、Ｂは、志賀毒素のＢフラグメント又は突然変異、欠失又は付加により志賀毒素のＢフラグメントに由来し、標的細胞内で志賀毒素のＢフラグメントと同様のルーチング特性を有する任意のフラグメントを表し、Ｘは、治療的に有意の単数又は複数のポリペプチドを表し、該ポリペプチドは、Ｂによって媒介される逆行性輸送と適合性であり細胞表面へのＸのプロセッシング又は正しいアドレッシングを確実にし、該治療的に有意の単数又は複数のポリペプチドが、クラスＩの主要組織適合遺伝子複合体により提示されることができるエピトープを含む）のキメラポリペプチド。
【請求項２】
該ポリペプチドが、さらに
－　グリコシル化部位、又は
－　小胞体内の保持シグナル、又は
－　硫酸化部位、又は
－　これらの混合物、
を含む、請求項１記載のキメラポリペプチド。
【請求項３】
Ｘが、ポリペプチド又はタンパク質のエピトープであり、該ポリペプチド又はタンパク質の発現が、免疫系の細胞表面である、請求項１記載のポリペプチド。
【請求項４】

該ポリペプチド又はタンパク質が、ガン細胞タンパク質、ウイルスタンパク質又は発ガン遺伝子である、請求項３記載のポリペプチド。
【請求項５】
Ｘが、黒色腫細胞に特異的なＭＡＧＥエピトープである、請求項４記載のポリペプチド。
【請求項６】
Ｘが、細胞装置のタンパク質と相互作用することによって細胞内輸送の機能を正常に戻したり、あるいは活性化することができるポリペプチドであり、該ポリペプチドが、細胞内輸送に関係するタンパク質の突然変異体と小胞体内で競争するか又は前記輸送中の不十分な機能を補うことによる、請求項１記載のポリペプチド。
【請求項７】
Ｘが、ＣＦＴＲタンパク質とカルネキシンの相互作用ドメインである、請求項６に記載のポリペプチド。
【請求項８】
請求項１記載のポリペプチドを含む、治療目的の組成物。
【請求項９】
該組成物が、細胞内輸送の欠損を正常に戻す、請求項８記載の治療目的の組成物。
【請求項１０】
該組成物が、ウイルス、寄生虫、細胞又はガン抗原の感染に対する生体の免疫防御機能を刺激する、請求項８記載の治療目的の組成物。
【請求項１１】
該組成物が、自己免疫疾患における免疫反応を減少させるか又は除去する、請求項８記載の治療目的の組成物。
【請求項１２】
式Ｂ－Ｘ’（式中、Ｂは、志賀毒素のＢフラグメント又は突然変異、欠失又は付加により志賀毒素のＢフラグメントに由来し、標的細胞内で志賀毒素のＢフラグメントと同様のルーチング特性を有する任意のフラグメントを表し、Ｘ’は、ペプチドＸをコードするポリヌクレオチドであり、Ｘは、抗原エピトープであり、該抗原エピトープは、Ｂによって媒介される逆行性輸送と適合性であり細胞表面へのＸのプロセッシング又は正しいアドレッシングを確実にする。）のキメラポリペプチド。
【請求項１３】
該ポリペプチドが、さらに
－　グリコシル化部位、又は
－　小胞体内の保持シグナル、又は
－　硫酸化部位、又は
－　これらの混合物、
を含む、請求項１２記載のキメラポリペプチド。
【請求項１４】
Ｘが、クラスＩの主要組織適合遺伝子複合体により提示されることができるエピトープである、請求項１２記載のポリペプチド。
【請求項１５】
該抗原エピトープが、免疫系の細胞表面で発現される、請求項１４記載のポリペプチド。
【請求項１６】
該抗原エピトープが、ガン細胞タンパク質、ウイルスタンパク質又は発ガン遺伝子からである、請求項１５記載のポリペプチド。
【請求項１７】
Ｘが、黒色腫細胞に特異的なＭＡＧＥエピトープである、請求項１６記載のポリペプチド。
【請求項１８】

Ｘ’の発現産物が、細胞装置のタンパク質と相互作用することによって細胞内輸送の機能を正常に戻したり、あるいは活性化することができるポリペプチドであり、該ポリペプチドが、細胞内輸送に関係するタンパク質の突然変異体と小胞体内で競争するか又は前記輸送中の不十分な機能を補うことによる、請求項１２記載のポリペプチド。

【請求項１９】

Ｘ’の発現産物が、ＣＦＴＲタンパク質とカルネキシンの相互作用ドメインである、請求項１８に記載のポリペプチド。

【請求項２０】

請求項１３記載のポリペプチドを含む、治療目的の組成物。

【請求項２１】

該組成物が、細胞内輸送の欠損を正常に戻す、請求項２０記載の治療目的の組成物。

【請求項２２】

該組成物が、ウイルス、寄生虫、細胞又はガン抗原の感染に対する生体の免疫防御機能を刺激する、請求項２０記載の治療目的の組成物。

【請求項２３】

該組成物が、自己免疫疾患における免疫反応を減少させるか又は除去する、請求項２０記載の治療目的の組成物。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本発明は、タンパク質又はポリペプチドの細胞内輸送、及びある種のエピトープの膜提示のための手段とその利用を目的としている。

【０００２】

逆行性輸送は、場合によってゴルジ体を通り、小胞体（ＲＥ）に向かって細胞膜の分子を導くこととして定義づけることができる。このメカニズムは、そのカルボキシ末端にテトラペプチドＫＤＥＬ（又は酵母においてはＨＤＥＬ）を保持する小胞体の一定クラスのタンパク質について、実証されてきた。生化学的証拠と同時に形態学的証拠も、これらのタンパク質が、小胞体から退出しゴルジ体に到達し、そこでその炭水化物連鎖内で修飾を受け、その後再び小胞体に向かって導かれるということを表している。テトラペプチドＫＤＥＬは、ペプチド又はそれが付着しているタンパク質を小胞体内で捕捉することを可能にする保持シグナルであり、この捕捉は、Lewis M. J. et alがNature, 348 (6297): 162: 3, １９９０年１１月８日号の中で記述したこのモチーフＫＤＥＬのレセプタであるタンパク質に対する相互作用によって行われる。

【０００３】

細胞内逆行性輸送の存在についてのその他の証拠が、小胞体内を通過した後真核細胞の細胞質ゾルの中に入るある種の細菌毒素の研究からもたらされている（Pelham et al. (1992) Trends cell. Biol., 2: 183-185）。特に研究された一例は、志賀赤痢菌の志賀毒素ならびに、E. coliの志賀タイプの毒素のものである。これらの毒素は、２つのポリペプチド鎖からなり、そのうちの１つ（Ａフラグメント）は、毒性フラグメントでリボソームＲＮＡ ２８Ｓに対する作用によってタンパク質合成を阻害するデアデニラーゼ活性を有し、一方もう１つのサブユニット（Ｂフラグメント）は、その標的上への毒素の結合を可能にする（O’Brian et al (1992), Curr. Top. Microbiol. Immunol. 180: 65-94）。電子顕微鏡での研究は、細胞Ａ４３１, Vero, 特に Daudi細胞のＲＥ内で志賀毒素を検出できることを示した（Sandvig et al. 1992及び1994: KHINE, 1994）。そのうえ、ゴルジ体構造の消失を誘発する真菌代謝物（ブレフェルジンＡ）による細胞の処理は、細胞を志賀毒素から防御し、かくしてそれらがＲＥに達する前にゴルジ体を通過することを示唆する。Kim et al (1996)は、ついに、毒素のＢフラグメントがゴルジ体内に局在化していることを確認した。

