(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2008-507282
(P2008-507282A)
(43)公表日　平成20年3月13日(2008.3.13)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02		4C084
A61K 35/12	(2006.01)	A61K	35/12		4C087
A61K 35/76	(2006.01)	A61K	35/76		
A61K 35/74	(2006.01)	A61K	35/74	Z	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 70 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2007-522752 (P2007-522752)
(86)(22)出願日　平成17年7月20日 (2005.7.20)
(85)翻訳文提出日　平成19年3月20日 (2007.3.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2005/025878
(87)国際公開番号　WO2006/012416
(87)国際公開日　平成18年2月2日 (2006.2.2)
(31)優先権主張番号　60/589,707
(32)優先日　平成16年7月20日 (2004.7.20)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/614,529
(32)優先日　平成16年9月29日 (2004.9.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　505353250
アイソジェニス・インコーポレイテッド
ＩＳＯＧＥＮＩＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国８０２０６コロラド州デンバー、ゲイロード・ストリート１８９９番
(74)代理人　100081422
弁理士　田中　光雄
(74)代理人　100084146
弁理士　山崎　宏
(74)代理人　100106518
弁理士　松谷　道子
(74)代理人　100127638
弁理士　志賀　美苗
(74)代理人　100138911
弁理士　櫻井　陽子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】自己免疫および自己抗原に関連する疾患の特異的阻害

(57)【要約】
本発明は、自己抗原に対する宿主免疫応答を特異的に阻害するための組成物および方法を提供する。特に、自己抗原に対する宿主免疫応答の体液性成分および細胞性成分を特異的に阻害するための、ＣＤ８ポリペプチド発現を自己抗原の発現または提示と組み合わせる組成物および方法が、記載される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ａ．ＣＤ８ポリペプチドをコードする第１の核酸配列；
ｂ．自己反応性Ｔ細胞応答に関連する自己抗原の少なくとも１つのエピトープをコードする第２の核酸配列；および
ｃ．標的細胞における発現のための、前記第１の核酸および前記第２の核酸に作動可能に連結された制御配列
を含む、ポリヌクレオチド。
【請求項２】
前記第１の核酸がヒトＣＤ８α鎖をコードする、請求項１に記載のポリヌクレオチド。
【請求項３】
前記自己抗原が、インスリン、プロテオリピドタンパク質ＰＬＰ－１、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト、糖タンパク質、グルタミン酸デカルボキシラーゼ２、コリンレセプターγ鎖、サイログロブリン、ＩＩ型コラーゲン、α１マトリックスメタロプロテイナーゼおよびＭＭＰ－１からなる群より選択される、請求項１または２に記載のポリヌクレオチド。
【請求項４】
ＣＤ８ポリペプチドおよび自己反応性Ｔ細胞応答に関連する自己抗原の少なくとも１つのエピトープをコードする発現ベクターを含む、自己反応性Ｔ細胞応答を阻害するための治療用組成物。
【請求項５】
前記発現ベクターが前記自己抗原の複数のエピトープをコードする、請求項４に記載の治療用組成物。
【請求項６】
前記ＣＤ８ポリペプチドおよび前記自己抗原の少なくとも１つのエピトープの発現が、同じプロモーターの制御下にある、請求項４に記載の治療用組成物。
【請求項７】
ＣＤ８ポリペプチドをコードする第１の発現ベクターおよび自己反応性Ｔ細胞応答に関連する自己抗原の少なくとも１つのエピトープをコードする第２の発現ベクターを含む、自己反応性Ｔ細胞応答を阻害するための治療用組成物。
【請求項８】
前記第２の発現ベクターが前記自己抗原の複数のエピトープをコードする、請求項７に記載の治療用組成物。
【請求項９】
前記第２の発現ベクターが、前記自己反応性Ｔ細胞応答に関連する第２の自己抗原の少なくとも１つのエピトープをさらにコードする、請求項７または８に記載の治療用組成物。
【請求項１０】
前記自己反応性Ｔ細胞応答に関連する第２の自己抗原の少なくとも１つのエピトープをコードする第３の発現ベクターをさらに含む、請求項７または８に記載の治療用組成物。
【請求項１１】
自己反応性Ｔ細胞応答に関連する自己抗原タンパク質またはそのフラグメント、およびＣＤ８ポリペプチドをコードする発現ベクターを含む、自己反応性Ｔ細胞応答を阻害するための治療用組成物。
【請求項１２】
複数の自己抗原タンパク質を含む、請求項１１に記載の治療用組成物。
【請求項１３】
前記ＣＤ８ポリペプチドがヒトＣＤ８ポリペプチドである、請求項４から１２のいずれか一項に記載の治療用組成物。
【請求項１４】

前記ＣＤ８ポリペプチドが、ヒトＣＤ８α鎖の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメインから本質的になる、請求項１３に記載の治療用組成物。
【請求項１５】
前記自己抗原が、インスリン、プロテオリピドタンパク質ＰＬＰ－１、ミエリン塩基性タンパク質、ミエリンオリゴデンドロサイト、糖タンパク質、グルタミン酸デカルボキシラーゼ２、コリンレセプターγ鎖、サイログロブリン、ＩＩ型コラーゲン、α１マトリックスメタロプロテイナーゼおよびＭＭＰ－１からなる群より選択される、請求項４から１４のいずれか一項に記載の治療用組成物。
【請求項１６】
標的細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで、請求項４から１５のいずれか一項に記載の治療用組成物と接触させる工程を含む、標的抗原に対する自己免疫応答を阻害するための方法。
【請求項１７】
前記標的細胞が筋細胞であり、前記接触させる工程がｉｎ　ｖｉｖｏで実施される、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】
前記標的細胞が造血細胞である、請求項１６に記載の方法。
【請求項１９】
前記標的細胞が、リンパ球または抗原提示細胞である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記接触させる工程がｅｘ　ｖｉｖｏで実施される、請求項１８または１９に記載の方法。
【請求項２１】
請求項４から１５のいずれか一項に記載の治療用組成物を宿主に投与する工程を含む、宿主における自己免疫疾患の発症を予防するための、または自己免疫疾患を治療するための方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本願は、仮出願番号６０／６１４，５２９（２００４年９月２９日出願）および仮出願番号６０／５８９，７０７（２００４年７月２０日出願）の利益を主張し、これらは各々本明細書中に参照により組み込まれる。
【０００２】
本発明は、免疫抑制療法、より具体的には自己免疫障害を予防または治療するための方法および組成物に関する。
【背景技術】
【０００３】
免疫応答は、微視的病原体、およびより低い程度までではあるが新生物細胞を排除するにあたり驚くほど有効である。一般に、自己認識のための複雑な機構は効率的であり、強力な応答を外来抗原の排除にのみ向けるようにする。免疫系の重要な機能である自己／非自己識別の調節には、Ｔリンパ球およびＢリンパ球の発達および寿命の間の複数の機構が含まれる。残念ながら、免疫系は時折正しく機能せず、宿主の細胞に敵対するようになり、それによって自己免疫応答を誘発する。自己免疫は典型的には、免疫細胞上の抗原レセプターが宿主細胞上の特異的な自己抗原を認識し、宿主細胞の破壊を生じる反応を開始するときに生じる。ある場合には、自己反応性リンパ球がより長く生存し、アポトーシスを誘導するか、または別の方法で宿主細胞を排除し続け、自己免疫疾患を引き起こす。
【０００４】
Ｔリンパ球が自己を攻撃することを防止する種々の機構が記載されている。これらの寛容機構は、発達中のＴ細胞および成熟Ｔ細胞の両方に対して作用する。例えば、胸腺での正の選択により、自己ＭＨＣ分子を認識するＴ細胞のレパートリーが偏り、こうしてまた

自己反応性Ｔ細胞が富化される（Ｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９４：４２７－３８（１９９９））。正の選択の後に起こる胸腺での負の選択が、次に、除去または不活化のいずれかによって自己反応性Ｔ細胞を排除する（Ｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９４：４２７－３８（１９９９）；Ｚｅｐｐ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ　３３６：４７３－５（１９８８））。クローン除去は、ＣＤ４＋ＣＤ８＋ＴＣＲ^{ｈｉｇｈ}成熟段階で高親和性Ｔ細胞に対処するが、一方でクローン不活化は、おそらくはＴＣＲおよびＣＤ８α鎖の下方制御によって、より低い親和性の相互作用で働くようである（Ｂｅｒｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９４：４２７－３８（１９９９）；Ｊｏｒｄａｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：３０１－６（２００１）；Ｓｔｅｐｈｅｎｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．３３：１２８２－９１（２００３））。しかし、これらの「アネルギー性」Ｔリンパ球は、それらの抗原に特異的に応答する能力をなお保持している。これらは、刺激の際にＩＬ－１０およびＴＧＦ－βを放出するので、実際には制御性Ｔ細胞の集団に相当する可能性が示唆されている（Ａｓｓｅｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９０：９９５－１００４（１９９９）；Ｓｅｄｄｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８９：２７９－８８（１９９９））。このように、胸腺の（中枢性）寛容機構がすべての自己反応性Ｔ細胞を排除するわけではないことは、十分に確立されている。実際、ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）、インスリンおよびグルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）などの自己抗原に反応性のあるＴ細胞を、末梢において容易に見出すことができる。

【０００５】

ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞ならびにＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）の両方が、自己抗原免疫応答において重要な役割を果たす。十分に受容された自然発症糖尿病ＮＯＤマウスモデルにおいて、例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＣＤ８＋Ｔ細胞の両方が、疾患発症に重要である。Ｗｉｃｋｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：１７９－２００（１９９５）；Ｍｏｒａ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６２：４５７６－８８（１９９６）。直接的および間接的に刺激されたＣＤ４＋Ｔ細胞は自己抗体の産生を助け、ＣＤ８＋ＣＴＬの誘導に必要なシグナルを提供し、これらの両方が、自己抗原を発現する細胞を傷害できる。このように、自己免疫応答に対するいずれの免疫抑制戦略の成功も、Ｔ細胞の両方の主要なサブセットの有効な阻害に依存している。

【０００６】

自己免疫疾患のための既存の治療は、限定的な成功しか収めていない。例えば、器官特異的な自己免疫疾患を代謝制御を通じて治すことがしばしば可能である。機能が失われて回復できない場合、機械的代替物または組織移植片が適切であり得る。このアプローチを使用して症状のいくつかを緩和することが可能なことがあるが、多発性硬化症およびインスリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）を含む最も障害の大きい自己免疫障害のいくつかについては、有効な長期の治癒的治療は存在しない。インスリン、コルチコステロイドおよび改変βインターフェロンを含む多数の化合物が自己免疫疾患の症状のいくつかを寛解できるものの、これらは、重篤な副作用を有する、および／または長期使用を必要とすることがある。一般的な免疫抑制薬物治療（例えば、シクロスポリンＡ、ＦＫ５０６およびラパマイシンによる長期治療）もまた、これらの疾患に対する治癒を提供できておらず、それらの使用は、宿主の有害な副作用を伴う。

【０００７】

より最近、単独または２型ヘルパーＴ細胞（Ｔｈ２）サイトカイン（例えば、ＩＬ－４およびＩＬ－１０）との併用でのいずれかでの、自己抗原をコードするＤＮＡワクチンの全身投与に基づく、免疫調節戦略が提案されている。例えば、Ｒｕｉｚ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６２：３３３６－３３４１（１９９９）；Ｇａｒｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ　１５：１５－２２（２００１）；米国特許公開番号ＵＳ２００３／０１４８９８３Ａ１（これらの開示は、本明細書に参照により明示的に組み込まれる）を参照のこと。これらの研究者により報告された予備的データにより、自己抗原のみをコードするＤＮＡワクチンは、自己反応性Ｔ細胞をアネルギー化できる可能性があるが

、ＩＬ－４と併用した寛容化ワクチンは、Ｔｈ２応答の誘導を助け得ることが示唆された。Ｒｏｂｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．２１：１０３３－３９（２００３）。別の研究者グループからのデータにより、ＩＬ－４の存在が、寛容化ワクチンによって誘導される疾患の発症に対する保護に重要であることが示唆された。Ｂｏｔ ｅｔ ａｌ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６７：２９５０－５５（２００１）。このように、この治療戦略の成功は、炎症促進性１型ヘルパーＴ細胞（Ｔｈ１）応答をより保護的なＴｈ２応答に偏らせるための、Ｔｈ２関連サイトカインまたはそれをコードするベクターの寛容化ワクチンとの同時投与に依存する可能性がある。このワクチンベースの戦略は予防的な設定においていくらか有効であったが、炎症性Ｔｈ１応答にすでに大きく偏った活性な自己免疫応答を治療することはかなりより困難であることが判明しているといってよい。

【０００８】

したがって、高度に特異的な様式で、Ｔｈ１型Ｔ細胞を含む自己反応性Ｔ細胞の機能を阻害できる新規な治療用組成物およびプロトコールが模索される。本発明の目的は、自己反応性ＣＤ４＋Ｔリンパ球およびＣＤ８＋Ｔリンパ球を阻害および／または排除して、自己免疫疾患の発症ならびに進行を予防することである。

【０００９】

関連文献の要旨

ＭＨＣクラスＩ拘束Ｔ細胞（例えば、ＣＤ８＋ ＣＴＬ）の活性は、そのＴ細胞レセプター複合体を介してシグナルを受容したＣＴＬが、そのクラスＩ ＭＨＣ分子のα３ドメインを介したシグナルもまた受容する場合に、抑制され得ることが知られている。このいわゆるｖｅｔｏシグナルは、刺激因子即ち「ｖｅｔｏ」細胞によって発現されるＣＤ８分子によって送達され得る。Ｓａｍｂｈａｒａ ａｎｄ Ｍｉｌｌｅｒ、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５２：１４２４－１４２７（１９９１）。生じる免疫抑制は、抗原特異的かつＭＨＣ拘束性の両方であり、応答性のＣＴＬによるｖｅｔｏ細胞の一方向認識から生じるが、その逆ではこれは当てはまらない。Ｒａｍｍｅｎｓｅｅ ｅｔ ａｌ．、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１２：９３０－９３４（１９８２）；Ｆｉｎｋ ｅｔ ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１５７：１４１－１５４（１９８３）；Ｒａｍｍｅｎｓｅｅ ｅｔ ａｌ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３２：６６８－６７２（１９８４）。ｖｅｔｏ活性は、ＣＤ８α鎖の存在に関連付けられてきたので、ｖｅｔｏ機能は、ＣＤ８の発現が欠落したときに失われ、ＣＤ８α鎖が発現されるときに確立される。Ｈａｍｂｏｒ ｅｔ ａｌ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４５：１６４６－１６５２（１９９０）；Ｈａｍｂｏｒ ｅｔ ａｌ．、Ｉｎｔｅｒｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２：８８５６－８８７９（１９９０）；Ｋａｐｌａｎ ｅｔ ａｌ．、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：８５１２－８５１５（１９８９）。

【００１０】

望まれない細胞障害性Ｔ細胞応答を排除するために、この抗原特異的抑制経路を利用する多数の戦略が提案されてきた。１つのこのような戦略は、ＣＤ８のｖｅｔｏ活性を特定の標的細胞に向けさせる二次リガンドにＣＤ８またはその機能的ドメインを共有結合させる、ポリペプチドコンジュゲートの使用を含む。例えば、米国特許第５，２４２，６８７号、同第５，６０１，８２８号および同第５，６２３，０５６号を参照のこと。あるいは、ＣＤ８α鎖の細胞外ドメインに連結された、ＭＨＣクラスＩ分子に対する特異性を有するモノクローナル抗体結合部位を有するハイブリッド抗体分子が研究されてきた。Ｑｉ ｅｔ ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８３：１９７３－１９８０（１９９６）。しかし、このような分子はいくつかの欠点を持っており、実際の臨床上の有用性を未だ見出す必要がある。重要なことに、応答性のＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞集団に影響を与えるためにＣＤ４ハイブリッドが必要であるとの考えに基づいて、自己免疫疾患の治療のために、ＣＤ４およびＣＤ８の両方のハイブリッド抗体を使用するハイブリッド抗体アプローチが提案された。Ｓｔａｅｒｚ ｅｔ ａｌ．、Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｔｏｄａｙ ２１（４）：１７２－６（２０００）。

【００１１】
より最近、国際ＰＣＴ公開番号ＷＯ０２／１０２８５２は、ＭＨＣクラスＩに対する親和性が増大するように設計されたアミノ酸改変を有する可溶性ＣＤ８α鎖変異体を使用するＣＴＬの阻害を記載している。重要なことに、かつ上記先行技術と一致して、提案されたＣＤ８α組成物がクラスＩ　ＭＨＣ分子に特異的であり、したがって、ＣＤ８＋　ＣＴＬの応答のみを阻害することが予測されるということが、この文献中で教示されている。同文献の２７頁。他の免疫抑制剤との併用が、細胞性免疫応答および体液性免疫応答の他の要素（例えば、ＣＤ４＋Ｔ細胞などのＭＨＣクラスＩＩ拘束Ｔ細胞）が関係する状況において必要とされるであろうことが、さらに示唆される。同文献の２８頁。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００１２】
本発明は、誘導された自己抗原の発現または提示と共にＣＤ８αが標的で発現されると、自己抗原に対する自己免疫応答を有効かつ特異的に抑制できるという驚くべき発見に基づいている。したがって、本明細書に記載される組成物および方法を用いれば、一般的な免疫抑制剤の長期投与を必要とすることなく、自己抗原に対する宿主免疫応答の全範囲を選択的に阻害して、自己抗原に対する特異的免疫寛容を有効に生じさせることができる。本明細書に記載される組成物および方法を使用して、特異的自己反応性Ｔ細胞集団を、予防的手段として、または継続中の自己免疫応答の治療のために、阻害することができる。

【課題を解決するための手段】

【００１３】
本発明によれば、自己免疫疾患の発症を予防するためおよび自己免疫疾患を治療するための方法および組成物が提供され、これらは、標的細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで、自己抗原、およびＣＤ８ポリペプチド、好ましくはヒトＣＤ８ポリペプチド、より好ましくはＣＤ８α鎖をコードする発現ベクターと接触させることを含み、接触させた標的細胞によるＣＤ８ポリペプチドの発現と自己抗原提示とが組み合わさって、自己抗原に対する自己反応性免疫応答を選択的に阻害する。この標的細胞は、例えば、筋細胞、造血細胞、幹細胞、または自己免疫応答に供された細胞もしくはそのリスクがある細胞であり得る。好ましい実施形態において、この標的細胞は、抗原提示細胞、例えば樹状細胞であり、接触させる工程はｅｘ　ｖｉｖｏである。宿主に投与されるかまたは宿主中に存在する場合、接触させた標的細胞と同じ自己抗原を発現する他の宿主細胞の両方が保護され、自己抗原に対して応答性のＣＤ４＋Ｔ細胞およびＣＤ８＋Ｔ細胞の両方を排除することにより、それらの細胞の生存は延長される。好ましくは、本発明の組成物および方法は、このような自己抗原に対する体液性免疫応答および細胞性免疫応答の両方を阻害することが可能である。

【００１４】
一態様において、自己抗原に対する免疫応答を特異的に阻害するための方法が提供され、この方法は、標的細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで、ＣＤ８ポリペプチド、好ましくはヒトＣＤ８ポリペプチド、より好ましくはヒトＣＤ８α鎖および自己抗原をコードする発現ベクターと接触させる工程を含み、それによって、ＣＤ８ポリペプチドおよび自己抗原がこの標的細胞によって発現され、この自己抗原に対する自己免疫応答が特異的に阻害される。一実施形態において、ＣＤ８ポリペプチドおよび自己抗原は、同じ発現ベクターによってコードされる。代替的実施形態において、ＣＤ８ポリペプチドおよび自己抗原は、別個の発現ベクターによってコードされる。この自己抗原は、全長タンパク質であってもそのフラグメントであってもよく、あるいは１つまたは複数の機能的に関連するエピトープを含んでいてもよい。さらなる実施形態において、自己免疫応答には、体液性成分および細胞性成分の両方が含まれる。好ましい実施形態において、この自己免疫応答は、一般的な免疫抑制剤を必要とすることなく、有効に阻害される。

【００１５】
別の態様において、自己抗原に対する免疫応答を特異的に阻害するための方法が提供さ

れ、この方法は、標的細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏで、自己抗原タンパク質またはペプチド、およびＣＤ８ポリペプチド、好ましくはヒトＣＤ８ポリペプチド、より好ましくはヒトＣＤ８α鎖をコードする発現ベクターと接触させる工程を含み、それによって、この自己抗原の提示と共に、ＣＤ８ポリペプチドが標的細胞によって発現され、この自己抗原に対する自己免疫応答が特異的に阻害される。この自己抗原は、全長タンパク質であってもそのフラグメントであってもよく、あるいは１つまたは複数の機能的に関連するエピトープを含んでいてもよい。好ましい実施形態において、この標的細胞は、造血細胞、特にリンパ球または抗原提示細胞である。特に好ましい実施形態において、接触させる工程はｅｘ　ｖｉｖｏで実施される。

【００１６】

別の態様において、標的細胞に対する自己免疫応答を阻害するための組成物が提供され、この組成物は、ＣＤ８ポリペプチド、好ましくはヒトＣＤ８ポリペプチド、より好ましくはヒトＣＤ８α鎖およびこの標的細胞に関連する自己抗原をコードする発現ベクターを含む。一実施形態において、ＣＤ８ポリペプチドおよび自己抗原は、同じ発現ベクターによってコードされる。別の実施形態において、ＣＤ８ポリペプチドおよび自己抗原は、別個の発現ベクターによってコードされる。代替的実施形態において、この組成物は、ＣＤ８ポリペプチドをコードする発現ベクターと併用して、自己抗原タンパク質またはポリペプチドを含む。

【００１７】

自己抗原を発現する細胞の生存を延長させるための方法もまた提供され、この方法は、細胞を、ＣＤ８ポリペプチドおよび自己抗原をコードする発現ベクターと接触させる工程を含み、このＣＤ８ポリペプチドおよび自己抗原はこの細胞によって発現され、それによって、この細胞の生存時間が延長される。

【００１８】

本発明の方法および組成物において使用するのに好ましいＣＤ８ポリペプチドは一般に、ＣＤ８α鎖、より好ましくはＣＤ８α鎖の細胞外ドメイン、そしてより好ましくはＣＤ８α鎖のＩｇ様ドメインを含むであろう。代替的な好ましい実施形態において、このＣＤ８ポリペプチドは、ＣＤ８α鎖の細胞外ドメインおよび膜貫通ドメイン、またはより好ましくはＣＤ８α鎖のＩｇ様ドメインおよび膜貫通ドメインを含むか、またはこれらから本質的になり得る。特に好ましい実施形態において、この膜貫通ドメインは、ＣＤ８α鎖の膜貫通ドメインである。本発明の発現方法の性質および上記ＣＤ８α鎖の先行技術の可溶性形態の明らかな不適切さを考慮すると、ＣＤ８α鎖膜貫通ドメインまたは適切な代替的膜貫通領域の存在が重要であると考えられる。

【００１９】

１つの好ましい実施形態において、ＣＤ８α鎖は自己抗原と同時発現される。別の好ましい実施形態において、ＣＤ８ポリペプチドを含む発現ベクターが、自己抗原タンパク質またはペプチドと同時投与される。好ましい自己抗原は、自己免疫疾患に関連するもの、例えば、Ｉ型糖尿病における（プロ）インスリン（β鎖）およびグルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）、多発性硬化症におけるミエリン塩基性タンパク質、関節リウマチにおけるＭＭＰ－１、重症筋無力症におけるコリンレセプターα鎖、自己免疫性甲状腺炎におけるサイログロブリンなどである。

【００２０】

本明細書に記載の組成物および方法の好ましい標的細胞には、例えば、筋細胞、造血起源の細胞（例えば、抗原提示細胞（例えば樹状細胞）、マクロファージ、顆粒球、赤血球、白血球、Ｂリンパ球、Ｔリンパ球など、および皮膚のランゲルハンス細胞）、幹細胞（例えば、造血幹細胞ならびに組織特異的幹細胞（即ち、ニューロン、肝臓などに運命付けられた幹細胞））、ならびに自己免疫性の攻撃のリスクがあるかまたはそれに供された細胞（例えば、膵島細胞、脳のグリア細胞、ならびに本明細書に記載される他の細胞および組織）が含まれる。

【００２１】

本発明の方法および組成物における使用が企図された適切な発現ベクターには、組換えベクターおよび非組換えベクター、ならびにウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス、アデノ随伴ウイルスのベクターなど）および非ウイルスベクター（例えば、細菌プラスミド、ファージ、リポソームなど）が含まれる。好ましい実施形態において、標的細胞の改変は、リポソーム媒介性の核酸移入ビヒクル、またはウイルス媒介性の核酸移入ビヒクル、または裸ＤＮＡによって達成され得る。

【００２２】

さらなる実施形態において、標的細胞は、本発明の免疫調節分子の機能的部分を、自己抗原またはその生物学的に活性なフラグメントと共に発現するようにｅｘ　ｖｉｖｏで誘導され、誘導された細胞を患者に注入する。この自己抗原は、発現ベクターの形態で、あるいは標的細胞の表面上に提示するためにクラスＩまたはクラスＩＩ　ＭＨＣ経路によってプロセシングされるタンパク質またはポリペプチドとして、標的細胞にデリバーされ得る。

【００２３】

複数の実施形態が開示されるが、本発明のなお他の実施形態は、本発明の例示的な実施形態を示し、記載する以下の詳細な説明から、当業者に明らかとなろう。理解されるように、本発明は、本発明の趣旨および範囲からすべて逸脱することなく、種々の明白な態様での変更が可能である。したがって、図面および詳細な説明は、本来、例示と解釈されるべきであり、限定と解釈すべきではない。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２４】

自己免疫疾患の有効かつ持続可能な治療は得がたいものであった。本発明の成功は、免疫調節分子（例えば、ＣＤ８、特にＣＤ８α鎖）および自己抗原の同時発現が、その自己抗原に対して応答性のＴ細胞を有効かつ特異的に阻害するであろうこと、したがって、両方の自己反応性免疫応答が阻害できるという、驚くべき発見に基づいている。

【００２５】

それにより、本発明は、自己抗原を発現する宿主細胞に対する免疫応答を阻害するための組成物および方法を提供し、これらは、免疫調節分子、好ましくはＣＤ８ポリペプチド、より好ましくはＣＤ８α鎖のすべてまたは機能的部分を、自己抗原の少なくとも１つのエピトープと合わせ、標的宿主細胞中で同時発現させることを含む。好ましい実施形態において、馴化工程は、宿主細胞を、本明細書に記載されるようなＣＤ８ポリペプチドおよび自己抗原の少なくとも１つのエピトープをコードする発現ベクターと接触させることを含む。本発明はさらに、標的細胞に対する免疫応答を有効かつ特異的に阻害するために、標的細胞中のＣＤ８の発現レベルを調節するための、例えば、ＣＤ８発現の増大を生じる転写アクチベータを提供するための、代替的な馴化方法をさらに企図する。例えば、Ｍｏｒｔｌｏｃｋ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎｕｃ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．３１：１５２（２００３）；Ｍｉｚｕｇｕｃｈｉ　ｅｔ　ａｌ．、Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．１４：１２６５－７７（２００３）を参照のこと。本発明の方法および組成物によって達成される免疫阻害の特異性および選択性は、従来の免疫抑制戦略（免疫系の全般的かつ非特異的な阻害を典型的に生じ、それにより、外来性の感染、そしてある場合には変異原性および癌に対し、宿主を高度に感受性のままにする）を超える有意な改善を提供する。

【００２６】

本明細書に記載される方法は、単独で、または当該分野で公知の他の方法（例えば、他の活性剤（例えば、治療剤もしくは予防剤、および／または一般的な免疫抑制剤（例えば、シクロスポリン、ＦＫ５０６）、Ｔ細胞除去抗体（例えば、ＯＫＴ３、ポリクローナル抗胸腺細胞調製物））の投与など）と併用して、使用できる。好ましくは、このような剤の使用は、本発明の組成物および方法を使用して得られる自己抗原特異的な免疫抑制に関しては不要である。

【００２７】

「阻害」は、細胞性（例えば、白血球動員）であろうと体液性であろうと、自己抗原に

対する自然免疫応答または獲得免疫応答の、直接的または間接的な、部分的または完全な、阻害および／または低減を意味する。阻害は、免疫細胞が自己抗原をそれ以上標的化しないように、免疫細胞に対して変化をシグナル伝達することによって、免疫応答を予防することを含むことができる。あるいは、阻害は、免疫細胞のアネルギーおよび／または死（例えばアポトーシス）を生じるシグナルを提供することを含むことができる。

【００２８】

「免疫応答」は、好ましくは、細胞性免疫応答または体液性免疫応答などの、獲得免疫応答を意味する。

【００２９】

「特異的免疫阻害」または「抗原特異的免疫阻害」は、抗原特異的でない全般的な免疫阻害とは逆の、自己抗原などの抗原に対する免疫応答の阻害を意味する。したがって、例として、患者によって以前に認識された自己抗原に対する細胞性および／または体液性の自己免疫応答が存在しないことは、他の抗原に対するｉｎ　ｖｉｖｏ免疫能の証拠と組み合わせて、自己抗原の特異的免疫阻害を実証しよう。

【００３０】

「発現ベクター」は、標的細胞への核酸のデリバリーのための任意のビヒクルを意味する。発現ベクターは一般に、ウイルスベクターと非ウイルスベクターに分けることができる。ウイルスベクターは、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターなどを意味するが、これらに限定されない。非ウイルスベクターは、プラスミドベクター、裸ＤＮＡ、異なる担体に連結した裸ＤＮＡ、またはリポソームもしくは他の脂質調製物と結合したＤＮＡを意味する。一般に、発現ベクターは組換え体であるが、ある実施形態、例えばリポソームまたは細胞除去（例えば、バイオロスティック（ｂｉｏｌｏｓｔｉｃ）技術）が使用される場合、発現ベクターは組換え体ではない。本明細書中での使用に好ましい組換えベクターは、プラスミドベクター、ならびにアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターからなる群より選択されるウイルスベクターである。組換えウイルスベクター、および特にアデノウイルスベクターを利用するいくつかの実施形態において、カプシド（例えば、アデノウイルスカプシドのヘキソンタンパク質）の免疫原性は、当該分野で公知の方法に従って低減され得るが、このような改変は、本明細書中に詳述される改善を考慮すれば、もはや必要ではない。

【００３１】

「接触」は、ベクターと細胞との間の物理的接触をもたらすような様式および量で、発現ベクターを投与することを意味する。ベクターが組換えウイルス粒子である場合、望ましくは、ウイルスベクターによる細胞への付着および細胞の感染が、このような物理的接触によってもたらされる。ウイルスベクターが組換えウイルス粒子以外（例えば、非カプセル化ウイルス核酸または他の核酸）である場合、望ましくは、核酸による細胞への侵入がもたらされる。

【００３２】

このような「接触」は、ベクターと標的細胞との見かけの触れ合い（ｔｏｕｃｈｉｎｇ）または接触状態（ｔａｎｇｅｎｃｙ）をもたらすことができる、当業者に公知のおよび本明細書に記載される任意の手段によって実施できる。所望により、ベクター（例えばアデノウイルスベクター）は、二重特異的または多重特異的な分子（例えば、抗体またはそのフラグメント）とさらに複合体化することができ、この場合、「接触」は、ベクターと二重特異的または多重特異的な分子との複合体の、標的細胞との見かけの接触または相互接触を含む。例えば、ベクターと二重特異的（多重特異的）分子とは、例えば当業者に公知の化学的手段または他の手段によって、共有結合できる。好ましくは、ベクターと二重特異的（多重特異的）分子とは、非共有結合相互作用（例えば、イオン結合、水素結合、ファンデルワールス力、および／または非極性相互作用）によって連結できる。ベクターと二重特異的（多重特異的）分子とは、小容量の同じ溶液中で混合することによって接触させることができるが、標的細胞とこの複合体とは、小容量中で接触させることは必ずし

も必要ではなく、例えばこの場合、この複合体は宿主（例えばヒト）に投与され、この複合体が血流によって標的細胞へと移動し、その細胞に選択的に結合し、その中に侵入する。ベクターと二重特異的（多重特異的）分子との接触は、好ましくは、標的細胞がベクターと二重特異的（多重特異的）分子との複合体と接触する前に実施される。

【００３３】

自己抗原

「自己抗原」は、自分自身の免疫系の標的である「自己の」抗原を意味する。自己抗原には、宿主または患者の免疫系が認識し、異物として応答する任意の自己の抗原が含まれ、例えば、自己免疫障害に関連する自己の抗原、例えば、ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）、プロテオリピドタンパク質ＰＬＰ－１、ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質、プロ－インスリン／インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）、マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ－１）、ＩＩ型コラーゲン、サイログロブリンなどが含まれる。さらに、自己抗原は、健常人または非罹患患者において存在するレベルとは異なるレベル（例えば、上昇または低減した）で宿主中に存在する可能性がある。これらには、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病およびプリオン病が含まれる。健常人または非罹患患者において存在するレベルとは異なるレベルで宿主中に存在する自己抗原に関連するいくつかの他の疾患には、肥満、骨関節炎、脊髄損傷、高血圧、消化性潰瘍疾患、加齢性の鬱、通風、偏頭痛、高脂血症および冠動脈疾患が含まれる。

