

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5975983号
(P5975983)

(45) 発行日 平成28年8月23日(2016. 8. 23)

(24) 登録日 平成28年7月29日(2016. 7. 29)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 39/00 (2006. 01)

A 6 1 K 39/00

H

A 6 1 K 48/00 (2006. 01)

A 6 1 K 48/00

A 6 1 K 45/00 (2006. 01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 35/12 (2015. 01)

A 6 1 K 35/12

A 6 1 K 35/76 (2015. 01)

A 6 1 K 35/76

請求項の数 60 (全 168 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-505156 (P2013-505156)
 (86) (22) 出願日 平成23年4月14日 (2011. 4. 14)
 (65) 公表番号 特表2013-525305 (P2013-525305A)
 (43) 公表日 平成25年6月20日 (2013. 6. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/032572
 (87) 国際公開番号 W02011/130566
 (87) 国際公開日 平成23年10月20日 (2011. 10. 20)
 審査請求日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14)
 (31) 優先権主張番号 61/442, 582
 (32) 優先日 平成23年2月14日 (2011. 2. 14)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/325, 127
 (32) 優先日 平成22年4月16日 (2010. 4. 16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510274452
 ベリカム ファーマシューティカルズ,
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 テキサス 77030,
 ヒューストン, ウェスト ホルコム
 ブールバード 2130, スイート 8
 50
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 固形腫瘍を処置するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体における 7 以上のグリーソンスコアを有する前立腺癌を処置するための組合せ物であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞であって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD 40 細胞外ドメインを欠く CD 40 細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、前立腺癌抗原が負荷されている、抗原提示細胞と、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドとを含み、

該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置するのに有効な量で投与され、該グリーソンスコアが 7 以上であることを特徴とする、組合せ物。

【請求項 2】

被験体における 7 以上のグリーソンスコアを有する前立腺癌を処置するための組合せ物であって、

(a) キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および前立腺癌抗原をコードするポリヌクレオチドを含む組成物であって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング

10

20

領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含む、組成物と、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドとを含み、

該組成物およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置するのに有効な量で投与され、該グリーンスコアが7以上であることを特徴とする、組合せ物。

【請求項3】

被験体における7以上のグリーンスコアを有する前立腺癌を処置するための組合せ物であって、

(a) キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および前立腺癌抗原をコードするポリヌクレオチドであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ポリヌクレオチド、および前立腺癌抗原をコードする該ポリヌクレオチドが、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ポリヌクレオチドと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドとを含み、

該ポリヌクレオチドおよびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置するのに有効な量で投与され、該グリーンスコアが7以上であることを特徴とする、組合せ物。

【請求項4】

被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するための組合せ物であって、該被験体が7以上のグリーンスコアを有する前立腺癌を有し、該組合せ物は、

(a) キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および前立腺癌抗原をコードするポリヌクレオチドであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ポリヌクレオチド、および前立腺癌抗原をコードする該ポリヌクレオチドが、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ポリヌクレオチドと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドとを含み、

該ポリヌクレオチドおよびリガンドが、該多量体リガンドを投与した12週間までに7以上のグリーンスコアを有する前立腺癌を有する該被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与されることを特徴とする、組合せ物。

【請求項5】

被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するための組合せ物であって、該被験体が7以上のグリーンスコアを有する前立腺癌を有し、該組合せ物は、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞であって、
該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に前立腺特異的膜抗原が負荷されている、抗原提示細胞と、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドとを含み、

該抗原提示細胞およびリガンドが、該多量体リガンドを投与した12週間までに7以上のグリーンスコアを有する前立腺癌を有する該被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与されることを特徴とする、組合せ物。

【請求項6】

被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するための組合せ物であって、該被験

10

20

30

40

50

体が7以上のグリーソンスコアを有する前立腺癌を有し、該組合せ物は、

(a) キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド、および前立腺特異的膜抗原をコードするポリヌクレオチドを含む組成物であって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含む、組成物と、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドとを含む、

該組成物およびリガンドが、該多量体リガンドを投与した12週間までに7以上のグリーソンスコアを有する前立腺癌を有する該被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与されることを特徴とする、組合せ物。

10

【請求項7】

前記腫瘍血管新生が、前立腺において軽減される、請求項4または5に記載の組合せ物。

【請求項8】

前記腫瘍血管新生が、肝臓、リンパ節、骨、または肺において縮小される、請求項4または5に記載の組合せ物。

【請求項9】

前記前立腺癌抗原または腫瘍抗原が、前立腺特異的膜抗原である、請求項1から8のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項10】

20

前記膜ターゲティング領域が、ミリスチル化領域、パルミチル化領域、プレニル化領域、および受容体の膜貫通配列からなる群から選択される、請求項1から9のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項11】

前記膜ターゲティング領域が、ミリスチル化領域である、請求項1から9のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項12】

前記多量体リガンド結合領域が、FKBP、シクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、可撓性のリンカードメインにより隔てられた重鎖可変領域および軽鎖可変領域をタンデムで含む単鎖抗体、ならびにこれらが変異した配列からなる群から選択される、請求項1から11のいずれかに記載の組合せ物。

30

【請求項13】

前記多量体リガンド結合領域が、FKBP12領域である、請求項1から12のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項14】

前記多量体リガンドが、FK506二量体または二量体FK506類似体リガンドである、請求項1から13のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項15】

前記リガンドが、AP1903である、請求項1から14のいずれかに記載の組合せ物。

40

【請求項16】

前記CD40細胞質ポリペプチド領域が、配列番号1のポリヌクレオチド配列によりコードされる、請求項1から15のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項17】

前記FKBP12領域が、FKBP12_{v36}領域である、請求項13に記載の組合せ物。

【請求項18】

前記キメラタンパク質が、MyD88ポリペプチド、またはTIRドメインを欠く切断型MyD88ポリペプチドをさらに含む、請求項1から17のいずれかに記載の組合せ物

50

。

【請求項 19】

前記切断型M y D 8 8ポリペプチドが、配列番号6のペプチド配列もしくはその断片を有するか、または配列番号5のヌクレオチド配列もしくはその断片によりコードされる、請求項18に記載の組合せ物。

【請求項 20】

少なくとも2用量の前記抗原提示細胞および前記リガンドが、前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項1、5、7から19のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 21】

少なくとも1用量の前記抗原提示細胞および前記リガンドが、前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項1、5、7から19のいずれかに記載の組合せ物。

10

【請求項 22】

前記少なくとも2用量が、各用量の間に10～18日間を置いて、前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項20に記載の組合せ物。

【請求項 23】

抗原提示細胞の各用量が、 4×10^6 個の細胞を含む、請求項1、5、7から22のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 24】

抗原提示細胞の各用量が、 1.25×10^6 個の細胞を含む、請求項1、5、7から22のいずれかに記載の組合せ物。

20

【請求項 25】

抗原提示細胞の各用量が、 2.5×10^6 個の細胞を含む、請求項1、5、7から22のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 26】

前記抗原提示細胞が、樹状細胞である、請求項1、5、7から25のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 27】

前記抗原提示細胞が、B細胞である、請求項1、5、7から25のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 28】

前記抗原提示細胞が、アデノウイルスベクターでトランスフェクトされる、請求項1、5、7から27のいずれかに記載の組合せ物。

30

【請求項 29】

前記抗原提示細胞が、Ad5f35ベクターでトランスフェクトされる、請求項1、5、7から28のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 30】

前記形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、該細胞に抗原を接触させることにより、該抗原が負荷される、請求項1、5、7から29のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 31】

前記形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、該抗原提示細胞を、抗原をコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトすることにより、該抗原が負荷される、請求項1、5、7から29のいずれかに記載の組合せ物。

40

【請求項 32】

前記前立腺特異的膜抗原が、配列番号4のアミノ酸配列もしくはその断片を含むか、または配列番号3のヌクレオチド配列もしくはその断片によりコードされる、請求項9に記載の組合せ物。

【請求項 33】

前記抗原をコードする前記ポリヌクレオチド、および前記キメラタンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、異なる核酸または同じ核酸に存在する、請求項2、3、4お

50

よび 6 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 3 4】

前記抗原をコードする前記ポリヌクレオチド、および前記キメラタンパク質をコードする前記ポリヌクレオチドが、異なるアデノウイルスベクターまたは同じアデノウイルスベクターに存在する、請求項 2、3、4 および 6 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 3 5】

前記組成物が、粒子をさらに含み、前記組成物が、推進力により投与されることを特徴とする、請求項 2 および 6 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 3 6】

少なくとも 2 用量の前記組成物および前記リガンドが、前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項 2 および 6 のいずれかに記載の組合せ物。

10

【請求項 3 7】

少なくとも 2 用量の 1 以上の前記アデノウイルスベクターおよび前記リガンドが、前記被験体に投与されることを特徴とする、請求項 3、4 および 3 4 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 3 8】

前記組合せ物が、化学療法剤と組み合わせて投与されることを特徴とし、前記抗原提示細胞または組成物、リガンド、および該化学療法剤が、前記被験体における前記前立腺癌を処置するのに有効な量で投与されることを特徴とする、請求項 1 から 3 7 のいずれかに記載の組合せ物。

20

【請求項 3 9】

前記化学療法剤が、タキサンである、請求項 3 8 に記載の組合せ物。

【請求項 4 0】

前記化学療法剤が、ドセタキセルまたはカバジタキセルである、請求項 3 8 に記載の組合せ物。

【請求項 4 1】

前記前立腺癌が、転移性前立腺癌、転移性去勢抵抗性前立腺癌、転移性去勢感受性前立腺癌、局所進行前立腺癌、および限局性前立腺癌からなる群から選択される、請求項 1 から 3 および 3 2 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 4 2】

30

前記被験体において、前立腺癌の進行が防止されるか、または前立腺癌の進行が遅延されることを特徴とする、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 4 3】

前立腺癌の進行が少なくとも 6 カ月間防止されるかまたは遅延される、請求項 4 2 に記載の組合せ物。

【請求項 4 4】

前立腺癌の進行が少なくとも 1 2 カ月間防止されるかまたは遅延される、請求項 4 2 に記載の組合せ物。

【請求項 4 5】

前記前立腺癌のグリーソンスコアが 8 以上である、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 から 4 4 のいずれかに記載の組合せ物。

40

【請求項 4 6】

前記被験体が、前記多量体リガンドを投与した 3 カ月後までに、部分奏効または完全奏効を示す、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 から 4 5 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 4 7】

前記被験体が、前記多量体リガンドを投与した 6 カ月後までに、部分奏効または完全奏効を示す、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 から 4 4 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 4 8】

前記被験体における血清 P S A レベルが、前記多量体リガンドを投与した 3 カ月後までに 2 0 % 低下される、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 から 4 4 のいずれかに記載の組合

50

せ物。

【請求項 4 9】

前記被験体における血清 P S A レベルが、前記多量体リガンドを投与した 6 カ月後までに 2 0 % 低下される、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 から 4 4 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 5 0】

前記前立腺癌の腫瘍サイズが、前記多量体リガンドを投与した 3 カ月後までに 2 0 % 縮小される、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 から 4 4 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 5 1】

前記前立腺癌の腫瘍サイズが、前記多量体リガンドを投与した 6 カ月後までに 2 0 % 縮小される、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 から 4 4 のいずれかに記載の組合せ物。

10

【請求項 5 2】

前記前立腺癌の腫瘍血管新生が、前記多量体リガンドを投与した 6 カ月後までに 2 0 % 軽減される、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 から 4 4 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 5 3】

前記前立腺癌の腫瘍血管新生が、前記多量体リガンドを投与した 9 カ月後までに 2 0 % 軽減される、請求項 1 から 3、3 2 および 4 1 から 4 4 のいずれかに記載の組合せ物。

【請求項 5 4】

前記被験体がヒトである、請求項 1 から 5 3 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 5 5】

前記抗原が、前立腺特異的膜抗原である、請求項 1 から 5 3 のいずれか一項に記載の組合せ物。

20

【請求項 5 6】

前記抗原をコードするポリヌクレオチドを前記被験体に投与しないことを除き、前記組合せ物が抗原ポリペプチドと組み合わせて投与されることを特徴とする、請求項 2、3、4、6 および 3 3 から 5 5 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 5 7】

前記抗原が、前立腺特異的膜抗原である、請求項 5 6 に記載の組合せ物。

【請求項 5 8】

腫瘍血管新生が、前記多量体リガンドを投与した 1 2 週後までに前記被験体において軽減または緩徐化される、請求項 1 から 3 および 9 から 5 7 のいずれか一項に記載の組合せ物。

30

【請求項 5 9】

腫瘍血管新生が、前記多量体リガンドを投与した 6 カ月後までに前記被験体において軽減または緩徐化される、請求項 1 から 3 および 9 から 5 7 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【請求項 6 0】

腫瘍血管新生が、前記多量体リガンドを投与した 6 カ月後までに前記被験体において軽減または緩徐化される、請求項 4 から 6 のいずれか一項に記載の組合せ物。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連特許出願

2 0 1 1 年 2 月 1 4 日に出願し、「固形腫瘍を処置するための方法 (Method for Treating Solid Tumors)」との表題の米国仮特許出願第 6 1 / 4 4 2, 5 8 2 号に対する優先権；2 0 1 0 年 6 月 4 日に出願し、「固形腫瘍を処置するための方法 (Method for Treating Solid Tumors)」との表題の米国仮特許出願第 6 1 / 3 5 1, 7 6 0 号に対する優先権；および 2 0 1 0 年 4 月 1 6 日に出願し、「固形腫瘍を処置するための方法 (Method for Treating Solid Tumors)」との表題の米国仮特許出願第 6 1 / 3 2