【０００４】

逆行性輸送、特にＲＥ内での志賀毒素のＢフラグメントの輸送に関する知識の現状は、以下の参考文献中に示されている：Sandvig et al (1992) Nature 358: 510-512; Sandvig

et al (1994) J. Cell. Biol 126: 53-64; Kim et al, (1996)J. Cell. Biol 134: 1387-1399。

【０００５】

細胞内輸送は、異なる細胞区画間の交換全体として定義される。

【０００６】

本出願の著者は、ＢフラグメントがＲＥに向かってのみならず、造血系統の細胞の核、特に樹状細胞及びマクロファージ内にもルーティングされていることを観察した。

【０００７】

著者らは、以下で記すようなフラグメントＢ－ｇｌｙ－ＫＤＥＬの２マイクロモルが存在する中で３時間インキュベートし次に固定したこれらの細胞が、核内でも又更にはこれらの細胞の核小体内でも、毒素に対する特異的抗体との反応性を呈することを示した（結果は非公表）。このことは前記フラグメントの細胞内輸送の存在を充分に表している。

【０００８】

本発明は、志賀毒素のＢフラグメント（Ｂフラグメント）の細胞内輸送についての観察の結果もたらされたものであり、

－　このフラグメント又はそのあらゆる機能的等価物に結合された治療向けのペプチド又はポリペプチド、又は

－　その発現が求められている配列を有するポリヌクレオチド配列、

を含むキメラポリペプチド配列を構築するためそのルーティング特性を利用する。Ｂフラグメントとポリヌクレオチド配列の間の結合は、当業者にとって既知のあらゆる技術によって、特にAllinquant B et alがJournal of Cell Biology, 1288 (5): 919-27, (1995)で記述した技術により実現される。

【０００９】

ＤＮＡ分子又はその他の分子のＢフラグメントに対する共有結合以外に、結合は強い非共有相互作用を介しても実現され得る。そのため、一例を挙げると、ＢフラグメントのｃＤＮＡは、記述された方法に従って、ストレプトアビジンのもの又はアビジンの他のあらゆる誘導体と融合される。（Johannes et al.(１９８７）J. Biol. Chem., 272: 19554-19561）。

【００１０】

融合の結果得られたタンパク質（Ｂ－ストレプトアビジン）は、ビオチニル化プライマを用いてＰＣＲにより得られたビオチニル化ＤＮＡ又はその他のあらゆるビオチニル化物質との反応に付すことができる。結果として得た複合体は、標的細胞に結合され、細胞内Ｂフラグメントとして輸送されなくてはならない。

【００１１】

もう１つのカップリング方法に従うと、Ｂフラグメントの部位特異的ビオチニル化段階が利用される。このためには、ＢフラグメントのｃＤＮＡを、酵素ＢｉｒＡの認識部位についてコードするｃＤＮＡと融合させる（Boer et al. (1995) J. Bacterial. 177: 2572-2575: Saou et al. (1996) Gene, 169: 59-64）。In vitroでのビオチニル化の後、Ｂフラグメントは、ストレプトアビジン又はアビジンのその他のあらゆる４価誘導体を介して、ビオチニル化されたその他の分子（例えばｃＤＮＡ、上記参照）に結合させられる。

【００１２】

機能的等価物というのは、突然変異、欠失又は付加によりＢフラグメントから誘導され、Ｂフラグメントと同じルーチング特性を呈するあらゆる配列のことである。

【００１３】

広義には、機能的等価物は、Ｂフラグメントについて記述されたものと同じ逆行性輸送更には、核に至るまでの細胞内輸送の特性を呈するあらゆるフラグメントで構成されていてよい。一例としては、Proceeings of the National Academy of Science of the United States of America, 84 (13): 4364-8, 1987年７月に記述されているベロ毒素のＢフラグメント、又はEuropean Journal of Biochemistry, 148 (2): 265-70 (1995)中で Lamb F. Ｉ. et alが記述したリシンのＢフラグメントを挙げることができる。これらのフラグメ

ントの特殊な輸送特性の記述の後、当事者は、任意の細胞区画内の任意の配列のルーティングベクターとして最高の候補となるはずのフラグメントを選択することができるだろう。

【００１４】

かくして、本出願は、志賀毒素のＢフラグメント又は、志賀毒素のＢフラグメントを模倣するポリペプチドを含めたＢフラグメントのものと比較可能な活性、特にこれに類似した輸送経路特性をもつ細菌毒素の他のあらゆるサブユニットを網羅している。これらのポリペプチドそして一般的にはこれらの機能的等価物は、ランダム（random）ペプチド配列及びレセプタGb_3又はこのレセプタの可溶性類似体の間の相互作用の検出の原理を共通して有するスクリーニング方法（Screening methods）によって同定することができる。一例としては、Gb_3を有する又はGBb_3の可溶性放射性類似体へのハイブリダイゼーション後のアフィニティカラム上での選択のためのランダムペプチド配列を発現するファージライブラリ（phagelibrary）の利用を実施することができる。糖脂質Gb_3は、志賀毒素の細胞レセプタとして同定された（Lingwood (1993), Adv. Lipid Res., 25: 189-211）。Gb_3は、毒素に対し感受性をもつ細胞により発現され、毒素の吸蔵は、Gb_3との相互作用を介して可能となるだろう。本出願の発明人は、レセプタGb_3の発現が阻害されたＨｅＬａ細胞の中では（図１）Ａ）、内在化されたＢフラグメントはゴルジ体内で輸送されず細胞質内の胞状構造のレベルに蓄積されるということを示した。対照細胞内では、Ｂフラグメントはゴルジ体レベルに輸送される（図１）Ｂ）。

【００１５】

レセプタGb_3の不在下ではＢフラグメントが生合成系又は分泌系に向かってもはや搬送されないとするこの仮定は、生化学実験によって確認されている（図２）。

【００１６】

発明人は、レセプタGb_3の合成阻害物質の存在下で、内在化されたＢフラグメントの最高５０％までのＰＰＮＰ（＋ＰＰＮＰ）がＴＣＡ可溶性物質の形で分解され、このことはエンドソーム又はリソソーム区画といった後の分解区画に向かっての輸送活性と合致しているということを示した。レセプタGb_3の合成が阻害されない場合（－ＰＰＮＰ）、はるかに低い割合の内在化Ｂフラグメントが可溶性ＴＣＡとなる。したがって、特定の区画内のＢフラグメントのアドレッシングにはレセプタGb_3の存在が必要であり、このことは、Ｂフラグメントの活性の優勢面がそのレセプタGb_3に対する結合であろうという事実を弁護することになるという結論を下すことができる。