【００３４】

本発明の好ましい態様によれば、発現ベクターは所望により、本明細書に記載されるような免疫調節分子をコードする少なくとも１つの導入遺伝子と共に、自己抗原の少なくとも１つのエピトープをコードする１つまたは複数の導入遺伝子を含む。あるいは、特定の実施形態において、自己抗原タンパク質またはペプチドは、ＣＤ８ポリペプチドのＤＮＡベースの発現と組み合わせて使用してもよい。この自己抗原は、全長タンパク質であってもそのフラグメントであってもよく、あるいは１つまたは複数の機能的に関連するエピトープを含んでもよい。本発明によって治療できる疾患には、多発性硬化症、Ｉ型糖尿病、重症筋無力症、自己免疫性甲状腺炎および関節リウマチなどが含まれるが、これらに限定されない。さらなる自己抗原はＮａｔｕｒｅ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　７：８（Ａｕｇ．２００１）８９９－９０５に記載されており、これは参照によって本明細書中に明示的に組み込まれる。このような疾患に関連する自己抗原を以下の表１に示す。

【００３５】

【表１－１】

表1

自己免疫疾患	自己抗原	mRNA番号	参考文献
多発性硬化症	プロテオリピドタンパク質	NM_000533	J. Neurosci Res. 2001 Feb 1;63(3):290-302
	ミエリン塩基性タンパク質	NM_002385	J Neurosci Res. 2001 Feb 63(3):290-302
	ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質	NM_006501	J. Neurochem. 88 (5), 1211-1219 (2004); J. Biol. Chem. 269 (50), 31725-31730 (1994)
	ミエリン関連糖タンパク質	NM_002361; NM_080600	J. Neuropathol. Exp. Neurol. 62 (1), 25-33 (2003); J. Neurosci. Res. 24 (2), 137-142 (1989)
	α－B－クリスタリン	NM_001885	J. Neurosci. Res. 75 (4), 516-523 (2004)

【表１－２】

	環状ヌクレオチド ホスホジエステラーゼ	NM_033133	
	ミエリンオリゴデンドロサイト 糖タンパク質	NM_002433	J Neurosci Res. 2001 Feb 63(3):290-302
1型糖尿病	プレープロインスリン／ プローインスリン／ インスリン	NM_000207	Proc Natl Acad Sci USA 2003 Sep 2;100(18):10376-81. Epub 2003 Aug 18
	グルタミン酸 デカルボキシラーゼ2 （65kDa型および67kDa型）	NM_000818	J Autoimmun. 2003 May;203):203-6
	チロシンホスファターゼ IA2、IA－2β	NM_002846	
	カルボキシペプチダーゼH		
	ヒートショックタンパク質		
	Glima 38		J. Clin. Invest. 1996 Jun; 15:97(12): 2772-83
	膵島抗原　69kDa		J. Biol. Chem; 2003 Jul; 11:278(28): 26166-73
	P52		J. Autoimmun. 1997 Aug; 1-(4): 387-94
	膵島グルコーストランスポーター GLUT－2	J03810	
ギランバレー 症候群	末梢ミエリンタンパク質I(など)		
重症筋無力症	コリンレセプターα鎖	NM_005199	Ann NY Acad Sci. 2003 Sep;998:284-307

【表１－３】

自己免疫性甲状腺炎	サイログロブリン	NM_003235	Int Rev Immunol. 2000;19(6):501-33
	甲状腺ペルオキシダーゼ	AF439430	
関節リウマチ	I型、II型、III型、IV型、V型、IX型およびXI型コラーゲン	NM_001844	J Rheumatol. 2000 Mar;27(3):589-93
	イムノグロブリン		
	フィブリン		
	フィラグリン	XM_048104	
	GP-39	NM_001276	Genomics 43 (2), 221-225 (1997)
	hnRNPs		
	マトリックスメタロプロテイナーゼMMP－1	NM_002412	J Rheumatol. 2003 Jun;30(6):1147-56
自己免疫性ブドウ膜炎	S－抗原		
	光受容体間レチノイド結合タンパク質(IRBP)	M22453	
	ロドプシン		
	リカバリン		
原発性胆汁性肝硬変	ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(2－オキソ酸デヒドロゲナーゼ)		
自己免疫性肝炎	肝臓肝細胞抗原		
	シトクロムp450		
尋常性天疱瘡	デスモグレイン－1、－3(など)	NM_001942 NM_001944	
自己免疫性胃炎	H+/K+ ATPASE		Eksp Klin Gastroenterol. 2003;(3):5-6, 116.
	内因子		
悪性貧血	内因子		

【表１－４】

多発性筋炎	ヒスチジルtRNAシンテターゼ	NM_002109	
	他のシンテターゼ		
	他の核抗原		
グレーブス病	甲状腺刺激ホルモンレセプター	NM_000369	
乾癬			
白斑症	チロシナーゼ	NM_000372	
	チロシナーゼ関連タンパク質－２	NM_000550	
全身性エリテマトーデス	全身性核抗原		
	DNA		
	ヒストン		
	リボ核タンパク質		
セリアック病	トランスグルタミナーゼ	NM_198951	J. Biol. Chem. 277 (37), 34109-34116 (2002)

【００３６】

自己抗原に関連する自己免疫疾患のいくつかの例および注目する標的組織を以下の表２に示す。

【００３７】

【表２－１】

表2

自己免疫疾患	標的組織
多発性硬化症	中枢神経系
ギランバレー症候群	末梢神経系
インスリン依存性糖尿病	膵臓の島中のβ細胞
関節リウマチ	滑膜関節
自己免疫性ブドウ膜炎	眼、ブドウ膜
原発性胆汁性肝硬変	肝臓の胆樹
自己免疫性肝炎	肝臓の胆樹
尋常性天疱瘡	皮膚の神経－筋接合部
自己免疫性胃炎	胃／壁細胞
悪性貧血多発性筋炎	胃の筋肉

【表２－２】

自己免疫性甲状腺炎	甲状腺
グレーブス病	甲状腺
乾癬	皮膚
白斑症	皮膚
全身性エリテマトーデス	
セリアック病	小腸

【００３８】

多発性硬化症

多発性硬化症（ＭＳ）は、最も一般的なＣＮＳの脱髄性障害であり、３５０，０００人のアメリカ人および世界の百万の人々が罹患している。症状の発生は典型的に、２０歳から４０歳の間で生じ、片側性の視覚障害、筋力低下、異常感覚、運動失調、眩暈、尿失禁、構音障害または精神障害（頻度が減少する順序で）の急性または亜急性の発作として顕れる。このような症状は、減速した軸索伝導に起因する負の伝導異常および異所的な活動電位の発生に起因する正の伝導異常（例えば、レルミット徴候）の両方を引き起こす脱髄の局所的病変から生じる。ＭＳの診断は、時間的に離れている、神経機能障害の客観的な臨床的証拠を生じ、ＣＮＳ白質の別個の領域に関係する、少なくとも２回の別個の神経機能障害の発作を含む病歴に基づく。ＭＳの診断を支持するさらなる客観的証拠を提供する実験室研究には、ＣＮＳ白質病変の磁気共鳴画像法（ＭＲＩ）、ＩｇＧの脳脊髄液（ＣＳＦ）オリゴクローナルバンド、および異常な応答の誘発が含まれる。ほとんどの患者が徐々に進行する再発寛解型の疾患経過を経るが、ＭＳの臨床経過は個体間で大きく異なり、生涯にわたる数回の軽い発作に限定されたものから劇症型の慢性進行性疾患までの範囲であり得る。ＩＦＮ－γ分泌能を有するミエリン－自己反応性Ｔ細胞における量的増加は、ＭＳおよびＥＡＥの病原と関連する。

【００３９】

自己免疫性脱髄疾患（例えば、多発性硬化症および実験的自己免疫性脳脊髄炎（ＥＡＥ））における自己免疫応答に関連する自己抗原は、プロテオリピドタンパク質（ＰＬＰ）；ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）；ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（ＭＯＧ）；環状ヌクレオチドホスホジエステラーゼ（ＣＮＰａｓｅ）；ミエリン関連糖タンパク質（ＭＡＧ）、およびミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質（ＭＢＯＰ）；α－Ｂ－クリスタリン（ヒートショックタンパク質）；ウイルス性および細菌性の模倣ペプチド（例えば、インフルエンザ、ヘルペスウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスなど）；ＯＳＰ（オリゴデンドロサイト特異的タンパク質）；シトルリン改変ＭＢＰ（６個のアルギニンがシトルリンに脱イミノ化されたＭＢＰのＣ８アイソフォーム）；など由来のエピトープを含むことができる。膜内在タンパク質ＰＬＰは、ミエリンの優勢な自己抗原である。ＰＬＰの抗原性の決定基は、いくつかのマウス系統で同定されており、残基１３９～１５１、１０３～１１６、２１５～２３２、４３～６４および１７８～１９１が含まれる。少なくとも２６個のＭＢＰエピトープが報告されている（Ｍｅｉｎｌ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｉｎｖｅｓｔ　９２、２６３３－４３、１９９３）。注目すべきは、残基１～１１、５９～７６および８７～９９である。いくつかのマウス系統において同定された免疫優性のＭＯＧエピトープには、残基１～２２、３５～５５、６４～９６が含まれる。本明細書中で使用される場合、用語「エピトープ」は、動物の免疫系のＢ細胞またはＴ細胞のいずれかによって認識される特定の形状または構造を有する自己抗原の一部分を意味すると理解される。

【００４０】

ヒトＭＳ患者において、以下のミエリンタンパク質およびエピトープが、自己免疫性Ｔ細胞およびＢ細胞応答の標的として同定された。ＭＳ脳のプラークから溶出した抗体は、

ミエリン塩基性タンパク質（ＭＢＰ）ペプチド８３～９７を認識した（Ｗｕｃｈｅｒｐｆｅｎｎｉｇ ｅｔ ａｌ．、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １００：１１１４－１１２２、１９９７）。抗体研究により、ＭＳ患者の約５０％がミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（ＭＯＧ）に対して反応性（対照では６～１０％）、２０％がＭＢＰに対して反応性（対照では８～１２％）、８％がＰＬＰに対して反応性（対照では０％）、０％がＭＡＧに対して反応性（対照では０％）の、末梢血リンパ球（ＰＢＬ）Ｔ細胞を有することが見出された。この研究において、１０人のＭＯＧ反応性患者のうち７人が、３つのペプチドエピトープ（ＭＯＧ １～２２、ＭＯＧ ３４～５６、ＭＯＧ ６４～９６を含む）のうち１つに集中したＴ細胞増殖応答を有した（Ｋｅｒｌｅｒｏ ｄｅ Ｒｏｓｂｏ ｅｔ ａｌ．、Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ ２７、３０５９－６９、１９９７）。Ｔ細胞およびＢ細胞（脳病変溶出Ａｂ）応答は、ＭＢＰ ８７－９９に集中した（Ｏｋｓｅｎｂｅｒｇ ｅｔ ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ ３６２、６８－７０、１９９３）。ＭＢＰ ８７～９９において、アミノ酸モチーフＨＦＦＫは、Ｔ細胞応答およびＢ細胞応答の両方の優勢な標的である（Ｗｕｃｈｅｒｐｆｅｎｎｉｇ ｅｔ ａｌ．、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ １００、１１１４－２２、１９９７）。別の研究で、残基ＭＯＢＰ ２１～３９およびＭＯＢＰ ３７～６０を含むミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質（ＭＯＢＰ）に対するリンパ球反応性が観察された（Ｈｏｌｚ ｅｔ ａｌ．、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １６４、１１０３－９、２０００）。ＭＳおよび対照の脳を染色するためのＭＯＧペプチドおよびＭＢＰペプチドの免疫金コンジュゲートを使用したところ、ＭＢＰペプチドおよびＭＯＧペプチドの両方が、ＭＳプラーク結合Ａｂによって認識された（Ｇｅｎａｉｎ ａｎｄ Ｈａｕｓｅｒ、Ｍｅｔｈｏｄｓ １０、４２０－３４、１９９６）。

【００４１】

関節リウマチ

関節リウマチ（ＲＡ）は、世界人口の０．８％が罹患している慢性自己免疫性炎症性滑膜炎である。これは、侵食性の関節破壊を引き起こす慢性炎症性滑膜炎によって特徴付けられる。ＲＡは、Ｔ細胞、Ｂ細胞およびマクロファージによって媒介される。

【００４２】

Ｔ細胞がＲＡにおいて重要な役割を果たすという証拠には、（１）滑膜に浸潤するＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の優勢、（２）シクロスポリンなどの薬物によるＴ細胞機能の抑制に関連する臨床的改善、および（３）ＲＡと特定のＨＬＡ－ＤＲ対立遺伝子との関連が含まれる。ＲＡに関連するＨＬＡ－ＤＲ対立遺伝子は、ペプチド結合およびＴ細胞への提示に関与するα鎖の３番目の超可変領域中の６７～７４位に類似のアミノ酸配列を含む。ＲＡは、滑膜関節中に存在する自己抗原を認識する自己反応性Ｔ細胞によって媒介される。ＲＡに関連する自己抗原には、ＩＩ型コラーゲン；ｈｎＲＮＰ；Ａ２／ＲＡ３３；Ｓａ；フィラグリン；ケラチン；シトルリン；ｇｐ３９を含む軟骨タンパク質；Ｉ型、ＩＩＩ型、ＩＶ型、Ｖ型、ＩＸ型、ＸＩ型コラーゲン；ＨＳＰ－６５／６０；ＩｇＭ（リウマチ因子）；ＲＮＡポリメラーゼ；ｈｎＲＮＰ－Ｂ１；ｈｎＲＮＰ－Ｄ；カルジオリピン；アルドラーゼＡ；シトルリン改変フィラグリンおよびフィブリン由来のエピトープが含まれる。改変アルギニン残基（脱イミノ化されてシトルリンを形成する）を含むフィラグリンペプチドを認識する自己抗体が、高い割合のＲＡ患者の血清中で同定されている。自己反応性Ｔ細胞およびＢ細胞の応答は共に、ある患者においては同じ免疫優性ＩＩ型コラーゲン（ＣＩＩ）ペプチド２５７～２７０に対するものである。

【００４３】

インスリン依存性糖尿病

ヒトＩ型インスリン依存性糖尿病、即ちインスリン依存性糖尿病（ＩＤＤＭ）は、膵臓ランゲルハンス島中のβ細胞の自己免疫性の破壊によって特徴付けられる。β細胞の枯渇により、血糖値を調節できなくなる。顕性の糖尿病は、血糖値が特定のレベル（通常約２５０ｍｇ／ｄｌ）を超えて上昇する際に生じる。ヒトにおいて、長い前駆症状期間が、糖尿病の発症に先行する。この期間の間、膵β細胞の機能が徐々に失われる。疾患の発生は

、インスリン、グルタミン酸デカルボキシラーゼおよびチロシンホスファターゼＩＡ２（ＩＡ２）（各々がＩＤＤＭに関連する自己抗原の例であり、本発明において使用される）に対する自己抗体の存在によって示される。

【００４４】

前駆症状段階の間に評価することができるマーカーは、膵臓における膵島炎の存在、島細胞抗体のレベルおよび頻度、島細胞表面抗体、膵β細胞上のクラスＩＩ　ＭＨＣ分子の異常な発現、血糖濃度ならびに血漿インスリン濃度である。膵臓中のＴリンパ球数、島細胞抗体および血糖の増加はこの疾患の指標であり、インスリン濃度の低下もまたこの疾患の指標である。

【００４５】

非肥満糖尿病（ＮＯＤ）マウスは、ヒトＩＤＤＭと共通した、多くの臨床的、免疫学的および病理組織学的特徴を有する動物モデルである。ＮＯＤマウスは、島の炎症およびβ細胞の破壊を自発的に発症し、これが高血糖および顕性の糖尿病を導く。ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞およびＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞は共に、糖尿病の発症に必要であるが、各々の役割は不明のままである。上で留意したように、寛容化条件下でのＮＯＤマウスへの、タンパク質としてまたはＤＮＡワクチンの形態でのインスリンまたはＧＡＤの投与は、疾患を予防し得、他の自己抗原に対する応答を下方制御できることが示されている。

【００４６】

血清中の種々の特異性を有する自己抗体の組合せが存在することは、ヒトＩ型糖尿病に対し高度に感受性であり特異的である。例えば、ＧＡＤおよび／またはＩＡ－２に対する自己抗体の存在は、対照血清からのＩ型糖尿病の同定に、約９８％の感受性、かつ９９％の特異性を有する。Ｉ型糖尿病患者の非糖尿病の１親等の親戚において、ＧＡＤ、インスリンおよびＩＡ－２を含む３種の自己抗原のうち２種に特異的な自己抗体が存在することは、５年以内のＩ型ＤＭの発生について、９０％を超える陽性の予測値を示す。

【００４７】

ヒトインスリン依存性糖尿病に関連する自己抗原には、チロシンホスファターゼＩＡ－２；ＩＡ－２β；６５ｋＤａ型および６７ｋＤａ型の両方のグルタミン酸デカルボキシラーゼ（ＧＡＤ）；カルボキシペプチダーゼＨ；インスリン；プロインスリン；ヒートショックタンパク質（ＨＳＰ）；ｇｌｉｍａ　３８；膵島抗原６９ｋＤａ（ＩＣＡ６９）；ｐ５２；２種のガングリオシド抗原（ＧＴ３およびＧＭ２－１）；ならびに膵島グルコーストランスポーター（ＧＬＵＴ２）が含まれ得る。

【００４８】

ヒトＩＤＤＭは、組換えインスリンの注射またはポンプベースのデリバリーを導くために、血糖値をモニタリングすることによって現在治療されている。食事療法および運動療法を続けて、適切な血糖の制御を達成する。

【００４９】

自己免疫性ブドウ膜炎

自己免疫性ブドウ膜炎は、米国において４００，０００人の人々が罹患していると推定される眼の自己免疫疾患であり、年間４３，０００人の新たな症例が発生する。自己免疫性ブドウ膜炎は、ステロイド、メトトレキセートおよびシクロスポリンなどの免疫抑制剤、静脈内イムノグロブリン、ならびにＴＮＦαアンタゴニストで現在治療されている。

【００５０】

実験的自己免疫性ブドウ膜炎（ＥＡＵ）は、神経網膜、ブドウ膜および眼中の関連組織を標的化するＴ細胞媒介性の自己免疫疾患である。ＥＡＵは、ヒト自己免疫性ブドウ膜炎と多くの臨床的および免疫学的特徴を共有し、フロインド完全アジュバント（ＣＦＡ）中に乳化させたブドウ膜炎惹起性（ｕｖｅｉｔｏｇｅｎｉｃ）ペプチドの末梢投与によって誘導される。

【００５１】

ヒト自己免疫性ブドウ膜炎における自己免疫性応答に関連する自己抗原には、Ｓ－抗原、光受容体間レチノイド結合タンパク質（ＩＲＢＰ）、ロドプシンおよびリカバリンが含

まれ得る。

【００５２】

原発性胆汁性肝硬変

原発性胆汁性肝硬変（ＰＢＣ）は、４０～６０歳の女性が主に罹患する器官特異的な自己免疫疾患である。この群において報告された罹患率は、１，０００人に１人に達する。ＰＢＣは、小さい肝内胆管を裏打ちする肝内胆管上皮細胞（ＩＢＥＣ）の進行性の破壊によって特徴付けられる。これが胆汁分泌の閉塞および妨害を導き、最終的な肝硬変を引き起こす。シェーングレン症候群、ＣＲＥＳＴ症候群、自己免疫性甲状腺疾患および関節リウマチを含む、上皮裏打ち／分泌系の損傷によって特徴付けられる他の自己免疫疾患との関連が報告されている。駆動抗原（ｄｒｉｖｉｎｇ　ａｎｔｉｇｅｎ）に関する注目は、５０年以上にわたってミトコンドリアに焦点を当てており、抗ミトコンドリア抗体（ＡＭＡ）の発見を導いている（Ｇｅｒｓｈｗｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｒｅｖ　１７４：２１０－２２５、２０００）；（Ｍａｃｋａｙ　ｅｔ　ａｌ．、Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｒｅｖ　１７４：２２６－２３７、２０００）。ＡＭＡは、臨床的症状が現れるずっと以前に９０～９５％の患者の血清中に存在し、すぐにＰＢＣの実験室診断の礎石となった。ミトコンドリアにおける自己抗原性の反応性は、Ｍ１およびＭ２と指定された。Ｍ２反応性は、４８～７４ｋＤａの成分のファミリーに対するものである。Ｍ２は、２－オキソ酸デヒドロゲナーゼ複合体（２－ＯＡＤＣ）の酵素の複数の自己抗原性サブユニットを示し、本発明の別の例示的自己抗原である。ＰＢＣの疾病原因におけるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体（ＰＤＣ）抗原の役割を同定する研究は、ＰＤＣがこの疾患の誘導において中心的役割を果たすという概念を支持している（Ｇｅｒｓｈｗｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｒｅｖ　１７４：２１０－２２５、２０００）；（Ｍａｃｋａｙ　ｅｔ　ａｌ．、Ｉｍｍｕｎｏｌ　Ｒｅｖ　１７４：２２６－２３７、２０００）。ＰＢＣの症例の９５％において最も頻繁な反応性は、ＰＤＣ－Ｅ２に属するＥ２　７４ｋＤａサブユニットである。２－オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体（ＯＧＤＣ）および分枝鎖（ＢＣ）２－ＯＡＤＣを含む、関連するが別個の複合体が存在する。３種の構成成分酵素（Ｅ１、２、３）が、２－オキソ酸基質をアシルコエンザイムＡ　ＣｏＡ）に変形させる触媒機能に寄与し、NAD^+が$NADH$に還元される。哺乳動物ＰＤＣは、プロテインＸまたはＥ－３結合タンパク質（Ｅ３ＢＰ）と称される、さらなる成分を含む。ＰＢＣ患者において、主要な抗原性応答は、ＰＤＣ－Ｅ２およびＥ３ＢＰに対するものである。Ｅ２ポリペプチドは、２つのタンデムに反復したリポイルドメインを含むが、Ｅ３ＢＰは単一のリポイルドメインを有する。リポイルドメインは、ＰＢＣの多数の自己抗原標的において見出され、本明細書中で「ＰＢＣリポイルドメイン」と称される。ＰＢＣは、グルココルチコイドならびにメトトレキセートおよびシクロスポリンＡを含む免疫抑制剤で現在治療されている。

【００５３】

実験的自己免疫性胆管炎（ＥＡＣ）のマウスモデルは、雌性ＳＪＬ／Ｊマウスにおいて、非化膿性破壊性胆管炎（ＮＳＤＣ）およびＡＭＡの産生を誘導する、哺乳動物ＰＤＣによる腹腔内（ｉ．ｐ．）感作を使用する（Ｊｏｎｅｓ、Ｊ　Ｃｌｉｎ　Ｐａｔｈｏｌ　５３：８１３－２１、２０００）。

【００５４】

他の自己免疫疾患および関連自己抗原

重症筋無力症に関連する自己抗原には、アセチルコリンレセプター内のエピトープが含まれ得る。尋常性天疱瘡に関連する自己抗原には、デスモグレイン－３が含まれ得る。シェーングレン症候群抗原には、ＳＳＡ（Ｒｏ）；ＳＳＢ（Ｌａ）；およびフォドリンが含まれ得る。尋常性天疱瘡について優勢な自己抗原には、デスモグレイン－３が含まれ得る。筋炎に関連する自己抗原には、ｔＲＮＡシンテターゼ（例えば、スレオニル、ヒスチジル、アラニル、イソロイシルおよびグリシル）；Ｋｕ；Ｓｃｌ；ＳＳＡ；Ｕ１　Ｓｎリボ核タンパク質；Ｍｉ－１；Ｍｉ－１；Ｊｏ－１；Ｋｕ；およびＳＲＰが含まれ得る。強皮症に関連する自己抗原には、Ｓｃｌ－７０；セントロメア；Ｕ１リボ核タンパク質；およ

びフィブリラリンが含まれ得る。悪性貧血に関連する自己抗原には、内因子；および胃Ｈ／Ｋ　ＡＴＰａｓｅの糖タンパク質βサブユニットが含まれ得る。全身性エリテマトーデス（ＳＬＥ）に関連する自己抗原には、ＤＮＡ；リン脂質；核抗原；Ｒｏ；Ｌａ；Ｕ１リボ核タンパク質；Ｒｏ６０（ＳＳ－Ａ）；Ｒｏ５２（ＳＳ－Ａ）；Ｌａ（ＳＳ－Ｂ）；カルレティキュリン；Ｇｒｐ７８；Ｓｃｌ－７０；ヒストン；Ｓｍタンパク質；およびクロマチンなどが含まれ得る。グレーブス病について、自己抗原には、Ｎａ＋／Ｉ－シンポーター；甲状腺刺激ホルモンレセプター；Ｔｇ；およびＴＰＯが含まれ得る。

【００５５】

神経変性疾患

さらに、いくつかの神経変性疾患が、健常人または非罹患患者において存在するレベルと異なるレベルで、宿主中に存在する自己抗原と関連する。これらの例を表３に示す。

【００５６】

【表３】

表3

神経変性疾患	病理学的変形	非生理学的に存在する自己抗原
アルツハイマー病	老人斑	アミロイドβタンパク質
パーキンソン病	レビー小体	α－シヌクレイン
ハンチントン病	核内封入体	ハンチンチンタンパク質
プリオン病	プリオンタンパク質封入体	プリオンタンパク質

【００５７】

アルツハイマー病

アルツハイマー病（ＡＤ）は、集団において最も一般的な神経変性疾患である（Ｃｕｍｍｉｎｇｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ　５１、Ｓ２－１７；ｄｉｓｃｕｓｓｉｏｎ　Ｓ６５－７、１９９８）。ＡＤは６５歳を超える人々の約１０％、８５歳を超える人々のほぼ５０％が罹患している。２０２５年までに、約２千２百万人の個人がＡＤに罹患すると推定されている。ＡＤは、ゆっくり進行する痴呆症によって特徴付けられる。ＡＤの最終的な診断は、痴呆症、神経原線維変化および老人斑の３兆候が死後に見出された場合になされる。老人斑は、アルツハイマー病を有する患者の脳において常に見出される。老人斑の主要成分は、アミロイドβタンパク質（Ａβ）であり（Ｉｗａｔｓｕｂｏ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎｅｕｒｏｎ　１３：４５－５３、１９９４）（Ｌｉｐｐａ　ｅｔ　ａｌ．、Ｌａｎｃｅｔ　３５２：１１１７－１１１８、１９９８）、これは本発明の自己抗原の別の例である。Ａβは、アミロイド前駆体タンパク質（ＡＰＰ）に由来する４２アミノ酸のペプチドであり、細胞増殖、接着、細胞シグナル伝達および神経突起成長を含む種々の生理学的役割を有する膜貫通糖タンパク質である（Ｓｉｎｈａ　ｅｔ　ａｌ．、Ａｎｎ　Ｎ　Ｙ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　９２０：２０６－８、２０００）。ＡＰＰは通常、Ａβドメイン内で切断されて、分泌型フラグメントを生じる。しかし、選択的スプライシングにより、ＡＰＰの切断が導かれ、老人斑内に蓄積し得る可溶性Ａβを生じる。

【００５８】

ＡＤに対する現在の治療は効力が限定されており、Ａβ蓄積に対して標的化されたものではない。利用可能な薬物は、脳におけるシナプス後アセチルコリンの濃度を増大させることを目的とした中枢性コリンエステラーゼ阻害剤である（Ｆａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｅｖａｎｓ、Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ　５１、Ｓ３６－４４；ｄｉｓｃｕｓｓｉｏｎ　Ｓ６５－７、１９９８）；（Ｈａｋｅ、Ｃｌｅｖｅ　Ｃｌｉｎ　Ｊ　Ｍｅｄ　６８、６０８－９：６１３－４、６１６、２００１）。これらの薬物は、少数の認知パラメータのみにおいて最小の臨床利益を提供する。ヒトＡβについてのトランスジェニックマウスは、ヒトＡＤと

共通する多数の特徴を有することが示されている（Ｇａｍｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ　３７３：５２３－５２７、１９９５）；（Ｈｓｉａｏ　ｅｔ　ａｌ．、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７４：９９－１０２、１９９６）。これらのトランスジェニックマウスにおいて、Ａβペプチドによる免疫は、認知の改善および病理組織学の低減に関し、実証された効力を有している（Ｍｏｒｇａｎ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ　４０８：９８２－９８５、２０００）；（Ｓｃｈｅｎｋ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ　４００：１７３－１７７、１９９９）。研究により、アルツハイマー病の動物モデルにおいてペプチドワクチンを用いてＡβに対する抗体応答を生じさせることによって、これらのモデルにおいて観察された異常な病理組織学ならびに挙動変化を逆転させることができることもまた、示されている（Ｂａｒｄ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎａｔ　Ｍｅｄ　６：９１６－１９、２０００）；（ＤｅＭａｔｔｏｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ　９８：８８５０－８８５５、２００１）。

【００５９】

パーキンソン病

パーキンソン病は、１００，０００人当たり１２８～１６８人という非常に高い罹患率を有する、錐体外路運動系の神経変性疾患である（Ｓｃｈｒａｇ　ｅｔ　ａｌ．、Ｂｍｊ　３２１：２１－２２、２０００）。主要な臨床的特徴は、安静時振戦、動作緩慢、硬直および姿勢不安定である。痴呆症もまた、その後期においてほとんどの症例で生じる。病態生理学的特徴は、脳の錐体外路系内、および特に黒質内のニューロンの喪失である。パーキンソン病を有する患者の脳内の多数のニューロンは、レビー小体として知られる細胞内封入体を有する（Ｆｏｒｎｏ　ａｎｄ　Ｎｏｒｖｉｌｌｅ、Ａｃｔａ　Ｎｅｕｒｏｐａｔｈｏｌ（Ｂｅｒｌ）３４：１８３－１９７、１９７６）。レビー小体の主要な構成成分は、α－シヌクレインとして公知のタンパク質であることが見出されており、これは本発明の自己抗原の別の例である（Ｄｉｃｋｓｏｎ、Ｃｕｒｒ　Ｏｐｉｎ　Ｎｅｕｒｏｌ　１４：４２３－４３２、２００１）。α－シヌクレインを含むレビー小体の蓄積は、疾患表現型と相関していた。

【００６０】

パーキンソン病に対する現在の治療は、内在する原因ではなく、疾患の結果として起こる症状を管理することを目的としている（Ｊａｎｋｏｖｉｃ、Ｎｅｕｒｏｌｏｇｙ　５５：Ｓ２－６、２０００）。パーキンソン病に対する入手可能な薬物は、ドパミン作動性剤（例えば、カルビドパ／レボドパおよびセレギリン）、ドパミンアゴニスト（例えば、ペルゴリドおよびロピニロール）、およびカテコール－ｏ－メチル－トランスフェラーゼ、即ちＣＯＭＴ阻害剤（例えば、エンタカポンおよびトルカポン）として分類される。これらの治療剤のすべては、罹患したニューロンにおいて利用可能なドパミンの量を増加させることを目的としている。全体として、これらの薬物は、振戦および硬直などの運動症状のいくつかを低減させることにおいてほとんどの患者において最初は有効であるが、黒質のニューロンの破壊を導く神経変性プロセスの進行を減弱するのには有効でない。

【００６１】

ハンチントン病

ハンチントン病は、常染色体優性様式で遺伝する遺伝性障害であり、ハンチンチンと呼ばれる遺伝子内に含まれるＣＡＧトリヌクレオチドリピートの長さの異常な伸長と関連している（Ｃｅｌｌ　７２、９７１－９８３、１９９３）。優勢な臨床的特徴は、舞踏病と呼ばれる異常な制御不能な運動および進行性の痴呆症からなる。病態生理学的には、選択的なニューロンの死、ならびに線条体および大脳皮質内の変性が存在する。これらの領域内のニューロンは、変異体タンパク質ハンチンチン（本発明の別の自己抗原である）の細胞内凝集体を蓄積することが示されており、この蓄積が疾患表現型と相関している。（ＤｉＦｉｇｌｉａ　ｅｔ　ａｌ．、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２７７：１９９０－１９９３、１９９７）；（Ｓｃｈｅｒｚｉｎｇｅｒ　ｅｔ　ａｌ．、Ｃｅｌｌ　９０：５４９－５５８、１９９７）；（Ｄａｖｉｅｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｃｅｌｌ　９０：５３７－５４８、１９９７）。