50

5, 127号に対する優先権が主張される。これらの出願は全て言及され、その全体が本明細書中に参考として援用される。

【0002】

分野

本技術は一般に、免疫学の分野に関し、部分的には、それを必要とする被験体における固形腫瘍を、免疫応答を誘導することにより処置する方法に関する。本技術は、部分的に、固形腫瘍に対する最適化された治療的処置にさらに関する。

【背景技術】

【0003】

背景

抗原提示細胞は、外来の抗原を、ナイーブT細胞に提示して、細胞傷害性Tリンパ球反応を誘導する。樹状細胞は、有効な抗原提示細胞であり、樹状細胞の活性化は、共刺激分子およびサイトカイン分子の高レベルの発現を結果としてもたらすことが多い。腫瘍細胞など、癌細胞に対して有効な免疫療法を施すためには、腫瘍細胞に対する任意の免疫応答が、持続的にT細胞を活性化しうる程度に十分に長い寿命を有する必要がある。癌細胞に対するワクチンとして用いられる場合、抗原提示細胞は、十分に活性化され、リンパ節まで十分に遊走し、リンパ節においてT細胞を活性化するのに十分な程度に長い寿命を有する必要がある。

【0004】

例えば、Sipuleucel-TおよびProstavaacを含め、前立腺癌に対するワクチンとしての使用について、樹状細胞および抗原提示細胞を介して作用する他のワクチンが被験体にあるが、いずれの薬剤を評価する無作為化臨床試験でも、処置を受ける被験体の疾患進行までの期間において、統計学的に有意な利益が見出されることはなかった（非特許文献1；非特許文献2；非特許文献3）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Drugs R & D (2006) 7:197-201

【非特許文献2】Kantoff, P., et al., (2010) New Engl. J. Med. 363:411-422

【非特許文献3】Kantoff, P., et al. (2010) J. Clin. Onc. 28:1099-1105

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

誘導性CD40 (iCD40) 系が、ヒト樹状細胞に適用されており、癌患者における腫瘍サイズを縮小させるのに用いられている。これらの特徴は、例えば、進行したホルモン不応性前立腺癌などの癌を処置または予防するための癌免疫療法の基盤をなしている。したがって、抗原提示細胞においてCD40を誘導し、前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) に対する抗原反応を活性化すれば、前立腺癌関連腫瘍に対するだけでなく、他の固形腫瘍に対しても、直接的な効果および腫瘍血管新生を標的とするものの両方を介して抗腫瘍効果がもたらされる。前立腺特異的タンパク質抗原、例えば、PSMAポリペプチドに対する免疫応答を誘導することにより、固形腫瘍サイズを縮小させることもでき、固形腫瘍成長を低減することもできる。治療的処置の経過は、各種の画像化モダリティ（例えば、CT、骨走査、MRI、PET走査、Troféx走査）を介して、各種の標準的な血液バイオマーカー（例えば、PSA、循環腫瘍細胞）を介して、または処置を受ける患者における各種の炎症性因子、低酸素性サイトカイン、もしくは他の因子の血清レベルを介して腫瘍サイズおよび血管新生性を決定することによりモニタリングすることができる。

【0007】

したがって、一部の実施形態では、被験体における前立腺癌を処置または予防する方法であって、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺特異的タンパク質抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原などの前立腺癌抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、抗原提示細胞およびリガンドが、被験体における前立腺癌を処置または予防するのに有効な量で投与される方法が特徴とされる。

10

【0008】

したがってまた、一部の実施形態では、被験体における、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、FK506二量体または二量体FK506類似体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、抗原提示細胞およびリガンドが、被験体において免疫応答を誘導するのに有効な量で投与される方法も特徴とされる。一部の実施形態では、免疫応答が、細胞傷害性Tリンパ球による免疫応答である。

20

【0009】

また、一部の実施形態では、被験体において、腫瘍サイズを縮小させるか、または腫瘍成長を阻害する方法であって、被験体における腫瘍抗原、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原に対する免疫応答を誘導するステップを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、免疫応答が、細胞傷害性Tリンパ球による免疫応答である。一部の実施形態では、方法が、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、抗原提示細胞およびリガンドが、被験体において、腫瘍サイズを縮小させるか、または腫瘍成長を阻害するのに有効な量で投与される。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌を有する。一部の実施形態では、腫瘍が、前立腺にある。一部の実施形態では、腫瘍が、肺、骨、肝臓、前立腺、脳、乳房、卵巣、腸、精巣、結腸、膵臓、腎臓、膀胱、神経内分泌系、リンパ系にあるか、または軟組織肉腫、神経膠芽腫、もしくは悪性骨髄腫である。一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、この細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原を接触させることにより、抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原が負荷される。一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、この抗原提示細胞を、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトすることにより、抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原が負荷される。一部の実施形態では、腫瘍が、前立腺にある。一部の実施形態

30

40

50

では、被験体が、前立腺癌を有する。一部の実施形態では、腫瘍が、肺にある。一部の実施形態では、被験体が、肺癌を有する。一部の実施形態では、腫瘍が、肺、リンパ節、骨、または肝臓にある。

【0010】

また、一部の実施形態では、被験体において、腫瘍血管新生を縮小させるか、または腫瘍血管新生を阻害する方法であって、被験体における腫瘍抗原、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などに対する免疫応答を誘導するステップを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、免疫応答が、細胞傷害性Tリンパ球による免疫応答である。一部の実施形態では、方法が、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、抗原提示細胞およびリガンドが、被験体において、腫瘍血管新生を縮小させるか、または腫瘍血管新生を阻害するのに有効な量で投与される。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌を有する。一部の実施形態では、腫瘍が、前立腺にある。一部の実施形態では、腫瘍が、肺、骨、肝臓、前立腺、脳、乳房、卵巣、腸、精巣、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、神経内分泌系、リンパ系にあるか、または軟組織肉腫、神経膠芽腫、もしくは悪性骨髄腫である。一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、この細胞に、例えば、前立腺特異的膜抗原などの抗原を接触させることにより、抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原が負荷される。一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、この抗原提示細胞を、例えば、前立腺特異的膜抗原などの抗原をコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトすることにより、抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原が負荷される。一部の実施形態では、血管新生のレベルを、分子イメージングにより決定する。一部の実施形態では、分子イメージングが、ヨウ素123で標識したPSA阻害剤、例えば、PSMA阻害剤の投与を含む。一部の実施形態では、阻害剤が、TROFEX（商標）/MIP-1072/1095である。

【0011】

また、一部の実施形態では、被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化する方法であって、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、腫瘍抗原、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、抗原提示細胞およびリガンドが、被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与される方法も特徴とされる。

【0012】

一部の実施形態では、腫瘍血管新生を、前立腺において軽減する。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌を有する。一部の実施形態では、腫瘍が、肺、肝臓、リンパ節、または骨にある。

【0013】

一部の実施形態では、膜ターゲティング領域が、ミリスチル化領域、パルミトイル化領域、プレニル化領域、および受容体の膜貫通配列からなる群から選択される。一部の実施形態では、膜ターゲティング領域が、ミリスチル化領域である。一部の実施形態では

、多量体リガンド結合領域が、F K B P、シクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、可撓性のリンカードメインにより隔てられた重鎖可変領域および軽鎖可変領域をタンデムで含む単鎖抗体、ならびにこれらが変異した配列からなる群から選択される。一部の実施形態では、多量体リガンド結合領域が、F K B P 1 2 領域である。一部の実施形態では、多量体リガンドが、F K 5 0 6 二量体または二量体 F K 5 0 6 類似体リガンドである。一部の実施形態では、リガンドが、A P 1 9 0 3 である。一部の実施形態では、抗原提示細胞を、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、腫瘍内投与、前立腺内 (i n t r a p r o t a t i c) 投与、または腹腔内投与を介して、被験体に投与する。一部の実施形態では、前立腺癌が、転移性前立腺癌、転移性去勢抵抗性前立腺癌、転移性去勢感受性前立腺癌、局所進行前立腺癌、および限局性前立腺癌からなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも 2 用量の抗原提示細胞およびリガンドを、被験体に投与する。一部の実施形態では、抗原提示細胞が、樹状細胞である。一部の実施形態では、C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域が、配列番号 1 のポリヌクレオチド配列によりコードされる。一部の実施形態では、前立腺特異的膜抗原が、配列番号 4 のアミノ酸配列もしくはその断片を含むか、または配列番号 3 のヌクレオチド配列もしくはその断片によりコードされる。一部の実施形態では、抗原提示細胞を、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターでトランスフェクトする。一部の実施形態では、抗原提示細胞を、A d 5 f 3 5 ベクターでトランスフェクトする。一部の実施形態では、F K B 1 2 領域が、F K B 1 2 v 3 6 領域である。

10

20

【0014】

一部の実施形態では、方法が、抗原提示細胞およびリガンドを投与した後の被験体における I L - 6 レベルを決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法が、抗原提示細胞およびリガンドを、被験体に、さらに 1 またはさらに複数の用量を投与するかどうかを決定するステップをさらに含み、この決定が、少なくとも 1 用量を投与した後の被験体における I L - 6 レベルに基づく。一部の実施形態では、I L - 6 レベルが正常レベルを超える場合に、さらなる用量を投与する。一部の実施形態では、I L - 6 が、血清に由来する。

【0015】

一部の実施形態では、方法が、抗原提示細胞およびリガンドを投与した後の被験体における V C A M - 1 レベルを決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法が、抗原提示細胞およびリガンドを、被験体に、さらに 1 またはさらに複数の用量を投与するかどうかを決定するステップをさらに含み、この決定が、少なくとも 1 用量投与した後の被験体における V C A M - 1 レベルに基づく。一部の実施形態では、V C A M - 1 レベルが正常レベルを超える場合に、さらなる用量の投与を行う。一部の実施形態では、V C A M - 1 が、血清に由来する。

30

【0016】

一部の実施形態では、被験体において、前立腺癌の進行を防止するか、または前立腺癌の進行を遅延させる。一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、この細胞に前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原を接触させることにより、前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的タンパク質抗原または前立腺特異的膜抗原が負荷される。一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、この抗原提示細胞を、前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトすることにより、前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原が負荷される。一部の実施形態では、前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードする核酸が、D N A である。一部の実施形態では、前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードする核酸が、R N A である。一部の実施形態では、抗原提示細胞が、B 細胞である。一部の実施形態では、キメラタンパク質が、M y D 8 8 ポリペプチド、または T I R ドメインを欠く切断型 M y D 8 8 ポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、切断型 M y D 8 8 ポリペプチドが、配列番号 6 のペプチド配列もしくはその

40

50

断片を有するか、または配列番号5のヌクレオチド配列もしくはその断片によりコードされる。一部の実施形態では、前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原が、前立腺特異的膜抗原ポリペプチドである。

【0017】

また、一部の実施形態では、被験体における前立腺癌を処置または予防する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的タンパク質抗原または前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、組成物およびリガンドが、被験体における前立腺癌を処置または予防するのに有効な量で投与される方法も特徴とされる。また、一部の実施形態では、被験体における前立腺癌を処置または予防する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列が、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターを用いて送達されるステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、組成物およびリガンドが、被験体における前立腺癌を処置または予防するのに有効な量で投与される方法も特徴とされる。

【0018】

一部の実施形態では、前立腺癌の進行を少なくとも6カ月間防止するかまたは遅延させる。一部の実施形態では、前立腺癌の進行を少なくとも12カ月間防止するかまたは遅延させる。一部の実施形態では、前立腺癌のグリーソンスコアが7、8、9、10以上である。一部の実施形態では、被験体が、多量体リガンドを投与した3カ月後までに、部分奏効または完全奏効を示す。一部の実施形態では、被験体が、多量体リガンドを投与した6カ月後までに、部分奏効または完全奏効を示す。一部の実施形態では、被験体が、多量体リガンドを投与した9カ月後までに、部分奏効または完全奏効を示す。一部の実施形態では、被験体における血清PSAレベルを、多量体リガンドを投与した6週間後までに20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下させる。一部の実施形態では、被験体における血清PSAレベルを、多量体リガンドを投与した3カ月後までに20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下させる。一部の実施形態では、被験体における血清PSAレベルを、多量体リガンドを投与した6カ月後までに20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下させる。一部の実施形態では、被験体における血清PSAレベルを、多量体リガンドを投与した9カ月後までに20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%低下させる。一部の実施形態では、前立腺癌の腫瘍サイズを、多量体リガンドを投与した3カ月後までに30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%縮小させる。一部の実施形態では、前立腺癌の腫瘍サイズを、多量体リガンドを投与した6カ月後までに30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%縮小させる。一部の実施形態では、前立腺癌の腫瘍サイズを、多量体リガンドを投与した9カ月後までに30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%縮小させる。一部の実施形態では、前立腺癌の腫瘍血管新生を、多量体リガンドを投与した3カ月後までに30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%軽減する。一部の実施形態では、前立腺癌の腫瘍血管新生を、多量体リガンドを投与した6カ月後までに30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%軽減する。一部の

実施形態では、前立腺癌の腫瘍血管新生を、多量体リガンドを投与した9カ月後までに30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%軽減する。一部の実施形態では、抗原特異的な T_H1 反応または T_H2 免疫応答が、多量体リガンドを投与した後に、被験体において検出される。