【００１７】

本発明は、

－　Ｂが N. G. Seidah et al (1986) J. Biol. Chem. 261: 13928-31及びStrockbine et al (1988) J. Bact. 170: 1116-22にその配列が記述されている志賀毒素又はその機能的等価物又はベロ毒素又はリシン（ricin）（上記参考文献）といった毒素のＢフラグメントを表し、

－　Ｘが、逆行性又は細胞内輸送との相容性の限界を上限とする合計長をもつ単数又は複数のポリペプチドを表すものとして、

Ｂ－Ｘ

という構造式を満たす、単数又は複数のポリペプチドＸが、カルボキシ末端に結合されている志賀毒素のＢフラグメント又はその機能的等価物を少なくとも含む、キメラポリペプチドを目的とする。

【００１８】

本発明は同様に、Ｂが上述のものと同じ意味をもちＸ’は、その発現が求められているペプチド配列Ｘ、特に抗原エピトープをコードするヌクレオチド配列を表すものとして、Ｂ－Ｘ’という構造をもつキメラ分子にも関する。

【００１９】

本発明のキメラ分子は更に以下のものを有する可能性がある。

ａ）　約２０個のアミノ酸で構成されたＮグリコシル化部位、リン酸化部位又は場合によ

って分子の成熟に必要なあらゆる配列といったような修飾部位。
ｂ）　ＲＥの常在性タンパク質のカルボキシ末端に結合された時点でゴルジ体内の通過によりタンパク質の成熟後の保持をひき起こすＫＤＥＬテトラペプチドタイプの保持シグナル（Ｌｙｓ－Ａｓｐ－Ｇｌｕ－Ｌｅｕ）。タンパク質成熟における保持シグナルの役目についての総括が、M. J. Lewis et al, (1992) Cell, 68: 353-64内で提案されている。
【００２０】
より一般的には、キメラポリペプチド配列は以下のものを含む可能性がある：
－　適合された細胞系内でのタンパク質の成熟に必要なすべての配列：
－　キメラ分子による一定の与えられた細胞型の認識に必要で、かくしてその細胞の細胞質内での作用及び浸透の選択性を可能にするあらゆる配列。
【００２１】
キメラＢ－Ｘ又はＢ－Ｘ’構造配列すべての共通点は、それらがＢフラグメント又はその機能的等価物を含有するという点である。
【００２２】
本発明のキメラ分子は、ＲＥ内の配列Ｘ又はＸ’の発現産物のルーティングを可能にする。ＸがＢフラグメントに結合している場合、逆行性輸送は同様にゴルジ体、そして恐らくはエンドソームを通過する。そのうえ、ある種の条件下では、本発明の分子は、キメラポリペプチド配列内に含まれているある種のエピトープの膜提示をもたらす成熟を受けることができる。
【００２３】
成熟というのは、一定の与えられたポリペプチドから、それ自体細胞質を含めた細胞区画内で提示され得るペプチドの出現をもたらすあらゆるプロセスのことである。成熟は、小胞体内の酵素切断によってか又は、ポリペプチドが分割を受けその後かくして得られたペプチドが改めて小胞体内に輸送される細胞質内の輸送によって実施され得る。
【００２４】
クラスＩの主要組織適合複合体（ＣＭＨｃｌ１）の分子は、このような分割の後有利なポリペプチドＸ又はＸ’の負荷を受け細胞膜上に提示され得る。
【００２５】
本発明のキメラ分子が、その等価物のＢフラグメントと、発現が求められている配列を含む発現ベクター又はポリヌクレオチド分子とのカップリングで構成されている場合、かくして合成されたポリペプチドは、核内での転写及びその後の細胞質内での翻訳の後、ポリペプチドキメラ配列について上述したものと同じ分割、成熟及び細胞内輸送の段階を受けることができるだろう。
【００２６】
本発明に従ったキメラポリペプチド分子は、免疫反応の発達に適した抗原提示に関して生物学的プロセスに近いメカニズムにより免疫療法向けの治療用組成物内の有効成分を構成することができる。フラグメントＸは、このとき、細胞の表面でその膜提示が求められている単数又は複数のエピトープを表す。フラグメントＸのサイズは、関係するキメラ分子の細胞内移送能力によってのみ制限される。
【００２７】
このアプローチは、抗感染又は抗ガン免疫療法のためと同様、ある種の自己免疫疾患における抗原様物質を構成するためにも考慮することができる。
【００２８】
ＣＭＨｃｌ１により提示されるあらゆるタイプの抗原が、本発明の構築物の一部をなす単純又はキメラエピトープを選択するための１つの優れた候補である。一例として以下のものを挙げることができる：
ａ）　黒色腫細胞タンパク質から誘導されたヒトエピトープ：
－　チロシナーゼ由来のＢＡＧＥ（Boel, P. et al (1995),Immunity 2, 167-75）；
－　ｇｐ７５由来のＧＡＧＥ（Van den Eynde, B et al (1995), J. Exp. Med. 182. 689-98）；