【００６２】
ハンチントン病の症状または病原原因のいずれかに対する利用可能な治療は現在存在しない。結果として、これらの患者は、症状の最初の発症の平均１７年後の不可避的な死まで、ゆっくりと進行する。
【００６３】
プリオン病
プリオン病は、伝染性海綿状脳症としても公知であり、動物およびヒトが罹患する潜在的に感染性の疾患であり、脳の海綿状の変性によって特徴付けられる（Ｐｒｕｓｉｎｅｒ、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ９５、１３３６３－８３、１９９８）。この障害の最も一般的な形態は、クロイツフェルト－ヤコブ病とも称される。新変異型クロイツフェルト－ヤコブ病と呼ばれる疾患の別の形態は、異種間の伝染（例えばウシからヒトへの）によって引き起こされると考えられているので、主要な環境衛生上の意味を有する。この群の障害の臨床的特徴には、迅速に進行する痴呆症、筋クローヌス、脱力感および運動失調が含まれる。病態生理学的には、正常なプリオンタンパク質（本発明の別の自己抗原である）におけるコンフォメーション変化が、プリオンタンパク質のβシート型構造への蓄積を引き起こし、中枢神経系内で見られる変性を導くことが、文献中に報告されている。現在、プリオン病に対する利用可能な治療は存在しない。臨床経過は迅速であり、不可避的な死が通常は診断の２年以内であり、この経過を変更できる介入は存在しない。
【００６４】
さらに、いくつかの他の疾患が、健常人または非罹患患者において存在するレベルとは異なるレベルで宿主中に存在する自己抗原と関連する。これらの例を表４中に示す。
【００６５】
【表４－１】

表4

疾患	異常	疾患に関連し、かつ 非生理学的に存在する自己抗原
肥満	消費を上回るエネルギー 摂取に起因する体重増加	シンデカン－3、ペリリピン、オレキシン、 ガラニン、グルカゴン様ペプチドレセプター
骨関節炎	軟骨変性	カテプシン、プラスミン、コラゲナーゼ、 メタロプロテイナーゼ
脊髄損傷	再生の阻害	Nogo-1
高血圧	持続性の高い血圧	アンギオテンシン変換酵素
消化性潰瘍疾患	過剰な胃酸	H^+/K^+ ATPase、ガストリン
加齢		スーパーオキシドジスムターゼ
鬱病	過剰なセロトニン	セロトニン5HT2レセプター、 α１－アドレナリンレセプター
痛風	過剰な尿酸	キサンチンオキシダーゼ

【表４－２】

偏頭痛	血管攣縮	セロトニン5HT1Bおよび 5HT1Dレセプター
高脂血症	上昇した脂質	HMG CoA－レダクターゼ、 アポリポタンパク質A、B－100
冠動脈疾患	血流を制限する 冠状動脈の閉塞	アンギオテンシン変換酵素、 アポリポタンパク質A

【００６６】

骨関節炎および変性性関節疾患

骨関節炎（ＯＡ）は、６０歳を超える人々の３０％が罹患しており、ヒト最も一般的な関節疾患である。骨関節炎は、滑膜関節の変性および不全を示し、関節軟骨の破壊を伴う。

【００６７】

軟骨は、主にプロテオグリカン（負荷に耐える硬さおよび能力を提供する）およびコラーゲン（剪断強度に対する張力および抵抗性を提供する）からなる。軟骨細胞は、潜在性のコラゲナーゼ、潜在性のストロメライシン、潜在性のゼラチナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーターおよび他の関連酵素（これらは各々本発明での使用のための自己抗原である）を産生および分泌することにより、ターンオーバーし、正常な軟骨を再構築する。メタロプロテイナーゼの組織阻害剤（ＴＩＭＰ）およびプラスミノーゲンアクチベーター阻害剤（ＰＡＩ－１）を含むいくつかの阻害剤もまた軟骨細胞によって産生され、中性メタロプロテイナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーターおよび他の酵素の分解活性を制限する。これらの分解性酵素および阻害剤もまた、本発明での使用のための自己抗原である。これらの分解性酵素および阻害剤は、正常な軟骨の再構築および維持を協調させる。ＯＡにおいて、このプロセスの調節不全が、軟骨の変質および分解を生じる。

【００６８】

初期ＯＡにおいて、コラーゲン線維の配置およびサイズの異常な変化が存在する。メタロプロテイナーゼ、カテプシンおよびプラスミンは、単独または併用して本発明の自己抗原であり、有意な軟骨基質喪失を引き起こす。最初に、プロテオグリカンおよび軟骨の増大した軟骨細胞産生により、正常よりも厚い関節軟骨が生じる。次いで、関節軟骨は、コラゲナーゼ、ストロメライシン、ゼラチナーゼ、組織プラスミノーゲンアクチベーターおよび他の関連酵素（単独または併用して本発明の自己抗原である）を含む分解性酵素の作用の結果として、薄くなり軟化する。ＩＬ－１、カテプシンおよびプラスミンは、単独または併用して本発明の自己抗原であり、軟骨の変性および破壊を促進し得る。より軟化し薄くなった軟骨は、機械的応力による損傷に対してかなりより感受性である。これらの因子は、軟骨表面の破壊および垂直な割れ目の形成（細動）を導く。軟骨表面において侵食が形成され、疾患の最終段階においては骨まで達する。軟骨細胞は最初に複製してクラスターを形成し、最終段階では軟骨は低細胞性である。骨の再構築および肥大が、ＯＡの顕著な特徴である。

【００６９】

ＯＡに対する現在の治療には、安静、関節を支持する筋肉を強化するための理学療法、ブレスおよび関節を安定化させるための他の支持デバイス、非ステロイド性抗炎症剤ならびに他の鎮痛剤が含まれる。日常生活動作に必須な関節（例えば、膝または股関節）の末期の骨同士が擦れ合うＯＡでは、手術による関節置換がしばしば実施される。

【００７０】

肥満

肥満は、米国および他の先進国が直面している主要な健康問題である。肥満は米国人口の２０％が罹患していると推定される。肥満は、脂肪組織の過剰である。延長されたエネルギー摂取が延長された期間にわたって支出を超えると、過剰なカロリーは脂肪組織とし

て貯蔵され、肥満を生じる。このように、肥満は、増加した摂取および／または減少した支出から生じ得る。摂取は、大脳皮質によって制御される複雑なプロセスである摂食挙動に依存する。摂食中枢および満腹中枢を含む視床下部の別個の領域が、大脳皮質にシグナルを送り、摂食の調節を促進する。血糖、インスリン、グリセロールなどのレベルは、視床下部中の摂食中枢および満腹中枢によって検出されて、摂食挙動の調節を助け得る。

【００７１】

ヒトは、いくつかの機構によってカロリーの過剰摂取に対して部分的に適応できる。炭水化物およびタンパク質の過剰摂取は、トリヨードサイロニン（Ｔ３）の血漿レベルを増大させ、逆Ｔ３（ｒＴ３）のレベルを減少させる機構を介して、安静時の代謝率を増大させることによって、部分的に補償され得る。中枢または末梢の交感神経出力の増大もまた、カテコールアミン誘導性のカロリー使用および熱産生を増大させる。食事性の熱発生または食物に対する身体の熱応答は、食事摂取の後数時間にわたる増大した熱および安静時代謝率を上回る代謝支出を伴い、これは、炭水化物および脂肪ベースの食事よりも、タンパク質ベースの食事についてより高い。

【００７２】

摂食挙動および脂肪生成は、複雑な機構によって制御される。シンデカン－３を含む分子が摂食を調節し、視床下部における摂食挙動を増大させる（Ｒｅｉｚｅｓ ｅｔ ａｌ、Ｃｅｌｌ １０６：１０５－１１６、２００１）。食物摂取および代謝に影響を与える他の分子およびレセプターには、オレキシン、ガラニン、コルチコトロピン放出因子、メラニン凝集ホルモン、レプチン、コレシストキニン、ソマトスタチン、エンテロスタチン、グルカゴン様ペプチド１および２、ならびにボンベシン（これらはすべて、単独または併用のいずれかで、本発明における使用のための自己抗原である）が含まれる（Ｃｈｉｅｓｉ ｅｔ ａｌ、Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、２２：２４７－５４、２００１）。肥満の動物モデルにおいて、これらの分子のうちいくつかのアンタゴニストまたはアゴニストが、体重減少において有効であることが実証されている（Ｃｈｉｅｓｉ ｅｔ ａｌ、Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、２２：２４７－５４、２００１）。ペリリピンは、脂肪細胞の脂肪滴を被覆し、トリアシルグリセロール加水分解を調節し、ペリリピンによる干渉によって、食事誘導性肥満に対して抵抗性であるが正常な耐糖能を有するマウスが生じた（Ｔａｎｓｅｙ ｅｔ ａｌ、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９８：６４９４－９９）。

【００７３】

肥満が二次的な代謝性または他の疾患状態に対して二次的である場合、二次的な原因を治療する。原発性肥満は、カロリー摂取を低減させるための食事療法および摂食挙動変更、ならびに支出を増大させるための運動療法によって治療する。食欲抑制剤（アンフェタミン様剤）、甲状腺ホルモン薬物、およびヒト絨毛性ゴナドトロピンが、肥満を治療するために使用されてきた。小腸バイパス手術（空回腸シャント）もまた、病的肥満の重篤な症例を治療するために使用される。

【００７４】

脊髄損傷

米国で毎年約１１，０００人の脊髄損傷の新たな症例が存在し、全体的な罹患率は現在米国において合計１８３，０００～２３０，０００症例であると推定される（Ｓｔｏｖｅｒ ｅｔ ａｌ．、Ａｒｃｈ Ｐｈｙｓ Ｍｅｄ Ｒｅｈａｂｉｌ ８０、１３６５－７１、１９９９）。脊髄損傷から回復することは非常に少なく、荒廃的な不可逆的神経性能力障害を生じる。急性脊髄損傷の現在の治療は、例えば外科的介入による損傷部位の機械的安定化、および非経口ステロイドの投与からなる。これらの介入は、脊髄損傷後の永続的な麻痺の発生を低減させるためには、ほとんど実施されてこなかった。慢性脊髄損傷の治療は、生活の質の維持、例えば疼痛、痙攣および膀胱機能の管理に焦点を当てている。神経性機能の回復を扱う現在利用可能な治療は存在しない。

【００７５】

脊髄損傷後のこのような低い回復の原因である因子の１つは、ミエリン鞘中の軸索再生阻害剤の存在である。これらの因子は、損傷後すぐに放出され、軸索が病変を横切って成長して機能的接続を再確立するのを防止する。これらの軸索再生阻害剤の１つは、Ｎｏｇｏ－Ａと呼ばれるタンパク質であり、これは本発明の自己抗原である（Ｈｕｂｅｒ ａｎｄ Ｓｃｈｗａｂ、Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ ３８１、４０７－１９．、２０００；Ｒｅｉｌｌｙ、Ｊ Ｎｅｕｒｏｌ ２４７、２３９－４０、２０００；Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．、Ｎａｔｕｒｅ ４０３、４３４－９、２０００）。Ｎｏｇｏ－Ａは、神経突起成長を阻害することがｉｎ ｖｉｔｒｏで示されており、Ｎｏｇｏ－Ａに対する中和抗体は、この成長阻害特性を逆転することが示されている。さらに、Ｎｏｇｏ－Ａに対するモノクローナル抗体は、脊髄損傷の動物モデルにおいてｉｎ ｖｉｖｏで軸索再生を促進することが示されている（Ｒａｉｎｅｔｅａｕ ｅｔ ａｌ．、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ ９８、６９２９－３４．、２００１；Ｍｅｒｋｌｅｒ ｅｔ ａｌ．、Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ ２１、３６６５－７３、２００１；Ｂｌｏｃｈｌｉｎｇｅｒ ｅｔ ａｌ．、Ｊ Ｃｏｍｐ Ｎｅｕｒｏｌ ４３３、４２６－３６、２００１；Ｂｒｏｓａｍｌｅ ｅｔ ａｌ．、Ｊ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ ２０、８０６１－８、２０００）。Ｎｏｇｏ－Ａは、大脳皮質および脊髄内のオリゴデンドロサイトにおいて主に発現される膜貫通タンパク質である。Ｎｏｇｏ－Ａ分子の２つの領域（即ち、細胞外の６６アミノ酸のループおよびＡＳ４７２と称される細胞質内のＣ末端領域）が、この分子の阻害能を潜在的に担うとして同定されている。

【００７６】

分子模倣

感染性因子もまた、自己抗原を検出するＴ細胞の能力に影響を与えることが知られており、これは分子模倣の結果である。理論に束縛されることなく、自己の抗原に密接に関連する感染性病原体由来の抗原は、自己の抗原に対する免疫応答を誘導して、見かけの自己免疫疾患を生じ得ると考えられている。したがって、このような感染性因子由来の抗原もまた、本明細書に記載されるようなＣＤ－８を提供する場合に使用を見出す。分子模倣の結果として自己免疫疾患を引き起こす感染性因子の例は、Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、７：８（Ａｕｇ、２００１）、ｐｐ：８９９－９０５中に示され、この文献は、参照によって本明細書中に明示的に組み込まれる。

【００７７】

いくつかの実施形態において、全長自己抗原を本発明の免疫調節分子と同時発現させる必要はない。この実施形態において、自己抗原の少なくとも１つのエピトープを、本発明の免疫調節分子と同時発現させる。好ましい実施形態において、このエピトープは、少なくとも約３アミノ酸長、好ましくは少なくとも約５アミノ酸長、最も好ましくは少なくとも約８アミノ酸長である。さらに、全長自己抗原の他の短縮型を、免疫調節分子と同時発現させることができる。自己抗原の一部分またはフラグメントを発現させる場合、融合タンパク質としてフラグメントを発現させて、所望の標的細胞に応じて、自己抗原エピトープの適切な標的化および／またはプロセシングを確実にすることが望ましいことがある。いくつかの実施形態において、例えば、少なくとも１つのエピトープを含むポリペプチドが標的細胞の原形質膜に達するのを確実にするために、本明細書に記載されるようなシグナルペプチドまたはリーダーペプチドに融合されたフラグメントを含む融合タンパク質を発現させることが必要であり得る。シグナル配列は典型的に、当該分野で周知のように、細胞からのタンパク質の分泌を指示する疎水性アミノ酸からなるシグナルペプチドをコードする。さらに、そして再度所望の標的細胞に応じて、融合タンパク質がそれを発現する標的細胞と結合したままであることを確実にするために、融合タンパク質中の膜貫通領域または他の膜アンカードメインを含むことが望ましいことがある。一実施形態において、膜貫通は、自己抗原に天然である必要はない。この実施形態において、「合成膜貫通ドメイン」は、約２０～２５個の疎水性アミノ酸と、その後に少なくとも１つ、そして好ましくは２つの荷電アミノ酸とを含む。

【００７８】

免疫調節分子が、治療用導入遺伝子（例えば自己抗原）を含みかつ発現するベクターとは別個のベクター中に含まれる遺伝子によってコードされる場合、類似または同一の型のベクターが使用され、かつ接触効果のタイミングが細胞と接触したベクターに対する免疫応答を阻害するのに十分である限り、この免疫調節分子を含むベクターは、この遺伝子を含みかつ発現するベクターと細胞との接触の前、接触と同時または接触に引き続いて、細胞と接触させることができる。しかし、好ましくは、このベクターは、免疫調節分子と、自己抗原またはそのエピトープもしくは他のフラグメントをコードする配列との両方をコードする。免疫調節分子および治療用導入遺伝子の両方が同じベクターで発現される場合、好ましくは、それぞれのインサートは別個の制御エレメントの制御下にある。この実施形態において、発現系は、２つの発現カセットを含むか、または２つの核酸の同時発現を可能にする単一のカセット（バイシストロニック単位）を含むかのいずれかである。系が２つの発現カセットを含む場合、これらは同一または異なるプロモーターを使用できる。

【００７９】

発現系がベクター内に免疫調節分子および治療用導入遺伝子を含む場合、同一または類似の強度のプロモーター、および同一または類似のコピー数の核酸を使用できる。一般に、ｉｎ　ｖｉｖｏで産生される２つの導入遺伝子のそれぞれの量は、十分に近い。しかし、特定の状況において、異なる量の各導入遺伝子を産生することが好ましい場合がある。この場合、異なる強度のプロモーターもしくは異なる遺伝子のコピー数が存在する系のいずれかを使用することか、または投与される用量を変化させることが可能である。

【００８０】

一実施形態において、治療用分子（例えば自己抗原）は、標的細胞の表面上での提示のためのクラスＩまたはクラスＩＩ　ＭＨＣ経路を介したプロセシングのために、タンパク質またはポリペプチドの形態で標的細胞にデリバーされる。全長タンパク質またはその免疫原性フラグメントのいずれかが標的細胞にデリバーされる。この実施形態において、免疫調節分子は好ましくは、本明細書に記載されるような発現系で標的細胞にデリバーされる。

【００８１】

一実施形態において、治療用自己抗原は、ＭＨＣクラスＩ分子および／またはクラスＩＩ分子との融合タンパク質として提供されるか、あるいはこのような融合タンパク質をコードする核酸である。この実施形態において、自己抗原ならびにＭＨＣクラスＩ分子およびクラスＩＩ分子は、自己抗原が好ましくは共有結合によってＭＨＣ分子に連結されるように操作される。いくつかの実施形態において、自己抗原は、当該分野で公知のように、ＭＨＣ分子に直接（例えば隣接して）連結される。例えば、Ｍｏｔｔｅｚ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８１：４９３－５０２（１９９５）を参照のこと。別の実施形態において、ペプチドリンカーが含まれるがこれに限定されないリンカーが、自己抗原とＭＨＣ分子との間に含められ、この技術もまた当該分野で公知である。例えば、Ｋｏｚｏｎｏ　ｅｔ　ａｌ．、ｎａｔｕｒｅ　３６９：１５１－１５４（１９９４）；Ｗｈｉｔｅ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６２：２６７１－７６（１９９９）を参照のこと。このような融合タンパク質は、米国特許第６，２１１，３４２号中により詳細に記載されており、その開示は、参照により本明細書中に明示的に組み込まれる。

【００８２】

「標的細胞」は、単一の実体として存在し得るか、または細胞のより大きな集合の一部であり得る。このような「細胞のより大きな集合」は、例えば、細胞培養物（混合または純粋のいずれか）、組織（例えば、上皮または他の組織）、器官（例えば、心臓、肺、肝臓、胆嚢、膀胱、眼または他の器官）、器官系（例えば、循環器系、呼吸器系、消化器系、泌尿器系、神経系、外被系または他の器官系）、または生体（例えば、トリ、哺乳動物、特にヒトなど）を含むことができる。好ましくは、標的化される器官／組織／細胞は、造血起源（例えば、樹状細胞、マクロファージ、赤血球、白血球、Ｔリンパ球およびＢリンパ球などが含まれるがこれらに限定されない）のものであり、かつ／または造血幹細胞もしくは他の組織特異的幹細胞であり得る。幹細胞を培養および使用する方法は、米国特

許第５，６７２，３４６号、同第６，１４３，２９２号および同第６，５３４，０５２号中により詳細に開示されており、これらは参照によって本明細書中に組み込まれる。

【００８３】

特に、ウイルスベクターまたはプラスミドなどの発現ベクターが接触する標的細胞は、接触した標的細胞が、発現ベクターによって標的化され得る特定の細胞表面結合部位を含んでいる点で、別の細胞とは異なる。「特定の細胞表面結合部位」とは、ベクター（例えばアデノウイルスベクター）が細胞に付着し、それによって細胞に侵入するために相互作用できる、細胞の表面上に存在する任意の部位（即ち、分子または分子の組合せ）を意味する。したがって、特定の細胞表面結合部位は、細胞表面レセプターを包含し、好ましくは、これはタンパク質（改変タンパク質を含む）、炭水化物、糖タンパク質、プロテオグリカン、脂質、ムチン分子またはムコタンパク質などである。潜在的な細胞表面結合部位の例には、グルコサミノグリカン上で見出されるヘパリンおよびコンドロイチン硫酸部分；ムチン、糖タンパク質およびガングリオシド上に見出されるシアル酸部分；主要組織適合複合体Ｉ（ＭＨＣ　Ｉ）糖タンパク質；膜糖タンパク質中に見出される一般的な炭水化物分子（マンノース、Ｎ－アセチル－ガラクトサミン、Ｎ－アセチル－グルコサミン、フコースおよびガラクトースを含む）；糖タンパク質（例えば、ＩＣＡＭ－１、ＶＣＡＭ、Ｅ－セレクチン、Ｐ－セレクチン、Ｌ－セレクチンおよびインテグリン分子）；ならびに癌性細胞上に存在する腫瘍特異的抗原（例えば、ＭＵＣ－１腫瘍特異的エピトープなど）が含まれるが、これらに限定されない。しかし、アデノウイルスなどの発現ベクターを細胞に標的化することは、細胞相互作用の任意の特定の機構（即ち、所定の細胞表面結合部位との相互作用）に限定されない。

【００８４】

一実施形態において、発現ベクターの標的細胞特異性は、ベクターのシュードタイピングによって、野生型ベクターに対して変更される。シュードタイピングとは、ベクターに対して標的細胞特異性を付与する他の標的細胞特異的結合部分が、発現ベクター中に含まれることを意味する。このような標的細胞特異的結合部分には、野生型ベクターと比して異なる細胞を標的化するタンパク質、抗体フラグメントもしくは他の結合部分（例えば、ロイシンジッパー）、またはビオチン－アビジン結合部位をコードする遺伝子が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、この標的細胞特異的結合部分は、例えば細胞表面分子または細胞表面結合抗体に付着するために抗カプシド抗体を使用して、他の標的化分子が容易に付着され得るように、ウイルスカプシド中に組み込まれる。シュードタイピングベクターのさらなる例は、米国特許第６，７３４，０１４号、同第６，７８３，９８１号および同第６，７６２，０３１号中に示され、これらの開示は、参照によって本明細書中に明示的に組み込まれる。本発明の発現ベクターおよび方法は、このようなシュードタイピング改変ならびに当業者に周知の他の標的化改変および技術を、有利に含むことができる。一般的には、Ｃｕｒｉｅｌ ａｎｄ Ｄｏｕｇｌａｓ、Ｅｄｓ．、Ｖｅｃｔｏｒ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｆｏｒ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ Ｇｅｎｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ（Ｗｉｌｅｙ－Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．２００２）を参照のこと。

【００８５】

好ましい実施形態において、これらのベクターは全身投与され、免疫調節分子および自己抗原エピトープの発現は任意の細胞中で生じ得る。この実施形態において、自己免疫疾患を治療する場合、ベクターは、自己免疫応答に供される細胞と接触する必要はない。むしろ、このベクターは、任意の細胞に投与できるか、または任意の細胞中で発現させることができる。

【００８６】

一実施形態において、樹状細胞が、本発明の抗原を患者の免疫系に提示するために使用される。樹状細胞は、ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩ、Ｂ７補助刺激分子およびＩＬ－２を発現し、したがって高度に特殊化した抗原提示細胞である。樹状細胞は、ＭＨＣクラスＩ分子およびクラスＩＩ分子に関して、Ｔ細胞にペプチドを提示するために使用できる。一実施形態において、自己樹状細胞は、ＭＨＣ分子に結合できるペプチドでパルスされ

る。別の実施形態において、樹状細胞は、完全タンパク質でパルスされる。なお別の実施形態は、当該分野で公知であり本明細書に記載される種々の実行ベクター（例えば、アデノウイルス（Ａｒｔｈｕｒ　ｅｔ　ａｌ．、１９９７、Ｃａｎｃｅｒ　Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．４：１７－２５）、レトロウイルス（Ｈｅｎｄｅｒｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．、１９９６、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５６：３７６３－３７７０）、レンチウイルス、アデノ随伴ウイルス、ＤＮＡトランスフェクション（Ｒｉｂａｓ　ｅｔ　ａｌ．、１９９７、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．５７：２８６５－２８６９）および腫瘍由来ＲＮＡトランスフェクション（Ａｓｈｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．、１９９７、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８６：１１７７－１１８２））を使用して、樹状細胞における抗原をコードする遺伝子の過剰発現を操作することを含み、これらはすべて、参照によって本明細書中に明示的に組み込まれる。このような樹状細胞ワクチンのさらなる例は、米国特許第６，４４０，７３５号に見出され、その開示は参照によって本明細書中に明示的に組み込まれる。

【００８７】

本明細書中で使用され、以下でさらに定義されるように、「ポリヌクレオチド」または「核酸」とは、ＤＮＡもしくはＲＮＡ、またはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドの両方を含む分子のいずれかを意味することができる。核酸には、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡならびにセンスおよびアンチセンス核酸を含むオリゴヌクレオチドが含まれる。このような核酸はまた、生理学的環境におけるこのような分子の安定性および半減期を増大させるために、リボース－リン酸骨格中に改変を含んでもよい。

【００８８】

核酸は、二本鎖、一本鎖であってよく、または二本鎖もしくは一本鎖の配列の両方の部分を含んでいてもよい。当業者に理解されるように、一方の鎖（「ワトソン」）を記述すれば、他方の鎖（「クリック」）の配列を規定することにもなる。したがって、図中に示される配列は、その配列の相補体をも含む。本明細書中の用語「組換え核酸」とは、一般に、エンドヌクレアーゼによる核酸の操作によって、天然に通常見出されない形態でｉｎｖｉｔｒｏで元来形成された核酸を意味する。したがって、直線型の単離された核酸、または通常連結されないＤＮＡ分子をライゲーションさせることによってｉｎ　ｖｉｔｒｏで形成された発現ベクターは共に、本発明の目的のために組換え体とみなされる。一旦組換え核酸が作製され、宿主細胞または生体中に再導入されると、それは非組換え的に、即ちｉｎ　ｖｉｔｒｏまたは染色体外操作ではなく、宿主細胞のｉｎ　ｖｉｖｏ細胞機構を使用して、複製し得るが、このような核酸は、一旦組換え的に生成されると、引き続いて非組換え的に複製されても、なお本発明の目的のために組換え体とみなされることが理解される。

【００８９】

用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は、本願を通して相互交換可能に使用され得、少なくとも２つの共有結合したアミノ酸を意味し、これにはタンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチドおよびペプチドが含まれる。タンパク質は、天然に存在するアミノ酸およびペプチド結合、または合成のペプチド模倣構造から形成され得る。したがって、本明細書中で使用する場合、「アミノ酸」または「ペプチド残基」とは、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸の両方を意味する。例えば、ホモ－フェニルアラニン、シトルリンおよびノルロイシンは、本発明の目的のためにアミノ酸とみなされる。「アミノ酸」には、プロリンおよびヒドロキシプロリンなどのイミノ酸残基も含まれる。その側鎖は、（Ｒ）配置または（Ｓ）配置のいずれであってもよい。好ましい実施形態において、アミノ酸は（Ｓ）即ちＬ－配置である。天然に存在しない側鎖が使用される場合、例えばｉｎｖｉｖｏでの分解を防止または遅延させるために、非アミノ酸置換基が使用され得る。標的化または導入遺伝子としての発現のために変異体タンパク質およびペプチドを生成するための天然アミノ酸配列の変更は、例えば、当業者に公知の種々の手段によって実施できる。変異体ペプチドは、所定のペプチドに対して実質的に相同であるが、そのペプチドとは異なるアミノ酸配列を有するペプチドである。相同性の程度（即ち、同一性％）は、例えば、そのような比較のために最適化されたコンピュータプログラムを使用して（例え

ば、ＧＡＰコンピュータプログラム、バージョン６．０またはそれより高度なバージョン（Ｄｅｖｅｒｅｕｘ ｅｔ ａｌ．（Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、１２、３８７（１９８４））に記載され、かつＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ（ＵＷＧＣＧ）から自由に入手可能）を使用して）配列情報を比較することによって、決定できる。変異体タンパク質および／またはペプチドの活性は、当業者に公知の他の方法を使用して評価できる。

【００９０】

変異体タンパク質（ペプチド）と参照タンパク質（ペプチド）との間で同一でないアミノ酸残基に関して、変異体タンパク質（ペプチド）は、好ましくは保存的アミノ酸置換を含み、即ちその結果、所定のアミノ酸が類似のサイズ、荷電密度、疎水性／親水性、および／または配置の別のアミノ酸（例えば、Ｐｈｅに対してＶａｌ）で置換される。変異体の部位特異的変異は、改変部位を含む合成オリゴヌクレオチドを発現ベクター中にライゲーションすることによって導入できる。あるいは、オリゴヌクレオチド指向性の部位特異的変異誘発手順、例えば、Ｗａｌｄｅｒ ｅｔ ａｌ．、Ｇｅｎｅ、４２：１３３（１９８６）；Ｂａｕｅｒ ｅｔ ａｌ．、Ｇｅｎｅ、３７：７３（１９８５）；Ｃｒａｉｋ、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、Ｊａｎｕａｒｙ １９９５、ｐｐ．１２－１９；ならびに米国特許第４，５１８，５８４号および同第４，７３７，４６２号に開示されるものが使用できる。

【００９１】

免疫調節分子

本明細書の文脈において、「免疫調節分子」は、抗原特異的な様式で標的細胞に対する細胞性および／または体液性の宿主免疫応答を調節、即ち増大または減少させるポリペプチド分子であり、好ましくは宿主免疫応答を減少させるポリペプチド分子である。一般に、本発明の教示に従って、免疫調節分子は、標的細胞の表面膜と会合されよう。例えば、本明細書に記載されるベクターからの発現の後、細胞表面膜に挿入されるか、または当該膜に共有結合もしくは非共有結合されよう。

【００９２】

好ましい実施形態において、免疫調節分子は、ＣＤ８タンパク質のすべてまたは機能的部分を含み、より好ましくは、ＣＤ８α鎖のすべてまたは機能的部分を含む。ヒトＣＤ８コード配列については、Ｌｅａｈｙ、Ｆａｓｅｂ Ｊ．９：１７－２５（１９９５）；Ｌｅａｈｙ ｅｔ ａｌ．、Ｃｅｌｌ ６８：１１４５－６２（１９９２）；Ｎａｋａｙａｍａ ｅｔ ａｌ．、Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ ３０：３９３－７（１９８９）を参照のこと。ＣＤ８タンパク質およびポリペプチドに関して「機能的部分」とは、本明細書に記載されるｖｅｔｏ活性を保持するＣＤ８α鎖の部分を意味し、より具体的には、ＣＤ８α鎖のＨＬＡ結合活性を保持する部分、特にＣＤ８α鎖の細胞外領域中のＩｇ様ドメインを意味する。例示的な変異体ＣＤ８ポリペプチドは、参照により本明細書中に組み込まれる、Ｇａｏ ａｎｄ Ｊａｋｏｂｓｅｎ、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ ２１：６３０－６３６（２０００）中に記載されている。いくつかの実施形態において、全長ＣＤ８α鎖が使用される。しかし、いくつかの実施形態においては、その細胞質ドメインは欠失されている。好ましくは、膜貫通ドメインおよび細胞外ドメインが保持される。

【００９３】

当業者に理解されるように、必要に応じて、細胞外ドメインと標的細胞表面との会合を改変するために、ＣＤ８α鎖の膜貫通ドメインは、他の分子の膜貫通ドメインと交換できる。この実施形態において、ＣＤ８α鎖の細胞外ドメインをコードする核酸は、膜貫通ドメインをコードする核酸と作動可能に連結される。任意の膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインが、本発明において使用できる。あるいは、膜貫通タンパク質中に見出されることが知られていない膜貫通を使用してもよい。この実施形態において、「合成膜貫通ドメイン」は、約２０～２５個の疎水性アミノ酸と、その後に少なくとも１つ、そして好ましくは２つの荷電アミノ酸とを含む。いくつかの実施形態において、ＣＤ８細胞外ドメインは、当該分野の従来技術によって、標的細胞膜に連結される。好ましいＣＤ８α鎖の配列は以

下の表中に示され、ヒト、マウス、ラット、オランウータン、クモザル、モルモット、ウシ、アラゲコトンラット、家畜のブタおよびネコを含む種由来の全長ＣＤ８α鎖をコードするアミノ酸配列または核酸配列のいずれかの全長配列についてのアクセッション番号を含む。そのアクセッション番号で含まれる配列は、参照によって本明細書中に明示的に組み込まれる。

CD8α鎖の配列

種	アクセッション番号
Homo sapiens	NM_001768, M27161 および NM_171827
Pongo pygmaeus（オランウータン）	X60223
Mus musculus（マウス）	XM_132621, BC030679 および U34881
Rattus norveticus（ラット）	NM_031538
Cavia porcellus（モルモット）	AY303773
Bos Taurus（ウシ）	NM_174015
Sus scrofa（家畜用ブタ）	AY517855
Felis catus（ネコ）	D16536
Sigmodon hispidus（アラゲコトンラット）	AY065643
Saimiri sciureus（コモンリスザル）	AJ130818