【0019】

また、一部の実施形態では、被験体における腫瘍抗原、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、組成物およびリガンドが、被験体において免疫応答を誘導するのに有効な量で投与される。また、一部の実施形態では、被験体における腫瘍抗原、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列が、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターを用いて送達されるステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、ヌクレオチド配列およびリガンドが、被験体において免疫応答を誘導するのに有効な量で投与される。一部の実施形態では、免疫応答が、細胞傷害性Tリンパ球による免疫応答である。

【0020】

また、一部の実施形態では、被験体において、腫瘍サイズを縮小させるか、または腫瘍成長を阻害する方法であって、被験体における、腫瘍抗原、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原に対する免疫応答を誘導するステップを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、方法が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む。一部の実施形態では、方法が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列が、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターを用いて送達されるステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む。一部の実施形態では、組成物またはヌクレオチド配列およびリガンドが、被験体において、腫瘍サイズを縮小させるか、または腫瘍成長を阻害するのに有効な量で投与される。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌を有する。一部の実施形態では、腫瘍が、前立腺にある。一部の実施形態では、腫瘍が、肺、骨、肝臓、前立腺、脳、乳房、卵巣、腸、精巣、結腸、脾臓、腎臓、膀胱、神経内分泌系、リンパ系にあるか、または軟組織肉腫、神経膠芽腫、もしくは悪性骨髄腫である。一部の実施形態では、腫瘍が、肺、肝臓、リンパ節、または骨にある。

10

20

30

40

50

【0021】

また、一部の実施形態では、被験体において、腫瘍血管新生を軽減するか、または腫瘍血管新生を阻害する方法であって、被験体における、腫瘍抗原、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原に対する免疫応答を誘導するステップを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、方法が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む。一部の実施形態では、方法が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列が、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターを用いて送達されるステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む。一部の実施形態では、組成物またはヌクレオチド配列およびリガンドが、被験体において、腫瘍血管新生を軽減するか、または腫瘍血管新生を阻害するのに有効な量で投与される。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌を有する。一部の実施形態では、腫瘍が、前立腺にある。一部の実施形態では、腫瘍が、肺、骨、肝臓、前立腺、脳、乳房、卵巣、腸、精巣、結腸、膵臓、腎臓、膀胱、神経内分泌系、リンパ系にあるか、または軟組織肉腫、神経膠芽腫、もしくは悪性骨髄腫である。一部の実施形態では、腫瘍が、骨、肺、肝臓、またはリンパ節にある。一部の実施形態では、血管新生のレベルを、分子イメージングにより決定する。一部の実施形態では、分子イメージングが、ヨウ素123で標識したPSA阻害剤、例えば、PSMA阻害剤の投与を含む。一部の実施形態では、阻害剤が、TROFEX（商標）/MIP-1072/1095である。

【0022】

したがって、一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原の腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、IL-6、もしくはVCAM-1、または前出の一部であるステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法が特徴とされる。

【0023】

また、一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的

タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原の腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、I L-6もしくはV C A M-1、または前出の一部であるステップと、その後被験体に投与される細胞またはリガンドの用量が、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき調整されるかどうかを決定するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0024】

したがって、一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびC D 4 0細胞外ドメインを欠くC D 4 0細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、u P A R、H G F、E G F、もしくはV E G F、または前出の一部であるステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法が特徴とされる。

【0025】

また、一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびC D 4 0細胞外ドメインを欠くC D 4 0細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、u P A R、H G F、E G F、もしくはV E G F、または前出の一部であるステップと、その後被験体に投与される細胞またはリガンドの用量が、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき調整されるかどうかを決定するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0026】

一部の実施形態では、少なくとも2用量の抗原提示細胞およびリガンドの投与を、各用量の間に10～18日間を置いて、被験体に行う。一部の実施形態では、6用量の抗原提示細胞およびリガンドを、各用量の間に10～18日間を置いて、被験体に投与する。一部の実施形態では、3用量の抗原提示細胞およびリガンドを、各用量の間に24～32日間を置いて被験体に投与する。一部の実施形態では、6用量の抗原提示細胞およびリガンドを、各用量の間に2週間を置いて被験体に投与する。一部の実施形態では、3用量の抗原提示細胞およびリガンドを、各用量の間に4週間を置いて被験体に投与する。一部の実施形態では、抗原提示細胞の各用量が、約 4×10^6 個の細胞を含む。一部の実施形態では、抗原提示細胞の各用量が、約 1.25×10^6 個の細胞を含む。一部の実施形態では、抗原提示細胞の各用量が、約 2.5×10^6 個の細胞を含む。

【0027】

一部の実施形態では、方法が、化学療法剤を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、組成物、リガンド、および化学療法剤が、被験体における前立腺癌を処置す

10

20

30

40

50

るのに有効な量で投与される。一部の実施形態では、組成物またはヌクレオチド配列、リガンド、および化学療法剤が、被験体における前立腺癌を処置するのに有効な量で投与される。一部の実施形態では、化学療法剤を、カルボプラチン、リン酸エストラムスチン（Emcyt）、およびサリドマイドからなる群から選択する。一部の実施形態では、化学療法剤が、タキサンである。タキサンは、例えば、ドセタキセル（Taxotere）、パクリタキセル、およびカバジタキセルからなる群から選択することができる。一部の実施形態では、タキサンが、ドセタキセルである。

【0028】

一部の実施形態では、化学療法剤を、抗原提示細胞もしくはリガンドの投与と同時にあるか、または抗原提示細胞もしくはリガンドの投与後1週間以内に投与する。他の実施形態では、化学療法剤を、リガンドを投与した後に投与する。他の実施形態では、化学療法剤を、リガンドを投与した1～4週間後、または1週間～1カ月後、または1週間～2カ月後、または1週間～3カ月後に投与する。他の実施形態では、方法が、化学療法剤を、抗原提示細胞を投与する1～4週間前、または1週間～1カ月間前、または1週間～2カ月間前、または1週間～3カ月間前に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、化学療法剤を、抗原提示細胞を投与する少なくとも2週間前に投与する。一部の実施形態では、化学療法剤を、抗原提示細胞を投与する少なくとも1カ月間前に投与する。一部の実施形態では、化学療法剤を、多量体リガンドを投与した後に投与する。一部の実施形態では、化学療法剤を、多量体リガンドを投与した少なくとも2週間後に投与する。一部の実施形態では、化学療法剤を、多量体リガンドを投与した少なくとも1カ月後に投与する。

【0029】

一部の実施形態では、方法が、2つ以上の化学療法剤を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、化学療法剤を、カルボプラチン、リン酸エストラムスチン、およびサリドマイドからなる群から選択する。一部の実施形態では、少なくとも1つの化学療法剤が、タキサンである。タキサンは、例えば、ドセタキセル、パクリタキセル、およびカバジタキセルからなる群から選択することができる。一部の実施形態では、タキサンが、ドセタキセルである。一部の実施形態では、化学療法剤を、抗原提示細胞もしくはリガンドの投与と同時にあるか、または抗原提示細胞もしくはリガンドの投与後1週間以内に投与する。他の実施形態では、化学療法剤を、リガンドを投与した後に投与する。他の実施形態では、化学療法剤を、リガンドを投与した1～4週間後、または1週間～1カ月後、または1週間～2カ月後、または1週間～3カ月後に投与する。他の実施形態では、方法が、化学療法剤を、抗原提示細胞を投与する1～4週間前、または1週間～1カ月間前、または1週間～2カ月間前、または1週間～3カ月間前に投与するステップをさらに含む。

【0030】

また、一部の実施形態では、腫瘍の化学療法感受性を増大させる方法であって、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、前立腺特異的膜抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、抗原提示細胞およびリガンドが、被験体における腫瘍の化学療法感受性を増大させるのに有効な量で投与される方法も特徴とされる。腫瘍は、例えば、ドセタキセルまたはカバジタキセルなどの、例えば、タキサンなど、任意の化学療法剤に対して、化学療法感受性を増大させる。

【0031】

腫瘍の化学療法感受性を増大させることとは、例えば、腫瘍のサイズ、成長速度、外見、または血管新生性など、任意の方法により測定される、例えば、任意の化学療法剤に対

10

20

30

40

50

する腫瘍の感受性を増大させることを意味する。腫瘍の化学療法感受性を増大させることとは、腫瘍が、ワクチン療法以前より、例えば、少なくとも５％、１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、または１００％化学療法剤に対して感受性を増大させることを意味する。

【００３２】

また、一部の実施形態では、前立腺膜タンパク質抗原が負荷された抗原提示細胞および多量体リガンドを投与された被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびＣＤ４０細胞外ドメインを欠くＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合するステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

10

【００３３】

また、一部の実施形態では、前立腺膜タンパク質抗原が負荷された抗原提示細胞および多量体リガンドを投与された被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびＣＤ４０細胞外ドメインを欠くＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合するステップと、その後被験体に投与される細胞またはリガンドの用量が、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき調整されるかどうかを決定するステップとを含む方法も特徴とされる。

20

【００３４】

また、一部の実施形態では、前立腺膜タンパク質抗原が負荷された抗原提示細胞および多量体リガンドを投与された被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を含む情報を受け取るステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびＣＤ４０細胞外ドメインを欠くＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合するステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

30

【００３５】

また、一部の実施形態では、前立腺膜タンパク質抗原ペプチドが負荷された抗原提示細胞および多量体リガンドを投与された被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびＣＤ４０細胞外ドメインを欠くＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合するステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整する意思決定者に、このバイオマーカーの存在、非存在、または量を伝達するステップとを含む方法も特徴とされる。

40

【００３６】

また、一部の実施形態では、前立腺膜タンパク質抗原ペプチドが負荷された抗原提示細胞

50

胞および多量体リガンドを投与された被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合するステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づきこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するための指標を伝達するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0037】

また、一部の実施形態では、治療有効性を最適化する方法であって、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、IL-6またはVCAM-1であるか、あるいはこのバイオマーカーが、uPAR、HGF、EGF、もしくはVEGF、または前出の一部であるステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0038】

また、一部の実施形態では、処置の毒性を軽減する方法であって、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、IL-6またはVCAM-1であるか、あるいはこのバイオマーカーが、uPAR、HGF、EGF、もしくはVEGF、または前出の一部であるステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0039】

また、一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与する方法であって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体における

I L-6 ポリペプチドまたはその一部の量を同定するステップと、この被験体において同定された I L-6 ポリペプチドまたはその一部の量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、被験体の I L-6 ポリペプチドまたはその一部のレベルが、細胞を投与する前の健常な被験体と比べて上昇する。

【0040】

また、一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与する方法であって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体における V C A M-1 ポリペプチドまたはその一部の量を同定するステップと、この被験体において同定された V C A M-1 ポリペプチドまたはその一部の量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態、方法の実施形態 I 1 1 では、被験体の V C A M-1 ポリペプチドまたはその一部のレベルが、細胞を投与する前の健常な被験体と比べて上昇する。

【0041】

また、一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与する方法であって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体における u P A R ポリペプチド、H G F ポリペプチド、E G F ポリペプチド、もしくは V E G F ポリペプチドまたはその一部の量を同定するステップと、この被験体において同定された V C A M-1 ポリペプチドまたはその一部の量に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態、方法の実施形態 I 1 1 では、被験体の u P A R ポリペプチド、H G F ポリペプチド、E G F ポリペプチド、もしくは V E G F ポリペプチドまたはその一部のレベルが、細胞を投与する前の健常な被験体と比べて上昇する。

【0042】

また、一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与する方法であって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体における個別の分泌因子または分泌因子のパネルの量を同定するステップであって、これらの分泌因子が、G M- C S F、M I P-1 アルファ、M I P-1 ベータ、M C P-1、I F N-ガンマ、R A N T E S、E G F、および H G F からなる群から選択されるステップと、こ

の被験体において同定された個別の血清因子または血清因子のパネルの量または量の変化に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0043】

また、一部の実施形態では、被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびC D 4 0細胞外ドメインを欠くC D 4 0細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む方法も特徴とされる。また、一部の実施形態では、被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびC D 4 0細胞外ドメインを欠くC D 4 0細胞質ポリペプチド領域を含み、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列が、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターを用いて送達されるステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0044】

一部の実施形態では、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列、およびキメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列が、異なる核酸または同じ核酸に存在する。一部の実施形態では、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列、およびキメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列が、異なるアデノウイルスベクターまたは同じアデノウイルスベクターに存在する。一部の実施形態では、膜ターゲティング領域が、ミリストイル化領域、パルミトイル化領域、プレニル化領域、および受容体の膜貫通配列からなる群から選択される。一部の実施形態では、膜ターゲティング領域が、ミリストイル化領域である。一部の実施形態では、多量体リガンド結合領域が、F K B P、シクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、可撓性のリンカードメインにより隔てられた重鎖可変領域および軽鎖可変領域をタンデムで含む単鎖抗体、ならびにこれらが変異した配列からなる群から選択される。一部の実施形態では、多量体リガンド結合領域が、F K B P 1 2領域である。一部の実施形態では、多量体リガンドが、F K 5 0 6二量体または二量体F K 5 0 6類似体リガンドである。一部の実施形態では、前立腺腫瘍抗原が、例えば、前立腺特異的膜抗原ポリペプチドである。一部の実施形態では、組成物が、粒子をさらに含み、この組成物が、推進力により投与される。一部の実施形態では、粒子が、金粒子またはナノ粒子である。一部の実施形態では、リガンドが、A P 1 9 0 3である。一部の実施形態では、前立腺癌が、転移性前立腺癌、転移性去勢抵抗性前立腺癌、転移性去勢感受性前立腺癌、局所進行前立腺癌、および限局性前立腺癌からなる群から選択される。一部の実施形態では、少なくとも2用量の組成物およびリガンドを、被験体に投与する。一部の実施形態では、少なくとも2用量の、1以上のアデノウイルスベクターおよびリガンドを、被験体に投与する。一部の実施形態では、C D 4 0細胞質ポリペプチド領域が、配列番号1のポリヌクレオチド配列によりコードされる。一部の実施形態では、前立腺特異的膜抗原が、配列番号4のアミノ酸配列もしくはその断片を含むか、または配列番号3のヌクレオチド配列もしくはその断片によりコ