－　チロシナーゼ（Brichard V. et al (1993), J. Exp. Med. 178, 489-95）；
－　Melan A/ＭＡＲＴ－１由来のｐ１５（Coulie P.G. et al (1994). J. Exp. Med. 180, 35-42; Kawakami Y. et al. (1994), J. Exp. Med. 180, 347-52）；
－　βカテニン由来のＭＡＧＥ－１及び－３（De Plaen E. et al (1994). Immunogenetics 40. 369-9; Traversan C et al (1992). J. Exp. Med. 176, 1453-7）。
ｂ）　ガンの発生に関与するウイルスタンパク質から誘導されたヒトエピトープ
－　ＨＰＶ１６のタンパク質Ｅ６及びＥ７から誘導されたペプチド（Feltkamp M.C, et al (1993), Eur. J. lmmunol. 23, 2242-9; Davis H.L. et al (1995), Hum Gene Ther 6, 1447-56）；
－　ＨＢＶのタンパク質から誘導されたペプチド（Rehermann B. et al (1995). J. Exp. Med. 181, 1047-58）；
－　ＥＢＶのタンパク質から誘導されたペプチド（Murray R.J. et al (1992), J. Exp. Med. 176. 157-68）；
－　サイトメガロウイルスから誘導されたペプチド
ｃ）　発ガン遺伝子から誘導されたヒトエピトープ；
－　ｐ２１ ras (Peace D. J. (1993), J. Immumnother 14, 110-4; Ciernik, I.F. et al (1995) Hybridoma 14, 139-42）；
－　ｐ５３（Gnjatic S.(1995), Eur. J. Immunol. 25, 1638-42）。
ｄ）　自己免疫疾患のための利点を呈するエピトープ
これらのエピトープは、Immunol. Today 15,155-60内にChiez R.M. et al (1994)により記述されているものの中から選ぶことができる。
ｅ）　感染症の状態下で利点を呈するエピトープ
かかるエピトープの一例としては、Furukawa K. et al (1994)により、J. Clin. Invest, 94, 1830-9の中で記述されているものを挙げることができる。
【００２９】
本発明の構成体においては、Ｘ又はＸ’の発現産物は同様に、いかなる原因によってであれ混乱を受けた細胞内輸送の機能を正常に戻すことを可能にするポリペプチド配列を表すこともできる。一例を挙げると、生物学的分子は、この分子の成熟又は移送を遮断する作用をもつ１つの配列の突然変異、欠失又は付加による修飾の結果ＲＥ内に捕捉され得る。これは例えば、カルネキシンといった分子シャペロンへのその結合がその塩析を妨げるか又は遅延させ、かくして、細胞内移送を妨げるような形で修飾される突然変異体ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）の場合に言えることである。この突然変異は、膵腺維症の原因である、突然変異を受けていない複製を小胞体の中に導入することにより、カルネキシンとの相互作用部位から糖タンパク質ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）のＮグリコシル化鎖を移動させることができ、その結果として、原形質膜に至るまでのタンパク質の輸送及び肺の上皮細胞の正常な機能が新たに可能となると思われる。
【００３０】
本発明は同様に、核酸特にその構造及び異なる変形形態が以上で定義されているキメラタンパク質についてコードするヌクレオチド配列を含むＤＮＡ又はｃＤＮＡの構成体にも関する。より特定的に言うと、本発明は、上述の構成体の担体でありそれらを細菌培養内で発現する可能性のあるプラスミド又は発現ベクターにも関する。一例を挙げると、発現ベクターは、G. F. Su et al, (1992) Infect, Immun., 60: 3345-59内に記述されているプラスミドｐＳＵ１０８であり得る。
【００３１】
より特定的に言うと、本発明は、以下のものを含む構成体に関する：
－　Ｂフラグメントについてコードする配列、
－　その発現が求められている単数又は複数のポリペプチドについてコードする配列。
これは、細胞表面でのその膜発現が求められているエピトープであり得る。同様にこれは、ゴルジ体内でのタンパク質の保持を可能にするポリペプチドであってもよい。最後にこれは、混乱を受けた細胞内輸送機能を正常に戻すことを可能にするポリペプチドであって

もよい。
【００３２】
該構成体は更に、その存在が本発明の分子により処理される予定の細胞における正しい細胞内輸送を可能にするポリペプチドについてコードするあらゆる核酸配列を含んでいてよい。すなわち特に以下のものが考えられる：
－　Ｎグリコシル化シグナルについてコードする配列、
－　保持シグナルＫＤＥＬについてコードする配列。
【００３３】
本発明のポリヌクレオチド構成体は、１つのプロモータ、好ましくは、それがトランスフェクションを受けた細菌の中で正確な発現の割合を可能にする強いプロモータの制御下にある。
【００３４】
本発明は同様に、これらの構成体を含み、本発明のキメラポリペプチド又はタンパク質を産生することのできる細菌をもその目的としている。
【００３５】
本発明の分子によって処置された宿主細胞も同様に本発明の一部をなす。これらはあらゆる細胞型、特に以下のものであり得る：
－　樹状細胞、マイクロファージ又はＢリンパ球といった細胞免疫の触発において活性な免疫系の細胞のように、ex vivoで処置され得る細胞；
－　遺伝子欠損又は代謝混乱によって変化を受けた機能の正常化において利用可能である上皮細胞のような、in situで処置され得る細胞：
－　ガン細胞。
【００３６】
一般的に言って、本発明のキメラ分子は、動物の細胞内で外因性分子を組込み発現させるために通常用いられるウイルス又はレトロウイルスベクターに関連する問題から解放された新しい治療方法にアプローチすることを可能にする。本発明の分子からもたらされる治療方法は、ex vivoで、又はキメラポリペプチド配列の定位型の直接利用によってか、あるいは又エアゾルのような従来の粘膜処置方法によって、患者の細胞を直接処置することからなる。
【００３７】
本発明は、特定のポリペプチドが標的細胞の膜のレベルで発現されている治療用組成物の製造における、本発明のポリペプチドについてコードするポリヌクレオチド配列又はキメラポリペプチドの利用に関する。これらのポリペプチドは有利にも、免疫系の細胞、特に樹状細胞、マイクロファージ又はＢリンパ球の表面でその時提示される、求められている免疫反応の発生の対象であるエピトープである。志賀毒素のＢフラグメントは、抗原提示細胞のプログラミングを可能にするエピトープベクターとして作用する。
【００３８】
本発明は、生体内での望ましくない抗原の存在により細胞免疫を増大させることからなる免疫療法に関するものであり、この方法は、樹状細胞及びマクロファージのような細胞免疫のキー細胞により特定のエピトープを発現させることからなる。本発明に従った処置方法は、標的細胞内での制限の後、有利なエピトープでＣＭＨｃｌＩ又はｃｌIIの分子を負荷することにより細胞性及び体液性免疫を触発することを目的としている。こうして、その除去が求められている抗原に対抗した細胞毒性Ｔ細胞の活性化がもたらされる。
【００３９】
本発明の構成体のおかげで提示されるエピトープは、ウイルス、寄生虫又は細菌性抗原又は、ガン細胞又は感染細胞がそうであり得るように、その除去が求められているあらゆる細胞、細胞小器官又は微生物に由来する。エピトープは同様に、自己免疫疾患において外来性抗原として認識される「自己」の分子が本発明のエピトープにより置換され、かくして免疫反応の緩和又は低減をもたらすことを可能にするデコイでもあり得る。
【００４０】