【００９４】

好ましい実施形態において、ＣＤ８α鎖は、融合タンパク質ではないが、むしろ細胞内ドメインが欠失された短縮型タンパク質である。図１Ａ～Ｂに示されるように、ヒトＣＤ８α鎖遺伝子は、２３５アミノ酸のタンパク質を発現する。このタンパク質は、以下のドメインに分割されるとみなすことができる（ポリペプチドのアミノ末端で始まり、カルボキシ末端で終わる）：シグナルペプチド（アミノ酸１～２１）；免疫グロブリン（Ｉｇ）様ドメイン（ほぼアミノ鎖２２～１３６）；膜近位柄（ｓｔａｌｋ）領域（アミノ酸１３７～１８１）；膜貫通ドメイン（アミノ酸１８３～２１０）および細胞質ドメイン（アミノ酸２１１－２３５）。これらの異なるドメインをコードするコード配列のヌクレオチドは、シグナルペプチドをコードする１～６３、細胞外ドメインをコードする６４～５４６、細胞内ドメインをコードする約５４７～６２１および細胞内ドメインをコードする約６２２～７０８を含む。同様に、マウス配列は以下のようにドメインに分割できる。そのポリペプチドは、アミノ酸１～２７を含むシグナル配列、アミノ酸約２８～１９４を含む細胞外ドメイン、アミノ酸約１９５～２２２を含む膜貫通ドメインおよびアミノ酸約２２３～３１０を含む細胞内ドメインに分割できる。同様に、これらのドメインをコードするコード配列のヌクレオチドは、シグナルペプチドをコードする核酸１～８１、細胞外ドメインをコードする約８２～５８２、膜貫通ドメインをコードする約５８３～６６６および細胞外ドメインをコードする約６６７～９２３を含む。

【００９５】

いくつかの実施形態において、全長タンパク質をコードする核酸は、遺伝子デリバリービヒクル中に含まれる。他の実施形態において、細胞内ドメインをコードする核酸は、遺伝子デリバリービヒクル中のポリヌクレオチドには含まれず、細胞内ドメインを欠く膜アンカー型タンパク質を生じる。対応するドメインは、好ましい実施形態におけるマウスを含む、他の種においても同定できる。

【００９６】

当業者は、上記ポリペプチドに対する実質的な相同性を有する免疫調節分子が、本発明

において有利な用途を見出し得ることもまた理解しよう。したがって、例えば、「ＣＤ８ポリペプチド」には、図１Ａ中に示されるヌクレオチドによりコードされるポリペプチドと、少なくとも約８０％の配列同一性、通常は少なくとも約８５％の配列同一性、好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、最も好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性を有する、相同なポリペプチドもまた包含される。

【００９７】

「ＣＤ８をコードする核酸分子」およびその文法的等価物は、図１Ａ中に示されるヒトＣＤ８のヌクレオチド配列、ならびに図１Ａ中に示されるヌクレオチドと、少なくとも約８０％の配列同一性、通常は少なくとも約８５％の配列同一性、好ましくは少なくとも約９０％の配列同一性、より好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性、最も好ましくは少なくとも約９８％の配列同一性を有し、かつ図１Ａ中に示される配列を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を意味する。

【００９８】

以前に示したように、多数の異なるプログラムが、タンパク質または核酸が既知の配列に対する配列同一性または類似性を有するか否かを同定するために使用できる。配列同一性および／または類似性は、好ましくはデフォルトの設定を使用するか、または検査により、Ｓｍｉｔｈ　＆　Ｗａｔｅｒｍａｎ、Ａｄｖ．Ａｐｐｌ．Ｍａｔｈ．２：４８２（１９８１）の局所配列同一性アルゴリズム、Ｎｅｅｄｌｅｍａｎ　＆　Ｗｕｎｓｃｈ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３（１９７０）の配列同一性アラインメントアルゴリズム、Ｐｅａｒｓｏｎ　＆　Ｌｉｐｍａｎ、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　８５：２４４４（１９８８）の類似性検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化実行（Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ　Ｐａｃｋａｇｅ、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ、５７５　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｄｒｉｖｅ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩのＧＡＰ、ＢＥＳＴＦＩＴ、ＦＡＳＴＡおよびＴＦＡＳＴＡ）、Ｄｅｖｅｒｅｕｘ　ｅｔ　ａｌ．、Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ　Ｒｅｓ．１２：３８７－３９５（１９８４）により記載されるＢｅｓｔ　Ｆｉｔ配列プログラムが含まれるがこれらに限定されない、当該分野で公知の標準技術を使用して、決定される。好ましくは、同一性％は、以下のパラメータに基づいてＦａｓｔＤＢによって計算される：ミスマッチペナルティ１；ギャップペナルティ１；ギャップサイズペナルティ０．３３；およびジョイニングペナルティ３０、「Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ　ａｎｄ　Ａｎａｌｙｓｉｓ」、Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ　ａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ、Ｓｅｌｅｃｔｅｄ　Ｍｅｔｈｏｄｓ　ａｎｄ　Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ、ｐｐ　１２７－１４９（１９８８）、Ａｌａｎ　Ｒ．Ｌｉｓｓ，Ｉｎｃ．。

【００９９】

有用なアルゴリズムの一例はＰＩＬＥＵＰである。ＰＩＬＥＵＰは、漸進的対合アラインメントを使用して、一群の関連配列から複数の配列アラインメントを生成する。アラインメントを生成するために使用されるクラスター化関係を示す階層をプロットすることもできる。ＰＩＬＥＵＰは、Ｆｅｎｇ　＆　Ｄｏｏｌｉｔｔｌｅ、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｅｖｏｌ．３５：３５１－３６０（１９８７）の漸進的アラインメント法の単純化を使用し、この方法は、Ｈｉｇｇｉｎｓ　＆　Ｓｈａｒｐ　ＣＡＢＩＯＳ　５：１５１－１５３（１９８９）に記載される方法と類似である。デフォルトギャップウェイト３．００、デフォルトギャップレングスウェイト０．１０および加重エンドギャップを含む有用なＰＩＬＥＵＰパラメータ。

【０１００】

有用なアルゴリズムの別の例は、Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５、４０３－４１０、（１９９０）およびＫａｒｌｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、ＰＮＡＳ　ＵＳＡ　９０：５８７３－５７８７（１９９３）に記載されるＢＬＡＳＴアルゴリズムである。特に有用なＢＬＡＳＴプログラムは、Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．、Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、２６６：４６０－４８０（１９９６）；h

ｔｔｐ：／／ｂｌａｓｔ．ｗｕｓｔｌ／ｅｄｕ／ｂｌａｓｔ／ＲＥＡＤＭＥ．ｈｔｍｌ］から得られたＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２プログラムである。ＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２は、いくつかの検索パラメータを使用し、そのほとんどはデフォルト値に設定される。調節可能なパラメータは、以下の値で設定される：オーバーラップスパン＝１、オーバーラップフラクション＝０．１２５、ワード閾値（Ｔ）＝１１。ＨＳＰ ＳおよびＨＳＰ Ｓ２パラメータは動的な値であり、特定の配列の組成および目的の配列がそれに対して検索されている特定のデータベースの組成に依存して、プログラム自身によって確立される；しかし、これらの値は、感度を増大させるために調節してもよい。

【０１０１】

さらなる有用なアルゴリズムは、Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２により報告されたギャップ付きＢＬＡＳＴである。ギャップ付きＢＬＡＳＴは、ＢＬＯＳＵＭ－６２置換スコア；９に設定した閾値Ｔパラメータ；ギャップのない伸長を誘発するためのツーヒット法；ギャップレングスｋの１０＋ｋのコストへの当てはめ；１６に設定したＸｕ、ならびにアルゴリズムのデータベース検索段階について４０に、アルゴリズムの出力段階について６７に設定したＸｇを使用する。ギャップ付きアラインメントは、約２２ビットに対応するスコアによって誘発される。

【０１０２】

アミノ酸または核酸配列同一性の％値は、一致している同一残基の数を整列させた領域中の「より長い」配列の総残基数で除算することによって決定される。「より長い」配列は、整列された領域中の最も現実的な残基を有する配列である（アラインメントスコアを最大化するためにＷＵ－Ｂｌａｓｔ－２によって導入されたギャップは無視される）。

【０１０３】

アラインメントは、整列すべき配列におけるギャップの導入を含むことができる。さらに、図１Ａ中に示されるヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列よりも多いかまたは少ないアミノ酸のいずれかを含む配列について、一実施形態において、配列同一性の割合は、アミノ酸残基の総数に対する同一アミノ酸の数に基づいて決定されることが理解される。したがって、例えば、図１Ａ中のヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの配列よりも短い配列の配列同一性は、以下で議論するように、一実施形態において、このより短い配列中のアミノ酸の数を使用して決定されよう。同一性％の計算において、相対的な加重は、配列バリエーション（例えば、挿入、欠失、置換など）の種々の顕現に割り当てられない。

【０１０４】

一実施形態において、同一性のみが正に（＋１）スコア付けされ、ギャップを含む配列バリエーションのすべての形態が「０」の値を割り当てられ、これにより、配列類似性の計算について以下に記載されるような加重スケールまたはパラメータの必要性が排除される。配列同一性％は、例えば、一致する同一残基の数を整列された領域中の「より短い」配列の総残基数で除算し、１００を乗算することによって計算できる。「より長い」配列は、整列された領域中の最も現実的な残基を有する配列である。

【０１０５】

図１Ａ中のヌクレオチドによってコードされるポリペプチドと１００％未満の配列同一性を有するＣＤ８は一般に、ヒト以外の種由来のネイティブＣＤ８ヌクレオチド配列、およびヒトまたは非ヒト供給源由来のネイティブＣＤ８ヌクレオチド配列の変異体から生成されよう。これに関して、多数の技術が当該分野で公知であり、ネイティブＣＤ８配列のヌクレオチド配列変異体を生成するため、ネイティブＣＤ８ポリペプチドに通常関連する少なくとも１つの活性の存在についてそれらの変異体のポリペプチド産物を評価するために、慣用的に使用され得ることが留意される。好ましい実施形態において、ＣＤ８α鎖はヒト由来であるが、表２中に示されるように、ラット、マウスおよび霊長類由来のＣＤ８α鎖が公知であり、本発明において用途を見出す。

【０１０６】

ＣＤ８活性を有するポリペプチドは、図１Ａ中に示されるヌクレオチドによってコードされるポリペプチドよりも、短くても長くてもよい。したがって、好ましい実施形態において、図１Ａ中のヌクレオチドによってコードされるポリペプチドの部分またはフラグメントが、ＣＤ８ポリペプチドの定義内に含まれる。本明細書中の一実施形態において、図１Ａ中のヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのフラグメントは、上記のように、ａ）少なくとも示された配列同一性を有し；かつｂ）天然に存在するＣＤ８の生物学的活性を好ましくは有する場合に、ＣＤ８ポリペプチドとみなされる。

【０１０７】

さらに、以下でより完全に概説するように、ＣＤ８α鎖は、例えば、他の融合配列の付加、またはさらなるコード配列および非コード配列の解明によって、図１Ａ中のヌクレオチドによってコードされるポリペプチドよりも長くなり得る。

【０１０８】

ＣＤ８ポリペプチドは好ましくは組換え体である。「組換えポリペプチド」は、組換え技術を使用して作製される、即ち、以下に記載されるような組換え核酸の発現によって作製されるポリペプチドである。好ましい実施形態において、本発明のＣＤ８は、図１Ａ中に示される核酸配列またはそのフラグメントの発現によって作製される。組換えポリペプチドは、少なくとも１つまたは複数の特徴によって、天然に存在するタンパク質とは区別される。例えば、ポリペプチドは、その野生型宿主において通常関連するタンパク質および化合物のいくらかまたはすべてから離れて単離または精製され得、したがって、実質的に純粋であり得る。例えば、単離されたポリペプチドには、その天然の状態で通常関連する物質の少なくとも幾分かが付随せず、これは、所定のサンプル中の総タンパク質の好ましくは少なくとも約０．５重量％、より好ましくは少なくとも約５重量％を構成する。実質的に純粋なポリペプチドは、総ポリペプチドの少なくとも約７５重量％を構成し、少なくとも約８０％が好ましく、少なくとも約９０％が特に好ましい。この定義は、異なる生体または宿主細胞中での１つの生体からのＣＤ８ポリペプチドの産生を含む。

【０１０９】

あるいは、ポリペプチドは、誘導性プロモーターまたは高発現プロモーターの使用によって、通常見られない顕著に高い濃度で生成され得、その結果、ポリペプチドは増大した濃度レベルで生成される。あるいは、ポリペプチドは、以下で議論するように、アミノ酸の置換、挿入および欠失の付加などの場合と同様に、天然に通常見出されない形態であり得る。

【０１１０】

一実施形態において、本発明は、核酸ＣＤ８変異体を提供する。これらの変異体は、３つのクラス：置換変異体、挿入変異体または欠失変異体のうちの１つまたは複数に入る。これらの変異体は、当該変異体（遺伝子治療ベクター中の変異体を含む）をコードするＤＮＡを産生し、その後当該ＤＮＡを発現するために、カセットもしくはＰＣＲ変異誘発または当該分野で周知の他の技術を使用して、図１Ａのヌクレオチド中のヌクレオチドの部位特異的変異誘発によって、通常調製される。アミノ酸配列変異体は、そのバリエーションの予め決定された性質、その変異体をＣＤ８アミノ酸配列の天然に存在する対立遺伝子または種間バリエーションとは別のものにする特徴によって、特徴付けられる。これらの変異体は、天然に存在するアナログと同じ質的生物学的活性を典型的に示すが、以下により完全に概説されるように、改変された特徴を有する変異体もまた選択できる。

【０１１１】

配列バリエーションを導入するための部位または領域は予め決定されるが、変異自体を予め決定する必要はない。例えば、所定の部位での変異の成績を最適化するために、ランダム変異誘発を、標的のコドンまたは領域で実施してもよく、発現された変異体を最適な所望の活性についてスクリーニングしてもよい。既知の配列を有するＤＮＡ中の予め決定された部位に置換変異を作製するための技術、例えば、Ｍ１３プライマー変異誘発およびＰＣＲ変異誘発が、周知である。変異体を作製するための技術の別の例は、遺伝子シャッフリングの方法であり、それにより、ヌクレオチド配列の類似の変異体のフラグメントを

組み替えて、新規変異体の組合せを生成することが可能となる。このような技術の例は、米国特許第５，６０５，７０３号；同第５，８１１，２３８号；同第５，８７３，４５８号；同第５，８３０，６９６号；同第５，９３９，２５０号；同第５，７６３，２３９号；同第５，９６５，４０８号；および同第５，９４５，３２５号中に見出され、これらは各々、その全体が参照により本明細書中に組み込まれる。

【０１１２】

アミノ酸置換は、典型的には単一残基の置換であり；挿入は、通常約１～２０アミノ酸のオーダーであるが、それよりかなり長い挿入が許容され得る。欠失は、約１～約２０残基の範囲であるが、ある場合には、欠失はかなり大きくてもよく、細胞質ドメインまたはそのフラグメントを含んでもよい。

【０１１３】

置換、欠失、挿入またはそれらの任意の組合せが、最終誘導体に到達するために使用され得る。一般に、これらの変化は、分子の変更を最小化するために、数個のアミノ酸に対して行われる。しかし、より大きい変化が、特定の状況において許容され得る。ＣＤ８の特徴における小さい変更が所望される場合、置換は、以下のチャートに従って一般になされる：

チャート1

元の残基	例示的置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

【０１１４】

機能または免疫学的実体における実質的な変化は、チャート１に示されるものよりも保存的でない置換を選択することによってなされる。例えば、変更の領域中のポリペプチド骨格の構造（例えば、α－ヘリックスまたはβ－シート構造）；標的部位における分子の電荷または疎水性；または側鎖の嵩高さに、より顕著に影響を与える置換がなされ得る。一般にポリペプチドの特性において最大の変化を生じることが予測される置換は、（ａ）親水性残基（例えば、セリルまたはスレオニル）が、疎水性残基（例えば、ロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニル）で（または、によって）置換される；（ｂ）システインまたはプロリンが任意の他の残基で（または、によって）置換される；（ｃ）正に荷電した側鎖を有する残基（例えば、リジル、アルギニルまたはヒスチジル）が負に荷電した残基（例えば、グルタミルまたはアスパルチル）で（または、によって）置換される；または（ｄ）嵩高い側鎖を有する残基（例えばフェニルアラニン）が側鎖を有さない残基（例えばグリシン）で（または、によって）置換されることである。

【０１１５】

これらの変異体は典型的に、天然に存在するアナログと、同じ質的生物学的活性を示し、同じ免疫応答を誘発するであろうが、必要に応じてＣＤ８の特徴を改変するために変異体を選択することもある。あるいは、変異体は、タンパク質の生物学的活性が変更されるように設計され得る。

【０１１６】

本発明の範囲内に含まれるポリペプチドの共有結合改変の１つの型は、ポリペプチドのネイティブのグリコシル化パターンを変更することを含む。「ネイティブのグリコシル化パターンを変更する」とは、本明細書の目的のために、ネイティブ配列のＣＤ８ポリペプチド中に見出される１つもしくは複数の炭水化物部分を欠失させること、および／またはネイティブ配列のポリペプチド中に存在しない１つもしくは複数のグリコシル化部位を付加することを意味する意図である。

【０１１７】

ポリペプチドへのグリコシル化部位の付加は、そのアミノ酸配列を変更することによって達成され得る。変更は、例えば、ネイティブ配列のポリペプチドへの、１つまたは複数のセリン残基またはスレオニン残基の付加またはこれらの残基による置換によって、なされ得る（Ｏ－結合型グリコシル化部位について）。アミノ酸配列は、所望により、ＤＮＡレベルでの変化を介して、特に、所望のアミノ酸に翻訳されるコドンが生成されるように、予め選択された塩基でポリペプチドをコードするＤＮＡに変異導入することによって、変更することができる。

【０１１８】

ポリペプチド上に存在する炭水化物部分の除去は、グリコシル化の標的として作用するアミノ酸残基をコードするコドンの変異的置換によって達成することができる。

【０１１９】

その天然の供給源から単離されると（例えば、プラスミドもしくは他のベクター内に含まれるか、または直線状核酸セグメントとしてそれらから切り出されると）、組換え核酸は、他の核酸を同定および単離するためのプローブとして、さらに使用することができる。これは、改変されたまたは変異体の核酸およびタンパク質を作製するための「前駆体」核酸としても使用できる。これは、本明細書に記載されるように標的細胞を処理するために、ベクターまたは他のデリバリービヒクル中に組み込むこともできる。

【０１２０】

発現ベクター

本発明の文脈において、任意の適切な発現ベクターが使用できる。「ベクター」は、遺伝子移入のためのビヒクルであり、この用語は当業者に理解される。本発明に従う発現ベクターには、プラスミド、ファージ、ウイルス、リポソームなどが含まれるが、これらに限定されない。本発明に従う発現ベクターは、好ましくは、さらなる配列および変異を含む。特に、本発明に従う発現ベクターは、本明細書中で定義されるような、免疫調節分子、特にＣＤ８α鎖をコードする導入遺伝子を含む核酸を含む。さらに、このベクターは、

本明細書に記載されるような自己抗原を含む少なくとも１つのエピトープをコードする配列を含む。核酸は、全体的または部分的に合成により作製されたコード配列または他の遺伝子配列、あるいはゲノムＤＮＡまたは相補ＤＮＡ（ｃＤＮＡ）配列を含んでもよく、ＤＮＡまたはＲＮＡのいずれかの形態で提供され得る。

【０１２１】

自己抗原をコードする遺伝子は、ｍＲＮＡの発現およびタンパク質の産生のために、そして他の生化学的特徴の評価のために、ウイルスベクターへ、もしくはウイルスベクターから、あるいはバキュロウイルス中に、または適切な原核生物もしくは真核生物の発現ベクター中に移動させることができる。

【０１２２】

本発明に従うベクター（組換えアデノウイルスベクターおよび移入ベクターを含む）の産生に関して、このようなベクターは、当業者に公知のような、標準的な分子技術および遺伝学的技術を使用して構築できる。ビリオンまたはウイルス粒子を含むベクター（例えば、組換えアデノウイルスベクター）は、適切な細胞株においてウイルスベクターを使用して産生され得る。同様に、１種または複数種のキメラコートタンパク質を含む粒子は、標準的細胞株（例えば、アデノウイルスベクターについて現在使用されているもの）中で産生され得る。これらの得られた粒子は次いで、所望の場合、特定の細胞に対して標的化され得る。

【０１２３】

任意の適切な発現ベクター（例えば、Ｐｏｕｗｅｌｓ　ｅｔ　ａｌ．、Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ　（Ｅｌｓｅｖｉｏｒ、Ｎ．Ｙ．：１９８５）に記載されるようなもの）および対応する適切な宿主細胞が、宿主細胞における組換えペプチドまたはタンパク質の産生のために使用できる。発現宿主には、エシェリキア属、バチルス属、シュードモナス属、サルモネラ属内の細菌種、哺乳動物または昆虫の宿主細胞系（バキュロウイルス系（例えば、Ｌｕｃｋｏｗ　ｅｔ　ａｌ．、Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、６、４７（１９８８）に記載されるようなもの）を含む）、および樹立細胞株（例えば、ＣＯＳ－７、Ｃ１２７、３Ｔ３、ＣＨＯ、ＨｅＬａ、ＢＨＫ）などが含まれるが、これらに限定されない。本発明に従うキメラタンパク質（ペプチド）を調製するために特に好ましい発現系は、バキュロウイルス発現系であり、この系では、Ｔｒｉｃｈｏｐｌｕｓｉａ　ｎｉ、Ｔｎ　５Ｂ１－４昆虫細胞または他の適切な昆虫細胞が、高レベルの組換えタンパク質を産生するために使用される。もちろん、当業者は、発現宿主の選択が、産生されるペプチドの型に対して影響を有することを承知している。例えば、酵母または哺乳動物細胞（例えば、ＣＯＳ－７細胞）中で産生されたペプチドのグリコシル化は、細菌細胞（例えば、エシェリキア・コリ）中で産生されたペプチドのグリコシル化とは異なるであろう。

【０１２４】

好ましい実施形態において、これらのタンパク質は、哺乳動物細胞において発現される。哺乳動物発現系もまた当該分野で公知であり、レトロウイルス系およびレンチウイルス系が含まれる。哺乳動物プロモーターは、哺乳動物ＲＮＡポリメラーゼを結合し、タンパク質のコード配列のｍＲＮＡへの下流（３’）への転写を開始できる任意のＤＮＡ配列である。プロモーターは、コード配列の５’末端に対して近位に通常配置される転写開始領域、および転写開始部位の上流２５～３０塩基対に位置するものを使用するＴＡＴＡボックスを有する。ＴＡＴＡボックスは、ＲＮＡポリメラーゼＩＩに、正確な部位でＲＮＡ合成を開始させると考えられている。哺乳動物プロモーターは、ＴＡＴＡボックスの上流１００～２００塩基対以内に典型的には位置する、上流のプロモーターエレメント（エンハンサーエレメント）もまた含む。上流のプロモーターエレメントは、転写が開始される率を決定し、いずれの方向でも作用できる。哺乳動物プロモーターとして、哺乳動物ウイルス遺伝子由来のプロモーターが特に使用される。なぜなら、ウイルス遺伝子は、しばしば高度に発現され、広い宿主範囲を有するからである。例には、ＳＶ４０初期プロモーター、マウス乳癌ウイルスＬＴＲプロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター、単純

疱疹ウイルスプロモーターおよびＣＭＶプロモーターが含まれる。

【０１２５】

典型的に、哺乳動物細胞によって認識される転写終結配列およびポリアデニル化配列は、翻訳終止コドンの３’側に位置する調節領域であり、したがって、プロモーターエレメントと共に、免疫調節分子および自己抗原のエピトープの両方についてのインサートのコード配列に隣接する。成熟ｍＲＮＡの３’末端は、部位特異的翻訳後切断およびポリアデニル化によって形成される。転写ターミネーターおよびポリアデニル化シグナルの例には、ＳＶ４０由来のものが含まれる。

【０１２６】

哺乳動物宿主ならびに他の宿主に外因性核酸を導入する方法は、当該分野で周知であり、使用される宿主細胞によって異なるであろう。技術には、デキストラン媒介性トランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿、ポリブレン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、ウイルス感染、ポリヌクレオチドのリポソーム中での封入、および核へのＤＮＡの直接マイクロインジェクションが含まれる。

【０１２７】

タンパク質は、当該分野で周知の技術を使用して、融合タンパク質として作製してもよい。したがって、例えば、タンパク質は、発現を増大させるためまたは他の理由のために、融合タンパク質として作製してもよい。例えば、タンパク質がペプチドである場合、このペプチドをコードする核酸は、本明細書に記載されるように、発現目的のために他の核酸に連結させてもよい。好ましい実施形態において、自己抗原のエピトープを発現する場合、タンパク質は、適切な標的化およびプロセシングを確実にするために、融合タンパク質として発現される。即ち、エピトープを含むポリペプチドは、分泌経路にポリペプチドを標的化するシグナル配列としてこのようなプロセシング配列を含んでいてもよい、融合タンパク質として発現される。融合タンパク質はまた、免疫調節分子および自己抗原のエピトープの両方が細胞表面上で同時発現されるように、自己抗原のエピトープを含むポリペプチドを細胞膜に固定化する、膜貫通ドメインを含んでいてもよい。

【０１２８】

ＣＤ８または自己抗原について試験するために、発現後にタンパク質を精製または単離する。タンパク質は、サンプル中に存在する他の成分が何であるかに応じて、当業者に公知の種々の方法で単離または精製することができる。標準的な精製方法には、電気泳動技術、分子技術、免疫学的技術およびクロマトグラフィー技術（イオン交換、疎水性、アフィニティおよび逆相ＨＰＬＣクロマトグラフィーを含む）、ならびに等電点電気泳動が含まれる。例えば、ＣＤ８タンパク質は、標準的な抗ＣＤ８抗体カラムを使用して精製することができる。限外濾過技術およびダイアフィルトレーション技術もまた、タンパク質濃縮と組み合わせて、有用である。適切な精製技術における一般的な指針については、Ｓｃｏｐｅｓ，Ｒ．、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ、Ｓｐｒｉｎｇｅｒ－Ｖｅｒｌａｇ、ＮＹ（１９８２）を参照のこと。精製の必要性の程度は、ＣＤ８タンパク質の使用に依存して変化しよう。ある例においては、精製は必要ないであろう。ある例においては、ＣＤ８および／または自己抗原の発現は、例えば、抗体結合および蛍光を介した検出により、または蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）によって、細胞表面上で検出される。

【０１２９】

ＣＤ８および自己抗原をコードする核酸分子、ならびにＣＤ８核酸分子のコード鎖または非コード鎖のいずれかに由来する任意の核酸分子は、当該分野で公知でありかつ慣用的に使用される種々の方法で、標的の細胞と接触させてもよく、このとき、接触はｅｘ　ｖｉｖｏであってもｉｎ　ｖｉｖｏであってもよい。

【０１３０】

ウイルスの付着、侵入および遺伝子発現は、所望のタンパク質またはＲＮＡおよびマーカー遺伝子（例えばβ－ガラクトシダーゼ）を発現する組換えウイルスを作製するための目的のインサートを含むアデノウイルスベクターを使用することによって、最初に評価できる。β－ガラクトシダーゼ遺伝子を含むアデノウイルス（Ａｄ－ＬａｃＺ）が感染した

細胞におけるβ－ガラクトシダーゼ発現は、細胞にＡｄ－Ｇｌｕｃを添加したわずか２時間後に検出できる。この手順は、組換えウイルスの細胞侵入および遺伝子発現の迅速かつ効率的な分析を提供し、従来技術を使用して当業者に容易に実施される。

【０１３１】

タンパク質をコードする本発明の核酸を使用して、種々の発現ベクターを作製できる。これらの発現ベクターは、自己複製型の染色体外ベクターまたは宿主ゲノム中に組み込まれるベクターのいずれであってもよい。一般に、これらの発現ベクターは、当該タンパク質をコードする核酸に作動可能に連結された転写調節核酸および翻訳調節核酸を含む。用語「制御配列」とは、特定の宿主生体中での、作動可能に連結されたコード配列の発現に必要な、転写調節核酸配列および翻訳調節核酸配列をいう。原核生物に適切な制御配列には、例えば、プロモーター、所望によりオペレーター配列およびリボソーム結合部位が含まれる。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。

【０１３２】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係になるよう配置される場合、「作動可能に連結」されている。例えば、プレ配列または分泌リーダーについてのＤＮＡは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現される場合、当該ポリペプチドについてのＤＮＡと作動可能に連結されている；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響を与える場合、コード配列と作動可能に連結されている；またはリボソーム結合部位は、翻訳を促進するように配置されている場合、コード配列と作動可能に連結されている。別の例として、作動可能に連結されるとは、隣接するように、そして分泌リーダーの場合には隣接しかつ読み取りと一致するように連結されたＤＮＡをいう。しかし、エンハンサーは、隣接する必要はない。連結は、簡便な制限部位でのライゲーションによって達成される。このような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドのアダプターまたはリンカーが、従来の慣行に従って使用される。転写調節核酸および翻訳調節核酸は、一般に、ＣＤ８および自己抗原を発現するために使用される宿主細胞に適切であり、例えば、ヒトの転写調節核酸配列および翻訳調節核酸配列が、ヒト細胞中でＣＤ８および自己抗原を発現するために使用されることが好ましい。種々の宿主細胞について、多数の型の適切な発現ベクターおよび適切な調節配列が当該分野で公知である。

【０１３３】

一般に、転写調節配列および翻訳調節配列には、プロモーター配列、リボソーム結合部位、転写開始配列および終止配列、翻訳開始配列および終止配列、ならびにエンハンサー配列またはアクチベータ配列が含まれ得るが、これらに限定されない。好ましい実施形態において、調節配列には、プロモーターならびに転写開始配列および終止配列が含まれる。

【０１３４】

プロモーター配列は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターのいずれかをコードする。これらのプロモーターは、天然に存在するプロモーターまたはハイブリッドプロモーターのいずれであってもよい。１つより多いプロモーターのエレメントを組み合わせたハイブリッドプロモーターもまた当該分野で公知であり、本発明において有用である。

【０１３５】

さらに、発現ベクターは、さらなるエレメントを含むことができる。例えば、発現ベクターは２つの複製系を有して、２種の生体中（例えば、発現のために哺乳動物または昆虫細胞中、ならびにクローニングおよび増幅のために原核生物宿主中）で維持されることが可能となり得る。さらに、発現ベクターを組み込むために、発現ベクターは、宿主細胞ゲノムに対して相同な配列を少なくとも１つ、好ましくは発現構築体に隣接する相同な配列を２つ含む。組み込みベクターは、ベクター中に含めるのに適切な相同配列を選択することによって、宿主細胞中の特定の遺伝子座に指向させ得る。組み込みベクター用の構築体は当該分野で周知である。

【０１３６】

さらなる実施形態において、発現ベクターは、形質転換された宿主細胞の選択を可能にするために、選択マーカー遺伝子を含むことができる。選択遺伝子は当該分野で周知であり、使用される宿主細胞によって異なるであろう。

【０１３７】

好ましくは、このベクターは、とりわけ、ウイルスベクター（例えば、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスベクターまたはレトロウイルスベクター）である。最も好ましくは、このウイルスベクターはアデノウイルスベクターである。アデノウイルスベクターは、任意のアデノウイルス由来であり得る。「アデノウイルス」は、Ａｄｅｎｏｖｉｒｉｄａｅ科の任意のウイルスであり、望ましくは、Ｍａｓｔａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ属（例えば、哺乳動物アデノウイルス）またはＡｖｉａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ属（例えば、鳥類アデノウイルス）のウイルスである。アデノウイルスは、任意の血清型のものである。アデノウイルス供給源として使用できるアデノウイルスストックは、アデノウイルス血清型１～４７から増幅でき、これらは現在、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、Ｍｄ．）から、または任意の他の供給源から入手可能なアデノウイルスの任意の他の血清型から入手可能である。例えば、アデノウイルスは、サブグループＡ（例えば、血清型１２、１８および３１）、サブグループＢ（例えば、血清型３、７、１１、１４、１６、２１、３４および３５）、サブグループＣ（例えば、血清型１、２、５および６）、サブグループＤ（例えば、血清型８、９、１０、１３、１５、１７、１９、２０、２２～３０、３２、３３、３６～３９および４２～４７）、サブグループＥ（血清型４）、サブグループＦ（血清型４０および４１）、または任意の他のアデノウイルス血清型のものであり得る。しかし好ましくは、アデノウイルスは、血清型２、５または９のものである。望ましくは、アデノウイルスは、同じ血清型のコートタンパク質（例えば、ペントンベース、ヘキソンおよび／またはファイバー）を含む。しかし、これもまた好ましくは、例えば、所定のコートタンパク質のすべてまたは一部が別の血清型由来であり得るという意味で、１つまたは複数のコートタンパク質がキメラであり得る。

【０１３８】

好ましくはアデノウイルスベクターであるウイルスベクターは、複製能のあるものであり得るが、好ましくは、このウイルスベクターは、複製欠損または条件付で複製欠損である。例えば、好ましくはアデノウイルスベクターであるウイルスベクターは、ウイルスを複製欠損にする少なくとも１つの改変を有するゲノムを含む。ウイルスゲノムに対する改変には、ＤＮＡセグメントの欠失、ＤＮＡセグメントの付加、ＤＮＡセグメントの再編成、ＤＮＡセグメントの置換、またはＤＮＡ損傷の導入が含まれるが、これらに限定されない。ＤＮＡセグメントは、１ヌクレオチド程度に小さくできるか、あるいは３６キロ塩基対（即ち、アデノウイルスゲノムのおおよそのサイズ）または３８キロ塩基対（これは、アデノウイルスビリオン中にパッケージングできる最大量である）程度に大きくできる。