10

20

30

40

50

ードされる。一部の実施形態では、FKB12領域が、FKB12v36領域である。

【0045】

一部の実施形態では、方法が、組成物またはアデノウイルスベクターおよびリガンドを投与した後の被験体におけるIL-6レベルを決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法が、被験体に、さらに1またはさらに複数の用量を投与するかどうかを決定するステップをさらに含む、この決定が、少なくとも1用量投与した後の被験体におけるIL-6レベルに基づく。一部の実施形態では、IL-6レベルが正常レベルを超える場合に、さらなる用量の投与を行う。一部の実施形態では、IL-6が、血清に由来する。

【0046】

一部の実施形態では、方法が、組成物またはアデノウイルスベクターおよびリガンドを投与した後の被験体におけるVCAM-1レベルを決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法が、被験体に、さらに1またはさらに複数の用量を投与するかどうかを決定するステップをさらに含む、この決定が、少なくとも1用量投与した後の被験体におけるVCAM-1レベルに基づく。一部の実施形態では、VCAM-1レベルが正常レベルを超える場合に、さらなる用量の投与を行う。一部の実施形態では、VCAM-1が、血清に由来する。

【0047】

一部の実施形態では、方法が、組成物またはアデノウイルスベクターおよびリガンドを投与した後の被験体におけるuPARレベル、HGFレベル、EGFレベル、またはVEGFレベルを決定するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法が、被験体に、さらに1またはさらに複数用量を投与するかどうかを決定するステップをさらに含む、この決定が、少なくとも1用量投与した後の被験体におけるuPARレベル、HGFレベル、EGFレベル、またはVEGFレベルに基づく。一部の実施形態では、方法が、VCAM-1レベルが正常レベルを超える場合に、さらなる用量を投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、uPAR、HGF、EGF、またはVEGFが、血清に由来する。

【0048】

一部の実施形態では、被験体において、前立腺癌の進行を防止するか、または前立腺癌の進行を遅延させる。一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、この細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原を接触させることにより、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷される。一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、この抗原提示細胞を、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトすることにより、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷される。一部の実施形態では、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードする核酸が、DNAである。一部の実施形態では、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードする核酸が、RNAである。一部の実施形態では、抗原提示細胞が、B細胞である。一部の実施形態では、キメラタンパク質が、MyD88ポリペプチド、またはTIRドメインを欠く切断型MyD88ポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、切断型MyD88ポリペプチドが、配列番号6のペプチド配列もしくはその断片を有するか、または配列番号5のヌクレオチド配列もしくはその断片によりコードされる。一部の実施形態では、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が、前立腺特異的膜抗原ポリペプチドである。

【0049】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および

10

20

30

40

50

、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、IL-6もしくはVCAM-1、または前出の一部であるステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

10

【0050】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、IL-6もしくはVCAM-1、または前出の一部であるステップと、その後被験体に投与される組成物またはリガンドの用量が、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき調整されるかどうかを決定するステップとを含む方法も特徴とされる。

20

【0051】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、uPAR、HGF、EGF、もしくはVEGF、または前出の一部であるステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

30

【0052】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、uPAR、HGF、EGF、もしくはVEGF、または前出の一部であるステップと、その後被験体に投与される組成物またはリガンドの用量が、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき調整されるかどうかを決定するステップとを含む方法も特徴とされる。

40

【0053】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および

50

、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0054】

10

また、一部の実施形態では、組成物および多量体リガンドを投与された被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、この組成物が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含み、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合し、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合するステップと、その後被験体に投与される組成物またはリガンドの用量が、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき調整されるかどうかを決定するステップとを含む方法も特徴とされる。

20

【0055】

また、一部の実施形態では、組成物および多量体リガンドを投与された被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を含む情報を受け取るステップであって、この組成物が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含み、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合し、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合するステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物の用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物の用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

30

【0056】

また、一部の実施形態では、組成物および多量体リガンドを投与された被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、この組成物が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含み、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合し、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合するステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整する意思決定者に、このバイオマーカーの存在、非存在、または量を伝達するステップとを含む方法も特徴とされる。

40

【0057】

また、一部の実施形態では、組成物および多量体リガンドを投与された被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、この組成物が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレ

50

オチド配列を含み、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合し、多量体リガンドが、多量体リガンド結合領域に結合するステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整するための指標を伝達するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0058】

また、一部の実施形態では、治療有効性を最適化する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、IL-6もしくはVCAM-1、または前出の一部であるステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0059】

また、一部の実施形態では、治療の毒性を軽減する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定するステップであって、このバイオマーカーが、IL-6もしくはVCAM-1、またはuPAR、HGF、EGF、もしくはVEGF、あるいは前出の一部であるステップと、この被験体において同定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

【0060】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるIL-6ポリペプチドまたはその一部の量を同定するステップと、この被験体において同定されたIL-6ポリペプチドまたはその一部の量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、被験体のIL-6ポリペプチドまたはその一部のレベルが、組成物を投与する前の健常な被験体と比べて上昇する。

【0061】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および

、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるVCAM-1ポリペプチドまたはその一部の量を同定するステップと、この被験体において同定されたVCAM-1ポリペプチドまたはその一部の量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、被験体のVCAM-1ポリペプチドまたはその一部のレベルが、組成物を投与する前の健常な被験体と比べて上昇する。

10

【0062】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体におけるuPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部の量を同定するステップと、この被験体において同定されたuPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部の量に基づき、この被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の組成物もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、被験体のuPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部のレベルが、組成物を投与する前の健常な被験体と比べて上昇する。

20

【0063】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体における個別の分泌因子または分泌因子のパネルの量を同定するステップであって、これらの分泌因子が、GM-CSF、MIP-1アルファ、MIP-1ベータ、MCP-1、IFN-ガンマ、RANTES、EGF、およびHGFからなる群から選択されるステップと、この被験体において同定された個別の血清因子または血清因子のパネルの量または量の変化に基づき、この被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を維持するか、またはこの被験体に投与される後続の細胞もしくはリガンドの用量を調整するステップとを含む方法も特徴とされる。

30

40

【0064】

一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌を有する。一部の実施形態では、被験体が、固形腫瘍を有する。一部の実施形態では、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原に対する免疫応答を、細胞または組成物およびリガンドを投与することにより誘導する。一部の実施形態では、細胞傷害性T細胞反応を誘導する。一部の実施形態では、細胞または組成物およびリガンドを投与することにより、腫瘍血管新生を軽減または阻害する。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌の予防を必要とする。一部の実施形態では、キメラタンパク質が、MyD88ポリペプチド、またはTIRドメインを欠く切断型MyD88ポリペプチドをさらに含む。

50

【0065】

一部の実施形態では、バイオマーカーの存在、非存在、または量を、被験体に由来する生物学的試料から決定する。一部の実施形態では、試料が、血液または血液画分を含有する。

【0066】

一部の実施形態では、バイオマーカーが、IL-6ポリペプチドまたはその一部である。一部の実施形態では、IL-6ポリペプチドまたはその一部の存在、非存在、または量を、IL-6ポリペプチドまたはその一部をIL-6ポリペプチドまたはその一部に特異的に結合する抗体を接触させるステップを含む方法により決定する。一部の実施形態では、IL-6ポリペプチドまたはその一部の存在、非存在、または量を、高速液体クロマトグラフィーを介してIL-6ポリペプチドまたはその一部を解析するステップを含む方法により決定する。一部の実施形態では、IL-6ポリペプチドまたはその一部の存在、非存在、または量を、質量分析を介してIL-6ポリペプチドまたはその一部を解析するステップを含む方法により決定する。

10

【0067】

一部の実施形態では、バイオマーカーが、VCAM-1ポリペプチドまたはその一部である。一部の実施形態では、VCAM-1ポリペプチドまたはその一部の存在、非存在、または量を、VCAM-1ポリペプチドまたはその一部をVCAM-1ポリペプチドまたはその一部に特異的に結合する抗体を接触させるステップを含む方法により決定する。一部の実施形態では、VCAM-1ポリペプチドまたはその一部の存在、非存在、または量を、高速液体クロマトグラフィーを介してVCAM-1ポリペプチドまたはその一部を解析するステップを含む方法により決定する。一部の実施形態では、VCAM-1ポリペプチドまたはその一部の存在、非存在、または量を、質量分析を介してVCAM-1ポリペプチドまたはその一部を解析するステップを含む方法により決定する。

20

【0068】

また、一部の実施形態では、被験体における固形腫瘍を処置する方法であって、被験体におけるIL-6の量もしくはVCAM-1の量、またはこれらの両方を低減するのに有効な量で医薬組成物を投与するステップを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、方法が、抗体を被験体に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法が、ステロイド剤を被験体に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法が、化学療法剤を被験体に投与するステップをさらに含む。一部の実施形態では、医薬組成物が、核酸組成物を含む。一部の実施形態では、固形腫瘍が、前立腺癌腫瘍として分類される。

30

【0069】

一部の実施形態では、バイオマーカーが、uPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部である。一部の実施形態では、uPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部の存在、非存在、または量を、uPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部をuPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部に特異的に結合する抗体を接触させるステップを含む方法により決定する。一部の実施形態では、uPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部の存在、非存在、または量を、高速液体クロマトグラフィーを介してuPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部を解析するステップを含む方法により決定する。一部の実施形態では、uPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部の存在、非存在、または量を、質量分析を介してuPARポリペプチド、HGFポリペプチド、EGFポリペプチド、もしくはVEGFポリペプチドまたはその一部を解析するステップを含む方法により決定する。

40

50

【0070】

また、一部の実施形態では、被験体における生活の質を改善する方法であって、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、抗原提示細胞およびリガンドが、被験体における生活の質を改善するのに有効な量で投与される方法も特徴とされる。

10

【0071】

一部の実施形態では、被験体が、癌、例えば、末期癌を有する。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌、例えば、末期前立腺癌を有する。一部の実施形態では、悪液質、疲労、または貧血のうちの1以上の症状が緩和される。一部の実施形態では、悪液質、疲労、または貧血のうちの2つ以上の症状が緩和される。

【0072】

また、一部の実施形態では、被験体における生活の質を改善する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、抗原化合物およびリガンドが、被験体における生活の質を改善するのに有効な量で投与される方法も特徴とされる。また、一部の実施形態では、被験体における生活の質を改善する方法であって、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列が、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターを用いて送達されるステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、これにより、ヌクレオチド配列およびリガンドが、被験体における生活の質を改善するのに有効な量で投与される方法も特徴とされる。一部の実施形態では、被験体が、癌、例えば、末期癌を有する。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌、例えば、末期前立腺癌を有する。一部の実施形態では、悪液質、疲労、または貧血のうちの1以上の症状が緩和される。一部の実施形態では、悪液質、疲労、または貧血のうちの2つ以上の症状が緩和される。

20

30

40

【0073】

また、一部の実施形態では、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、この抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原が負荷されているステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体における1以上の生活の質の指標を測定するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実

50

施形態では、被験体が、癌、例えば、末期癌を有する。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌、例えば、末期前立腺癌を有する。一部の実施形態では、悪液質、疲労、または貧血のうちの1以上の症状が測定される。一部の実施形態では、悪液質、疲労、または貧血のうちの2つ以上の症状が測定される。

【0074】

また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含むステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体における1以上の生活の質の指標を測定するステップとを含む方法も特徴とされる。また、一部の実施形態では、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列が、ベクター、例えば、ウイルスベクター、例えば、アデノウイルスベクターを用いて送達されるステップと、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、被験体における1以上の生活の質の指標を測定するステップとを含む方法も特徴とされる。一部の実施形態では、被験体が、癌、例えば、末期癌を有する。一部の実施形態では、被験体が、前立腺癌、例えば、末期前立腺癌を有する。一部の実施形態では、悪液質、疲労、または貧血のうちの1以上の症状が測定される。一部の実施形態では、悪液質、疲労、または貧血のうちの2つ以上の症状が測定される。

【0075】

また、一部の実施形態では、本明細書における実施形態の方法であって、キメラタンパク質、および、例えば、前立腺癌抗原、前立腺特異的タンパク質抗原、または前立腺特異的膜抗原などの腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を被験体に送達し、このキメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与する方法も特徴とされる。したがって、キメラタンパク質および腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を方法において用いる、本明細書における実施形態では、前立腺特異的膜抗原ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列ではなく、前立腺特異的膜抗原ポリペプチドを被験体に投与する。

【0076】

一部の実施形態では、被験体が、哺乳動物である。一部の実施形態では、被験体が、ヒトである。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

被験体における前立腺癌を処置する方法であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、前立腺癌抗原が負荷されているステップと、

10

20

30

40

50

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと
を含み、
これにより、該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置する
のに有効な量で投与される、方法。

(項目2)

被験体における前立腺癌を処置する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコード
するヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであ
って、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および
C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと
を含み、
これにより、該組成物およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置するのに有
効な量で投与される、方法。

(項目3)

被験体における前立腺癌を処置する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコード
するヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメ
ラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞
外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコード
する該ヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデ
ノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと
を含み、
これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置
するのに有効な量で投与され、
これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置
するのに有効な量で投与される、方法。