これらのエピトープの例は、キメラポリペプチド配列の記述に際し上記で引用している。
【００４１】
本発明は同様に、治療用組成物の製造における本発明のキメラ分子の利用において、発現が望まれている特定のポリペプチドが、ＲＥ内でのその捕捉及び発現欠損をもたらすような変性された構造をもつタンパク質の細胞内移行の正常化を可能にする利用にも関する。これは、グリコシル化、硫酸化、折畳み（folding)などを含む細胞内成熟を受ける膜発現タンパク質の場合に言えることである。
【００４２】
特別な例は、カルネキシンといった分子シャペロンに対するその付着がタンパク質の修飾によって修正されている突然変異体ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）の例である。これは、膵腺維症の原因である分子の捕捉をもたらし、これは特に膵臓及び肺のレベルでの外分泌の全体的不足といった形で現われる。
【００４３】
本発明は、タンパク質の分泌障害を原因とする病気の治療処置方法に関する。本発明は、キメラポリペプチドを直接投与するか又は、欠損した細胞機能の正常化を可能にすることになるペプチド又はポリペプチドについてコードする外因性配列を支持するプラスミドの形で遺伝子情報を患者の細胞内に投与することからなる。
【００４４】
この正常化は、ポリペプチドＸによる欠損機能の補足、又は細胞機構に特異的なレセプタ又は分子との結合のための、突然変異を受けたタンパク質と外因性配列から合成されたポリペプチドの間の競争の結果としてもたらされ得る。特定の一例としては、膵腺維症の原因である上述の突然変異体を、その分子シャペロンを用いたタンパク質ＣＦＴＲの付着部位についてコードする配列の担体であるベクターの投与、又はキメラポリペプチドの直接的投与によって処置することがある。
【００４５】
本発明の構成は、健康な人間又は動物の共同体に対し、細胞内移送の欠損に起因する疾病を処置するため、又は分子、ポリペプチド又は有利なエピトープの膜提示を増大又は誘発するための新しい治療方法を提供している。
【００４６】
本発明のその他の特性は、以下の例及び図と照らし合わせて明らかになることだろう。
【００４７】
１．－　組換え型キメラポリヌクレオチドの構築及び対応するポリペプチドの産生
【００４８】
Ｉ－１）　プラスミドの構築
選択されたエピトープＸは、黒色腫を患う患者のガン細胞内に存在するエピトープＭＡＧＥであった。利用されたプラスミドは、Su et al., 1992, Infeet. Immun. 60: 33-45, 3359の中で記述されているプラスミドｐＳＵ１０８であった。
【００４９】
利用されるＰＣＲプライマーは以下のとおりであった：
５’－ＡＣＴＡＧＣＴＣＴＧＡＡＡＡＧＧＡＴＧＡＡＣＴＴＴＧＡＧＡＡＴＴＣＴＧＡＣＴＣＡＧＡＡＴＡＧＣＴＣ－３’
５’－ＣＴＴＴＴＣＡＧＡＧＣＴＡＧＴＡＧＡＡＴＴＡＧＧＡＴＧＡＴＡＧＣＧＧＣＣＧＣＴＡＣＧＡＡＡＡＡＴＡＡＣＴＴＣＧＣ－３’
【００５０】
これらのプライマーは、プラスミドＳＵ１０８の制限部位ＳｐｈＩ及びＳａｌＩのレベルでクローニングされたフラグメントを産生するべく、ベクターShiga Atp Ｅ（５’）の特異的プライマー、
５’－ＣＡＣＴＡＣＴＡＣＧＴＴＴＴＡＡＣ－３’
５’－ＣＧＧＣＧＣＡＡＣＴＡＴＣＧＧ－３’
と共に利用した。

【００５１】
硫酸塩１：（（５’リン酸化；５’－ＧＧＣＣＧＣＣＡＴＣＣＴＡＡＴＴＣＴＡＣＴＴＣＴ－３’）及び硫酸塩２（５’－ＣＴＣＡＧＡＡＧＴＡＧＡＡＴＴＡＧＧＡＴＧＧＣ－３’）又は硫酸塩３（５’－ＧＡＧＴＣＴＧＡＡＡＡＡＧＡＴＧＡＡＣＴＴＴＧＡＴＧＡＧ－３’）オリゴヌクレオチドで構成された、配列ＫＤＥＬ及びグリコシル化部位を含むアダプターフラグメントを、１６℃で一晩結合させた。
【００５２】
結果として得られたフラグメントを、Ｂ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬをコードするｃＤＮＡを含むｐＳＵ１０８　Ｎｏｔｌ及びＥｃｏＲＩの制限部位においてクローニングした。
【００５３】
Ｉ－２）　タンパク質の精製
組換え型フラグメントの精製は同様に、先に引用したSu et al. 1991の中で記述された技術に従って行った。簡単に言うと、ｐＳＵ１０８から得られた組換え型発現プラスミドを含むE. coliの細胞を一晩３０℃で培養させた。次に培養を、５０℃でアンピシリン５０mg/mlを追加したＬＢで５倍に希釈した。４２℃で４時間インキュベートした後、細胞を１０mMのトリス／ＨＣｌ中で徹底的に洗浄し、１０分間、１０mMのトリス／ＨＣｌ，pH８；２５％のスクロース、１mMのＥＤＴＡ中でインキュベートし、最後に、ＰＭＳＦ１mMを含む水と氷の混合物及びプロテアーゼ阻害物質混合物（ロイペプチン、キモスタチン、ペプスタチン、アンテパイン及びアプロチニン）の中で急速に再懸濁させた。最後の段階は、周辺質の破断をもたらす。清澄の後、上清をＱＦＦ（Pharmacia）カラム上に投入し、pH７.５のトリス／ＨＣｌ　２０mlの中でＮａＣｌの線形勾配により溶離させた。構成に応じて、Ｂフラグメントを１２０mM～４００mMの間で溶出した。Ｂフラグメントを含有する分画を次に２０mMのトリス／ＨＣｌ，pH７.５に対し透析させ、monoＱ（Pharmacia）カラム上に再投入し、前述の場合と同じ要領で溶出した。ポリアクリルアミド－ＳＤＳでの電気泳動ゲルにより純度９５％と見積られた、結果として得られたタンパク質を、その後利用するまで－８０℃で貯蔵した。
【００５４】
Ｉ－３）　in vitroでのＣＴＬ応答の誘発
予め立証されたプロトコル（Romani et al., (1994)に従って、樹状細胞（ＣＤ）を培養に付した。簡単に言うと、ＰＢＭＣをIscove培地中で再懸濁し、６ウエル付きのケース内で３７℃で２時間インキュベートした。付着しなかった細胞をとり出し、残った細胞をＧＭ－ＣＳＦ（８００U/ml）及びＩＬ－４（５００U/ml）の存在下で３７℃でインキュベートした。５日間の培養の後、それぞれ５０U/ml及び１５０U/mlの濃度のＩＬ－１α及びＩＦＮ－γを添加し、２４時間３０℃でインキュベーションを続行した。樹状細胞はその後、膜エピトープの提示に対する細胞の能力を改善するべく、３μg/mlのヒトβ２ミクログロブリンの存在下でかつＭＡＧＥエピトープにカップリングされた増大する濃度のＢフラグメントの存在下で、Iscove培地内で再懸濁した。この混合物を４時間３０℃でインキュベートした。このエピトープに結合したＢフラグメントを内在化させたＣＤに５０００radの放射線を照射し、遠心分離によりまとめ、再懸濁し、リンパ球$CD8^+$（ＰＢＭＣから調製したもの）と混合した。抗原でパルス処理したこれらのＣＤ及び$CD8^+$を次に5ng/mlのＩＬ－７の存在下で同時培養する。
【００５５】
１０日後、応答性あるリンパ球$CD8^-$を、それ自体同様にこの同じエピトープに結合した増大する濃度のＢフラグメントの存在下でインキュベートした、調製したばかりの照射済みＣＤにより再度刺激した。ＣＤ及び応答性リンパ球$CD8^+$の同時培養を、それぞれ１０U/ml及び5ng/mlのＩＬ－２及びＩＬ－７の存在下で続行する。この再刺激プロトコルを３回くり返す。
【００５６】
ＣＴＬ応答の誘発を測定するため、上述のように予備刺激した応答性リンパ球$CD8^+$をガン細胞又はウイルス感染細胞の存在下でインキュベートした。選択されたエピトープを