【０１３９】

ウイルス、特にアデノウイルスのゲノムに対する好ましい改変には、ウイルスを複製欠損にする改変に加えて、本明細書中に定義されるような免疫調節分子をコードする導入遺伝子のインサート、さらにかつ好ましくは、目的の治療用分子をコードする少なくとも１つの導入遺伝子のインサートが含まれる。アデノウイルスなどのウイルスはまた、好ましくは、共組換え体（即ち、アデノウイルスなどのウイルスのゲノム配列と他の配列（例えば、プラスミド、ファージまたは他のウイルスのもの）とのライゲーション）であり得る。

【０１４０】

アデノウイルスベクター（特に、複製欠損アデノウイルスベクター）に関して、このようなベクターは、完全カプシド（即ち、アデノウイルスゲノムなどのウイルスゲノムを含む）または空のカプシド（即ち、ここで、例えば物理的または化学的手段により、ウイルスゲノムが欠如しているかまたは分解されている）のいずれかを含むことができる。好ましくは、このウイルスベクターは完全カプシドを、即ち免疫調節分子をコードする導入遺

伝子、および所望によりかつ好ましくは阻害手段をコードする少なくとも１つの導入遺伝子を運搬する手段として、含む。あるいは、好ましくは、これらの導入遺伝子は、アデノウイルスカプシドの外側上で、細胞中に運搬され得る。

【０１４１】

アデノウイルスなどのウイルスを特定の細胞に標的化することが好まれるかまたは望まれる程度まで、ウイルスは、細胞中へのプラスミドＤＮＡの移入において、本質的にエンドソーム溶解剤として使用でき、このプラスミドＤＮＡは、マーカー遺伝子を含み、細胞結合リガンド（例えば、トランスフェリン）に共有結合したポリリジンと複合体化および縮合される（Ｃｏｔｔｅｎ ｅｔ ａｌ．、ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）、８９、６０９４－６０９８（１９９２）；およびＣｕｒｉｅｌ ｅｔ ａｌ．、ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）、８８、８８５０－８８５４（１９９１））。トランスフェリン－ポリリジン／ＤＮＡ複合体とアデノウイルスとの連結（例えば、アデノウイルスに対する抗体によるか、トランスグルタミナーゼによるか、またはビオチン／ストレプトアビジン架橋を介する）は、遺伝子移入を実質的に増強することが実証されている（Ｗａｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．、ＰＮＡＳ（ＵＳＡ）、８９、６０９９－６１０３（１９９２））。

【０１４２】

あるいは、１つまたは複数のコートタンパク質（例えば、アデノウイルスファイバー）は、例えば、細胞表面レセプターに対するリガンドの配列または二重特異的抗体（即ち、一方の末端が当該ファイバーに対する特異性を有し、他方の末端が細胞表面レセプターに対する特異性を有する分子）への結合を可能にする配列のいずれかの組み込みによって、改変できる（ＰＣＴ国際特許出願番号ＷＯ９５／２６４１２（’４１２出願）およびＷａｔｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．、「Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ－Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｇｅｎｅ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ ｗｉｔｈ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ」、Ａｂｓｔ．Ｎｏ．３３６）。両方の場合、典型的なファイバー／細胞表面レセプター相互作用は抑止され、アデノウイルスなどのウイルスは、そのファイバーによって新たな細胞表面レセプターに再指向される。

【０１４３】

あるいは、選択された細胞型に特異的に結合可能な標的化エレメントは、高親和性結合対の第１の分子と連結され、宿主細胞に投与され得る（ＰＣＴ国際特許出願番号ＷＯ９５／３１５６６）。次いで、高親和性結合対の第２の分子に連結された遺伝子デリバリービヒクルは、宿主細胞に投与され得、この第２の分子は第１の分子に特異的に結合可能であり、その結果遺伝子デリバリービヒクルが選択された細胞型に標的化される。

【０１４４】

同じ路線に沿って、方法（例えば、電気泳動、形質転換、三親交配の接合、（同時）トランスフェクション、（同時）感染、膜融合、微粒子弾の使用、リン酸カルシウム－ＤＮＡ沈殿物とのインキュベーション、直接マイクロインジェクションなど）が、ウイルス、プラスミドおよびファージを、それらの核酸配列の形態（即ち、ＲＮＡまたはＤＮＡ）で移入するために利用可能なので、ベクターは同様に、任意の関連タンパク質（例えば、カプシドタンパク質）の非存在下かつ任意のエンベロープ脂質の非存在下で、ＲＮＡまたはＤＮＡを含むことができる。

【０１４５】

同様に、リポソームは細胞膜と融合することによって細胞に侵入するので、ベクターは、コートタンパク質をコードする構成的核酸と共に、リポソームを構成し得る。このようなリポソームは、例えばＬｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、Ｍｄ．から市販されており、製造業者の推奨に従って使用できる。さらに、リポソームは、遺伝子デリバリーをもたらすために使用でき、増大した移入能および／または低減したｉｎ ｖｉｖｏ毒性を有するリポソームが使用できる。可溶性キメラコートタンパク質（本明細書に記載される方法を使用して産生されるものなど）は、リポソームを製造業者の指示に従って調製した後、またはリポソームの調製中のいずれかで、リポソームに添加できる。

【０１４６】
本発明に従うベクターは、本発明の方法において使用できるものに限定されないが、遺伝子移入ベクターの構築において使用できる中間型ベクター（例えば、「移入ベクター」）もまたこれに含まれる。
【０１４７】
１つまたは複数の核酸配列のｉｎ　ｖｉｖｏデリバリーのための好ましい方法の１つは、アデノウイルス発現ベクターの使用を伴う。「アデノウイルス発現ベクター」は、（ａ）構築体のパッケージングを支持する、および（ｂ）センス方向またはアンチセンス方向でその中にクローニングされたポリヌクレオチドを発現するのに十分なアデノウイルス配列を含む構築体を含むことを意味する。もちろん、アンチセンス構築体の文脈において、発現とは、遺伝子産物が合成されることを必要としない。
【０１４８】
発現ベクターは、アデノウイルスの遺伝子操作された形態を含む。アデノウイルスの遺伝子組成についての知見（３６ｋｂの直線状二本鎖ＤＮＡウイルス）により、アデノウイルスＤＮＡの大きい断片の、７ｋｂまでの外来配列による置換が可能である（Ｇｒｕｎｈａｕｓ　ａｎｄ　Ｈｏｒｗｉｔｚ、１９９２）。レトロウイルスとは対照的に、宿主細胞のアデノウイルス感染は、染色体組み込みを生じない。なぜなら、アデノウイルスＤＮＡは、潜在的な遺伝毒性なしにエピソーム様式で複製できるからである。また、アデノウイルスは構造的に安定であり、大規模な増幅後のゲノム再編成は検出されていない。アデノウイルスは、それらの細胞周期段階に関わらず、事実上すべての上皮細胞に感染できる。これまで、アデノウイルス感染は、ヒトにおける急性呼吸器疾患などの軽度な疾患にのみ関連するようである。
【０１４９】
アデノウイルスは、その中程度のゲノムサイズ、操作の容易さ、高い力価、広い標的細胞範囲および高い感染性のために、遺伝子移入ベクターとしての使用に特に適している。ウイルスゲノムの両方の末端は、１００～２００塩基対の逆方向反復（ＩＴＲ）を含み、これらは、ウイルスＤＮＡの複製およびパッケージングに必要なシスエレメントである。ゲノムの初期（Ｅ）および後期（Ｌ）領域は、ウイルスＤＮＡ複製の開始によって分割される、異なる転写単位を含む。Ｅ１領域（Ｅ１ＡおよびＥ１Ｂ）は、ウイルスゲノムおよび数個の細胞遺伝子の転写の調節を担うタンパク質をコードする。Ｅ２領域（Ｅ２ＡおよびＥ２Ｂ）の発現は、ウイルスＤＮＡ複製のためのタンパク質の合成を生じる。これらのタンパク質は、ＤＮＡ複製、後期遺伝子発現および宿主細胞の遮断に関与する（Ｒｅｎａｎ、１９９０）。ウイルスカプシドタンパク質の大部分を含む後期遺伝子の産物は、主要後期プロモーター（ＭＬＰ）によって与えられる単一の一次転写物の顕著なプロセシングの後にのみ発現される。このＭＬＰ（１６．８ｍ．ｕ．に位置する）は、感染の後期段階の間に特に有効であり、このプロモーターから与えられるすべてのｍＲＮＡは、これらを翻訳に好ましいｍＲＮＡにする５’－三者リーダー（ＴＰＬ）配列を保有する。
【０１５０】
現在の系において、組換えアデノウイルスは、シャトルベクターとプロウイルスベクターとの間の相同組換えから生成される。２つのプロウイルスベクター間での可能な組換えに起因して、野生型アデノウイルスが、このプロセスから生成され得る。したがって、個々のプラークからウイルスのシングルクローンを単離すること、およびそのゲノム構造を試験することが、重要である。
【０１５１】
複製欠損アデノウイルスベクターの生成および増殖は、独自のヘルパー細胞株に依存する。本来、アデノウイルスは、野生型ゲノムの約１０５％をパッケージでき（Ｇｈｏｓｈ－Ｃｈｏｕｄｈｕｒｙ　ｅｔ　ａｌ．、１９８７）、約２ｋＢ過剰なＤＮＡ分の限度容量を提供する。Ｅ１およびＥ３領域中の置換可能な約５．５ｋＢのＤＮＡと合わせて、現在のアデノウイルスベクターの最大限度容量は、７．５ｋＢを下回るか、またはベクターの全長の約１５％である。８０％より多いアデノウイルスのウイルスゲノムがベクター骨格

中に残存し、これは、ベクター由来の細胞毒性の供給源である。また、Ｅ１欠失ウイルスの複製欠損性は不完全である。例えば、ウイルス遺伝子発現の漏れが、高い感染多重度（ＭＯＩ）で、現在利用可能なベクターで観察されている（Ｍｕｌｌｉｇａｎ、１９９３）。

【０１５２】

ヘルパー細胞株は、ヒト胚性腎臓細胞、筋細胞、造血細胞または他のヒト胚性間葉系細胞もしくは上皮細胞などのヒト細胞由来であり得る。あるいは、ヘルパー細胞は、ヒトアデノウイルスに対して許容的な他の哺乳動物種の細胞由来であり得る。このような細胞には、Ｖｅｒｏ細胞または他のサル胚性間葉系細胞もしくは上皮細胞が含まれる。上記のように、現在好ましいヘルパー細胞株は２９３である。

【０１５３】

最近、Ｒａｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９５）は、２９３細胞を培養し、アデノウイルスを増殖させるための改善された方法を開示した。１つの様式において、個々の細胞を、１００～２００ｍｌの培地を含んだ１リットルのシリコン処理したスピナーフラスコ（Ｔｅｃｈｎｅ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＵＫ）中に接種することによって、天然細胞凝集物を増殖させる。４０ｒｐｍで攪拌した後、細胞生存率をトリパンブルーで評価する。別の様式において、Ｆｉｂｒａ－Ｃｅｌマイクロキャリア（Ｂｉｂｂｙ　Ｓｔｅｒｌｉｎ、Ｓｔｏｎｅ、ＵＫ）（５ｇ／ｌ）を以下のように使用する。５ｍｌの培地に再懸濁した細胞接種材料を、２５０ｍｌのエルレンマイヤーフラスコ中のキャリア（５０ｍｌ）に添加し、ときどきかき混ぜながら１～４時間静置する。次いで、培地を５０ｍｌの新たな培地で置換し、振盪を開始する。ウイルス産生のために、細胞を約８０％コンフルエンスまで増殖させ、その後培地を（最終容量の２５％まで）置換し、０．０５のＭＯＩでアデノウイルスを添加する。培養物を一晩静置し、その後容量を１００％まで増大させ、さらに７２時間の振盪を開始する。

【０１５４】

好ましい実施形態において、アデノウイルスは、当該分野で公知のような「ガットレス」アデノウイルスである。「ガットレス」アデノウイルスベクターは、アデノウイルス遺伝子デリバリーのために最近開発された系である。アデノウイルスの複製は、ヘルパーウイルスならびにＥ１ａおよびＣｒｅの両方を発現する（天然の環境中には存在しない条件）特別なヒト２９３細胞株を必要とする。今までの最も有効な系では、Ｅ１欠失ヘルパーウイルスが、バクテリオファージＰ１　ｌｏｘＰ部位が隣接した（「ｆｌｏｘｅｄ」）パッケージングシグナルと共に使用される。Ｃｒｅリコンビナーゼを発現するヘルパー細胞の、ｆｌｏｘｅｄパッケージングシグナルを有するヘルパーウイルスと一緒のガットレスウイルスによる感染は、ガットレスｒＡＶのみを生じるはずである。なぜなら、パッケージングシグナルは、ヘルパーウイルスのＤＮＡから欠失されるからである。しかし、２９３ベースのヘルパー細胞が使用される場合、ヘルパーウイルスＤＮＡは、ヘルパー細胞ＤＮＡ中に組み込まれるＡＤ５　ＤＮＡと組み換わることができる。結果として、野生型パッケージングシグナルだけでなくＥ１領域が回復される。したがって、Ｅ１欠失ヘルパーウイルスが使用される場合、２９３（または９１１）ベースのヘルパー細胞上でのガットレスｒＡＶの産生は、ＲＣＡの生成もまた生じ得る。

【０１５５】

このベクターからは、すべてのウイルス遺伝子が取り除かれる。したがって、このベクターは非免疫原性であり、必要に応じて反復して使用され得る。「ガットレス」アデノウイルスベクターはまた、導入遺伝子を収容するための３６ｋｂの空間を含み、したがって、多数の遺伝子の細胞への同時デリバリーを可能にする。ＲＧＤモチーフなどの特定の配列モチーフが、その感染性を増強するために、アデノウイルスベクターのＨ－Ｉループ中に挿入され得る。アデノウイルス組換え体は、本明細書に記載され当該分野で公知のもののような任意のアデノウイルスベクター中に、特定の導入遺伝子または導入遺伝子のフラグメントをクローニングすることによって、構築される。アデノウイルス組換え体は、脊椎動物の表皮細胞を、免疫剤としての使用のために非侵襲的な様式で形質導入するために

、使用され得る。

【０１５６】

「ガットレス」アデノウイルスの使用は、異種ＤＮＡの大きいインサートの挿入のために特に有利である（概説については、Ｙｅｈ．ａｎｄ　Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ、ＦＡＳＥＢ　Ｊ．１１：６１５（１９９７）を参照のこと）、これは、参照により本明細書中に組み込まれる。さらに、ガットレスアデノウイルスベクターならびにそれらを作製および使用する方法は、米国特許第６，１５６，４９７号および同第６，２２８，６４６号中により詳細に記載され、これらは共に、参照により本明細書中に明示的に組み込まれる。

【０１５７】

アデノウイルスベクターが複製欠損または少なくとも条件付で欠損であるという要件以外は、アデノウイルスベクターの性質は、本発明の首尾よい実施に重要でないと考えられる。アデノウイルスは、４２の異なる既知の血清型またはサブグループＡ～Ｆのいずれかのものであり得る。サブグループＣのアデノウイルス５型は、大量の生化学的情報および遺伝的情報が知られているヒトアデノウイルスであり、歴史的にベクターとしてアデノウイルスを使用するほとんどの構築体に使用されてきたので、アデノウイルス５型は、本発明における使用のための条件付複製欠損アデノウイルスベクターを得るための、好ましい出発材料である。

【０１５８】

上記のように、本発明に従う典型的なベクターは、複製欠損であり、かつアデノウイルスＥ１領域を有さないであろう。したがって、Ｅ１コード配列が除去された位置で、目的の免疫調節分子および／またはさらなる治療タンパク質をコードする導入遺伝子を導入することが、最も簡便であろう。しかし、アデノウイルス配列内の発現構築体の挿入位置は、本発明にとって重要ではない。目的の導入遺伝子はまた、Ｋａｒｌｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）により記載されたＥ３置換ベクター中またはＥ４領域（このとき、ヘルパー細胞株またはヘルパーウイルスが、Ｅ４欠損を補完している）中の欠失されたＥ３領域の代わりに挿入され得る。

【０１５９】

アデノウイルスは、増殖および操作が容易であり、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏで広い宿主範囲を示す。このグループのウイルスは、高い力価（例えば、１ｍｌ当たり10^{9}～10^{11}個のプラーク形成単位）で得ることができ、高度に感染性である。アデノウイルスの生活環は、宿主細胞のゲノムへの組み込みを必要としない。アデノウイルスベクターによってデリバーされる外来遺伝子はエピソーム性であり、したがって、宿主細胞に対する低い遺伝毒性を有する。野生型アデノウイルスによるワクチン接種の研究（Ｃｏｕｃｈ　ｅｔ　ａｌ．、１９６３；Ｔｏｐ　ｅｔ　ａｌ．、１９７１）においては副作用は報告されておらず、このことは、ｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子移入ベクターとしてのそれらの安全性および治療上の可能性を実証している。

【０１６０】

アデノウイルスベクターは、真核生物遺伝子発現（Ｌｅｖｒｅｒｏ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１；Ｇｏｍｅｚ－Ｆｏｉｘ　ｅｔ　ａｌ．、１９９２）およびワクチン開発（Ｇｒｕｎｈａｕｓ　ａｎｄ　Ｈｏｒｗｉｔｚ、１９９２；Ｇｒａｈａｍ　ａｎｄ　Ｐｒｅｖｅｃ、１９９２）において使用されてきた。最近、動物研究により、組換えアデノウイルスが遺伝子治療に使用できることが示唆された（Ｓｔｒａｔｆｏｒｄ－Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ　ａｎｄ　Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ、１９９１；Ｓｔｒａｔｆｏｒｄ－Ｐｅｒｒｉｃａｕｄｅｔ　ｅｔ　ａｌ．、１９９０；Ｒｉｃｈ　ｅｔ　ａｌ．、１９９３）。異なる組織に組換えアデノウイルスを投与する研究には、気管点滴注入（Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．、１９９２）、筋肉注射（Ｒａｇｏｔ　ｅｔ　ａｌ．、１９９３）、末梢静脈内注射（Ｈｅｒｚ　ａｎｄ　Ｇｅｒａｒｄ、１９９３）および脳への定位接種（Ｌｅ　Ｇａｌ　Ｌａ　Ｓａｌｌｅ　ｅｔ　ａｌ．、１９９３）が含まれる。

【０１６１】

したがって、好ましい実施形態において、本明細書中で使用される発現ベクターはアデノウイルスベクターである。適切なアデノウイルスベクターは、Ａｄ２またはＡｄ５などのヒトアデノウイルスの改変を含み、ここで、ウイルスがｉｎ　ｖｉｖｏで複製するのに必要な遺伝因子（例えば、Ｅ１領域、およびアデノウイルスゲノム中に挿入された目的の外因性遺伝子をコードする発現カセット）は除去されている。

【０１６２】

さらに、上記のように、好ましい発現ベクター系は、ＰＣＴ／ＵＳ９７／０１０１９およびＰＣＴ／ＵＳ９７／０１０４８（これらは共に、参照によって本明細書中に明示的に組み込まれる）中に一般に記載されるようなレトロウイルスベクター系である。

【０１６３】

レトロウイルスは、逆転写のプロセスによって、感染細胞中でそれらのＲＮＡを二本鎖ＤＮＡに変換する能力によって特徴付けられる、一本鎖ＲＮＡウイルスのグループである（Ｃｏｆｆｉｎ、１９９０）。得られたＤＮＡは次いで、プロウイルスとして細胞染色体に安定に組み込まれ、ウイルスタンパク質の合成を指示する。組み込みにより、レシピエント細胞およびその子孫におけるウイルス遺伝子配列の保持が生じる。レトロウイルスゲノムは、３つの遺伝子ｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖを含み、これらはそれぞれ、カプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素およびエンベロープ成分をコードする。ｇａｇ遺伝子の上流に見出される配列は、ビリオンへのゲノムのパッケージングのためのシグナルを含む。２つの末端反復配列（ＬＴＲ）の配列は、ウイルスゲノムの５’末端および３’末端に存在する。これらは、強力なプロモーター配列およびエンハンサー配列を含み、宿主細胞ゲノムにおける組み込みにも必要である（Ｃｏｆｆｉｎ、１９９０）。

【０１６４】

レトロウイルスベクターを構築するために、１つまたは複数の目的のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド配列をコードする核酸を、特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノム中に挿入して、複製欠損のウイルスを産生する。ビリオンを産生するために、ｇａｇ、ｐｏｌおよびｅｎｖ遺伝子を含むがＬＴＲおよびパッケージング成分を含まないパッケージング細胞株を構築する（Ｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．、１９８３）。レトロウイルスＬＴＲおよびパッケージング配列と共にｃＤＮＡを含む組換えプラスミドが（例えば、リン酸カルシウム沈殿によって）この細胞株に導入される場合、このパッケージング配列により、組換えプラスミドのＲＮＡ転写物がウイルス粒子中にパッケージングされることが可能となり、次いでこのウイルス粒子が培養培地中に分泌される（Ｎｉｃｏｌａｓ　ａｎｄ　Ｒｕｂｅｎｓｔｅｉｎ、１９８８；Ｔｅｍｉｎ、１９８６；Ｍａｎｎ　ｅｔ　ａｌ．、１９８３）。組換えレトロウイルスを含む培地を次いで収集し、所望により濃縮して、遺伝子移入に使用する。レトロウイルスベクターは、広範な種々の細胞型に感染できる。しかし、組み込みおよび安定な発現には、宿主細胞の分裂が必要である（Ｐａｓｋｉｎｄ　ｅｔ　ａｌ．、１９７５）。

【０１６５】

レトロウイルスベクターの特異的な標的化を可能にするように設計された新規アプローチが、ウイルスエンベロープへのラクトース残基の化学的付加によるレトロウイルスの化学的改変に基づいて最近開発された。この改変は、シアロ糖タンパク質レセプターを介した肝細胞の特異的感染を可能にし得る。

【０１６６】

レトロウイルスエンベロープタンパク質に対するビオチン化抗体および特定の細胞レセプターに対するビオチン化抗体が使用される、組換えレトロウイルスの標的化のための異なるアプローチが設計された。これらの抗体は、ストレプトアビジンを使用することによって、ビオチン成分を介して連結された（Ｒｏｕｘ　ｅｔ　ａｌ．、１９８９）。主要組織適合複合体クラスＩおよびクラスＩＩ抗原に対する抗体を使用して、彼らは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、狭宿主性ウイルスによる、これらの表面抗原を保有する種々のヒト細胞の感染を実証した（Ｒｏｕｘ　ｅｔ　ａｌ．、１９８９）。適切なレトロウイルスベクターには、ＬＮＬ６、ＬＸＳＮおよびＬＮＣＸが含まれる（概説については、Ｂｙｕｎ　ｅｔ

ａｌ．、Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．３（９）：７８０－８（１９９６）。

【０１６７】

ＡＡＶ（Ｒｉｄｇｅｗａｙ、１９８８；Ｈｅｒｍｏｎａｔ　ａｎｄ　Ｍｕｚｙｃｓｋａ、１９８４）は、アデノウイルスストックの混入物として発見されたパルボウイルスである。これは、遍在性のウイルスであり（米国のヒト集団の８５％に抗体が存在する）、いずれの疾患にも関連していない。これはまた、その複製がヘルパーウイルス（例えばアデノウイルス）の存在に依存するので、ディペンドウイルスとして分類される。５つの血清型が単離されており、そのうちＡＡＶ－２が最も特徴付けられている。ＡＡＶは、直径２０～２４ｎｍの正十二面体ビリオンを形成するカプシドタンパク質ＶＰ１、ＶＰ２およびＶＰ３中に封入された、一本鎖直線状ＤＮＡを有する（Ｍｕｚｙｃｚｋａ　ａｎｄ　Ｍｃ　Ｌａｕｇｈｌｉｎ、１９８８）。

【０１６８】

ＡＡＶ　ＤＮＡは、約４．７キロ塩基長である。これは、２つのオープンリーディングフレームを含み、２つのＩＴＲが隣接している。ＡＡＶゲノムには、２つの主要な遺伝子：ｒｅｐおよびｃａｐが存在する。ｒｅｐ遺伝子は、ウイルス複製を担うタンパク質をコードし、一方ｃａｐは、カプシドタンパク質ＶＰ１～３をコードする。各ＩＴＲは、Ｔ型ヘアピン構造を形成する。これらの末端反復は、染色体組み込みにのみ必須なＡＡＶのシス成分である。したがって、ＡＡＶは、すべてのウイルスコード配列が除去され、デリバリーのための遺伝子のカセットによって置換されたベクターとして使用できる。３つのウイルスプロモーターが同定されており、そのマップ位置に従って、ｐ５、ｐ１９およびｐ４０と命名されている。ｐ５およびｐ１９からの転写はｒｅｐタンパク質の産生を生じ、ｐ４０からの転写はカプシドタンパク質を産生する（Ｈｅｒｍｏｎａｔ　ａｎｄ　Ｍｕｚｙｃｚｋａ、１９８４）。

【０１６９】

ＡＡＶはまた、その安全性に起因して、デリバリービヒクルのよい選択肢である。比較的複雑なレスキュー機構が存在し、野生型アデノウイルスだけでなく、ＡＡＶの遺伝子もまた、ｒＡＡＶを動員するのに必要である。同様に、ＡＡＶは病原性ではなく、いずれの疾患にも関連しない。ウイルスコード配列の除去により、ウイルス遺伝子発現に対する免疫反応が最小化され、したがって、ｒＡＡＶは、炎症応答を誘発しない。ＡＡＶに関連する他の開示は、米国特許第６，５３１，４５６号に示されており、これは、参照によって本明細書に明示的に組み込まれる。

【０１７０】

他のウイルスベクターが、宿主細胞への免疫調節分子のデリバリーのために、本発明において発現ベクターとして使用され得る。ワクシニアウイルス（Ｒｉｄｇｅｗａｙ、１９８８；Ｃｏｕｐａｒ　ｅｔ　ａｌ．、１９８８）、レンチウイルス、ポリオウイルスおよびヘルペスウイルスなどのウイルス由来のベクターが使用され得る。これらは、種々の哺乳動物細胞にとって魅力的ないくつかの特徴を提供する（Ｆｒｉｅｄｍａｎｎ、１９８９；Ｒｉｄｇｅｗａｙ、１９８８；Ｃｏｕｐａｒ　ｅｔ　ａｌ．、１９８８；Ｈｏｒｗｉｃｈ　ｅｔ　ａｌ．、１９９０）。

【０１７１】

発現ベクターのデリバリー

免疫調節分子（例えば、ＣＤ８α鎖）および／またはさらなる治療タンパク質（例えば、自己抗原の少なくとも１つのエピトープを含むポリペプチド）の発現をもたらすために、発現ベクターを細胞中にデリバーする必要がある。このデリバリーは、細胞株を形質転換するための実験室手順の場合同様ｉｎ　ｖｉｔｒｏで、または特定の疾患状態の治療の場合同様ｉｎ　ｖｉｖｏもしくはｅｘ　ｖｉｖｏで、達成され得る。上記のように、デリバリーのための１つの好ましい機構は感染を介したものであり、このとき、核酸は組換えウイルス粒子中に封入されている。好ましい実施形態において、このデリバリーは、注射または静脈内投与などの、患者へのベクターの全身投与によって達成される。全身投与は、任意の細胞における免疫調節分子およびエピトープを含むポリペプチドの同時発現をも

たらし得る。即ち、発現は特定の細胞型に標的化されない。

【０１７２】

一旦発現ベクターが宿主細胞中にデリバーされると、所望のオリゴヌクレオチド配列またはポリヌクレオチド配列をコードする核酸は、異なる部位で配置され、発現され得る。特定の実施形態において、構築体をコードする核酸は、細胞のゲノム中に安定に組み込まれ得る。この組み込みは、相同組換えを介して特定の位置および方向であり得るか（遺伝子置換）、あるいはランダムな非特異的位置に組み込まれ得る（遺伝子増大）。さらなる好ましい実施形態において、核酸は、ＤＮＡの分離したエピソーム性のセグメントとして、細胞中で安定に維持され得る。このような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主の細胞周期と独立または同期した、維持および複製を許容するのに十分な配列をコードする。発現構築体が細胞に如何にデリバーされ、核酸が細胞中の何処に留まるかは、使用される発現ベクターの型に依存する。

【０１７３】

本発明の特定の実施形態において、発現ベクターは単に、裸の組換えＤＮＡまたはプラスミドからなり得る。ベクターの移入は、細胞膜を物理的または化学的に透過化する上記方法のいずれかによって、実施され得る。これは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでの移入に特に適用可能であるが、ｉｎ　ｖｉｖｏでの使用にも同様に適用され得る。Ｄｕｂｅｎｓｋｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）は、成体および新生児のマウスの肝臓および脾臓中に、リン酸カルシウム沈殿物の形態でポリオーマウイルスＤＮＡを首尾よく注射し、活発なウイルス複製および急性感染を実証した。Ｂｅｎｖｅｎｉｓｔｙ　ａｎｄ　Ｒｅｓｈｅｆ（１９８６）はまた、リン酸カルシウム沈殿したプラスミドの直接的腹腔内注射が、トランスフェクトされた遺伝子の発現を生じることを実証した。目的の遺伝子をコードするＤＮＡがまた、同様の様式でｉｎ　ｖｉｖｏで移入され、遺伝子産物を発現することが想定される。

【０１７４】

裸のＤＮＡ発現構築体を細胞中に移入するための本発明の別の実施形態は、粒子ボンバードメントを含むことができる。この方法は、ＤＮＡでコーティングされた微粒子弾を高速まで加速して、それらが細胞膜を穿孔し、細胞を殺さずに細胞に入るようにできる能力に依存する（Ｋｌｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、１９８７）。小粒子を加速するためのいくつかのデバイスが開発されている。１つのこのようなデバイスは、電流を発生させるために高電位放電に依存し、この電流が次に原動力を提供する（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、１９９０）。使用される微粒子弾は、生物学的に不活性な物質（例えば、タングステンまたは金のビーズ）から一般になる。

【０１７５】

ラットおよびマウスの肝臓、皮膚および筋肉の組織を含む選択された器官が、ｉｎ　ｖｉｖｏでボンバードメントに付される（Ｙａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．、１９９０；Ｚｅｌｅｎｉｎ　ｅｔ　ａｌ．、１９９１）。これは、銃と標的器官との間の任意の介在組織を排除するために、組織または細胞の外科的露出を必要とし得る（即ち、ｅｘ　ｖｉｖｏ処置）。再度、特定の遺伝子をコードするＤＮＡがこの方法を介してデリバーされ得、なおも本発明によって組み込まれ得る。

【０１７６】

本発明の一実施形態において、核酸分子は、リポソーム媒介性の核酸移入によって、標的細胞中に導入される。これに関して、多数のリポソームベースの試薬が当該分野で周知であり、市販されており、標的の細胞中に核酸分子を導入するために慣用的に使用され得る。本発明の特定の実施形態は、カチオン性脂質移入ビヒクル（例えば、ＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅまたはＬｉｐｏｆｅｃｔｉｎ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ））、カチオン性コレステロール誘導体（ＤＣコレステロール）と一緒のジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（ＤＯＰＥ）、Ｎ［１－（２，３－ジオレオイルオキシ）プロピル］－Ｎ，Ｎ，Ｎ－トリメチルアンモニウムクロライド（ＤＯＴＭＡ）（Ｓｉｏｕｄ　ｅｔ　ａｌ．、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４２：８３１－８３５（１９９１））、ＤＯＳＰＡ：ＤＯＰＥ、ＤＯＴＡＰ、ＤＭＲＩＥ：コレステロール、ＤＤＡＢ：ＤＯＰＥなどを使

用するだろう。リポソーム封入核酸の産生は、当該分野で周知であり、約１：１の比で脂質および核酸を合わせることを典型的に含む。

【０１７７】

本発明の使用

上で詳述したように、本明細書に記載され可能となった方法および組成物は、自己抗原に対する細胞性および／または体液性自己免疫応答を阻害することにおいて一般的な有用性を見出す。本発明によれば、自己抗原を発現する細胞の生存は、ＣＤ８ポリペプチド、より好ましくはＣＤ８α鎖、および自己抗原の少なくとも１つのエピトープを含むポリペプチドを発現するように宿主細胞を条件付けることによって、慢性的な一般的免疫抑制剤を必要とせずに、延長させることができる。本明細書に記載されるようなＣＤ８ポリペプチドおよび自己抗原エピトープの発現は、自己抗原に対する自己免疫応答の有効かつ特異的な阻害を生じる。