(項目4)

被験体における前立腺癌を処置する方法であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験
体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する
核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およ
び C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に、前立腺特異的膜抗原
が負荷されているステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと
を含み、
これにより、該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置する
のに有効な量で投与される、方法。

(項目5)

被験体における前立腺癌を処置する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原を
コードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステッ
プであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、
および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップ
と、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと

を含み、

これにより、該組成物およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 6)

被験体における前立腺癌を処置する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD 40 細胞外ドメインを欠く CD 40 細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

10

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置するのに有効な量で投与され、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 7)

前記前立腺癌抗原が、前立腺特異的タンパク質抗原である、項目 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

20

(項目 8)

前記前立腺癌抗原が、前立腺特異的膜抗原である、項目 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

(項目 9)

被験体における腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD 40 細胞外ドメインを欠く CD 40 細胞質ポリペプチド領域を含み、

30

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に腫瘍抗原が負荷されている、ステップと、

(b) FK 506 二量体または二量体 FK 506 類似体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体において免疫応答を誘導するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 10)

被験体における腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD 40 細胞外ドメインを欠く CD 40 細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

40

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該組成物およびリガンドが、該被験体において免疫応答を誘導するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 11)

被験体における腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および腫瘍抗原をコードする

50

ヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および該腫瘍抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体において免疫応答を誘導するのに有効な量で投与される、方法。

(項目12)

被験体において、腫瘍サイズを縮小させるか、腫瘍成長を阻害するか、腫瘍血管新生を軽減するか、または腫瘍血管新生を阻害する方法であって、該被験体における腫瘍抗原に対する免疫応答を誘導するステップを含む方法。

(項目13)

前記免疫応答が、細胞傷害性Tリンパ球による免疫応答である、項目12に記載の方法。

(項目14)

前記腫瘍抗原が、前立腺癌抗原である、項目9から13のいずれかに記載の方法。

(項目15)

前記腫瘍抗原が、前立腺特異的膜抗原である、項目9から13のいずれかに記載の方法。

(項目16)

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に腫瘍抗原が負荷されている、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体において、腫瘍サイズを縮小させるか、または腫瘍成長を阻害するのに有効な量で投与される、項目12から15のいずれかに記載の方法。

(項目17)

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該組成物およびリガンドが、該被験体において、腫瘍サイズを縮小させるか、または腫瘍成長を阻害するのに有効な量で投与される、項目12から15のいずれかに記載の方法。

(項目18)

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする

10

20

30

40

50

該ヌクレオチド配列、および該腫瘍抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体において、腫瘍サイズを縮小させるか、または腫瘍成長を阻害するのに有効な量で投与される、項目 12 から 15 のいずれかに記載の方法。

(項目 19)

前記腫瘍が、前立腺にある、項目 12 から 18 のいずれかに記載の方法。

(項目 20)

前記腫瘍が、肝臓、骨、リンパ節、または肺にある、項目 12 から 18 のいずれかに記載の方法。

(項目 21)

前記腫瘍血管新生が、前立腺において軽減される、項目 12 から 18 のいずれかに記載の方法。

(項目 22)

前記腫瘍血管新生が、肝臓、骨、リンパ節、または肺において軽減される、項目 12 から 18 のいずれかに記載の方法。

(項目 23)

被験体における前立腺癌を予防する方法であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD40 細胞外ドメインを欠く CD40 細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に前立腺癌抗原が負荷されているステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む、方法。

(項目 24)

被験体における前立腺癌を予防する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD40 細胞外ドメインを欠く CD40 細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む、方法。

(項目 25)

被験体における前立腺癌を予防する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD40 細胞外ドメインを欠く CD40 細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および該前立腺癌抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む、方法。

(項目 26)

被験体における前立腺癌を予防する方法であって、

10

20

30

40

50

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に前立腺特異的膜抗原が負荷されているステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む、方法。

(項目27)

被験体における前立腺癌を予防する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む、方法。

(項目28)

被験体における前立腺癌を予防する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および該前立腺特異的膜抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む、方法。

(項目29)

被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化する方法であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に前立腺癌抗原が負荷されている、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含む、

これにより、該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与される、方法。

(項目30)

被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと

10

20

30

40

50

を含み、

これにより、該組成物およびリガンドが、該被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 3 1)

被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 3 2)

被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化する方法であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に前立腺特異的膜抗原が負荷されている、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 3 3)

被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該組成物およびリガンドが、該被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 3 4)

被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

10

20

30

40

50

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における腫瘍血管新生を軽減または緩徐化するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 3 5)

前記前立腺癌抗原が、前立腺特異的タンパク質抗原である、項目 2 3 から 2 5、または 1 2 3 から 1 2 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 6)

前記前立腺癌抗原が、前立腺特異的膜抗原である、項目 2 3 から 2 5、または 1 2 3 から 1 2 5 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 7)

前記腫瘍血管新生が、前立腺において軽減される、項目 2 9 から 3 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 8)

前記腫瘍が、肝臓、リンパ節、骨、または肺において縮小される、項目 2 9 から 3 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 3 9)

被験体における生活の質を改善する方法であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に前立腺特異的膜抗原が負荷されている、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体における生活の質を改善するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 4 0)

被験体における生活の質を改善する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該抗原化合物およびリガンドが、該被験体における生活の質を改善するのに有効な量で投与される、方法。

(項目 4 1)

被験体における生活の質を改善する方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における生活の質を改善す

10

20

30

40

50

るのに有効な量で投与される、方法。

(項目 4 2)

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に前立腺癌抗原が負荷されている、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、

(c) 該被験体における 1 以上の生活の質の指標を測定するステップとを含む方法。

(項目 4 3)

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、

(c) 該被験体における 1 以上の生活の質の指標を測定するステップとを含む方法。

(項目 4 4)

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および C D 4 0 細胞外ドメインを欠く C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および前立腺癌抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップと、

(c) 該被験体における 1 以上の生活の質の指標を測定するステップとを含む方法。

(項目 4 5)

前記前立腺癌抗原が、前立腺特異的タンパク質抗原である、項目 4 2 から 4 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 6)

前記前立腺癌抗原が、前立腺特異的膜抗原である、項目 4 2 から 4 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 7)

前記膜ターゲティング領域が、ミリストイル化領域、パルミトイル化領域、プレニル化領域、および受容体の膜貫通配列からなる群から選択される、項目 1 から 1 1、1 3 から 4 5、または 4 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 8)

前記膜ターゲティング領域が、ミリストイル化領域である、項目 1 から 1 1、1 3 から 4 5、または 4 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 4 9)

前記多量体リガンド結合領域が、F K B P、シクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体、重鎖抗体サブユニット、軽鎖抗体サブユニット、可撓性のリンカードメインにより隔てられた重鎖可変領域および軽鎖可変領域をタンデムで含む単鎖抗体、ならびにこれらが変異した配列からなる群から選択される、項目 1 から 1 1、1 3 から 4 5、または 4 6 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 5 0)

前記多量体リガンド結合領域が、F K B P 1 2 領域である、項目 1 から 1 1、1 3 から 4 8、または 4 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 1)

前記多量体リガンドが、F K 5 0 6 二量体または二量体 F K 5 0 6 類似体リガンドである、項目 1 から 1 1、1 3 から 4 9、または 5 0 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 2)

前記リガンドが、A P 1 9 0 3 である、項目 1 から 1 1、1 3 から 5 0、または 5 1 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 3)

前記 C D 4 0 細胞質ポリペプチド領域が、配列番号 1 のポリヌクレオチド配列によりコードされる、項目 1 から 1 1、1 3 から 5 1、または 5 2 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 4)

前記 F K B 1 2 領域が、F K B 1 2 v_{3 6} 領域である、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記キメラタンパク質が、M y D 8 8 ポリペプチド、または T I R ドメインを欠く切断型 M y D 8 8 ポリペプチドをさらに含む、項目 1 から 1 1、1 3 から 5 3、または 5 4 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 6)

前記切断型 M y D 8 8 ポリペプチドが、配列番号 6 のペプチド配列もしくはその断片を有するか、または配列番号 5 のヌクレオチド配列もしくはその断片によりコードされる、項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記抗原提示細胞を、静脈内投与、皮内投与、皮下投与、腫瘍内投与、前立腺内投与、または腹腔内投与を介して、前記被験体に投与する、項目 1、4、9、1 6、1 9 から 2 2、3 2、3 5 から 3 9、4 2、4 5 から 5 5、または 5 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 8)

少なくとも 2 用量の前記抗原提示細胞および前記リガンドを、前記被験体に投与する、項目 1、4、9、1 6、1 9 から 2 2、3 2、3 5 から 3 9、4 2、4 5 から 5 6、または 5 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 5 9)

少なくとも 1 用量の前記抗原提示細胞および前記リガンドを、前記被験体に投与する、項目 1、4、9、1 6、1 9 から 2 2、3 2、3 5 から 3 9、4 2、4 5 から 5 7、または 5 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 0)

前記少なくとも 2 用量を、各用量の間に 1 0 ～ 1 8 日間を置いて、前記被験体に投与する、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 1)

6 用量の前記抗原提示細胞および前記リガンドを、前記被験体に、各用量の間に 1 0 ～ 1 8 日間を置いて投与する、項目 1、4、9、1 6、1 9 から 2 2、3 2、3 5 から 3 9、4 2、4 5 から 5 6、または 5 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 2)

3 用量の前記抗原提示細胞および前記リガンドを、前記被験体に、各用量の間に 2 4 ～ 3 2 日間を置いて投与する、項目 1、4、9、1 6、1 9 から 2 2、3 2、3 5 から 3 9、4 2、4 5 から 5 6、または 5 7 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 3)

6 用量の前記抗原提示細胞および前記リガンドを、前記被験体に、各用量の間に 2 週間を置いて投与する、項目 6 1 に記載の方法。

(項目 6 4)

3 用量の前記抗原提示細胞および前記リガンドを、前記被験体に、各用量の間に 4 週間

10

20

30

40

50

を置いて投与する、項目 6 2 に記載の方法。

(項目 6 5)

抗原提示細胞の各用量が、約 4×10^6 個の細胞を含む、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 63、または 64 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 6)

抗原提示細胞の各用量が、約 12.5×10^6 個の細胞を含む、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 63、または 64 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 7)

抗原提示細胞の各用量が、約 25×10^6 個の細胞を含む、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 63、または 64 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 8)

前記抗原提示細胞が、樹状細胞である、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 66、または 67 のいずれかに記載の方法。

(項目 6 9)

前記抗原提示細胞が、B 細胞である、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 66、または 67 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 0)

前記抗原提示細胞を、アデノウイルスベクターでトランスフェクトする、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 68、または 69 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 1)

前記抗原提示細胞を、Ad5f35 ベクターでトランスフェクトする、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 69、または 70 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 2)

前記形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、該細胞に抗原を接触させることにより、該抗原が負荷される、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 70、または 71 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 3)

前記形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞は、該抗原提示細胞を、抗原をコードする核酸で形質導入またはトランスフェクトすることにより、該抗原が負荷される、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 70、または 71 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 4)

前記抗原をコードする前記核酸が、DNA である、項目 2、3、4 から 8、10、11、14、15、17 から 22、24、25、27、28、30 から 38、40、41、43 から 72、または 73 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 5)

前記抗原をコードする前記核酸が、RNA である、項目 2、3、4 から 8、10、11、14、15、17 から 22、24、25、27、28、30 から 38、40、41、43 から 72、または 73 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 6)

前記前立腺特異的膜抗原が、配列番号 4 のアミノ酸配列もしくはその断片を含むか、または配列番号 3 のヌクレオチド配列もしくはその断片によりコードされる、項目 1、4、9、16、19 から 22、32、35 から 39、42、45 から 71、または 72 のいずれかに記載の方法。

(項目 7 7)

前記抗原をコードする前記ヌクレオチド配列、および前記キメラタンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、異なる核酸または同じ核酸に存在する、項目 7 4 または 7 5 に記載の方法。

(項目 7 8)

前記抗原をコードする前記ヌクレオチド配列、および前記キメラタンパク質をコードする前記ヌクレオチド配列が、異なるアデノウイルスベクターまたは同じアデノウイルスベクターに存在する、項目 7 4 に記載の方法。

(項目 7 9)

前記組成物が、粒子をさらに含み、前記組成物が、推進力により投与される、項目 2、5、1 7、1 9 から 2 2、2 4、3 0、4 0、4 3、4 7 から 5 6、7 6 から 7 7、または 7 8 のいずれかに記載の方法。

10

(項目 8 0)

前記粒子が、金粒子またはナノ粒子である、項目 7 9 に記載の方法。

(項目 8 1)

少なくとも 2 用量の前記組成物および前記リガンドを、前記被験体に投与する、項目 2、5、1 7、1 9 から 2 2、2 4、3 0、4 0、4 3、4 7 から 5 6、7 6 から 7 7、または 7 8 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 2)

少なくとも 2 用量の 1 以上の前記アデノウイルスベクターおよび前記リガンドを、前記被験体に投与する、項目 3、1 1、1 8、2 5、3 1、4 1、または 4 4 のいずれかに記載の方法。

20

(項目 8 3)

化学療法剤を投与するステップをさらに含み、これにより、前記抗原提示細胞、リガンド、および前記化学療法剤が、前記被験体における前記前立腺癌を処置するのに有効な量で投与される、項目 1、4、9 から 2 2、2 3、2 6、2 9、3 7 から 3 9、4 2、4 7 から 5 7、6 3 から 7 5、または 7 6 のいずれかに記載の方法。

(項目 8 4)