発現するこれらの細胞を$Na_2{}^{51}CrO_4$で標識し、応答性$CD8^-$と５時間接触させた（Bakker et al. 1994）。その後、培地中に遊離した放射能を測定し、これにより予備刺激された応答性リンパ球$CD8^+$の細胞毒性活性を数量化することができた。

【００５７】

結果

II－ＭＡＧＥＩ抗原の担体である志賀毒素のＢフラグメントによりパルス処理された樹状及びPena－ＥＢＶ細胞によるこの抗原の提示

II－１）　エピトープＭＡＧＥ－１の担体であるＢフラグメントの細胞内輸送の形態学的研究

我々は、小胞体（ＲＥ）への該タンパク質の細胞内経路指定を保存しながら、志賀毒素のフラグメントのカルボキシ末端においてペプチド配列を融合させることが可能であることを示した。この実証は、Ｂフラグメント、Ｎ－グリコシル化部位及び保持シグナルＫＤＥＬを含むキメラポリペプチドを構築することによって実施された。対照として、ペプチドＫＤＥＬの不活性バージョンである保持シグナルＫＤＥＬＧＬを利用した。Misendock et Rothman, 1995, J. Cell. Biol.129: 309-319。形態学及び生化学研究により、修飾されたＢフラグメントが、プラスミド膜からエンドソーム及びゴルジ体を介して小胞体に向かって輸送されることが示された。この輸送は、ＢＦＡ（真菌代謝物ブレフェルジンＡ）により阻害され、ノコダゾル（微小管脱重合剤）により減少させられた。

【００５８】

これらの実験は、明らかに、小胞体への融合タンパク質の細胞内経路指定が保存されていることを示している。in vitroでの抗腫瘍ワクチン接腫のためのエピトープベクターとしてのＢフラグメントの潜在性を評価するため、上述の実験条件下でＢ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬに対しエピトープＭＡＧＥ－１を再度添加した。新しいタンパク質は、Ｂ－ＭＡＧＥ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬと命名された。共焦顕微鏡によりその細胞内輸送を追従できるように、タンパク質Ｂ－ＭＡＧＥ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬは、蛍光体ＤＴＡＦと結合させた。このタンパク質は、その内在化の後、ゴルジ体のレベルならびにＨｅＬａ細胞、Pena－ＥＢＶ細胞（エプスタイン－バーウイルスを用いて不死身化されたＢリンパ球の系統）のＲＥのレベルで検出可能である。これらの結果は、そのカルボキシ末端（前述）で修飾されたＢフラグメントの細胞内輸送に関する当初の観察を確認し、造血細胞系統のある種の提示細胞がＢフラグメントを内在化させＲＥに至るまでタンパク質を輸送する能力をもつことを明言できるようにしている。

【００５９】

我々はここで、タンパク質 Ｂ－ＭＡＧＥ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬのＮグリコシル化を測定することによりこれらの研究を明確に示そうと思う。Ｎグリコシル化は、ＲＥのレベルで特異的に行われる修飾であり、我々は先に、Ｎグリコシル化のための認識部位をもつＢフラグメントは、それがＲＥまで輸送された場合に実際にグリコシル化される、ということを示した。

【００６０】

II－２）　タンパク質 Ｂ－ＭＡＧＥ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬによりパルス処理された樹状及びPena－ＥＢＶ細胞による、ＭＡＧＥ－１抗原の提示の研究

エピトープベクタとして作用するフラグメントの能力を評価するため、我々は、ハプロタイプＨＬＡ－Ａ１の提示細胞のクラスＩのＣＭＨに結合したエピトープＭＡＧＥ－１を特異的に認識する細胞毒性Ｔリンパ球（ＣＴＬ８２／３０）のクローンを用いた。これらのＣＴＬは、タンパク質Ｂ－ＭＡＧＥ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬでパルス処理した樹状又はPena－ＥＢＶ細胞の存在下に保たれた。エピトープＭＡＧＥ－１が提示細胞により提示される場合、ＣＴＬは活性化され、インタフェロンγ（ＩＦＮγ）を分泌することになり、その後これを定量した。

【００６１】

分泌されたＩＮＦγの量は、提示細胞によるＣＴＬの刺激の大きさに比例した。

【００６２】

提示細胞（Pena－ＥＢＶ及び樹状細胞）のうち、丸底マイクロウエル１つあたり２万個の細胞を、ＰＢＳ－パラグロムアルデヒド４％で１時間固定するか又は固定しなかった。これらを次に0pti ＭＥＭで２回洗浄してから、タンパク質Ｂ－ＭＡＧＥ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬの希釈液と１５時間インキュベートした。タンパク質を、まず最終濃度１０μMから始めて、0pti ＭＥＭ培地（無血清培地）の中で５倍ずつ希釈した、４つの希釈液でテストした。１５時間後、平板を低速の遠心分離により２回洗浄した。ＣＴＬ（ＣＴＬ８２／３０）を１００μlの培地（ＩＤ－ＨＳ－ＡＡＧ＋２５U/mlのＩＬ２）の中で、１ウエルあたり５０００ＣＴＬの割合でＣＴＬ（ＣＴＬ８２／３０）を再度添加した。陽性対照として、系統Ｇ４３（ＭＡＧＥ－１の発現プラスミドによるトランスフェクションを受けたＢリンパ球系統）の存在下にＣＴＬ８２／３０を保った。２４時間のインキュベーションの後、上清を回収して、産生されたＩＦＮγの量を定量した。

【００６３】

得られた結果は、表１に示した。

【００６４】

【表１】

表　１

細胞型		Ｂ－ＭＡＧＥ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬの濃度			
		10μM	2μM	0.4μM	0.08μM
樹状					
	固　定	446±293	821±64	661±18	312±181
	未固定	1557±404	1315±91	1231±150	1174±478
Pena－ＥＢＶ					
	固　定	70±47	68±48	23±32	4±5
	未固定	1966±415	1960±206	1544±42	853±116

【００６５】

結果は、各々の条件下で産生されたＩＦＮγ単位（平均±標準偏差；ｎ＝３）により表されている。

【００６６】

タンパク質Ｂ－ＭＡＧＥ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬでパルス処理されたPena－ＥＢＶ細胞及び樹状細胞が、たとえ低いタンパク質濃度であってもＣＴＬにより充分に認識されるということが確認できた。これに対して予め固定されたPena－ＥＢＶ細胞及び樹状細胞は認識されなかった。したがって、タンパク質Ｂ－ＭＡＧＥ－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬのエンドサイトーシス及びプロセシングがあったと思われる。これらの心強い結果は、ここでin vitroワクチン接腫実験により裏打ちされた。

【００６７】

III－マウスにおけるin vivo抗腫瘍及び/又は抗ウイルス活性試験

マウスの樹状細胞を調製し、抗腫瘍活性をテストするためにはタンパク質Ｐ２１　ＲＡＳ、Ｐ５３又はＥＰ２／ＮＥＲ、又抗ウイルス活性をテストするためにはＨＢＶ、ＥＢＶ又はＨＰＶから誘導された抗原を用いて標識づけした。樹状細胞のこの調製は、上記１－４）に示したプロトコルに従って行った。