【０１７８】

理論に束縛されることなく、細胞上でのＣＤ８の発現は、当該細胞に、宿主免疫系に対する「ｖｅｔｏ効果」を誘導する能力を付与すると考えられる。即ち、上記のように、ＣＤ８を発現する細胞が宿主Ｔ細胞と接触すると、このＴ細胞は下方制御または殺傷される。したがって、「ｖｅｔｏ」または「ｖｅｔｏ効果」とは、標的細胞が、当該標的細胞または当該標的細胞上に発現された抗原に対する免疫応答を下方制御する能力を意味する。ＣＤ８、特にＣＤ８α鎖は、ｖｅｔｏ効果の誘導または移入に必要であると考えられる。「ｖｅｔｏ効果の移入」とは、ｖｅｔｏ効果が、通常はｖｅｔｏ効果を誘導しない細胞に移入されることを意味する。即ち、標的細胞上の抗原に対する免疫応答を低減または下方制御する能力が、ＣＤ８の発現の誘導または増大によって、当該標的細胞に付与される。本明細書中に初めて報告したように、誘導された自己抗原の発現または提示と組み合わせた標的細胞上のＣＤ８α鎖の存在は、自己反応性ＣＤ４＋Ｔ細胞ならびにＣＤ８＋細胞の活性をｖｅｔｏ化でき、したがって、免疫応答の細胞性成分および体液性成分の両方がそれによって阻害され得ることが、驚くべきことに今回発見された。

【０１７９】

したがって、本発明は、ｖｅｔｏ効果を誘導することによって標的細胞に対する免疫応答を低減することに用途を見出す。これは、標的細胞を他の方法で認識するＴ細胞の下方制御または除去を生じる。標的細胞が自己免疫抗原を発現する細胞である場合、ｖｅｔｏ効果を誘導することは、宿主自己免疫応答に対する保護となる。

【０１８０】

一般に、ＣＤ８の発現が自己免疫のシナリオにおいて使用される場合、自己抗原を発現する細胞の寿命は、対象核酸の非存在下で通常予測され得る時間量を超える顕著な量、より通常は少なくとも５日間、より好ましくは少なくとも約３０日間、より好ましくは約３カ月間、最も好ましくは約６カ月間～１年間にわたり、延長されよう。自己免疫抗原発現細胞の寿命が延長される実際の時間量は、手順の種々の条件によって、特に自己抗原を発現する細胞に依存して、変動しよう。また、ＣＤ８核酸を含むデリバリービヒクルでの治療は、標的細胞が免疫応答によって認識されるように、ＣＤ８発現が減衰する場合には反復され得る。

【０１８１】

ｉｎ　ｖｉｖｏデリバリーには、筋肉、器官への直接注射、カテーテルを介したもの、または他の灌流手段によるものが含まれるが、これらに限定されない。核酸は、血管内投与または全身投与され得る。当業者は、デリバリーの各様式の利点および欠点を認識するであろう。例えば、直接注射は、患者において最大の力価の核酸を産生し得るが、核酸の分布は、身体中で不均一となる可能性があろう。全身投与は、筋肉内注射同様、好ましい方法である。核酸は、単回投与または数回の投与で導入され得る。当業者は、過度の実験なしに、満足のいくデリバリー手段およびデリバリーレジメンを決定できるだろう。

【０１８２】

対象核酸は、広範な種々の宿主、特に霊長類、より具体的にはヒト、または他の家畜動

物で使用され得る。

【０１８３】

本発明の方法および組成物の他の適用は、当業者に明らかとなろう。

【０１８４】

発現ベクターの製剤および投与

当業者は、発現ベクター（特にアデノウイルスベクター）を動物に投与する多数の適切な方法（例えば、Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５２、４３１－４３４（１９９１）；Ｊａｆｆｅ ｅｔ ａｌ．、Ｃｌｉｎ．Ｒｅｓ．、３９（２）、３０２Ａ（１９９１）；Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ ｅｔ ａｌ．、Ｃｌｉｎ．Ｒｅｓ．、３９（２）、３１１Ａ（１９９１）；Ｂｅｒｋｎｅｒ、ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、６、６１６－６２９（１９８８）を参照のこと）が利用可能であり、１つより多い経路が投与のために使用できるが、特定の経路が別の経路よりもより迅速かつより有効な反応を提供できることを理解するであろう。発現ベクターの投与における使用のための医薬的に許容される賦形剤および／または免疫応答を阻害する手段もまた、当業者に周知であり、容易に利用可能である。賦形剤の選択は、発現ベクターを投与するために使用する特定の方法によって、そして免疫応答を阻害する手段によって、一部決定されよう。したがって、本発明は、免疫調節分子（例えば、ＣＤ８α鎖）をコードする発現ベクターを、単独でまたは導入遺伝子とさらに組み合わせて、適切な担体中に含む組成物を提供し、本発明の文脈における使用のために適切な広範な種々の製剤が存在する。特に、本発明は、ＣＤ８ポリペプチドおよび少なくとも１つの自己抗原またはその機能的フラグメントをコードする遺伝子を含む発現ベクター、ならびにそのための担体を含む組成物を提供する。代替的実施形態において、この発現ベクターは、目的のさらなる治療用分子またはタンパク質（例えば、抗炎症分子）をさらにコードする。このような組成物は、他の活性剤（例えば、当該分野で公知のような治療もしくは予防剤および／または免疫抑制剤）をさらに含むことができる。以下の方法および賦形剤は単なる例示であり、決して限定するものではない。

【０１８５】

経口投与に適切な製剤は、以下からなり得る：（ａ）例えば、有効量の化合物が希釈剤（例えば、水、生理食塩水またはオレンジジュース）中に溶解した、液状溶液；（ｂ）各々が所定量の活性成分を、固体または顆粒として含む、カプセル剤、サシェ剤または錠剤；（ｃ）適切な液体中の懸濁物；および（ｄ）適切なエマルジョン。錠剤形態は、ラクトース、マンニトール、コーンスターチ、ポテトスターチ、微結晶セルロース、アカシア、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸および他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、防腐剤、香料、ならびに薬理学的に適合性の賦形剤のうち１種または複数を含むことができる。ロゼンジ形態は、香味剤（通常、スクロースおよびアカシアまたはトラガカント）中に活性成分を含むことができ、そしてトローチは、不活性基材（例えば、ゼラチンおよびグリセリン）中に活性成分を含み、エマルジョン、ゲルなどは、活性成分に加えて、当該分野で公知のそのような賦形剤を含む。

【０１８６】

エアロゾル製剤は、吸入を介した投与のために製造され得る。これらのエアロゾル製剤は、加圧された許容可能な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素など）中に配置され得る。これらはまた、加圧されていない製剤のための医薬として、例えばネビュライザーまたはアトマイザー中に製剤され得る。

【０１８７】

非経口投与に適切な製剤には、水性および非水性の等張滅菌注射溶液（抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤およびこの製剤を意図したレシピエントの血液と等張にする溶質を含むことができる）、ならびに水性および非水性の滅菌懸濁物（懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤および防腐剤を含むことができる）が含まれる。これらの製剤は、単位用量または複数用量の密封された容器（例えば、アンプルおよびバイアル）中に与えられ得、フリーズドライ（凍結乾燥）条件下で保存され得、使用直前に注射用の滅菌液体賦形剤（例えば水）の

添加のみを必要とする。即席の注射溶液および懸濁物は、以前に記載された種類の滅菌の粉末、顆粒および錠剤から調製できる。さらに、坐剤は、種々の基材（例えば、乳化基材または水溶性基材）の使用によって製造できる。膣内投与に適切な製剤は、活性成分に加えて、適切であることが当該分野で公知のそのような担体を含む、ペッサリー、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォームまたはスプレー製剤として与えられ得る。

【０１８８】

本発明の文脈において、動物、特にヒトに投与される用量は、目的の治療用導入遺伝子、ベクターの供給源および／または免疫調節分子の性質、使用される組成物、投与方法、ならびに治療される特定の部位および生体によって異なるであろう。しかし、好ましくは、有効量のベクター（例えば、本発明に従うアデノウイルスベクター）に対応する用量が使用される。「有効量」とは、当業者に公知ないくつかのエンドポイントを使用してモニタリングできる、宿主における所望の効果を生じるのに十分な量である。例えば、１つの所望の効果は、宿主細胞への核酸移入である。このような移入は、治療効果（例えば、治療される疾患、状態、障害または症候群に関連するある症状の軽減）が含まれるがこれらに限定されない種々の手段によって、あるいは移入された遺伝子もしくはコード配列または宿主内でのその発現の証拠によって、モニタリングできる（例えば、ポリメラーゼ連鎖反応、ノーザンもしくはサザンハイブリダイゼーション、または宿主細胞において核酸を検出するための転写アッセイを使用する、あるいは、イムノブロット分析、抗体媒介性の検出、または移入された核酸によってコードされるタンパク質もしくはポリペプチドまたはこのような移入に起因するレベルもしくは機能における影響を検出するための特殊アッセイを使用する）。記載されたこれらの方法は、決して包括的なものではなく、特定の適用に適したさらなる方法が、当業者に明らかであろう。これに関して、ベクター（例えばウイルスベクター、特にアデノウイルスベクター）、ならびに免疫応答を阻害する手段をコードするベクターの導入に対する宿主の応答は、投与されるウイルスの用量、デリバリーの部位、およびベクターならびに導入遺伝子および免疫応答を阻害する手段の遺伝学的製造に依存して変動し得ることに、留意すべきである。

【０１８９】

一般に、本発明のベクターの有効な移入を確実にするために、所定の投与経路について接触させるべき細胞の概数に基づいて、接触させるべき細胞１個当たり、約１～約５，０００コピーの本発明に従うベクターを使用することが好ましく、約３～約３００ｐｆｕが各細胞に侵入することがさらにより好ましい。しかし、これは一般的な指針に過ぎず、ｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏのいずれかの特定の適用において保証され得るような、より高いまたはより低い量の使用を排除するものでは決してない。同様に、免疫応答を阻害する手段の量は、タンパク質を含む組成物の形態である場合、導入遺伝子を含む組換えベクターに対する免疫応答を阻害するのに十分であるべきである。例えば、実際の用量およびスケジュールは、組成物が他の医薬組成物と併用して投与されるか否かに依存するか、または薬物動態、薬物体内動態および代謝における個体間の差異に依存して、変動し得る。同様に、量は、標的化される特定の細胞型またはベクターが移入される手段に依存して、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ適用において変動し得る。当業者は、特定の状況の要件に従って、任意の必要な調節を容易に行うことができる。

【０１９０】

本発明は、好ましい実施形態を参照して記載されているが、当業者は、本発明の趣旨および範囲から逸脱することなく、形態および詳細において変化がなされ得ることを認識するであろう。本明細書中で特定した特許、刊行物および他の参考文献の各々は、その全体が参照により本明細書中に明示的に組み込まれる。

【実施例１】

【０１９１】

ｖｅｔｏベクターを用いた研究

ａ．ｖｅｔｏ細胞として線維芽細胞を操作するための、プラスミド発現ベクターの使用

線維芽細胞を、ヒトまたはマウスのいずれかのＣＤ８α鎖をそれらの表面上で発現する

ように操作した。線維芽細胞を、ｐＣＭＶｈＣＤ８αプラスミドまたはｐＣＭＶｍＣＤ８αプラスミドでトランスフェクトした。これらのプラスミドにおいて、ＣＤ８α鎖の発現が、ＣＭＶ最初期プロモーター／エンハンサー（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によって駆動される。ＣＤ８α鎖をトランスフェクトした線維芽細胞（Ｈ－２^{b}）を混合リンパ球培養物（Ｂａｌｂ／ｃ；Ｈ－２^{d}抗－Ｃ５７ＢＬ／６；Ｈ－２^{b}）中に添加したところ、ＣＤ８α鎖発現系統のみが、ＣＴＬ応答を抑制した。図２ＡおよびＢ中に示されるように、マウスまたはヒトのＣＤ８α鎖のいずれかを発現するＭＣ５７Ｔ線維芽細胞の添加は、ＣＴＬの誘導を完全に抑制した。対照的に、トランスフェクトしていない線維芽細胞の添加は、Ｔリンパ球活性化に影響を与えなかった。ＣＤ８α鎖の阻害機能を確立することに加えて、これらの実験はまた、マウスＴリンパ球が、ヒトＣＤ８α鎖でｖｅｔｏ化され得ることを実証した。したがって、マウスモデルは、臨床使用のために設計されたｖｅｔｏを試験することにおいて有用であろう。

【０１９２】

操作されたｖｅｔｏ細胞のｉｎ　ｖｉｖｏ機能

動物において操作されたｖｅｔｏが機能するか否かを試験した。ＣＤ８α鎖を発現するようにトランスフェクトされたＣ５７ＢＬ／６（Ｈ－２^{b}）由来線維芽細胞を、Ｂａｌｂ／ｃ（Ｈ－２^{d}）マウスに注射した。対照動物に、トランスフェクトしていない線維芽細胞を注射した。８～４０日後に脾臓細胞を収集し、刺激因子細胞としてのＣ５７ＢＬ／６（Ｈ－２^{b}）脾臓細胞と共にＭＬＣ培養物中に導入した。５日後、培養物を収集し、それらがＥＬ４（Ｃ５７ＢＬ／６、Ｈ－２^{b}）標的細胞を溶解する能力について試験した。抗Ｈ－２^{b}ＣＴＬ応答の誘導は、ＣＤ８α鎖発現線維芽細胞を注射した動物において完全に抑制された（図３）。抗Ｈ－２^{b}　Ｔ細胞の阻害は高度に特異的であった。これらのマウス由来のＴ細胞は、第３者のＨ－２^{k}アロＭＨＣ分子に対する応答をなおも開始した。これらの実験により、操作されたｖｅｔｏ細胞が、従来のｖｅｔｏ細胞と同様にｉｎ　ｖｉｖｏで免疫応答を特異的に抑制し、非典型的なｖｅｔｏ細胞がｖｅｔｏ細胞になるように操作され得ることが確認された。換言すれば、操作された細胞は、これらの細胞上に保持される抗原に対して動物を陰性免疫した。

【０１９３】

ＣＤ８α鎖の発現が、完全に活性化したＴ細胞の機能を妨害するか否かを試験した。この目的のために、ＣＤ８α鎖を発現する標的細胞を、完全に活性化したＣＴＬによる溶解に対するそれらの感受性について試験した。２つの異なるＴ細胞集団（ＭＬＣにおいて刺激されたアロ反応性ＣＴＬおよび活性化したペプチド特異的ＣＴＬ）をこれらの研究のために選択した。図４Ａ～Ｂ中に示されるように、ＣＤ８α鎖を発現する標的は、アロ反応性Ｔ細胞の集団によって効果的に溶解されたが、抗原特異的Ｔ細胞によっては溶解されなかった。これらの結果は、操作されたｖｅｔｏが、継続中の抗原特異的免疫応答（例えば、自己免疫応答において見出されるもの）さえも妨害できることを示唆した。

【０１９４】

ｂ．ｖｅｔｏ細胞として線維芽細胞を操作するためのウイルス移入ベクター

アデノウイルス移入ベクターｍ－ＣＤ８のｖｅｔｏ機能：マウスＣＤ８α鎖を保有する、複製欠損ベクターであるアデノウイルス移入ベクター（ｍＡｄＣＤ８α）を開発した。ｍＡｄＣＤＢ　ｖｅｔｏ移入ベクターを感染させたマウス線維芽細胞（ＭＣ５７）は、２日目に高レベルのマウスＣＤ８α鎖を発現した。これらの速く増殖する細胞において、マウスＣＤ８α鎖の発現は、５日目までに顕著に減少する。ｍＡｄＣＤ８は、より低い効率を有するにもかかわらず、他のマウス細胞株（例えばＥＬ４）にも感染した（データ示さず）。

【０１９５】

引き続く実験において、ｍＡｄＣＤ８α感染ＭＣ５７線維芽細胞（Ｈ－２^{b}）を、Ｂａｌｂ／Ｃ（Ｈ－２^{d}）抗Ｃ５７Ｂ１／６（Ｈ－２^{b}）ＭＬＣに添加した。５日後、培養物を収集し、抗Ｈ－２^{b}　ＣＴＬの存在について試験した。感染した線維芽細胞を添加したＭＬＣは、抗Ｈ－２^{b}　ＣＴＬをもはや含まなかった（図１１）。これらの実験により、

ｖｅｔｏ移入ベクターが免疫抑制を媒介する能力が確立された。

【０１９６】

さらに、アデノウイルスベクターのヒトＣＤ８バージョンを作製した。また、マウスＣＤ８α鎖を発現するアデノ随伴ウイルスも作製した。これらのウイルスは、それぞれのＣＤ８鎖の発現を誘導することが実証されている。マウスまたはヒトのいずれかのＣＤ８α鎖を発現するアデノウイルスベクターは、キラーＴ細胞の誘導の完全な阻害を媒介した（図６を参照のこと）。

【０１９７】

ｍＡｄＣＤ８　ｖｅｔｏ移入ベクターによる陰性免疫：２つの異なる実験を、ｍＡｄＣＤ８がｉｎ　ｖｉｖｏで免疫応答を抑制するか否かを決定するために設定した。第１の実験において、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに、等用量の、ｍＡｄＣＤ８　ｖｅｔｏ移入ベクターまたはマウスＣＤ８α鎖の代わりにβ－ガラクトシダーゼをコードする類似のアデノウイルス対照ベクター（Ａｄβｇａｌ）のいずれかを感染させた。免疫の７日後、これらの動物を屠殺した。それらの脾臓細胞の単細胞懸濁物を、Ａｄβｇａｌウイルスの存在下で５日間培養した。次いで、培養物を収集し、それらの増殖能力を評価した。図６中に示すように、Ａｄβｇａｌで免疫したマウスから収集したＴ細胞は、Ａｄβｇａｌに対して活発に増殖し、高度に増殖性のＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の存在を示した。対照的に、ｍＡｄＣＤ８注射動物から収集したＴ細胞は増殖できなかった。

【０１９８】

第２段階において、本発明者らは、これらの培養物を、Ａｄβｇａｌ感染した標的細胞（ＥＬ４、Ｈ－２^{b}）を溶解するそれらの能力について試験して、これらの培養物が機能的ＣＤ８$^{+}$ＣＴＬを含むか否かを試験した。ＣＴＬは、Ａｄβｇａｌを感染させたマウスから樹立した培養物中でのみ明らかにできた（図８）。この第１の実験は、ＡｄＣＤ８αが、ＣＤ８α鎖の発現におそらく起因して、アデノウイルス抗原に対する応答を誘導しなかったことを示唆した。しかし、ＡｄＣＤ８が異なる理由のために免疫応答を誘導できなかった可能性があった。ＡｄＣＤ８は、ある未定義の方法で非機能的であったか、あるいはマウスは、ｍＡｄＣＤ８中に見出されないβ－ガラクトシダーゼタンパク質と反応しただけである可能性があった。

【０１９９】

異なる結論の妥当性を試験するために、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスに、ｍＡｄＣＤ８またはＡｄβｇａｌのいずれかを１回注射し、その７日後に、Ａｄβｇａｌでの２回目の注入を行った。７日後、マウスを屠殺し、Ａｄβｇａｌの存在下で５日目の脾臓細胞培養物を樹立した。応答性のＴ細胞を、Ａｄβｇａｌ感染した標的細胞に対するそれらの溶解能力について試験した（図７Ａ～Ｂ）。実際、Ａｄβｇａｌに対する２回の曝露は、免疫の改善を導いた。これらの研究はまた、ＡｄＣＤ８感染の後に、マウスがもはやＡｄβｇａｌに対して応答しないこと、およびＡｄβｇａｌが主に、排他的ではないにしろ、両方のベクターに共通するアデノウイルスタンパク質に対するＣＴＬ応答を誘導することを示した。この実験セットは、ベクター上に保有される遺伝子に対する応答に対して負に免疫することができる遺伝子治療ウイルスベクターを作製することが可能であろうことを、強力に示唆する。

【０２００】

ｖｅｔｏによるＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球の阻害：ｖｅｔｏ移入ベクターがＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球の誘導を阻害するために使用できるか否かを試験するために、以下の実験系を確立した。Ｃ５７Ｂｌ／６由来線維芽細胞刺激因子を、同種ＭＨＣクラスＩ分子（Ｈ－２Ｅ^{k}）および免疫刺激ＣＤ８０を発現するように形質転換した。それらの完全な刺激能を保存するために照射していない、これらのゆっくり増殖する線維芽細胞を、ｍＡｄＣＤ８またはＡｄβｇａｌ移入ベクターのいずれかで形質導入し、選択していないＣ５７Ｂ１／６脾臓細胞に添加した。４日後、これらの培養物を収集し、活性化した、即ち爆発的な（ｂｌａｓｔｉｎｇ）ＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球の存在について、表面免疫蛍光によって分析した（図８）。正常またはＡｄβｇａｌで形質導入した刺激因子細胞と共に培養した、選択していない

Ｃ５７Ｂ１／６脾臓細胞は、多数のＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ芽球を有することが見出された。対照的に、ｍＡｄＣＤ８感染した刺激因子を添加した培養物では、ごく少数のＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ芽球が検出された。これらの研究により、ｖｅｔｏがＣＤ４$^{+}$Ｔリンパ球を阻害し、さらに、ウイルスｖｅｔｏ移入ベクターがこの目的のために使用できることが確認された。

【０２０１】

種々のウイルス構築体での感染後のマウスおよびヒトのＣＤ８α鎖の表面発現

染色プロトコール：

ｍＡｄＣＤ８：

ＭＣ５７Ｔを、モック感染させたか、または改変ＩＭＤＭ中で３日間、約１０^{4}の感染多重度でｍＡｄＣＤ８に感染させた。感染細胞を収集し、ＦＩＴＣで直接標識した抗マウスＣＤ８α鎖抗体（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を用いて、ＣＤ８α鎖の表面発現について染色した。表面蛍光の程度を、蛍光標識細胞分析器（ＦＡＣＳｃａｎ、Ｂｅｃｋｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）で測定した（図９Ｂ）。

【０２０２】

骨髄細胞を、Ｂａｌｂ／ｃマウスの大腿骨の窩洞から収集した。これらの細胞に、β－ガラクトシダーゼを発現するアデノウイルス対照ベクター（ＡｄＬａｃＺ）またはｍＡｄＣＤ８を、改変ＩＭＤＭ中で３日間の培養につき、１０^{4}の感染多重度で感染させた。感染細胞を収集し、ＦＩＴＣで直接標識した抗マウスＣＤ８α鎖抗体を用いて、ＣＤ８α鎖の表面発現について染色した。表面蛍光の程度を測定した（図９Ｃ）。さらに、ＣＤ３４＋骨髄細胞、即ち、幹細胞プール内の細胞を含むいくつかの細胞型が、有効に形質導入されたことを決定した（表５）。

【０２０３】

【表５】

表5

マーカー	細胞型	染色陽性	
CD11a	白血球	29.3%	31.5%
CD34	造血系統	13.8%	10.5%
CD19	Bリンパ球	0.6%	7.7%
CD3	Tリンパ球	0.6%	nd

【０２０４】

ｈＡｄＣＤ８：

ＭＣ５７Ｔをモック感染させた。ｈＡｄＣＤ８のウイルス力価は未知である。１００μｌのストック溶液を使用して、３日間、３×１０^{5}個の細胞を感染させた。感染細胞を収集し、ＦＩＴＣで直接標識した抗ヒトＣＤ８α鎖抗体（Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を用いて、ＣＤ８α鎖の表面発現について染色した。表面蛍光の程度を、蛍光標識細胞分析器で測定した（図９Ａ）。

【０２０５】

ＡＡＶベースのベクター：ＡＡＶベースのベクターを、Ｓｔｒａｔｅｇｅｎｅ／Ａｖｉｇｅｎ系を使用して平行して作製した。これらの構築体において、ヒトおよびマウスのＣＤ８α鎖は、同じＭＣＶ最初期プロモーター／エンハンサーから操作した。２つのウイル

スｍＡＡＶＣＤ８およびｈＡＡＶＣＤ８を、ＨＥＫ２９３パッケージング細胞株中にパッケージングした。使用した系は、ヘルパーウイルスを含まない。ｍＡＡＶＣＤ８およびｈＡＡＶＣＤ８は、マウス線維芽細胞（ＭＣ５７Ｔ）に効率的に感染し、それぞれ、マウスまたはヒトのＣＤ８α鎖の高レベルの発現を駆動した。蛍光の程度を、蛍光標識細胞分析器で測定した（図９Ｄ）。高レベルのＣＤ８α鎖発現が、形質導入後３６時間以内に見られたことに注目するのは興味深い。この知見は、他者による観察と対照的であった。彼らは、ＡＡＶにより駆動される遺伝子発現は、顕著なレベルに達するのに数日間かかったことを見出していた（ＰＨ　Ｓｃｈｍｅｌｃｋ、ＰｒｉｍｅＢｉｏｔｅｃｈ）。ＡＡＶベクターを用いたさらなる研究は、これらが免疫応答を抑制するために使用できるという本発明者らの以前の知見を再確認した。ここでは、標準的ＭＬＣプロトコールを使用した（図５Ａ～Ｂ）。

【実施例２】

【０２０６】

ｉｎ　ｖｉｔｒｏ阻害研究－混合リンパ球培養物

Ｂａｌｂ／ｃ（Ｈ－２^{d}）マウスおよびＣ５７ＢＬ／６（Ｈ－２^{b}）マウスから脾臓細胞を収集した。単細胞懸濁物を調製した。Ｃ５７ＢＬ／６脾臓細胞を、３，０００ｒａｄで照射した（Ｍａｒｋ　１　Ｃｅｓｉｕｍ　Ｉｒｒａｄｉａｔｏｒ）。４×１０^{6}個のＢａｌｂ／ｃ脾臓細胞（レスポンダー／エフェクター細胞）を、１ウェル当たり４×１０^{6}の照射したＣ５７ＢＬ／６脾臓細胞（刺激因子細胞）と共に、２４ウェルプレート（ＴＰＰ、Ｍｉｄｗｅｓｔ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｉｎｃ．）中で、１０％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）（Ｓｉｇｍａ）、ＨＥＰＥＳ、ペニシリンＧ、硫酸ストレプトマイシン、硫酸ゲンタマイシン、Ｌ－グルタミン、２－メルカプトエタノール、非必須アミノ酸（Ｓｉｇｍａ）、ピルビン酸ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムを含むＩＭＤＭ（Ｓｉｇｍａ）（改変ＩＭＤＭ）中で培養した。CO_2インキュベータ（Ｆｏｒｍａ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）中で５日間培養した後、培養物をすべて収集し、Ｃ５７ＢＬ／６由来標的細胞（Ｈ－２^{b}）を溶解する能力について試験した。これらの培養物のいくつかに、４×１０^{5}個の、１２，０００ｒａｄで照射したＭＣ５７Ｔ線維芽細胞（Ｈ－２^{d}）を添加した。阻害培養物中に、４×１０^{5}個の、約１０^{4}～１の感染多重度でｍＡｄＣＤ８で２日間感染させたＭＣ５７Ｔ細胞を含めた。

【０２０７】

細胞傷害性Ｔリンパ球キラーアッセイ：混合リンパ球培養物から収集した細胞を、活性化Ｔリンパ球の指標として、芽細胞の数について計数した。これらのエフェクター細胞を、Ｕ底９６ウェルプレートの単一のウェルに添加した。１ウェル当たりのエフェクターの数を、１ウェル当たり３×１０^{6}個または１×１０^{5}個のエフェクターから開始して、３倍力価決定ステップで力価決定した。これらのエフェクター細胞に、１ウェル当たり１×１０^{4}個の標的細胞ＥＬ４（Ｈ－２^{b}）、ＭＣ５７Ｔ（Ｈ－２^{b}）またはＰ８１５（Ｈ－２^{d}）を添加した。この標的細胞は、予め^{51}Ｃｒ（Ｎａ－Ｃｈｒｏｍａｔｅ、Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ）で標識しておいた。１×１０^{6}個の標的細胞を、約５００μｌの容量の改変ＩＭＤＭ中で９０分間、１００μＣｉでインキュベートしておいた。その後、取り込まれていない^{51}Ｃｒを、改変ＩＭＤＭでの複数回の洗浄によって除去した。

【０２０８】

エフェクター細胞および標的細胞を、２００μｌの総容量で４時間、CO_2インキュベータ中でインキュベートした。その後、プレートを、遠心機（Ｃｅｎｔｒａ　ＣＪ３５Ｒ、Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｅｑｕｉｐｍｅｎｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ）で１，５００ｒｐｍで３分間遠心分離した。１００ｍｌの培地を各ウェルから取り出し、標的細胞から放出された^{51}Ｃｒの量を、Ｍｏｄｅｌ　４０００　Ｇａｍｍａ　ｃｏｕｎｔｅｒ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｉｎｓｔｒｕｍｅｎｔｓ）で計数した。バックグラウンド放出を決定するために、エフェクター細胞が除かれた対照培養物をセットした。標的細胞への総^{51}Ｃｒ取り込みをウェル中で決定し、このとき、Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ１００（Ｓｉｇｍａ）の１％溶液（ｗ／ｖ）を、エフェクター細胞の代わりとした。

【０２０９】
特異的溶解の量は、以下のように決定した：
％で＝（特異的放出－バックグラウンド放出）／（総放出－バックグラウンド放出）×１００
【０２１０】
ｉｎ　ｖｉｔｒｏでのｍＡｄＣＤ８の活性：混合リンパ球培養物（Ｂａｌｂ／ｃ抗Ｃ５７ＢＬ／６）を設置した。これらの培養物に、１２，０００ｒａｄで照射し、ｍＡｄＣＤ８を感染させておいたＭＣ５７Ｔ線維芽細胞を（示したとおりに）添加した。５日間の培養後、培養物を収集し、異なるエフェクター対標的（Ｅ／Ｔ）比で、ＥＬ４（Ｈ－２^{b}）標的細胞を溶解するそれらの能力について試験した（図３を参照のこと）。理解できるように、混合リンパ球培養物中でさえ、ＣＤ８を発現する細胞は、溶解性Ｔリンパ球の誘導を阻害した。
【０２１１】
ｍＡｄＣＤ８およびｈＡｄＣＤ８の作製：両方のアデノウイルスベクターを、ＢｉｏｇｅｎｅのＡｄＥａｓｙ（商標）システムの助けにより作製した。ここでは、マウスおよびヒトのＣＤ８α鎖のｃＤＮＡが、移入ベクター中に組み込まれる（ステップ１）。Ａｄ５ΔＥ１／ΔＥ３ベクターとの組換えを、ＢＪ５１８３　ＥＣ細菌中で達成する（ステップ２）。次いで、組換えベクターを、Ｅ１ＡおよびＥ１Ｂのアデノウイルス５ウイルス遺伝子（これらは、組換えアデノウイルス中のこの必須領域の欠失を補完する）を含むＱＢＩ－ＨＥＫ　２９３Ａ細胞中に移入させる。これらの細胞中で作製されたｈＡｄＣＤ８およびｍＡｄＣＤ８は、したがって、複製欠損である。
【０２１２】
細菌ＬａｃＺ遺伝子（β－ガラクトシダーゼ）を発現する対照ベクターとして、Ｑｂｉｏｇｅｎｅは、ＱＢＩ－Ｉｎｆｅｃｔ＋Ｖｉｒａｌ　Ｐａｒｔｉｃｌｅ（Ａｄ５．ＣＭＶＬａｃＺΔＥ１／ΔＥ３）を提供した。使用したマウスＣＤ８α鎖の配列。この配列は、公開されたマウス配列に類似する：
実際の配列：ＭＡＳＰＬＴＲＦＬＳ　ＬＮＬＬＬＭＧＥＳＩ　ＩＬＧＳＧＥＡＫＰＱＡＰＥＬＲＩＦＰＫＫ　ＭＤＡＥＬＧＱＫＶＤ　ＬＶＣＥＶＬＧＳＶＳ　ＱＧＣＳＷＬＦＱＮＳ　ＳＳＫＬＰＱＰＴＦＶＶＹＭＡＳＳＨＮＫＩ　ＴＷＤＥＫＬＮＳＳＫ　ＬＦＳＡＶＲＤＴＮＮ　ＫＹＶＬＴＬＮＫＦＳ　ＫＥＮＥＧＹＹＦＣＳＶＩＳＮＳＶＭＹＦＳ　ＳＶＶＰＶＬＱＫＶＮ　ＳＴＴＴＫＰＶＬＲＴ　ＰＳＰＶＨＰＴＧＴＳ　ＱＰＱＲＰＥＤＣＲＰＲＧＳＶＫＧＴＧＬＤ　ＦＡＣＤＩＹＩＷＡＰ　ＬＡＧＩＣＶＡＰＬＬ　ＳＬＩＩＴＬＩＣＹＨ　ＲＳＲＫＲＶＣＫＣＰＲＰＬＶＲＱＥＧＫＰ　ＲＰＳＥＫＩＶ
【０２１３】
使用したヒトＣＤ８α鎖の配列。示されるように、この配列は、公開されたヒト配列と比較して、わずかな変異を有している。
実際の配列：ＭＡＬＰＶＴＡＬＬＬ　ＰＬＡＬＬＬＨＡＡＲ　ＰＳＱＦＲＶＳＰＬＤＲＴＷＮＬＧＷＴＶＥ　ＬＫＣＱＶＬＬＳＮＰ　ＴＳＧＣＳＷＬＦＱＰ　ＲＧＡＡＡＳＰＴＦＬ　ＬＹＬＳＱＮＫＰＫＡＡＥＧＬＤＴＱＲＦＳ　ＧＫＲＬＧＤＴＦＶＬ　ＴＬＳＤＦＲＲＥＮＥ　ＧＹＹＦＣＳＡＬＳＮ　ＳＩＭＹＦＳＨＦＶＰＶＦＬＰＡＫＰＴＴＴ　ＰＡＰＲＰＰＴＰＡＰ　ＴＩＡＳＱＰＬＳＬＲ　ＰＥＡＣＲＰＡＡＧＧ　ＡＧＮＲＲＲＶＣＫＣＰＲＰＶＶＫＳＧＤＫ　ＰＳＬＡＲＹＶ
【０２１４】
ｐＡＡＶ－ｍＣＤ８およびｐＡＡＶ－ｈＣＤ８の作製：これらのベクターを、ＳｔｒａｔａｇｅｎｅのＡＡＶ　Ｈｅｌｐｅｒ－Ｆｒｅｅ　Ｓｙｓｔｅｍの助けにより作製した。この系は、マウスおよびヒトの配列を、ｐＡＡＶ－ＭＣＳクローニングベクター中に挿入することによって働く。次いで、このプラスミドを、ヘルパープラスミド（必要なアデノウイルスタンパク質を含む）およびｐＡＡＶ－ＲＣベクター（カプシド遺伝子を含む）と共にＨＥＫ２９３細胞中に同時トランスフェクトし、組換えＡＡＶ粒子を作製する。
【実施例３】