前記化学療法剤を、前記抗原提示細胞を投与する前に投与する、項目 8 3 に記載の方法。

(項目 8 5)

前記化学療法剤を、前記抗原提示細胞を投与する少なくとも 2 週間前に投与する、項目 8 3 に記載の方法。

30

(項目 8 6)

前記化学療法剤を、前記抗原提示細胞を投与する少なくとも 1 カ月間前に投与する、項目 8 3 に記載の方法。

(項目 8 7)

前記化学療法剤を、前記多量体リガンドを投与した後に投与する、項目 8 3 に記載の方法。

(項目 8 8)

前記化学療法剤を、前記多量体リガンドを投与した少なくとも 2 週間後に投与する、項目 8 3 に記載の方法。

40

(項目 8 9)

前記化学療法剤を、前記多量体リガンドを投与した少なくとも 1 カ月後に投与する、項目 8 3 に記載の方法。

(項目 9 0)

前記化学療法剤が、タキサンである、項目 8 3 から 8 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 1)

前記化学療法剤が、ドセタキセルまたはカバジタキセルである、項目 8 3 から 8 9 のいずれかに記載の方法。

(項目 9 2)

50

化学療法剤を投与するステップをさらに含み、これにより、前記組成物、リガンド、および前記化学療法剤が、前記被験体における前記前立腺癌を処置するのに有効な量で投与される、項目2、5、17、19から22、24、30、40、43、47から56、76から81、または82のいずれかに記載の方法。

(項目93)

化学療法剤を投与するステップをさらに含み、これにより、前記ヌクレオチド配列、リガンド、および前記化学療法剤が、前記被験体における前記前立腺癌を処置するのに有効な量で投与される、項目3、11、18、25、31、41、または44のいずれかに記載の方法。

(項目94)

前記化学療法剤を、前記組成物または前記ヌクレオチド配列を投与する前に投与する、項目92または93に記載の方法。

(項目95)

前記化学療法剤を、前記組成物または前記ヌクレオチド配列を投与する少なくとも2週間前に投与する、項目92または93に記載の方法。

(項目96)

前記化学療法剤を、前記組成物または前記ヌクレオチド配列を投与する少なくとも1カ月間前に投与する、項目92または93に記載の方法。

(項目97)

前記化学療法剤を、前記多量体リガンドを投与した後に投与する、項目92または93に記載の方法。

(項目98)

前記化学療法剤を、前記多量体リガンドを投与した少なくとも2週間後に投与する、項目92または93に記載の方法。

(項目99)

前記化学療法剤を、前記多量体リガンドを投与した少なくとも1カ月後に投与する、項目92または93に記載の方法。

(項目100)

前記化学療法剤が、ドセタキセルである、項目92から99のいずれかに記載の方法。

(項目101)

前記前立腺癌が、転移性前立腺癌、転移性去勢抵抗性前立腺癌、転移性去勢感受性前立腺癌、局所進行前立腺癌、および限局性前立腺癌からなる群から選択される、項目1から8、23から28、93から99、または100のいずれかに記載の方法。

(項目102)

前記被験体において、前立腺癌の進行を防止するか、または前立腺癌の進行を遅延させる、項目1から8、23から28、83から100、または101のいずれかに記載の方法。

(項目103)

前立腺癌の進行を少なくとも6カ月間防止するかまたは遅延させる、項目102に記載の方法。

(項目104)

前立腺癌の進行を少なくとも12カ月間防止するかまたは遅延させる、項目102に記載の方法。

(項目105)

前記前立腺癌のグリーソンスコアが7以上である、項目1から8、23から28、83から103、または104のいずれかに記載の方法。

(項目106)

前記前立腺癌のグリーソンスコアが8以上である、項目1から8、23から28、83から103、または104のいずれかに記載の方法。

(項目107)

前記前立腺癌のグリーソンスコアが9以上である、項目1から8、23から28、83から103、または104のいずれかに記載の方法。

(項目108)

前記前立腺癌のグリーソンスコアが10以上である、項目1から8、23から28、83から103、または104のいずれかに記載の方法。

(項目109)

前記被験体が、前記多量体リガンドを投与した3カ月後までに、部分奏効または完全奏効を示す、項目1から8、23から28、83から107、または108のいずれかに記載の方法。

(項目110)

前記被験体が、前記多量体リガンドを投与した6カ月後までに、部分奏効または完全奏効を示す、項目1から8、23から28、83から107、または108のいずれかに記載の方法。

(項目111)

前記被験体が、前記多量体リガンドを投与した9カ月後までに、部分奏効または完全奏効を示す、項目1から8、23から28、83から107、または108のいずれかに記載の方法。

(項目112)

前記被験体における血清PSAレベルが、前記多量体リガンドを投与した3カ月後までに20%低下される、項目1から3、23から28、83から110、または111のいずれかに記載の方法。

(項目113)

前記被験体における血清PSAレベルが、前記多量体リガンドを投与した6カ月後までに20%低下される、項目1から3、23から28、83から110、または111のいずれかに記載の方法。

(項目114)

前記前立腺癌の腫瘍サイズが、前記多量体リガンドを投与した3カ月後までに20%縮小される、項目1から3、23から28、83から112、または113のいずれかに記載の方法。

(項目115)

前記前立腺癌の腫瘍サイズが、前記多量体リガンドを投与した6カ月後までに20%縮小される、項目1から3、23から28、83から112、または113のいずれかに記載の方法。

(項目116)

前記前立腺癌の腫瘍血管新生が、前記多量体リガンドを投与した6カ月後までに20%軽減される、項目1から3、23から28、83から112、または113のいずれかに記載の方法。

(項目117)

前記前立腺癌の腫瘍血管新生が、前記多量体リガンドを投与した9カ月後までに20%軽減される、項目1から3、23から28、83から112、または113のいずれかに記載の方法。

(項目118)

抗原特異的な T_H1 免疫応答または T_H2 免疫応答が、前記多量体リガンドを投与した後に、前記被験体において検出される、項目1から3、23から28、83から112、または113のいずれかに記載の方法。

(項目119)

前記被験体がヒトである、項目1から118のいずれか一項に記載の方法。

(項目120)

前記抗原が、前立腺特異的膜抗原である、項目1から118のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 1 2 1)

前記抗原をコードするヌクレオチド配列を前記被験体に投与しないことを除き、抗原ポリペプチドを投与するステップをさらに含む、項目 2、3、10、11、17、18、24、25、30、31、40、41、43、44、74、75、77 から 93、または 100 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 2 2)

前記抗原が、前立腺特異的膜抗原である、項目 1 2 1 に記載の方法。

(項目 1 2 3)

腫瘍のを増大させる方法であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD 40 細胞外ドメインを欠く CD 40 細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に腫瘍抗原が負荷されている、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体における該腫瘍の化学療法感受性を増大させるのに有効な量で投与される、方法。

(項目 1 2 4)

腫瘍の化学療法感受性を増大させる方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD 40 細胞外ドメインを欠く CD 40 細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該組成物およびリガンドが、該被験体における該腫瘍の化学療法感受性を増大させるのに有効な量で投与される、方法。

(項目 1 2 5)

腫瘍の化学療法感受性を増大させる方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および腫瘍抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、および CD 40 細胞外ドメインを欠く CD 40 細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および該腫瘍抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置するのに有効な量で投与され、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における該腫瘍のそれを増大させるのに有効な量で投与される、方法。

(項目 1 2 6)

腫瘍の化学療法感受性を増大させる方法であって、

(a) 形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、

該抗原提示細胞が、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を含有する

10

20

30

40

50

核酸で形質導入またはトランスフェクトされており、

該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、

該形質導入またはトランスフェクトされた抗原提示細胞に前立腺特異的膜抗原が負荷されている、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該抗原提示細胞およびリガンドが、該被験体における該腫瘍の化学療法感受性を増大させるのに有効な量で投与される、方法。

(項目127)

腫瘍の化学療法感受性を増大させる方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を含む組成物を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含む、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該組成物およびリガンドが、該被験体における該腫瘍の化学療法感受性を増大させるのに有効な量で投与される、方法。

(項目128)

腫瘍のを増大させる方法であって、

(a) キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列、および前立腺特異的膜抗原をコードするヌクレオチド配列を、それを必要とする被験体に投与するステップであって、該キメラタンパク質が、膜ターゲティング領域、多量体リガンド結合領域、およびCD40細胞外ドメインを欠くCD40細胞質ポリペプチド領域を含み、該キメラタンパク質をコードする該ヌクレオチド配列、および該前立腺特異的膜抗原をコードする該ヌクレオチド配列が、アデノウイルスベクターを用いて送達される、ステップと、

(b) 該多量体リガンド結合領域に結合する多量体リガンドを投与するステップとを含み、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における該前立腺癌を処置するのに有効な量で投与され、

これにより、該ヌクレオチド配列およびリガンドが、該被験体における該腫瘍の化学療法感受性を増大させるのに有効な量で投与される、方法。

【0077】

以下の説明、例、特許請求の範囲、および図面では、特定の実施形態がさらに説明される。

【0078】

図は、当該技術の実施形態を例示し、限定するものではない。例示を明白かつ容易にするために、図は一定の縮尺で作成されておらず、ある場合には、種々の態様は、特定の実施形態の理解を容易にするために誇張または拡大して示されていることがある。

【図面の簡単な説明】

【0079】

【図1】図1は、iCD40の概略図およびヒトDCの発現を示す図である。A. ヒトCD40細胞質ドメインは、ミリスチル化ターゲティングドメイン(M)および2つのタンデムなドメイン(Fv)の下流にサブクロニングすることができる(Clackson T, Yang W, Rozamus LW, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95: 10437-10442)。本明細書では誘導性CD40(iCD40)と称されるM-Fv-Fv-CD40キメラタンパク質の発現は、サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターの制御下に置くこと

10

20

30

40

50

ができる。B. ウェスタンブロットによって評価された、CD40の内在性の形態（eCD40）および組換えの誘導性の形態（iCD40）の発現である。レーン1、野生型DC（内在性のCD40対照）；レーン2、1マイクログラム/mlのLPSで刺激したDC；レーン3および4、それぞれ、AP20187二量体化薬（dimerizer drug）を用いて、または用いずに、10,000VP/細胞（MOI約160）のAd5/f35-iCD40（iCD40-DC）で形質導入したDC；レーン5、LPSおよびAP20187で刺激したiCD40-DC；レーン6、CD40L（CD40リガンド、TNFファミリーのメンバーのタンパク質）およびLPSで刺激したDC；レーン7、Ad5/f35-GFP（GFP-DC）をMOI160で用いて形質導入し、AP20187およびLPSで刺激したDC；レーン8、AP20187で刺激したGFP-DC；レーン9、Ad5/f35-iCD40で形質導入した293T細胞（CD40の誘導性の形態についての陽性対照）。アルファチューブリンの発現レベルが内部標準としての機能を果たした。

10

【図2】図2は、RAW264.7細胞におけるiRIG-1およびiMyD88を示すグラフである。RAW264.7細胞を、iRIG-1についての発現プラスミド3マイクログラムおよびIFNガンマ依存性SEAPレポータープラスミド1マイクログラムで；およびNF-κB依存性SEAPレポータープラスミド1マイクログラムと一緒にiMyD88 3マイクログラムで一過性に同時トランスフェクトした。

【図3】図3は、誘導性のCD40受容体およびMyD88受容体ならびにNF-κB活性の誘導の概略図である。

20

【図4】図4は、誘導性キメラCD40/MyD88受容体およびNF-κB活性の誘導の概略図である。

【図5】図5は、293細胞における、誘導性MyD88受容体およびキメラMyD88-CD40受容体によるNF-κB活性化に関するグラフである。CD40Tは、「turbid」CD40を示し、受容体は、3コピーのFKBP12v36ドメイン（Fv'）を含む。

【図6】図6は、基質と一緒に3時間インキュベートした後の、誘導性切断型MyD88（MyD88L）およびキメラ誘導性切断型MyD88/CD40によるNF-κB活性に関するグラフである。

【図7】図7は、基質と一緒に22時間インキュベートした後の、誘導性切断型MyD88（MyD88L）およびキメラ誘導性の切断型MyD88/CD40によるNF-κB活性に関するグラフである。このアッセイには一部のアッセイ飽和が存在する。

30

【図8】図8は、293T細胞をアデノウイルス-MyD88Lで形質導入した後のHAタンパク質のウェスタンブロットを示す図である。

【図9】図9は、293T細胞をアデノウイルス-MyD88L-CD40で形質導入した後のHAタンパク質のウェスタンブロットを示す図である。

【図10】図10は、示されている誘導性のCD40構築物およびMyD88構築物を用いて骨髓由来DCにアデノウイルスを感染させた後のELISAアッセイに関するグラフである。

【図11】図11は、図10と同様のELISAアッセイの結果のグラフである。

40

【図12】図12は、より高量のアデノウイルスを感染させた後の、図10および図11と同様のELISAアッセイの結果のグラフである。

【図13】図13は、pShuttleX-iMyD88の構築物マップである。

【図14】図14は、pShuttleX-CD4-TLR4L3-Eの構築物マップである。

【図15】図15は、pShuttleX-iMyD88E-CD40の構築物マップである。

【図16】図16は、誘導性のMyD88-CD40複合構築物を発現しているアデノウイルスを異なる感染多重度で用いて形質導入したヒト単球由来樹状細胞（moDC）におけるIL-12p70の発現の用量依存的な誘導の結果を示す棒グラフである。