【００６８】

これらの樹状細胞はその後マウスに導入された。

【００６９】

抗ウイルス又は抗腫瘍効果は、このように移植されたこれらのマウスをその後この抗原を発現する腫瘍細胞又はウイルスにより処置することによって観察された。

【００７０】

結論
かくして、本発明のポリペプチド配列又はポリヌクレオチド配列は、有利にも、前記ウイルス又は前記ガン細胞の特定のウイルスが組換えヌクレオチド配列内に組込まれかくしてクラス１のＣＭＨにより制限され免疫系の細胞の膜表面で発現され得るキメラポリペプチドの合成をもたらすことになった時点で、ある種のガン又はある種のウイルス性の、又は細菌性の感染を処置することを目的とする薬学組成物の有効成分を構成することができる。

【００７１】
ＩＶ－志賀毒素のＢフラグメントを用いる、突然変異を受けたタンパク質ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）の細胞内輸送の正常化
ＣＦＴＲ（嚢胞性腺維症膜貫通レギュレータ）タンパク質は、原形質膜の塩素チャネルである。膵腺維症を患う患者の大部分において、ＣＦＴＲ遺伝子は突然変異を有している。最も頻繁に観られる突然変異（△Ｆ５０８）は、ＣＦＴＲタンパク質の細胞内経路設定に影響を与える。実際、そのイオンチャネル活性に関して機能的である突然変異タンパク質ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）は、原形質膜に至るまで搬送される代わりに、小胞体レベルで遮断された状態でとどまっている。我々は、志賀毒素のＢフラグメントを用いて小胞体の中に、カルネキシンタンパク質（ＲＥ内「シャペロン」）との相互作用ドメインとなるものとして知られているＣＦＴＲタンパク質の１ドメインを導入した。このドメインは、Ｂフラグメントのカルボキシ末端に融合されることになる。我々は、このキメラタンパク質が、カルネキシンとの相互作用部位から糖タンパク質ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）のＮ－グリコシル化連鎖を移動させることを可能にし、その結果タンパク質ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）がもはや小胞体内に保持されず原形質膜まで輸送されそのとき正常に機能し得るようになるということをテストした。

【００７２】
最初、我々は、ＢフラグメントとＣＦＴＲタンパク質から誘導された相互作用ドメインからなるキメラタンパク質を構築した。小胞体内でのその保持力を増大させるべく、このタンパク質のカルボキシ末端に再循環シグナル（ペプチドＫＤＥＬ）を添加した。まず第１に、新しいタンパク質が同様に標的細胞の小胞体の中に輸送されていることを確認した。ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）の可動化について、ＣＦＴＲ（△５０８）のｃＤＮＡによるトランスフェクションを受けた細胞ＬＬＣＰＫ１の安定した系統の細胞の中で研究した。この系統はM. A. Costa de Beauregard女史とM. D. Louvard (Institut Curie Paris, CNRS UMR144）によって樹立された。これらの細胞内で発現されたタンパク質ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）には更にエピトープ標識が具備された。したがって、原形質膜内部にタンパク質ＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）が到着したことを免疫螢光法により検出することが可能である。処置が無い場合、この系統の細胞ＬＬＣＰＫ１の原形質膜には、その内部にＣＦＴＲ（△Ｆ５０８）に特異的な標識付けが備わっていない。これらのパイロット実験の結果が有望なものであるならば、我々は、膵腺維症の治療という観点でこのアプローチを発展させることに尽力するであろう。

【００７３】
結論
上述の実験は、ＸがＣＦＴＲタンパク質とカルネキシンの間の相互作用ドメインで構成されている合成ポリペプチドが、有利にも、膵腺維症を処置することを目的とする治療用組成物の有効成分を構成し得るということを示している。実際、突然変異体に存在する突然変異を受けた相互作用ドメインとカルネキシンとの相互作用のための合成ポリペプチドのフラグメントの間の競合は、突然変異を受けたタンパク質の気管支レベルでの分泌を正常に戻すことを可能にする。

【００７４】
抗原提示試験
抗原提示細胞（ＣＭＳＰ、Ｂ－ＥＢＶ細胞、Ｔ細胞、樹状細胞）を、ウエルあたりの細胞数を10^5個にした、９６ウエルのマイクロプレート内でインキュベートして、Iscove培

地１００μｌの中に溶解させた抗原を用いて、４時間又は１５時間３７℃で初回免疫（pulsed）した。インキュベーションの終りで、培地を除去し、ＩＬ２を２５U/ml含有するＣＴＬの培地１００μｌ中で各ウエルに２００００個のＣＴＬ細胞を添加した。２４時間後、５０μｌの上清を収集し、ＥＬＩＳＡ試験（Diaclone）によりγインターフェロンを測定した。いくつかの実験においては、細胞を大気温で１０分間１％のパラホルムアルデヒドで固定し、マイクロプレート内への移送の前に徹底的に洗浄した。

【図面の簡単な説明】

【図１Ａ】　レセプターＧｂ$_3$の発現が阻害されたHela細胞。内在化されたＢフラグメントはゴルジ体に向かって輸送されず、小胞構造内に蓄積される。

【図１Ｂ】　Ｂフラグメントがゴルジ体に向かって輸送されている、対照のHela細胞。

【図２】　Ｂフラグメントの輸送障害を示す生化学試験

【図３】　末梢血の単球細胞（ＣＭＳＰ又はＰＢＭＣ）に対する志賀融合タンパク質Ｂ－Mage１の制限されたクラスのＣＭＨの提示：ＫＤＥＬ配列の役割。ＣＭＳＰ（５×１０^4）は、夜の間にペプチドMage１（１μM）か又はMart１（１μM）又は、活性（Ｂ－Mage１－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬ）又は不活性（Ｂ－Mage１－Ｇｌｙｃ－ＫＤＥＬＧＬ）の小胞体に向かう再循環配列を伴う志賀融合タンパク質Ｂ－Mage１（１μM）を用いて初回免疫された。洗浄の後、エピトープMageⅠ（クローン８２／３０）に対し特異的な２×１０^{4}の細胞毒性Ｔ細胞を、２４時間初回免疫されたＣＭＳＰ細胞を用いてインキュベートした。その後、上清を収集し、γインターフェロンの産生についてこれをテストした。

【図４】　異なる型の抗原提示細胞による志賀融合タンパク質Ｂ－Mage１の制限されたクラスⅠのＣＭＨの提示。図３の場合と同様に、志賀可溶性融合タンパク質Ｂ－Mage１を用いて、Ｂリンパ芽球細胞