【０２１５】
動物モデルにおける操作されたｖｅｔｏ
本発明者らは、動物が大量のｍＡｄＣＤ８の注射に如何に応答するかを調べた。実験の第１の設定において、Ｂａｌｂ／ｃマウス（各群２匹のマウス）に、ｍＡｄＣＤ８またはβ－ガラクトシダーゼをコードするアデノウイルス対照ベクター（ＡｄＬａｃＺ）の等用量を静脈内注射した。７日後、動物を屠殺した。それらの脾臓細胞を、５日間ＡｄＬａｃＺの存在下で培養した。次いで、これらを、ＡｄＬａｃＺ感染した標的細胞（Ｐ８１５、Ｂａｌｂ／ｃ由来）を溶解するそれらの能力について試験した。図１３Ａ中に示されるように、特異的溶解能を有するＣＴＬは、ＡｄＬａｃＺで免疫したＢａｌｂ／ｃマウスから増殖させることができたが、ｍＡｄＣＤ８を受けたマウスからは増殖させることができなかった。この結果は、ＡｄＣＤ８が、ＣＤ８α鎖の発現に起因して、アデノウイルス抗原に対する免疫応答を誘導しないことを示唆した。
【０２１６】
第２の設定において、Ｃ５７Ｂｌ／６マウスを、等用量のｍＡｄＣＤ８（２匹のマウス）またはＡｄＬａｃＺ（２匹のマウス）で免疫した。免疫の７日後、各群の１匹の動物を屠殺した。それらの脾臓細胞を、ＡｄＬａｃＺの存在下で５日間、細胞懸濁物中で培養した。次いで、これらを、ＡｄＬａｃＺ感染した標的細胞（ＥＬ－４、Ｃ５７Ｂｌ／６由来）を特異的に溶解するそれらの能力について試験した。再度、ＡｄＬａｃＺの注射は、低い頻度ではあったが特異的キラー細胞の発達を誘導したが、一方でｍＡｄＣＤ８は誘導できなかった（図１３Ａ）。
【０２１７】
この実験の第２期において、ｍＡｄＣＤ８またはＡｄＬａｃＺのいずれかを受けた残りのＣ５７ＢＬ／６マウスに、最初のウイルス注射の７日後に、第２の用量のＡｄＬａｃＺを受けさせた。７日後、マウスを屠殺し、５日目の脾臓細胞培養物をＡｄＬａｃＺの存在下で樹立した。応答性のＴ細胞を、再度、ＡｄＬａｃＺ感染したＥＬ４標的細胞に対するそれらの溶解能について試験した（図１３Ｂ）。実際、ＡｄＬａｃＺに対する２回の曝露により、幾分か改善された免疫が導かれた。しかし、予めｍＡｄＣＤ８を受けさせた動物は、応答を開始することがなおできなかった。これらの実験は、ＡｄＣＤ８が免疫応答を誘導できないだけでなく、それ自体に対する免疫応答の誘導をも防止したことを示唆する。したがって、ｍＡｄＣＤ８は、免疫系を逃れた。
【実施例４】
【０２１８】
ベクターの作製
アデノウイルスベクターの作製：全長マウスＣＤ８α鎖のｃＤＮＡを、Ｃ型肝炎ウイルスから採取した短いＩＲＥＳによって、オボアルブミンｃＤＮＡに連結する。ＰＣＲによって生成されるこのバイシストロニック構築体を、アデノウイルス移入プラスミド中に移動させ、このプラスミド中、非特異的ＣＭＶ最初期プロモーター／エンハンサーの後ろに配置する。ポリアデニル化もまた、このベクター中に提供する。このプラスミドを、ＤＥ１－ＤＥ２アデノウイルス５ゲノムを含むプラスミド（ｐＡｄＥａｓｙ－１）と一緒に細菌相同組換えし、アデノウイルスゲノムの本来のＥ１領域中に発現カセットが挿入された新たなプラスミドを得る。この得られたベクタープラスミドを、次いでＱＢＩ－２９３Ａ細胞中に移入し、ＣＤ８α鎖およびオボアルブミンをＣＭＶプロモーターの制御下で発現する組換えアデノウイルスベクターＡｄ／ＣＭＶ／ＣＤ８／Ｏｖａを得る。オボアルブミンのみを発現する対照ベクターを、同じ系を使用して得る。ＣＭＶプロモーター領域を、天然にＭＨＣクラスＩＩを発現するすべての細胞に遺伝子発現をもたらすことが見出されたマウスＭＨＣクラスＩＩプロモーターと交換した、第２のセットのアデノウイルスベクターを得る（Ｃｅｍａｎ、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９２ Ａｕｇ １；１４９（３）：７５４－６１；Ｍａｒｔｉｎ、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｇｅｎｅｔ．１９９０ Ｆｅｂ－Ａｐｒ；１７（１－２）：１５１－９）。アデノウイルスベクター粒子を、標準的手段によってＱＢＩ－２９３Ａ細胞中で生成し、勾配精製によって精製する。各調製物中の感染性粒子

の数を、標準的なプラークアッセイで決定する。

【０２１９】

ＡＡＶベースのベクターの生成：上記のバイシストロニック発現カセットを、ヘルパーウイルスを含まないＳｔｒａｔｅｇｅｎｅのＡＡＶベクター系を使用して、２型ＡＡＶカプシド中にパッケージングする。このベクター系において、目的の遺伝子、本発明の場合にはバイシストロニック構築体を、マルチクローニングサイトを介して、ｐＣＭＶ－ＭＣＳクローニングベクター中に移動させる。クローニング後、発現カセットをｐＡＡＶ－ＬａｃＺ複製欠損ＡＡＶベクター中に移動させる。結果として、ＬａｃＺ遺伝子が除去される。この組換えベクターを、ウイルスパッケージング細胞系２９３中に、組換え複製欠損ＡＡＶビリオンの産生のために、ｃａｐ遺伝子およびｒｅｐ遺伝子を保有するｐＡＡＶ－ＲＣベクターならびにＡＡＶの溶菌期を誘導するのに必要なアデノウイルス遺伝子（Ｅ２Ａ、Ｅ４およびＶＡ　ＲＮＡ）を保有するｐＨｅｌｐｅｒベクターと一緒に、同時トランスフェクトする。再度、ビリオンを標準的な精製プロトコールを使用して精製する。さらに、オボアルブミンのみのベクターを生成する。

【０２２０】

ガットレスアデノウイルスのヘルパーウイルスを含まない生成：ガットレスアデノウイルスをパッケージングするために、必要なアデノウイルス遺伝子を、トランスで提供する必要がある。ほとんどの公開されたプロトコールは、最終治療調製物から除去すべきヘルパーアデノウイルスを使用する。Ｃｒｅ－Ｌｏｘ組換え系が、さらなるヘルパーウイルスのパッケージングを制限するために使用されてきた（Ｈａｒｄｙ、１９９６；Ｓａｋｈｕｊａ、２００３）。感染性アデノウイルスヘルパーウイルスの代替として、アデノウイルス／バキュロウイルスハイブリッドゲノム構築体によってヘルパーゲノムがデリバーされる系が記載されている（Ｃｈｅｓｈｅｎｋｏ、２００１）。このハイブリッドゲノム構築体は、アデノウイルスヘルパーウイルスの使用を回避した。しかし、これは、ハイブリッドゲノム中のΔＥ１フラグメントと２９３Ａパッケージング細胞中のＥ１との間の相同組換えを介して、複製能のあるアデノウイルスの組換えを可能にした。使用したヘルパーゲノムは、Ｅ１遺伝子内に比較的短い欠失を有した。

【０２２１】

組換え体を防止するための戦略は、パッケージング細胞のゲノム中に存在するＥ１配列とヘルパーゲノム中に存在するＥ１配列との間の配列重複を排除することである（Ｎｉｃｈｏｌｓ、２００２）。これを達成するための潜在的なハードルは、Ｅ１Ｂ遺伝子およびｐＩＸ遺伝子を調節する方法である。これらの遺伝子は、同じポリアデニル化部位を使用する。さらに、ｐＩＸ遺伝子は、その発現を可能とするために、ヘルパーゲノム中に保有される必要がある。したがって、Ｅ１ＡおよびＥ１Ｂが欠失し、ｐＩＸ発現カセットが欠失していない、新たなアデノウイルス／バキュロウイルスハイブリッドゲノムを構築する。パッケージング細胞は、Ｅ１ＡおよびＥ１Ｂを発現するが、ｐＩＸを欠くであろう。Ｅ１領域を、４６０位と３５０９位との間で欠失させる。これは、Ｅ１ｂの短縮を導くが、ｐＩＸをインタクトなままにする。それ以外は、アデノウイルス／バキュロウイルスハイブリッドゲノムは、以前に記載されたように構築する（Ｃｈｅｓｈｅｎｋｏ、２００１）。これは、パッケージングシグナルならびにＥ１およびＥ３を欠失したアデノウイルス５型の機能的ゲノムを保有するように設計される。これは、アデノウイルス複製基点として作用する融合型ＩＴＲをも含む。アデノウイルスゲノムをｌｏｘＰ部位に隣接させ、Ｃｒｅリコンビナーゼの助けを借りたその切り出しを可能にする。ＶＳＶ糖タンパク質を用いたバキュロウイルスのシュードタイピングが、哺乳動物細胞のより効率的な形質導入を提供したことが示されている（Ｃｈｅｓｈｅｎｋｏ、２００１）。水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）糖タンパク質エンベロープタンパク質は、この構築体のバキュロウイルスゲノム中に配置される。バキュロウイルスポリヘドリンプロモーターによって駆動することにより、これは、昆虫細胞における選択的発現を提供しよう。アデノウイルス／バキュロウイルスハイブリッドゲノムを、組換えバキュロウイルスとして昆虫細胞中でレスキューする。Ｃｒｅ発現パッケージング細胞（以下を参照）の感染の際に、環状アデノウイルスゲノ

ムが、ハイブリッドゲノムから切り出される。２つの環状分子が生成され、１つはアデノウイルスゲノム（ΔＥ１、ΔＥ３）を含み、他方はバキュロウイルスゲノムを含む。アデノウイルスゲノムは、インサートＤＮＡ構築体、即ち発現カセット（設計については以下を参照のこと）の伝播に必要なすべてのヘルパー機能を提供するであろう。Ｃｒｅ－Ｌｏｘ組換えを介してハイブリッドから放出されたアデノウイルスゲノムは、アデノウイルスパッケージングシグナルを欠くので、ＣＤ８α鎖発現カセットのみがパッケージングされて、ヘルパーを含まないベクター調製物を生じる。

【０２２２】

新たなパッケージング細胞系の樹立：ヒト胚性網膜芽細胞（ＨＥＲ）を使用する。これらは、アデノウイルスＥ１遺伝子（Ｇｒａｈａｍ、１９７７）によって不死化でき、アデノウイルスの産生に非常に有効である（Ｇａｌｌｉｍｏｒｅ、１９８６）。ガットレスアデノウイルスの産生において使用するために、ＨＥＲ細胞を、以下の様式で改変する必要があろう：（ｉ）これらはＣｒｅを発現するので、環状アデノウイルスゲノムがハイブリッド分子から切り出される。したがって、これらに、ＳＶ４０　Ｔ抗原核局在化シグナル（Ｌｉｅｂｅｒ、１９９６）で改変されたＣｒｅ遺伝子をトランスフェクトする。Ｃｒｅは、アクチンプロモーターから駆動される。最初期ＣＭＶプロモーターは、ウイルス発現カセットとの配列重複を回避するため、使用しない。（ｉｉ）ＨＥＲ細胞は、アデノウイルス／バキュロウイルスハイブリッドゲノムから欠失している相補的Ｅ１遺伝子を提供する必要がある。Ｅ１プロモーターおよびポリアデニル化配列は、非ウイルス性供給源（例えば、ヒトハウスキーピング遺伝子ホスホグリセリン酸キナーゼ（ＰＧＫ）プロモーターおよびヘルペスウイルスポリアデニル化部位（Ｖａｌｅｒｉｏ、１９８５；Ｓｉｍｏｎｓｅｎ、１９８３））から得る。（ｉｉｉ）ＨＥＲ細胞を、ＣｒｅおよびＥ１発現カセットで同時トランスフェクトする。Ｈｅｒ細胞の不死化を、Ｅ１の組み込みの証拠として解釈する。継続的に増殖するＨＥＲ（ＣＥ－ＨＥＲ）細胞のクローンを、次いで、全長ＣｒｅおよびＥ１構築体の存在および発現について、ＰＣＲによってさらに分析する。

【０２２３】

ＣＤ８α鎖／インスリン発現カセットおよび非ウイルス性ｄｍＶＴＶの設計：以下の発現カセットを構築する。全長マウスＣＤ８α鎖のｃＤＮＡを、Ｃ型肝炎ウイルスから採取した短いＩＲＥＳによって、（プレプロ）インスリンまたは（プロ）インスリンのｃＤＮＡに連結させる。ｍＡｄＣＤ８において使用した最初期ＣＭＶプロモーター／エンハンサーを使用して、両方の遺伝子の協調的な発現を駆動する。このバイシストロニック構築体を、左側のアデノウイルスＩＴＲの２つの逆方向コピーとパッケージングシグナルとの間のスタッファーＤＮＡ配列中に配置する。発現カセットを構築プラスミドから切り出せるように、制限部位を配置する。２つの遺伝子のうち一方のみを発現する対照ベクターを生成する。アデノウイルスＩＴＲおよびパッケージング細胞を欠く発現カセットが、非ウイルス性ｄｍＶＴＶの基礎をなす。抗生物質選択配列および他の非必須ＤＮＡセグメントを使用前に切り出すことが可能な、非ウイルス性ｄｍＶＴＶを設計する。非ウイルス性ＤＮＡ構築体もまた使用して、２つの異なる遺伝子の発現を試験する。この目的のために、異なる細胞系をこの発現カセットでトランスフェクトする。ＤＮＡ組み込みおよび特異的ｍＲＮＡのレベルを、ＰＣＲによって試験する。ＣＤ８α鎖の表面発現のレベルは、表面免疫蛍光によって決定し、上清中に放出されたインスリンのレベルは、以前に確立された特異的ＥＬＩＳＡにより研究する。

【０２２４】

ウイルス性および非ウイルス性ｄｍＶＴＶの生成：ガットレスアデノウイルスｄｍＶＴＶの場合、ＣＤ－ＨＥＲ細胞を、酵素的に切り出したＣＤ８／インスリン／ＩＴＲ構築体でトランスフェクトし、次いで、アデノウイルス／バキュロウイルスヘルパーゲノムで形質導入する。形質導入したＣＥ－ＨＥＲ細胞由来の粗製溶解物を収集し、２９３細胞または組織培養線維芽細胞を形質導入するために使用する。ＣＤ８発現細胞の頻度を使用して、ｄｍＶＴＶの「機能的」力価を決定する。２９３プラークの数を決定することにより、組換え複製欠損ウイルスについての試験が提供される。アデノウイルスｄｍＶＴＶを、ア

デノウイルス／バキュロウイルスヘルパーゲノムを使用して、ＣＥ－ＨＥＲ細胞においてさらに継代して増殖させる。ｄｍＶＴＶ力価および組換えウイルスの存在を決定することに加えて、ｄｍＶＴＶの完全性を、ｄｍＶＴＶの制限酵素マッピング、ＰＣＲ研究およびＤＮＡ配列決定の助けにより研究する。バイシストロニック発現カセットからなる非ウイルス性ｄｍＶＴＶを使用して、異なる細胞系（例えば線維芽細胞）をトランスフェクトする。選択マーカーを、別個のプラスミドによって提供する。ＣＤ８α鎖およびインスリンの発現を研究する。

【実施例５】

【０２２５】

ベクターの機能的試験

異なるベクターの形質導入効率：表現型が異なる樹立された標準的な組織培養細胞株（例えば、線維芽細胞、リンパ腫、マクロファージなど）、新たに収集した分化した細胞（例えば、マクロファージおよびＤＣ）を試験する。Ｃ５７Ｂｌ／６由来のＢＭ細胞を収集し、マウスＧＭ－ＣＳＦ（トランスフェクトされたＪ５５８Ｌ細胞から収集した、Ｕ．Ｄ．Ｓｔａｅｒｚにより提供される）の存在下で培養する。細胞培養物を繰り返し洗浄して、非接着細胞を除去する。約４日後、接着性ＤＣは、未成熟の表現型を主に発現する。ＤＣを遊離させ、再プレートし、再培養する。得られた細胞を表現型について分析する（Ｋａｍａｔｈ、２０００；Ｂｅｌｌ、１９９９；Ｌｉｕ、２００２；Ｍｅｌｌｍａｎ、２００１；Ｍｅｌｌｍａｎ、１９９８）。これらを、ＬＰＳ（１０ｎｇ／ｍｌ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）の添加によって活性化する。マクロファージを、以前にプロテオースペプトン（Ｕ．Ｄ．Ｓｔａｅｒｚによって提供される調製物）を腹腔内注射していないＣ５７Ｂｌ／６マウスまたは注射したＣ５７Ｂｌ／６マウスのいずれかの腹腔から収集する。これらを、プラスチックへ接着するそれらの能力によって富化し、染色する（Ｌｅｅｎｅｎ、１９９４）。あるいは、マクロファージを、Ｍ－ＣＳＦの存在下でＢＭを除いて増殖させる。マクロファージを、ＩＮＦ－γおよびＬＰＳの添加によって、培養物中で活性化する。

【０２２６】

異なる細胞集団に、最も適切には、１０～１の感染多重度（ＭＯＩ）で開始して、10^4～１のＭＯＩのレベルに達する、漸増するＭＯＩで、異なるベクターを感染させる。細胞集団を、３０分～２４時間ベクターに曝露する。より短い曝露時間の後に、形質導入された遺伝子の発現を可能にするインキュベーション期間を設ける。全培養期間は、これらの実験において２４時間である。形質導入された細胞を、生存率について研究する。これらを、全ＤＮＡ含量の測定としてヨウ化プロピジウムで、膜配向の初期の測定としてアネキシン－５で、染色する。次いで、これらの細胞を蛍光標識細胞分析器（ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ、Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）で分析する。

【０２２７】

平行実験において、ＣＤ８α鎖および免疫原（オボアルブミン）の両方の発現レベルを決定する。ＲＮＡをこれらの細胞から精製し、ＣＤ８α鎖および免疫原（オボアルブミン）について遺伝子発現レベルを、アクチンＲＮＡのレベルに対して標準化して、ＲＴ－ＰＣＲによって決定する。これらの研究の後に、タンパク質レベルの決定を行う。ＣＤ８α鎖の場合、形質導入された細胞を、マウスＣＤ８α鎖の表面発現について染色する（ＦＩＴＣ結合した抗ＣＤ８α鎖　ｍＡｂ　５３－６－７５）。非特異的抗体結合による染色の妨害を、抗体のＦ（ａｂ）$'_2$調製物の使用によって防止する。ｍＡｂ結合の程度、したがってＣＤ８α鎖発現の程度を、蛍光標識細胞分析器で決定する。

【０２２８】

オボアルブミン産生のレベルを２つの方法で決定する。オボアルブミンはトランスフェクトされた細胞によって分泌されるので、培養物上清中のオボアルブミンの量を、Ｕ．Ｄ　Ｓｔａｅｒｚによって提供されるラット抗オボアルブミンｍＡｂおよび精製されたウサギ抗オボアルブミン抗体の助けにより、サンドイッチＥＬＩＳＡによって決定する。さらに、オボアルブミンがこれらの細胞の表面上のＭＨＣ分子上に、免疫学的に適切な形態で

提示され得るか否かを決定する。この目的のために、Ｔリンパ球をＴ細胞レセプタートランスジェニックマウスＯＴ－ＩおよびＤＯ１１．１０から収集し、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで活性化する。次いで、これらを、適切なＭＨＣ分子を発現する、異なる形質導入された細胞集団に曝露させる。標準的な活性化実験において、これらが、標的細胞を特異的に溶解できるか否か（ＯＴ０Ｉ）、またはＩＬ－２を分泌できるか否か（ＤＯ１１．１０）を決定する試験を実施する。対照実験を、ＣＤ８α鎖のみを保有するベクターで形質導入した細胞で実施する。外因性オボアルブミンペプチドを添加する。ここで、本発明者らは、ｖｅｔｏがエフェクターＴ細胞を阻害するか否かを決定する。抗ＣＤ８　ｍＡｂを添加して、標的細胞のＣＤ８を阻害する。さらに、オボアルブミンのみを保有するベクターを使用する。

【０２２９】

ベクターのｉｎ　ｖｉｔｒｏ阻害機能：形質導入プロトコールを最適化し、本発明者らは、異なるベクターが、特異的様式で、ＭＨＣクラスＩ拘束およびＭＨＣクラスＩＩ拘束された免疫応答を阻害するか否かを決定する。以前の実験から、本発明者らは、異なるベクターのどれが最も有望であるか、そしてどの細胞株がＣＤ８α鎖を発現し、オボアルブミンを有効に提示するかを知っている。第１の研究として、ＣＤ８α鎖の機能を、以前に記載したように、ＭＬＣ中で試験する。簡潔に述べると、Ｃ５７ＢＬ／６抗Ｂａｌｂ／ｃ　ＭＬＣを樹立する。これらに、段階的な数の、ＣＤ８α鎖を発現する、異なる形質導入された細胞集団を提供し、５日間培養する。アロ反応性ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＣＤ４＋Ｔ細胞の発達を、引き続くＣＴＬおよび再刺激アッセイで測定する。

【０２３０】

インスリン特異的ＣＤ８＋Ｔリンパ球およびＣＤ４＋Ｔリンパ球の系統を、場合によっては収集した膵島から、ＮＯＤマウスから樹立する。これらの系統を、確立された再刺激プロトコールを使用して維持する。ｄｍＶＴＶを形質導入またはトランスフェクトした同系細胞を、キラーアッセイ（ＣＤ８＋ＣＴＬ）およびサイトカイン放出研究（ＣＤ４＋ＴＨ細胞）に添加する。これらの応答を阻害するそれらの能力を試験する。ＡＰＣを含む異なる細胞集団を、この方法で試験する。全ＤＮＡ含量およびアネキシン－５配向（上記研究を参照のこと）を使用して、ｖｅｔｏ化Ｔ細胞が、これらの培養物中で阻害または殺傷されるか否かを研究する。

【０２３１】

ｄｍＶＴＶの全体的ｖｅｔｏ機能の、ｉｎ　ｖｉｖｏでの機能的試験：異なるｄｍＶＴＶの全体的ｖｅｔｏ機能を、ｖｅｔｏのｉｎ　ｖｉｖｏ活性を以前に実証した実験設定で、アロ応答の助けにより試験する。それぞれのｄｍＶＴＶで形質導入または安定にトランスフェクトしたＣ５７ＢＬ／６由来細胞株を、ＢＡＬＢ／ｃ動物中に注射する。１０日後、マウスを屠殺し、それらの脾臓細胞を収集し、常在性のＴ細胞を、Ｃ５７ＢＬ／６刺激因子細胞でｉｎ　ｖｉｔｒｏで活性化する。応答性Ｔ細胞の存在を、キラーおよびサイトカイン放出アッセイにおいて試験する。インスリンに対して特異的なＴ細胞レセプターについてトランスジェニックなマウスは入手できないので、ｄｍＶＴＶがインスリン特異的免疫応答を抑制する能力は、ＮＯＤマウスでの研究で評価しなければならない（以下を参照のこと）。

【０２３２】

異なるベクターが、オボアルブミン特異的ＴＣＲトランスジェニックＴリンパ球の誘導を特異的に阻害できるか否かを決定する：さらに、異なる細胞集団（上記を参照のこと）を、異なるベクターの助けにより、阻害細胞へと形質転換できるか否かを、決定する。ＯＴ－ＩおよびＤＯ１１．１０　Ｔリンパ球を収集し、それぞれのオボアルブミンペプチドで馴化した、照射した脾臓刺激因子細胞で刺激する。これらの培養物に、異なるベクターで形質導入した、段階的な数の細胞（異なる表現型のもの）を添加する。約５日間の培養後、Ｔリンパ球を収集し、培養し、機能について試験する。ＯＴ－Ｉ　Ｔリンパ球を、オボアルブミン被覆された標的細胞（ＯＴ－１）を特異的に殺傷するそれらの能力について試験する。ＤＯ１１．１０の場合、初代培養物におけるそれらの増殖応答を測定する。い

ずれの場合にも、応答性のＴリンパ球の運命が決定される。本発明者らは、これらがアポトーシスを受けたか否かを決定することを望んでいる。すべての研究は、ＣＤ８α鎖またはオボアルブミンのいずれかのみを単独で発現する異なる対照ベクターで対照を取った。

【０２３３】

抗原特異的ｖｅｔｏ阻害の決定：これらの実験において、ＴＣＲトランスジェニックマウス由来のＴリンパ球（Ｃ１０．４、ＡｔｔＭ、ＭＨＣクラスＩｂ拘束（Ｕ．Ｄ．Ｓｔａｅｒｚによって提供される）およびＡＮＤ、ハトシトクロムＣ、ＭＨＣクラスＩＩ拘束）を、適切なハプロタイプのベクター感染細胞の存在下で、ペプチド被覆された刺激因子細胞で刺激する。

【０２３４】

ベクターのｉｎ　ｖｉｖｏ機能的試験：ＴＣＲトランスジェニック動物は、Ｔ細胞の活性および運命を調査するための、最も直接的なアプローチを提示する。したがって、本発明者らは、Ｔ細胞がモデル抗原オボアルブミンと反応性である２つのＴＣＲトランスジェニックマウスを選択する。１つはＯＴ－Ｉであり、これは、オボアルブミン２５７～２６４に特異的なＣＤ８$^{+}$　Ｈ－２Ｋ^{b}拘束ＣＴＬを保有し、他方はＤＯ１１．１０であり、これは、オボアルブミン３２９～３３９に特異的なＣＤ４＋　Ｈ－２Ａ^{b}拘束Ｔヘルパー細胞を保有する。ｉｎ　ｖｉｖｏのｖｅｔｏ実験を、末梢Ｔ細胞の特定の割合のみがＴＣＲトランスジェニック型のものであるキメラマウスにおいて実施する。これらのキメラを、致死量未満で照射したマウスにおいて構築する。これらのマウスに、特定の数の前駆体（５％）が一方または両方のＴＣＲトランスジェニックマウス由来である、混合ＢＭを注射する。同様の割合の末梢Ｔ細胞が、トランスジェニックＴ細胞レセプターを発現した。この割合を、末梢血において測定し、この目的のために外科的に取り出したリンパ節において確認する。ここで、トランスジェニックＴ細胞の頻度を測定するために、脾臓の生検を行う。ｍＡｂ（上記を参照のこと）またはＴＣＲ導入遺伝子に特異的なＭＨＣ四量体での細胞表面染色に加えて、これらのＴ細胞の活性化状態を、ｍＡｂ（例えば、抗ＣＤ６２Ｌ、抗ＣＤ４４、抗ＣＤ２５および抗ＣＤ１２２）の助けにより決定する。これらのＴ細胞の機能性を、標準的なｉｎ　ｖｉｔｒｏ活性化アッセイで試験する。このアッセイにおいて、それらが特異的ＣＴＬに発達する能力またはそれらの抗原に対して特異的に増殖する能力を決定する。

【０２３５】

異なるベクターおよび対照ベクターを、最も適切には、漸増する用量で、適切には数回、静脈内注射する。特定の期間（適切には、１週間後から６カ月後まで）の後、動物から採血する。ＴＣＲトランスジェニックＴ細胞の頻度および機能的表現型（休止対休止）を決定する。さらに、ヨウ化プロピジウムおよびアネキシン－５染色を使用して、それらがアポトーシスを受けているか否かを決定する。これらの動物を、異なる時点で屠殺する。それらの脾臓およびリンパ節を収集する。回収されたＴリンパ球の数、活性化状態および生存率を決定する。さらに、これらのＴ細胞が、特異的ｉｎ　ｖｉｔｒｏ刺激の後に、増殖するように誘導され得るか否か（ＤＯ１１．１０）、または機能的ＣＴＬに発達するように誘導され得るか否か（ＯＴ－Ｉ）を、調査する。ＴＣＲトランスジェニックＴ細胞がもはや応答しないがなおも存在する場合、異なるＴ細胞集団を、類似のキメリズムの二次宿主中に養子移入して、調節性Ｔ細胞（例えば、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋Ｔ細胞）が誘導されたか否かを決定する。

【０２３６】

Ｂリンパ球、Ｔリンパ球、マクロファージ、ＤＣ、顆粒球を、抗ＣＤ８α鎖ｍＡｂと組み合わせてそれぞれのｍＡｂで同定して、どの細胞集団がベクターを取り込み、そこで、ＣＤ８α鎖を発現したかを決定する。脾臓およびリンパ節以外に、肝臓および肺を調査する。ベクターをキメラマウス中に直接注射することに対する代替的アプローチとして、マクロファージおよびＤＣなどの異なる細胞をｅｘ　ｖｉｖｏで感染させ、次いでマウスに再注射する。この処置に対するＴ細胞応答を上記のように決定する。

【０２３７】

ベクターを受けたマウスに、強力な免疫原（例えば、インフルエンザウイルスＰＲ／８）を、同時にまたは異なる時間遅延で注射して、ｖｅｔｏ阻害が特異的か否かを決定する。免疫の約２週間後、脾臓細胞およびリンパ節を収集し、ウイルスに対してｉｎ ｖｉｔｒｏで再刺激して、増殖するＣＤ４$^{+}$インフルエンザ特異的Ｔ細胞が発達したか否か、またはインフルエンザ特異的ＣＴＬが誘導され得るか否かのいずれかを試験する。

【実施例６】

【０２３８】

ＮＯＤマウスにおけるＩ型糖尿病の発症の阻害

ＣＤ８α／インスリン２ベクターの生成：ｐＢｕｄＣＥ４．１ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＃Ｖ５３２－２０）は、２つのマルチクローニングサイト（ＭＣＳ）を含んだ：１）ＣＭＶプロモーター、ＭＣＳ、ＳＶ４０ＰＡシグナル；２）伸長因子１α（ＥＦ－１α）、ＭＣＳ、ＢＧＨ ＰＡシグナル。マウスＣＤ８α鎖の遺伝子を、Ｋｐｎ１（５’）制限部位およびＸｈｏ１（３’）制限部位を有するｐＥＦ－１α ＭＣＳ中に、以下のプライマーを用いてクローニングした：Ｆｏｒｗａｒｄ：５’－ＣＴ ＴＡＴ ＧＧＴ ＡＣＣ ＧＣＡ ＡＴＧ ＧＣＣ ＴＣＡ ＣＣＧ ＴＴＧ－３’；Ｒｅｖｅｒｓｅ：５’－ＣＧ ＣＴＣ ＣＴＣ ＧＡＧ ＴＴＡ ＴＴＡ ＣＡＣ ＡＡＴ ＴＴＴ ＣＴＣ－３’。マウスＣＤ８α鎖遺伝子を、ｐＢｕｄＣＥ４．１ベクター中にクローニングする前に、最初にｐＣＲ２．１ベクター中にクローニングした。この遺伝子をＫｐｎ１酵素およびＸｈｏ１酵素を使用して切断すると、これは、ｐＣＲ２．１ベクター由来のＫｐｎ１部位を使用して実際に切断されて、マウスＣＤ８α鎖遺伝子の５’末端への約３０ヌクレオチドの付加を生じた。これらの過剰なヌクレオチドは、プロモーターの後かつ遺伝子のＡＴＧ開始コドンの前に位置した。