50

【図17】図17は、異なる誘導性構築物を発現しているアデノウイルスで形質導入したヒト単球由来樹状細胞（m o D C）における I L - 1 2 p 7 0 の発現の薬物依存性の誘導の結果を示す棒グラフである。

【図18】図18は、形質導入された樹状細胞における、ワクチンを接種する前の I L - 1 2 p 7 0 のレベルを示す棒グラフである。

【図19A】図19（a）は、形質導入された樹状細胞を用いてワクチン接種したマウスにおける E G . 7 - O V A 腫瘍の成長阻害に関するグラフである；図19（b）は、代表的なワクチン接種したマウスの写真を示す；図19（c）は、エラーバーを含めた19（a）に関するグラフである。

【図19B】図19（a）は、形質導入された樹状細胞を用いてワクチン接種したマウスにおける E G . 7 - O V A 腫瘍の成長阻害に関するグラフである；図19（b）は、代表的なワクチン接種したマウスの写真を示す；図19（c）は、エラーバーを含めた19（a）に関するグラフである。

【図19C】図19（a）は、形質導入された樹状細胞を用いてワクチン接種したマウスにおける E G . 7 - O V A 腫瘍の成長阻害に関するグラフである；図19（b）は、代表的なワクチン接種したマウスの写真を示す；図19（c）は、エラーバーを含めた19（a）に関するグラフである。

【図20】図20（a）は形質導入された樹状細胞によって誘導される A g 特異的な C D 8 + T 細胞の頻度の増大を示す散布図であり、20（b）は形質導入された樹状細胞によって誘導される A g 特異的な C D 8 + T 細胞の頻度の増大を示す棒グラフである。

【図21】図21は、形質導入された樹状細胞によって誘導される A g 特異的な I F N ガンマ + C D 8 + T 細胞および C D 4 + T H 1 細胞の頻度の増大を示す棒グラフである。

【図22】図22は、i n v i v o 細胞傷害性リンパ球アッセイの概略図および結果を示す図である。

【図23】図23は、樹状細胞によって誘導される i n v i v o C T L 活性の増強からのデータを要約している棒グラフである。

【図24-1】図24は、マウスにおける、形質導入された樹状細胞によって誘導される C T L アッセイの代表的な結果を示すグラフである。

【図24-2】図24は、マウスにおける、形質導入された樹状細胞によって誘導される C T L アッセイの代表的な結果を示すグラフである。

【図24-3】図24は、マウスにおける、形質導入された樹状細胞によって誘導される C T L アッセイの代表的な結果を示すグラフである。

【図25-1】図25は、形質導入された樹状細胞を接種したマウスにおける I L - 4 産生 T H 2 細胞についての細胞内染色の結果を示すグラフである。

【図25-2】図25は、形質導入された樹状細胞を接種したマウスにおける I L - 4 産生 T H 2 細胞についての細胞内染色の結果を示すグラフである。

【図26A】図26は、A d 5 - i C D 4 0 . M y D 8 8 で形質導入された細胞で処置したマウスにおける腫瘍の成長阻害アッセイの結果を示すグラフである。

【図26B】図26は、A d 5 - i C D 4 0 . M y D 8 8 で形質導入された細胞で処置したマウスにおける腫瘍の成長阻害アッセイの結果を示すグラフである。

【図26C】図26は、A d 5 - i C D 4 0 . M y D 8 8 で形質導入された細胞で処置したマウスにおける腫瘍の成長阻害アッセイの結果を示すグラフである。

【図27A】図27は、A d 5 - i C D 4 0 . M y D 8 8 で形質導入された細胞で処置したマウスにおける腫瘍特異的 T 細胞アッセイを示すグラフである。

【図27B】図27は、A d 5 - i C D 4 0 . M y D 8 8 で形質導入された細胞で処置したマウスにおける腫瘍特異的 T 細胞アッセイを示すグラフである。

【図27C】図27は、A d 5 - i C D 4 0 . M y D 8 8 で形質導入された細胞で処置したマウスにおける腫瘍特異的 T 細胞アッセイを示すグラフである。

【図27D】図27は、A d 5 - i C D 4 0 . M y D 8 8 で形質導入された細胞で処置し

10

20

30

40

50

たマウスにおける腫瘍特異的T細胞アッセイを示すグラフである。

【図28】図28は、処置したマウス由来の脾細胞をエフェクターとして使用した天然キラー細胞アッセイの結果を示すグラフである。

【図29】図29は、処置したマウス由来の脾細胞をエフェクターとして使用した細胞傷害性リンパ球アッセイの結果を示すグラフである。

【図30】図30は、示されているベクターで形質導入した樹状細胞と共培養したT細胞を使用したIFN-γ ELISAアッセイの結果を示すグラフである。

【図31-1】図31は、示されているベクターで形質転換した樹状細胞を使用した、アジュバントとしてLPSを伴う、または伴わないCCR7上方制御アッセイの結果を示すグラフである。

10

【図31-2】図31は、示されているベクターで形質転換した樹状細胞を使用した、アジュバントとしてLPSを伴う、または伴わないCCR7上方制御アッセイの結果を示すグラフである。

【図32】図32は、多数の動物からのデータを用いたCCR7上方制御アッセイの結果を1つのグラフに含めて示すグラフである。

【図33】図33は、Ad5f35ihCD40のプラスミドマップである。

【図34】図34は、探索的効力評価を示すチャートである。

【図35】図35は、被験体1001～1006についての第12週の免疫学的反応および臨床反応の概要のチャートである。

【図36】図36は、測定可能な転移性疾患、血管分布、およびPSAレベルについての、ベースラインから12週間の変化の分析を示すウォーターフォールプロットを示す。

20

【図37】図37は、処置後の被験体1008におけるサイトカインレベルに関するグラフである。

【図38】図38は、VCAM-1血清分析の結果のグラフである。

【図39】図39は、12週の時点のPSAレベルのウォーターフォールプロットである。

【図40】図40は、7週、12週、および52週の時点の患者1003のCTスキャンの結果を示す図である。

【図41】図41は、被験体1003の軟組織の部分奏効に関するグラフである。

【図42】図42は、潜在的な抗血管系効果を示す種々の血清マーカーに関するグラフを示す。

30

【図43】図43は、被験体1003において測定されたPSAレベルを示すグラフである。

【図44】図44は、誘導性CD40導入遺伝子のマップを示す。

【図45】図45は、患者1001の血清マーカー分析に関するグラフである。

【図46】図46は、患者1002の血清マーカー分析に関するグラフである。

【図47】図47は、患者1003の血清マーカー分析に関するグラフである。

【図48】図48は、患者1004の血清マーカー分析に関するグラフである。

【図49】図49は、患者1005の血清マーカー分析に関するグラフである。

【図50】図50は、患者1006の血清マーカー分析に関するグラフである。

40

【図51】図51は、患者1006におけるPSMA特異的注射部位免疫応答に関する棒グラフである。

【図52】図52は、KPSおよびCTCの評価に関するグラフを示す。

【図53】図53は、被験体1006における、処置期間にわたるPSAレベル血清濃度に関するグラフを示す。

【図54】図54は、被験体1003についての、処置期間にわたるuPAR濃度、HGF濃度、EGF濃度、およびVEGF濃度に関するグラフを示す。

【図55】図55は、被験体1001～1006についての安全性および反応の要約表である。

【図56】図56は、被験体1007～1012についての安全性および反応の要約表で

50

ある。

【図57】図57は、被験体1001～1012についての患者の人口統計表である。

【図58】図58は、被験体1001～1012についての臨床試験の状況を示す時系列である。

【図59】図59は、被験体1008の処置後の肺腫瘍の縮小を示す写真を示す。

【図60】図60は、被験体1011についてのPSAレベルに関するグラフである。

【図61】図61は、被験体1010についてのPSAレベルに関するグラフである。

【図62】図62は、被験体1010の骨スキンの写真を示す。

【図63】図63は、タキサンベースの化学療法とワクチン療法を用いた併用治療に対する被験体の反応のチャートである。

【図64】図64は、被験体1006における腫瘍の縮小を示す写真を示す。

【発明を実施するための形態】

【0080】

本明細書で、特許請求の範囲および／または明細書における「～を含む」という用語と共に用いられる「a（ある）」または「an（ある）」という語の使用は、「1つの」を意味しうるが、また、「1以上の」、「少なくとも1つの」、および「1または1を超える」の意味とも符合する。さらにまた、「～を有する」、「～を包含する」、「～を含有する」、および「～を含む」という用語は、互換的であり、当業者は、これらの用語がオープンエンドの用語であることを認識している。

【0081】

本明細書で用いられる「同種異系」という用語は、抗原的に異なるHLAまたはMHCの遺伝子座を指す。

【0082】

したがって、同じ種から導入された細胞または組織も、抗原的には異なりうる。同系のマウスも、1以上の遺伝子座においては異なる（類遺伝子性である）可能性があり、同種異系マウスも、バックグラウンドは同じでありうる。

【0083】

本明細書で用いられる「抗原」という用語は、免疫応答を引き起こす分子として定義される。この免疫応答は、抗体の生成を伴う場合もあり、特定の免疫コンピテント細胞の活性化を伴う場合もあり、これらの両方の場合もある。抗原は、生物、タンパク質／抗原のサブユニット、死滅させるかまたは不活化した全細胞または溶解産物に由来しうる。例示的な生物には、*Helicobacter*属種、*Campylobacter*属種、*Clostridia*属種、*Corynebacterium diphtheriae*、*Bordetella pertussis*、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、RS（respiratory syncytial）ウイルス、*Borrelia burgdorferi*、*Plasmodium*属種、単純ヘルペスウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、パピローマウイルス、*Vibrio cholera*、*E. coli*、麻疹ウイルス、ロタウイルス、赤痢菌、*Salmonella typhi*、*Neisseria gonorrhoea*が含まれるがこれらに限定されない。したがって、実質的にすべてのタンパク質またはペプチドを含めた任意の高分子を、抗原として用いることができる。さらに、抗原は、組換えDNAまたはゲノムDNAから誘導することもできる。病原性のゲノムもしくは遺伝子、または免疫応答を誘発するタンパク質の遺伝子断片のヌクレオチド配列または部分的なヌクレオチド配列を含有する任意のDNAは、抗原の合成を結果としてもたらす。さらに、本方法は、遺伝子またはゲノムの全核酸配列の使用に限定されない。本発明には、複数の遺伝子またはゲノムの部分的な核酸配列の使用が含まれるがこれに限定されず、これらの核酸配列が、所望の免疫応答を誘発するように多様な組合せで配列されることは、容易に明らかである。

【0084】

「抗原提示細胞」という用語は、その細胞表面上において（またはその細胞表面において）、少なくとも1つの抗原または抗原断片を、表示、獲得、または提示することが可能

10

20

30

40

50

な多様な細胞のうちのいずれかである。一般に、「抗原提示細胞」という用語は、抗原または抗原性組成物に対する免疫応答（すなわち、免疫系のT細胞アームまたはB細胞アームに由来する免疫応答）の増強を補助する目標を達成する任意の細胞でありうる。例えば、Kuby, 2000, Immunology, 4. sup. th edition, W. H. Freeman and company（参照により本明細書に組み込まれる）において論じられ、本明細書の特定の実施形態で用いられる通り、抗原を、通常は、クラスII主要組織適合性分子もしくはクラスII主要組織適合性複合体と共に、免疫細胞に表示または提示する細胞を、「抗原提示細胞」とする。特定の態様では、細胞（例えば、APC細胞）を、所望の抗原を発現する組換え細胞または腫瘍細胞など、別の細胞と融合させることができる。2つ以上の細胞の融合体を調製する方法は、例えば、それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる、Goding, J. W., Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 65-66, 71-74 (Academic Press, 1986); Campbell, in: Monoclonal Antibody Technology, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 13, Burden & Von Knippenberg, Amsterdam, Elsevier, pp. 75-83, 1984; Kohler & Milstein, Nature, 256:495-497, 1975; Kohler & Milstein, Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976, Gefter et al., Somatic Cell Genet., 3:231-236, 1977において論じられている。場合によっては、抗原提示細胞が、抗原を表示または提示する免疫細胞が、CD4+TH細胞である。APCまたは他の免疫細胞上で発現するさらなる分子も、免疫応答の増強を補助または改善しうる。例えば、サイトカインおよびアジュバントなど、分泌分子または可溶性分子もまた、抗原に対する免疫応答を補助または増強しうる。本明細書では、多様な例について論じる。

【0085】

本明細書で用いられる「癌」という用語は、それらの固有の形質（正常な制御の喪失）の結果として、増殖の非制御、分化の欠如、局所的な組織浸潤、および転移をもたらす細胞の過剰増殖性として定義される。例には、黒色腫、非小細胞肺癌、小細胞肺癌、肺癌、肝臓癌腫（hepatocarcinoma）、白血病、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、神経膠芽腫、歯肉癌、舌癌、神経芽細胞腫、頭部癌、頸部癌、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、腎癌、骨癌、精巣癌、卵巣癌、中皮腫、子宮頸癌、胃腸癌、リンパ腫、脳腫瘍、結腸癌、肉腫、または膀胱癌が含まれるがこれらに限定されない。

【0086】

本明細書で用いられる「細胞」、「細胞系」、および「細胞培養物」という用語は、互換的に用いることができる。これらの用語のすべてはまた、任意およびすべての後代細胞である、それらの子孫細胞も包含する。意図的な突然変異または偶発的な突然変異のために、すべての子孫細胞が同一であるわけではないことが理解される。