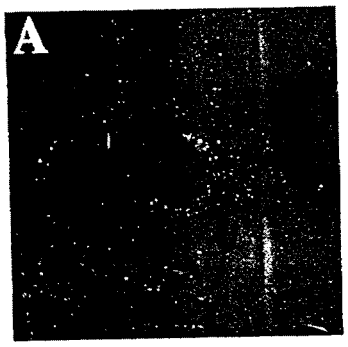
【外１】

（⊡）

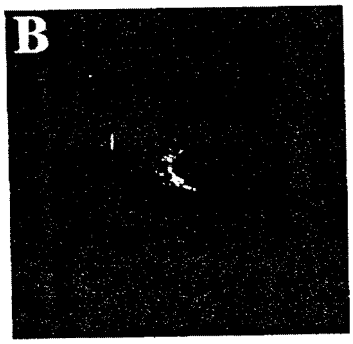
、樹状細胞（＋）又はクローナルＴ細胞（□）を初回免疫した。ペプチドMage１の提示を８２／３０ＣＴＬ系統でテストした。

【図５】　Ｂリンパ芽球細胞系統による志賀融合タンパク質Ｂ－Mage１の制限されたクラスⅠのＣＭＨ提示の特異性分析。リンパ芽球Ｂ系統の細胞ＢＭ２１（ＨＬＡ－Ａ１）又はＢＶ１（ＨＬＡ－Ａ２）を、夜の間、培地単独か、又は合成ペプチドMage１又はMart１（１μM）、又は志賀融合タンパク質Ｂ－Mage１（１μM）、又は融合タンパク質Antp-Mage１又は野生型志賀毒素のＢフラグメントで初回免疫した。洗浄後、Mage１ＣＴＬ８２／３０（Ａ）又はMart１ＣＴＬ　ＬＢ３７３（Ｂ）の特異的細胞を、初回免疫されたＢ－ＥＢＶ細胞を用いて２４時間インキュベートした。次に上清を収集し、γインタフェロンの産生についてこれをテストした。

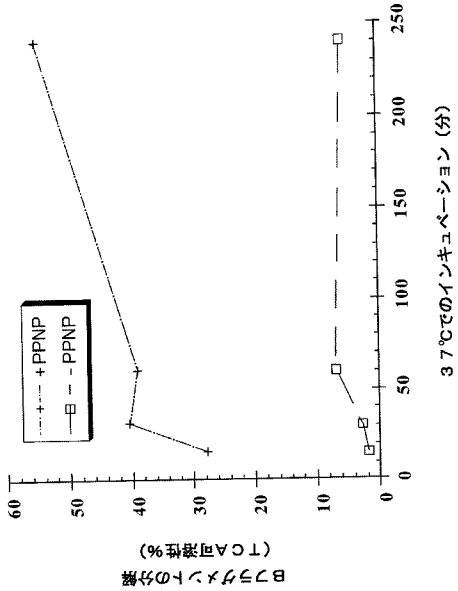
【図１Ａ】


A

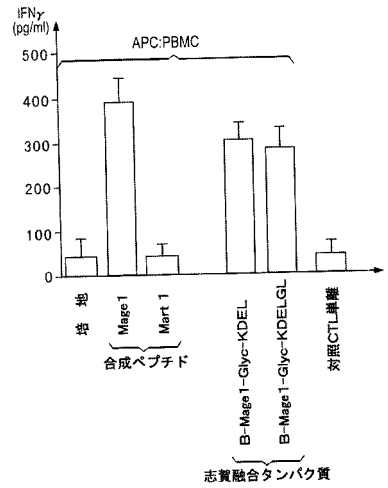
【図１Ｂ】


B

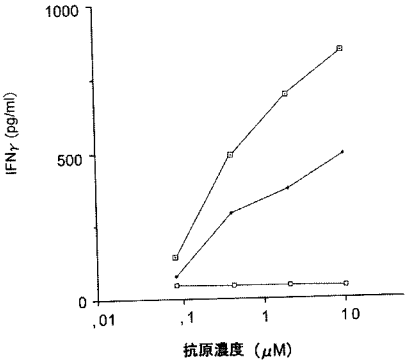
【図２】


+PPNP
-PPNP
0
50
100
150
200
250
37℃でのインキュベーション（分）
0
10
20
30
40
50
60
Bフラグメントの分解
（TCA可溶性%）

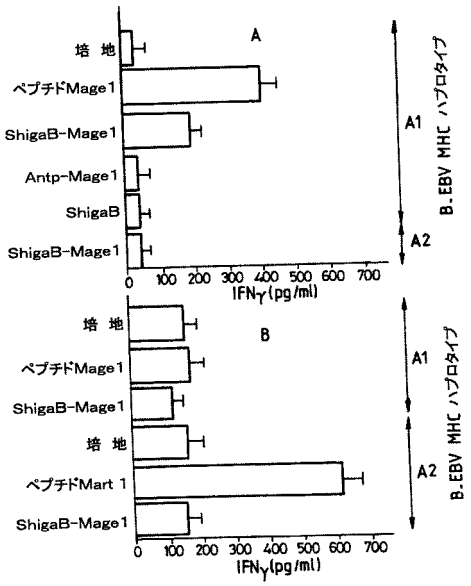
【図３】


IFNγ
(pg/ml)
APC:PBMC
500
400
300
200
100
0
培地
Mage1
Mart 1
合成ペプチド
B-Mage1-Glyc-KDEL
B-Mage1-Glyc-KDELGL
志賀融合タンパク質
対照CTL単離

【図４】


1000
500
0
IFNγ (pg/ml)
,01
,1
1
10
抗原濃度（μM）

【図５】


A
培 地
ペプチドMage1
ShigaB-Mage1
Antp-Mage1
ShigaB
ShigaB-Mage1
A1
A2
B.EBV MHC ハプロタイプ
0 100 200 300 400 500 600 700
IFNγ(pg/ml)
B
培 地
ペプチドMage1
ShigaB-Mage1
培 地
ペプチドMart 1
ShigaB-Mage1
A1
A2
B.EBV MHC ハプロタイプ
0 100 200 300 400 500 600 700
IFNγ(pg/ml)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI	
C07K 14/82	*(2006.01)*	C07K	14/82
C07K 19/00	*(2006.01)*	C07K	19/00

(74)代理人 100116919
弁理士 齋藤 房幸
(74)代理人 100141357
弁理士 鈴木 音哉
(72)発明者 グッド, ブルーノ
フランス国、エフ－７５０１５ パリ、リュ・デ・モリヨン ６１
(72)発明者 ジョアン, リュジェ
フランス国、エフ－７５０２０ パリ、リュ・デ・マレシェ ２０

審査官 横田 倫子

(56)参考文献 特表平０７－５０５０５２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９７／０１３４１０（WO，Ａ１）
特開平０５－５０２８８０（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９３／０１７１１５（WO，Ａ１）
Mol Biol Cell., 7[Suppl] (1996) p.75a
Trends Glycoscle Glycotechnol.,5[21] (1993) p.23-31
Gene, 160 (1995) p.287-290
Nature, 358 (1992) p.761-764
Cell, 68 (1992) p.353-364
J Biol Chem., 272[31] (1997 Aug) p.19554-19561
Eur J Immunol., 28 (1998) p.2726-2737

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)