【０２３９】

マウスインスリン２の遺伝子を、Ｈｉｎｄ ＩＩＩ（５’）制限部位およびＸｂａ１（３’）制限部位を有するＣＭＶ ＭＣＳ中に、以下のプライマーを使用してクローニングした：Ｆｏｒｗａｒｄ：５’－ＧＣ ＴＴＧ ＡＡＧ ＣＴＴ ＧＣＡ ＡＴＧ ＧＣＣ ＣＴＧ ＴＧＧ ＡＴＧ－３’；Ｒｅｖｅｒｓｅ：５’－ＣＧ ＣＴＣ ＴＣＴ ＡＧＡ ＴＴＡ ＣＴＡ ＧＴＴ ＧＣＡ ＧＴＡ ＧＴＴ Ｃ－３’。

【０２４０】

マウスＣＤ８α鎖遺伝子およびマウスインスリン２遺伝子の両方を配列決定したところ、変異は含んでいなかった。

【０２４１】

複数エピトープのインスリンベクター：代替的実施形態において、主要ＭＨＣクラスＩ（Ｈ－２^{d}－Ｂ１５－Ｂ２３、Ｂ２４－Ｃ３６）およびＭＨＣクラスＩＩ（Ｈ－２Ａ^{g7}－Ｂ９－２３）拘束エピトープ（即ち、Ｂ９－Ｃ３６（Ｍａｒｔｉｎｅｚ、２００３；Ｃｈｅｎ、２００１；Ｗｏｎｇ、１９９９；Ｗｅｇｍａｎｎ、１９９４；Ｗｅｇｍａｎｎ、１９９４；Ｗｅｇｍａｎｎ、１９９３））を包含するマウスインスリンの抗原性セグメントに連結された全長マウスＣＤ８α鎖ｃＤＮＡを有するベクターを、Ｃ型肝炎ウイルスから採取した短いＩＲＥＳによって調製する。さらに、それぞれのペプチドを合成する。

【０２４２】

ベースラインの実験において、異なる病期でＮＯＤマウスから収集したＴリンパ球が、これらのインスリンエピトープに対して、他者（Ｗｅｇｍａｎｎ、１９９３）によって以前に記載されたように応答するか否かを調査する。さらに、このインスリン構築体が適切に提示されているか否かを試験する。この構築体のみを保有する移入ベクターを生成する。これらを使用して、刺激因子細胞を形質導入し、認識効率を決定する。これらの予備実験が、それぞれのインスリン構築体が認識されたことを確立した後に、それぞれのベクターを生成する。

【０２４３】

ＮＯＤマウスにおける糖尿病発症の予防：予備研究において、本発明者らは、約７０％の雌性ＮＯＤマウスが、約４カ月以内に本発明者らの動物コロニーにおいて糖尿病を自然

発症することを見出した。他者の研究から、本発明者らは、末期の糖尿病に、約４週齢での膵島炎が先行することを知っている。この膵島炎は、約４週齢での膵島へのＴリンパ球の遊走によって特徴付けられる。

【０２４４】

本実験において、２群のＮＯＤマウスを使用した。対照群の１１匹のマウス（１５週齢）は処置しなかった。同じ齢の４匹のマウス（ＮＯＤ、雌性、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）に、ｐＢｕｄＣＥ４．１／ＣＤ８α鎖／インスリン２　ｖｅｔｏベクターを筋内注射した。注射は、両方の四頭筋（または腓筋）に、異なる時点で５０μｌ（１ｍｌ／ｍｇ）であった。血糖値を１週間に２回測定した。自己抗体産生について試験するために、１週間に１回、３滴の血液から血清を収集し、遠心分離した。

【０２４５】

図１４中に示されるように、ｐＢｕｄＣＥ４．１／ＣＤ８α鎖／インスリン２　ｖｅｔｏベクターを受けたマウスは、処置しなかった対照群と比較して、６週間の期間にわたって糖尿病マウスの割合の持続的な減少を実証した。末期糖尿病をすでに発症したＮＯＤマウスに同じベクターを提供したところ、その糖尿病状態に変化はなく、このことは、ベクターを介した治療上有効なインスリン産生がないであろうことを示唆する（データ示さず）。さらに、１２週目前のインスリン２およびＧＡＤを含むベクターの注射は何の効果も示さず、一方で即席のＣＤ８α鎖／インスリン２ベクターを１５週目に投与すると有効であることが、刊行された研究により示されている。したがって、本発明者らは、目的の方法に従う、最も適切には筋細胞上およびまた抗原提示細胞上でのＣＤ８およびインスリンの同時発現が、インスリン産生島細胞を破壊するのに必要なインスリン特異的Ｔ細胞の活性を阻害すると結論付けている。

【０２４６】

この結論を確認するために、ｐＢｕｄＣＥ４．１／ＣＤ８α鎖／インスリン２　ｖｅｔｏベクター（上記と同じもの）を、対照プラスミドｐＢｕｄＣＥ４．１＋マウスＣＤ８α鎖（ＥＦ－１αプロモーター）のみ、ＰＢｕｄＣＥ４．１＋マウスインスリン２（ＣＭＶプロモーター）のみ、および空のｐＢｕｄＣＥ４．１ベクターと一緒に使用して、以下の実験を実施する。

【０２４７】

雌性ＮＯＤマウスを以下の群に分離する（表６）。これらに、それぞれのベクター５０μｌ（１ｍｌ／ｍｇ）を筋内注射する。予備実験とは対照的に、これらは２週間隔てて２回の注射を受けることになる。血糖値を１週間に２回測定する。抗インスリン抗体のレベルを、ＲＩＡおよびＥＬＩＳＡを使用して決定する。特定の時間で、数匹のマウスを屠殺する。それらの脾臓およびリンパ節を収集し、インスリンおよびＧＡＤ特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＣＤ８＋Ｔ細胞の存在を、標準的なＴ細胞活性化アッセイを使用して決定する。炎症プロセスがこれらのマウスの膵島で生じたか否かを決定するために、組織学的研究を含める。

【０２４８】

【表６】

表6

群		処置	処置の回数／週
1	対照	注射なし	—
2	CD8対照	pBud / CD8	8および10
3	CD8対照	pBud / CD8	12および14
4	インスリン	pBud / インスリン	8および10
5	インスリン	pBud / インスリン	12および14
6	Vetoベクター	pBud / CD8 /インスリン	8および10
7	Vetoベクター	pBud / CD8 /インスリン	12および14

【０２４９】
約７０～８０％の未処置ＮＯＤマウスは、その生涯の約２６週以内に糖尿病を発症し、その率は、以前の実験で検出されたとおりである。ｖｅｔｏベクター単独での注射は、この率を有意に低下させないことが予測される（群２および３）。インスリン２の注射は、８週目および１０週目に与えられると、約３０％まで糖尿病の発生率を低下させ得る（群４）。後の時点で与えた場合（群５）、糖尿病の発生率における有意な低下は予測されない。ｖｅｔｏベクターを早期に与えると（群６）、群２と比較して、糖尿病の発生率における有意により顕著な低下が予測される。２０％未満の動物が、糖尿病を発症すると予測される。糖尿病の発生の遅延もまた予測される。群７中の３０％以下の動物（群５中の７０％より高い率と比較して）が、糖尿病を発症すると予測される。糖尿病の発症において類似の遅延が予測される。

【０２５０】
別の実験において、雌性ＮＯＤマウスに、２週齢から開始して、糖尿病の発症前にＣＤ８α鎖／インスリンベクターを注射して、これらの動物において、糖尿病の明白な発症が予防されない場合には、それが遅延されるか否かを決定する。末梢血中のグルコースレベルを測定する。さらに、異なる時点でマウスを屠殺し、その膵島を、膵島炎の証拠についての組織学的研究に供する。その結果を、それぞれの対照ベクター（インスリンのみ、ＣＤ８α鎖のみ）を注射する研究と比較する。

【０２５１】
ベクター処置を、糖尿病の後期段階で与えて、ベクターが疾患の発症（例えば膵島炎）の後期段階を妨害できるか否かを決定する。最後に、顕性の糖尿病の証拠を有する動物を処置する。

【０２５２】
糖尿病の発症が予防された場合には、Ｔリンパ球の同時阻害が観察されるか否かを調査するための研究を行う。この目的のために、Ｔリンパ球をこれらのマウスから収集し、インスリンに対して応答するそれらの能力について研究する。養子移入実験を、調節細胞の誘導の任意の証拠を見るために含める。

【図面の簡単な説明】

【０２５３】
【図１】それぞれヒトおよびマウスについてのタンパク質の異なるドメインの境界を含んだ、野生型ヒトＣＤ８α鎖のアミノ酸配列および核酸配列を示す図である。
【図２】Ｃ５７ＢＬ／６脾臓細胞で刺激したＢａｌｂ／ｃ脾臓細胞を示す図である。培養物に、正常な線維芽細胞、培地またはマウス（Ａ）起源もしくはヒト（Ｂ）起源のＣＤ８を有する線維芽細胞を補充した。培養物を収集し、Ｃ５７ＢＬ／６由来の標的細胞に対するそれらの溶解能について試験した。
【図３】対照線維芽細胞（黒四角および黒三角）またはｍＣＤ８をトランスフェクトしたＣ５７ＢＬ／６－（Ｈ－２^{b}）由来（白丸および黒丸）線維芽細胞を注射したＢａｌｂ／ｃ（Ｈ－２ｄ）マウスを示す図である。２週間後、動物を屠殺し、脾臓細胞を収集し、Ｃ５７ＢＬ／６（Ｈ－２^{b}）（黒四角および白丸）またはＣＢＡ／Ｊ（Ｈ－２^{k}）（黒丸および黒三角）脾臓細胞で刺激し、ＥＬ４（Ｈ－２ｂ）（黒四角および白丸）またはＳ．ＡＫＲ（Ｈ－２^{k}）（黒丸および黒三角）標的細胞に対するそれらの溶解能について試験した。
【図４】アロ反応性Ｔ細胞（Ａ）または抗原特異的ＣＴＬ（Ｂ）による溶解に対するそれらの感受性について試験した、標的細胞（黒三角）またはＣＤ８発現標的（黒四角）を示す図である。
【図５】正常線維芽細胞（黒丸）およびｍＡｄＣＤ８を形質導入した線維芽細胞（Ａ、黒三角）またはＨＡｄＣＤ８を形質導入した線維芽細胞（Ｂ、黒三角）の存在下に設定したＭＬＣ（Ｂａｌｂ／ｃ抗Ｃ５７Ｂ／６）を示す図である。対照培養物には線維芽細胞を添加しなかった（黒四角）。Ｃ５７ＢＬ／６由来標的に対するこれらの培養物の溶解活性を、培養期間の終了時に決定した。

【図６】アデノウイルスｖｅｔｏ移入ベクターｍＡｄＣＤ８での免疫を示す図である。Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、上に示したベクターに感染させた。１０日後、脾臓細胞を収集し、Ａｄｂｇａｌウイルスの存在下で培養した。芽細胞の数を示す。

【図７】ｍＡｄＣＤ８での陰性免疫を示す図である。（Ａ）Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、Ａｄβｇａｌまたはｍ Ａｄ ＣＤ８で１回静脈内免疫した。（Ｂ）（Ａ）と同様に処置した動物を、５日後にＡｄβｇａｌで再免疫した。最後の注射の７日後、動物を屠殺し、それらの脾臓細胞をＡｄβｇａｌの存在下で培養した。５日間の培養後、細胞を、それらの、Ａｄβｇａｌ感染させた同系標的細胞の溶解能について試験した。

【図８】示したとおりに形質導入した、1×10^{6}個（またはなし）の刺激因子細胞と共にインキュベートした3×10^{6}個の脾臓細胞を示す図である。４日後、培養物を、免疫蛍光によってＣＤ４＋Ｔリンパ芽球の存在について分析した。

【図９】種々のウイルス構築体による感染後の、マウスおよびヒトのＣＤ８α鎖の表面発現を示す図である。Ａ．感染細胞：ＭＣ５７Ｔ線維芽細胞；パネル１：モック感染；パネル２：ｈＡｄＣＤ８による感染。Ｂ．感染細胞：ＭＣ５７Ｔ線維芽細胞；パネル１：モック感染；パネル２：ｍＡｄＣＤ８による感染。Ｃ．感染細胞：Ｂａｌｂｃ非選択骨髄細胞；パネル１：ｌａｃＺアデノウイルスベクター（ＡｄＬａｃＺ）による感染；パネル２：ｍＡｄＣＤ８による感染。Ｄ．感染細胞：ＭＣ５７Ｔ線維芽細胞；パネル１：モック感染；パネル２：ｐＡＡＶ－ｍＣＤ８による感染；パネル３：ｐＡＡＶ－ｈＣＤ８による感染。

【図１０】形質導入後に０時間または５時間培養し、その後ＭＬＣに添加した線維芽細胞の存在下に設定した、ＭＬＣ（Ｂａｌｂ／ｃ抗Ｃ５７ＢＬ／６）を示す図である。培養終了時に、リンパ芽球の数を、蛍光標識細胞分析器で決定した。

【図１１】ｖｅｔｏ移入ベクターでのｉｎ　ｖｉｔｒｏ阻害を示す図である。Ｂａｌｂ／ｃ抗Ｃ５７ＢＬ／６混合リンパ球培養物（ＭＬＣ）を、未感染またはｍＡｄＣＤ８感染したＭＣ５７線維芽細胞（Ｈ－２ｂ）（Ｘ）の非存在下または存在下で樹立した。ＣＴＬ応答を、ＥＬ４（Ｈ－２ｂ）標的細胞において測定した。

【図１２】ＡｄＬａｃＺ（黒三角）またはｍＡｄＣＤ８（黒四角）で免疫したＢａｌｂ／ｃマウスを示す図である。それらの脾臓細胞をＡｄＬａｃＺの存在下で培養し、ＡｄＬａｃＺ感染した同系Ｐ８１５標的細胞に対する特異的溶解活性について試験した。

【図１３】（Ａ）ＡｄＬａｃＺ（黒四角）またはｍＡｄＣＤ８（黒三角）で免疫したＣ５７ＢＬ／６動物を示す図である。同系ＡｄＬａｃＺ　ＥＬ４標的細胞に対するそれらの脾臓細胞の溶解活性を試験した。（Ｂ）このような動物を、ＡｄＬａｃＺで再免疫し、その後ＡｄＬａｃＺ感染したＥＬ４標的に対するそれらの溶解活性を試験した。

【図１４】未処置の対照群（黒ダイヤ）と比較した、ｐＢｕｄＣＥ４．１／ＣＤ８α鎖／インスリン２　ｖｅｔｏベクター（黒四角）を注射したマウスにおける糖尿病マウスの割合の減少を示す図である。

【図１Ａ】

CD8α鎖のドメイン
リーダー
膜貫通

ヒトCD8α鎖

タンパク質:

MALPVTALLL PLALLLHAAR PSGFRVSPLD RTWNLGETVE LKCGVLLSNP
TSGCSWLFGP RGAAASPTFL LYLSGNKPKA AEGLDTGRFS GKRLGDTFVL
TLSDFRRENE GYYFCSALSN SIMYFSHFVP VFLPAKPTTT PAPRPPTPAP
TIASQPLSLR PEACRPAAGG AVHTRGLDFA CDIYIWAPLA GTCGVLLLSL
VITLYCNHRN RRRVCKCPRP VVKSGDKPSL SARYV

mRNA - コーディング

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca
cgccgccagg ccgagccagt tccgggtgtc gccgctggat cggacctgga
acctgggcga gacagtggag ctgaagtgcc aggtgctgct gtccaacccg
acgtcgggct gctcgtggct cttccagccg cgcggcgccg ccgccagtcc
caccttcctc ctatacctct cccaaaacaa gcccaaggcg gccgaggggc
tggacaccca gcggttctcg ggcaagaggt tgggggacac cttcgtcctc
accctgagcg acttccgccg agagaacgag ggctactatt tctgctcggc
cctgagcaac tccatcatgt acttcagcca cttcgtgccg gtcttcctgc
cagcgaagcc caccacgacg ccagcgccgc gaccaccaac accggcgccc
accatcgcgt cgcagcccct gtccctgcgc ccagaggcgt gccggccagc
ggcgggggcc gcagtgcaca cgaggggcct ggacttcgcc tgtgatatct
acatctgggc.gcccttgggc gggacttgtg gggtccttct cctgtcactg
gttatcaccc tttactgcaa ccacaggaac cgaagacgtg tttgcaaatg
tccccggcct gtggtcaaat cgggagacaa gcccagcctt tcggcgagat
acgtctaa

図1A

【図１Ｂ】

マウスCD8α鎖

タンパク質:

MASPLTRFLS LNLLLLGESI ILGSGEAKPG APELRIFPKK MDAELGGKVD
LVCEVLGSVS GGCSWLFGNS SSKLPGPTFV VYMASSHNKI TWDEKLNSSK
LFSAMRDTNN KYVLTLNKFS KENEGYYFCS VISNSVMYFS SVVPVLGKVN
STTTKPVLRT PSPVHPTGTS GPGRPEDCRP RGSVKGTGLD FACDIYIWAP
LAGICVALLL SLIITLICYH RSRKRVCKCP SIACLCLKLG GSKWYESVIC
SALAVSIRCN KSKSGELPLA VHLDIRAPCK NWEIAGSLVE RYGKSGKHSP
LSLKAVVESN

mRNA コーディング

atggcctcac cgttgacccg ctttctgtcg ctgaacctgc tgctgctggg
tgagtcgatt atcctgggga gtggagaagc taagccacag gcacccgaac
tccgaatctt tccaaagaaa atggacgccg aacttggtca gaaggtggac
ctggtatgtg aagtgttggg gtccgtttcg caaggatgct cttggctctt
ccagaactcc agctccaaac tcccccagcc caccttcgtt gtctatatgg
cttcatccca caacaagata acgtgggacg agaagctgaa ttcgtcgaaa
ctgttttctg ccatgaggga cacgaataat aagtacgttc tcaccctgaa
caagttcagc aaggaaaacg aaggctacta tttctgctca gtcatcagca
actcggtgat gtacttcagt tctgtcgtgc cagtccttca gaaagtgaac
tctactacta ccaagccagt gctgcgaact ccctcacctg tgcaccctac
cgggacatct cagccccaga gaccagaaga ttgtcggccc cgtggctcag
tgaaggggac cggattggac ttcgcctgtg atatttacat ctgggcaccc
ttggccggaa tctgcgtggc ccttctgctg tccttgatca tcactctcat
ctgctaccac aggagccgaa agcgtgtttg caaatgtccc agtatagcat
gcttgtgcct caaactgcaa ggaagcaagt ggtatgaatc tgtgatctgc
tcagctctgg ctgtgagcat cagatgtaac aaatcaaagt caggagaact
gcctttagcg gtgcacctgg acatcagagc cccttgtaag aactgggaaa
ttgctggcag tctagtggag cggtacggta aatctggaaa acactccccct
ctgtcactga aggctgtagt agaatccaat taa

図1B

【図２】

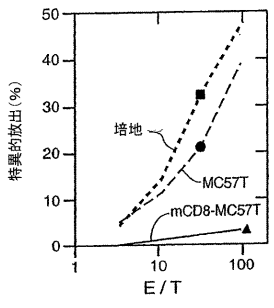


図2A

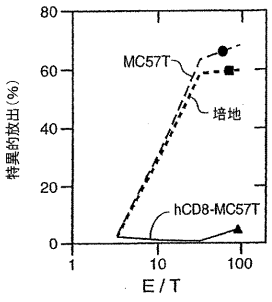


図2B

【図３】

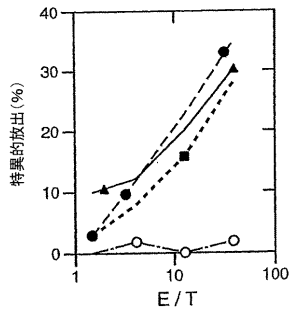


図3

【図４】

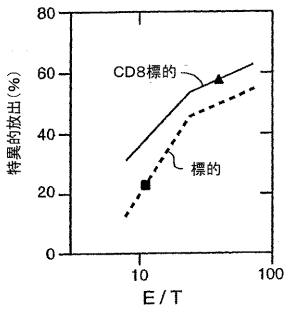


図4A

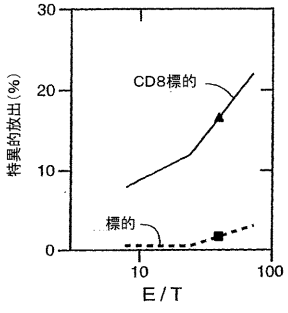


図4B

【図５】

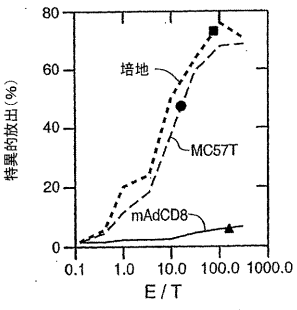


図5A

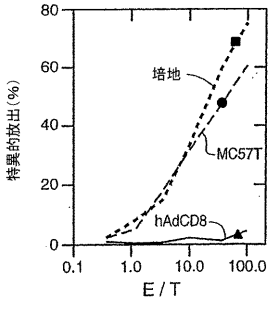


図5B

【図６】

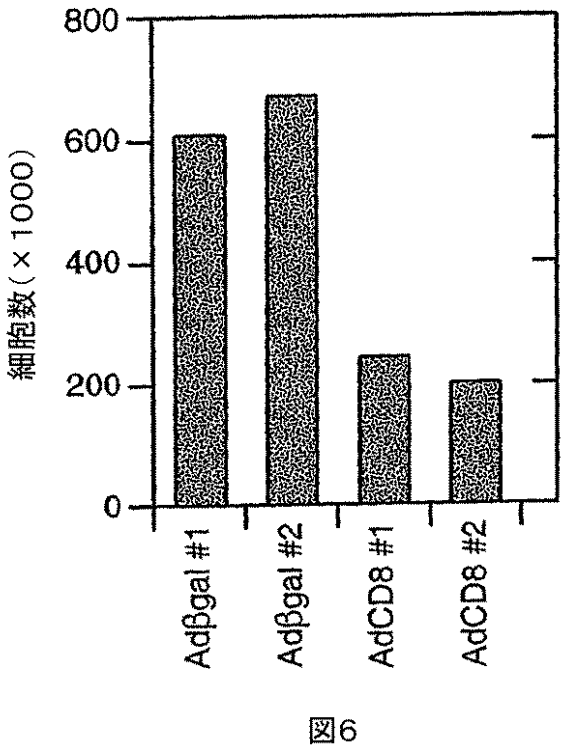


図6

【図７】

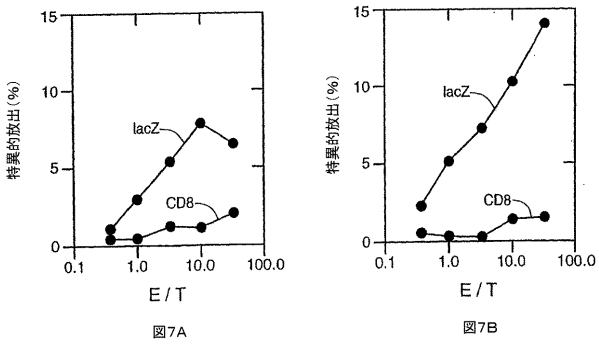


図7A 図7B

【図８】

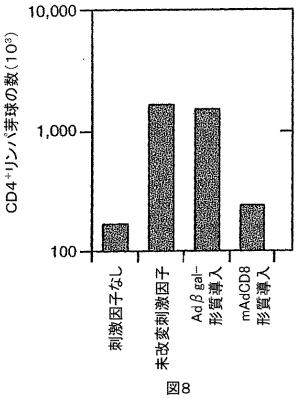


図8

【図９Ａ】

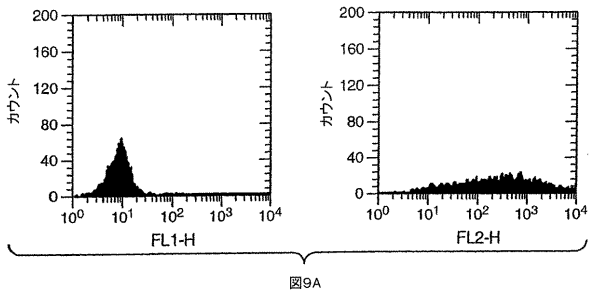


図9A

【図９Ｂ】

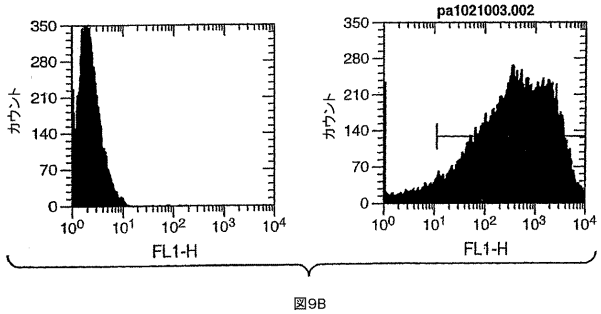


図9B

【図９Ｃ】

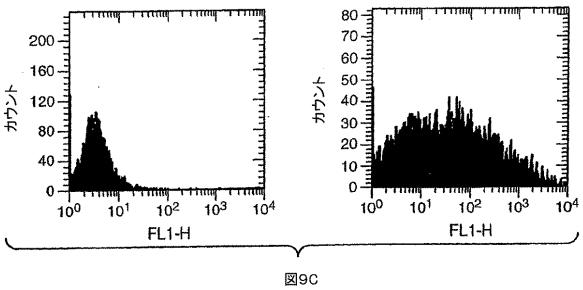


図9C

【図９Ｄ】

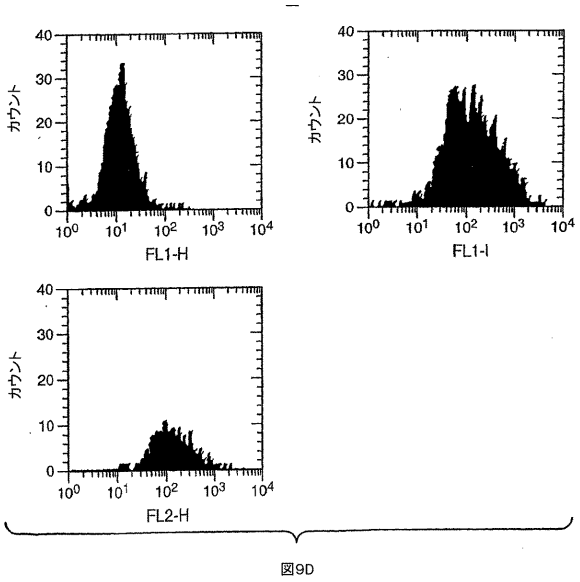


図9D

【図１０】

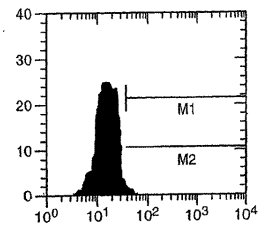


図10A

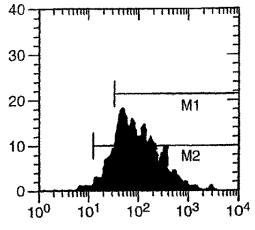


図10B

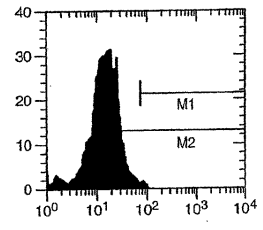


図10C

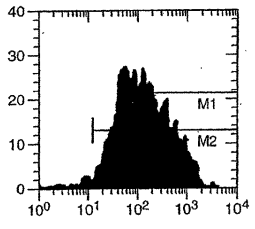


図10D

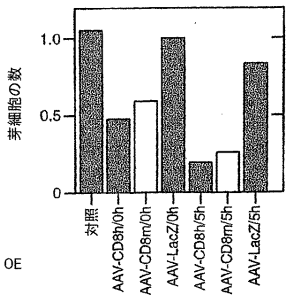


図10E

【図１１】

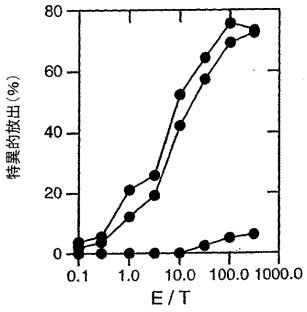


図11

【図１２】

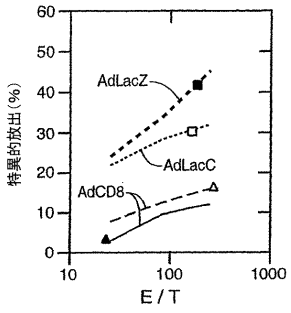


図12

【図１３】

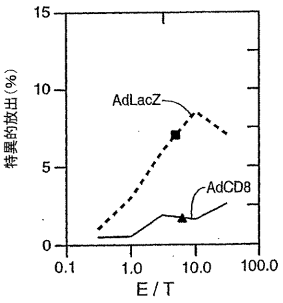


図13A

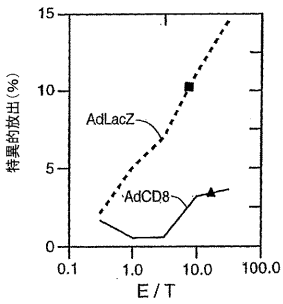


図13B

【図１４】

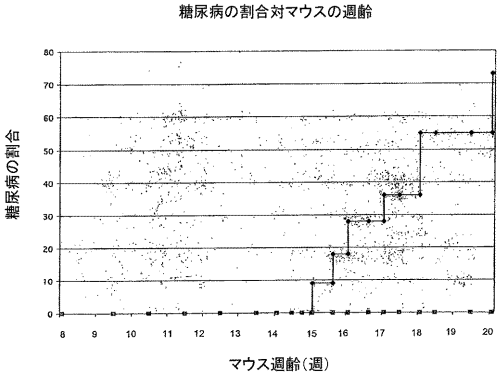


図14

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/25878

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: A61K 48/00(2006.01);C07K 19/00(2006.01);C12N 15/62(2006.01),15/63(2006.01)

USPC: 530/402;536/23.4;514/44;435/320.1
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)
U.S. : 530/402; 536/23.4; 514/44; 435/320.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US PATENT 5601828 (TYKOCINSKI ET AL.) 11 Feb 1997 , see entire document.	1-6
---		---
Y		3,7-12

☐ 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 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
16 March 2006 (16.03.2006)	17 MAY 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Authorized officer Ron Schwadron, Ph.D. Telephone No. 571 272 1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/25878

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of 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. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims 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:
Claims 13-21 were not searched because they are improperly multiply dependent as covered by the second and third sentences of PCT rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 13-21
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 any 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 claims 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 claims 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/US05/25878

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
WEST 2.1, MEDICINE/BIOTECH (DIALOG) search terms: inventor names, cd8?, alpha, autoantigen?, self, conjugat?, fusion

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00 １１１	
Ａ６１Ｐ 37/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/02	
Ａ６１Ｐ 25/28	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/28	
Ａ６１Ｐ 25/14	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/14	
Ａ６１Ｐ 25/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/16	
Ａ６１Ｐ 3/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/04	
Ａ６１Ｐ 19/02	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02	
Ａ６１Ｐ 19/08	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/08	
Ａ６１Ｐ 9/12	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/12	
Ａ６１Ｐ 1/04	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/04	
Ａ６１Ｐ 25/24	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/24	
Ａ６１Ｐ 19/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/06	
Ａ６１Ｐ 25/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	25/06	
Ａ６１Ｐ 3/06	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/06	
Ａ６１Ｐ 9/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	9/10	
Ａ６１Ｐ 3/10	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	3/10	
Ａ６１Ｐ 1/16	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	1/16	

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

(74)代理人 100146259
弁理士 橋本 諭志
(72)発明者 ヤン・キ
アメリカ合衆国８０１２６コロラド州ハイランズ・ランチ、イースト・ベックスリー・レイン４２１番
(72)発明者 ウベ・ディ・スターツ
アメリカ合衆国８０２０７コロラド州デンバー、モントビュー・ブールバード４１０１番

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 BA31 BA61 CA01 CA09 CA11 CA20 DA02 EA04 GA11 HA01 HA11 HA17
4C084 AA02 BA03 CA53 DC50 MA02 NA14 ZA022 ZA082 ZA122 ZA162 ZA182 ZA362 ZA422 ZA682 ZA702 ZA752 ZA962 ZB072 ZC022 ZC312 ZC332 ZC352
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA02 NA14 ZA02 ZA08 ZA12 ZA16 ZA18 ZA36 ZA42 ZA68 ZA70 ZA75 ZA96 ZB07 ZC02 ZC33 ZC35