【0087】

本明細書で用いられる「iCD40分子」という用語は、誘導性CD40として定義される。このiCD40は、内因性のCD40によるシグナル伝達を消失させる機構をバイパスしうる。「iCD40」という用語は、「iCD40核酸」、「iCD40ポリペプチド」、および／またはiCD40発現ベクターを包含する。

【0088】

本明細書で用いられる「cDNA」という用語は、メッセンジャーRNA（mRNA）を鋳型として用いて調製されるDNAを指すことを意図する。ゲノムDNA、またはプロセシングされていないかもしくはプロセシングが部分的なゲノムRNA鋳型から重合化されたDNAに対して、cDNAを用いることの利点は、cDNAが、主に、対応するタン

パク質のコード配列を含有するということである。最適な発現に非コード領域が必要とされる場合、またはアンチセンス戦略において、イントロンなどの非コード領域が標的とされる場合など、全ゲノム配列または部分的なゲノム配列を用いる場合もある。

【0089】

「樹状細胞」(DC)という用語は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*、または宿主もしくは被験体において存在する抗原提示細胞、あるいは造血幹細胞または単球から誘導する抗原提示細胞である。樹状細胞およびそれらの前駆細胞は、多様なリンパ器官、例えば、脾臓、リンパ節、ならびに骨髓および末梢血から単離することができる。DCは、樹状細胞体から複数の方向へと延びる薄いシート(葉状仮足)を伴う、特徴的な形態を有する。樹状細胞は、高レベルのMHC分子および共刺激分子(例えば、B7-1分子およびB7-2分子)を発現することが典型的である。樹状細胞は、*in vitro*において、T細胞の抗原特異的分化を誘導することが可能であり、*in vitro*および*in vivo*において、T細胞の一次反応を誘発することが可能である。

10

【0090】

本明細書で用いられる「発現構築物」または「導入遺伝子」という用語は、核酸コード配列のうちの一部または全部を転写することが可能であり、これをベクター内に挿入することが可能な、遺伝子産物をコードする核酸を含有する任意の種類の遺伝子構築物として定義される。転写物は、タンパク質へと翻訳されるが、タンパク質へと翻訳されなくともよい。特定の実施形態では、発現が、遺伝子の転写、およびmRNAの遺伝子産物への翻訳の両方を包含する。他の実施形態では、発現が、被験体の遺伝子をコードする核酸の転写だけを包含する。「治療用構築物」という用語はまた、発現構築物または導入遺伝子を指すのにも用いることができる。発現構築物または導入遺伝子は、例えば、癌などの過剰増殖性疾患または過剰増殖性障害を処置するための療法として用いることができ、したがって、発現構築物または導入遺伝子は、治療用構築物または予防用構築物である。

20

【0091】

本明細書で用いられる「発現ベクター」という用語は、転写が可能な遺伝子産物の少なくとも一部をコードする核酸配列を含有するベクターを指す。ある場合には、次いで、RNA分子が、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドへと翻訳される。他の場合、例えば、アンチセンス分子またはリボザイムが生成される場合には、これらの配列が翻訳されない。発現ベクターは、各種の制御配列を含有することが可能であり、これらの制御配列とは、特定の宿主生物において、作動的に連結されたコード配列の転写およびおそらくは翻訳に必要な核酸配列を指す。転写および翻訳を統御する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能を果たす核酸配列も含有する場合があります、これらについては以下で論じる。

30

【0092】

本明細書で用いられる「*ex vivo*」という用語は、体「外」を指す。本明細書では、「*ex vivo*」という用語と、「*in vitro*」という用語とを互換的に用いる場合がある。

【0093】

CD40に関して本明細書で用いられる「機能的に同等な」という用語は、例えば、CD40核酸断片、CD40変異体、またはCD40類似体を指し、腫瘍または過剰増殖性疾患を破壊する免疫応答を刺激する、CD40ポリペプチドをコードする核酸、またはCD40ポリペプチドを指す。「機能的に同等な」とは、例えば、細胞外ドメインを欠いているが、T細胞を介する腫瘍殺滅反応を増幅することが、樹状細胞による抗原提示分子の発現を上方制御することを介して可能なCD40ポリペプチドを指す。「機能的に同等な」という用語を、例えば、PSAペプチド、PSMAペプチド、MyD88、または切断型MyD88など、他の核酸またはポリペプチドに適用する場合、この用語は、本明細書における方法による基準のポリペプチドと同じであるかまたは同等の活性を示す断片、変異体などを指す。

40

【0094】

50

「過剰増殖性疾患」という用語は、細胞の過剰増殖性から結果として生じる疾患として定義される。例示的な過剰増殖性疾患には、癌または自己免疫疾患が含まれるがこれらに限定されない。他の過剰増殖性疾患には、血管閉塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化、または炎症性腸疾患が含まれる。

【0095】

本明細書で用いられる「遺伝子」という用語は、機能的なタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドコード単位として定義される。理解される通り、この機能的な用語には、タンパク質、ポリペプチド、ドメイン、ペプチド、融合タンパク質、および突然変異体を発現するか、またはこれらを発現するように適合させたゲノム配列、cDNA配列、および操作された低分子遺伝子セグメントが含まれる。

10

【0096】

「免疫原性組成物」または「免疫原」という用語は、免疫応答を引き起こすことが可能な物質を指す。免疫原の例には、例えば、抗原、自己免疫疾患の誘導において役割を果たす自己抗原、および癌細胞上で発現する腫瘍関連抗原が含まれる。

【0097】

本明細書で用いられる「免疫障害性の」という用語は、免疫系が低下または脆弱化している被験体として定義される。免疫障害性状態は、免疫系の欠損または機能不全に起因する場合もあり、感染および／または疾患に対する感受性を高める他の因子に起因する場合もある。このような類型化は、評価の概念的基盤を与えるが、免疫障害性の個体は、1つの群または他の群に完全に適合するわけではないことが多い。損なわれる可能性がある体内の防御機構の欠損は、複数でありうる。例えば、HIVにより特異的なTリンパ球の欠損が引き起こされる個体はまた、抗ウイルス療法に用いられる薬物により引き起こされる好中球減少症を有する場合もあり、皮膚および粘膜の完全性が損なわれるために免疫障害性となる場合もある。免疫障害性状態は、静脈内における薬物乱用に起因する中心留置ラインまたは他の種類の損傷から結果として生じる場合もあり、続発性の悪性腫瘍、栄養不良、または結核、もしくは性感染症、例えば、梅毒、もしくは肝炎など、他の感染性物質に感染していることにより引き起こされる場合もある。

20

【0098】

本明細書で用いられる「薬学的または薬理学的に許容される」という用語は、動物またはヒトに投与されるとき、有害反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応をもたらさない分子実体および組成物を指す。

30

【0099】

本明細書で用いられる「薬学的に許容される担体」には、任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。当技術分野では、薬学的有効成分のためのこのような媒体および薬剤の使用が周知である。任意の従来の媒体または薬剤が、本明細書で提示されるベクターまたは細胞に適合しない場合を除き、治療用組成物におけるその使用が意図される。組成物にはまた、補充の有効成分も組み込むことができる。

【0100】

本明細書で用いられる「ポリヌクレオチド」という用語は、ヌクレオチド鎖として定義される。さらに、核酸は、ヌクレオチドのポリマーである。したがって、本明細書で用いられる核酸とポリヌクレオチドとは、互換的である。核酸とは、単量体の「ヌクレオチド」へと加水分解されうるポリヌクレオチドである。単量体のヌクレオチドは、ヌクレオシドへと加水分解されうる。本明細書で用いられるポリヌクレオチドには、限定なしに述べると、組換え手段、すなわち、通常のクローニング法およびPCR（商標）などを用いる、組換えライブラリーまたは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニング、および合成手段を含めた、当技術分野で利用可能な任意の手段により得られるすべての核酸配列が含まれるがこれらに限定されない。さらに、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドの突然変異も包含し、これらには、当技術分野で周知の方法を介するヌクレオチドまたはヌクレオシドの突然変異が含まれるがこれらに限定されない。

40

50

【0101】

本明細書で用いられる「ポリペプチド」という用語は、通常は配列が規定されたアミノ酸残基鎖として定義される。本明細書で用いられるポリペプチドという用語は、「ペプチド」および「タンパク質」という用語と互換的である。

【0102】

本明細書で用いられる「プロモーター」という用語は、遺伝子の特異的な転写を開始するのに必要とされる、細胞の合成機構または導入された合成機構により認識されるDNA配列として定義される。

【0103】

本明細書で用いられる「免疫応答を制御する」または「免疫応答を調節する」という用語は、免疫応答を修飾する能力を指す。例えば、組成物は、免疫応答を増強および／または活性化することが可能である。さらになお、組成物はまた、免疫応答を抑制することも可能である。制御の形態は、組成物と共に用いられるリガンドにより決定される。例えば、化学物質の二量体類似体は、共刺激ポリペプチドの二量体化を結果としてもたらし、これにより、DCが活性化されるが、化学物質の単量体の類似体は、共刺激ポリペプチドの二量体化を結果としてもたらず、これによりDCが活性化されることはない。

10

【0104】

「トランスフェクション」および「形質導入」という用語は互換的であり、外因性のDNA配列を真核宿主細胞へと導入する過程を指す。トランスフェクション（または形質導入）は、電気穿孔、マイクロインジェクション、遺伝子銃による送達、レトロウイルス感染、リポフェクション、スーパーフェクションなどを含めた多くの手段のうちのいずれか1つにより達成することができる。

20

【0105】

本明細書で用いられる「同系の」という用語は、同一であるか、もしくは組織移植を可能とする程度に十分に近縁であるか、または免疫学的に適合性である遺伝子型を有する細胞、組織、または動物を指す。例えば、一卵性双生児または同じ近交系の動物を指す。同系と同種同系とは互換的に用いられる。

【0106】

本明細書で用いられる「被験体」という用語には、生物または動物、例えば、ヒト、非ヒト霊長動物（例えば、サル）、マウス、ブタ、ウシ、ヤギ、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター、ウマ、サル、ヒツジ、または他の非ヒト哺乳動物を含めた哺乳動物、例えば、鳥類（例えば、ニワトリまたはアヒル）または魚類などの哺乳動物以外の脊椎動物、および哺乳動物以外の非脊椎動物を含めた非哺乳動物が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0107】

本明細書で用いられる「転写制御下にある」または「作動的に連結された」という用語は、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる開始および遺伝子の発現を制御するのに、核酸との関係で適正な位置および方向にあることとして定義される。

【0108】

本明細書で用いられる「処置」、「処置する」、「処置された」、または「処置すること」という用語は、予防および／または治療を指す。例えば、癌性の固形腫瘍など、固形腫瘍に関して用いられる場合、この用語は、固形腫瘍または癌に対する被験体の抵抗性を増大させる予防的処置を介する予防を指す。一部の例では、癌が家族性であるか、または遺伝子的に関連している場合に、被験体を処置して、癌を予防することができる。例えば、感染性疾患に関して用いられる場合、この用語は、病原体による感染に対する被験体の抵抗性を増大させるか、または、言い換えれば、被験体が病原体に感染するか、もしくは感染に帰せられる疾病の徴候を示す可能性を減少させる予防的処置のほか、被験体が感染した後に、感染と戦う、例えば、感染を軽減もしくは除去するか、または感染が悪化することを防止するための処置も指す。

40

【0109】

50

本明細書で用いられる「ワクチン」という用語は、動物に投与することが可能な形態にある、本明細書で提示される組成物を含有する製剤を指す。ワクチンは、組成物を懸濁または溶解させる、従来の生理食塩液または緩衝水溶液媒体を含むことが典型的である。この形態にある組成物は、状態を防止、改善、または他の形で処置するのに用いることができ、簡便である。被験体に導入されると、ワクチンは、抗体、サイトカインの生成、および／または他の細胞反応が含まれるがこれらに限定されない免疫応答を引き起こすことが可能である。

【0110】

一部の実施形態では、核酸が、ウイルスベクター内に含有されている。特定の実施形態では、ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである。一部の実施形態では、*ex vivo*において抗原提示細胞にウイルスベクターを接触させ、一部の実施形態では、*in vivo*において抗原提示細胞にウイルスベクターを接触させることが理解される。

10

【0111】

一部の実施形態では、抗原提示細胞が、樹状細胞、例えば、哺乳動物の樹状細胞である。抗原提示細胞は、ヒト樹状細胞であることが多い。

【0112】

特定の実施形態ではまた、抗原提示細胞に抗原も接触させる。*ex vivo*において抗原提示細胞に抗原を接触させることが多い。*in vivo*において抗原提示細胞に抗原を接触させることもある。一部の実施形態では、抗原提示細胞が、被験体内にあり、抗原に対して免疫応答を発生させる。免疫応答は、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）による免疫応答であることもある。腫瘍抗原に対して免疫応答を発生させることもある。特定の実施形態では、抗原提示細胞を、アジュバントを添加せずに活性化させる。

20

【0113】

一部の実施形態では、*ex vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入し、皮内投与を介して被験体に投与する。一部の実施形態では、*ex vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入し、皮下投与を介して被験体に投与する。*ex vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入することもある。*in vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入することもある。

【0114】

MyD88とは、例えば、ncbi Gene ID 4615として言及されるそのヒト変化形であるがこれに限定されない、骨髄分化初期応答遺伝子88を意味する。「切断型」とは、タンパク質が全長ではなく、例えば、ドメインを欠いている可能性を意味する。例えば、切断型MyD88は、全長ではなく、例えば、TIRドメインを欠いている場合がある。本明細書では、切断型MyD88の一例を、MyD88Lと示し、また、配列番号5（核酸配列）および配列番号6（ペプチド配列）としても提示する。配列番号5は、サブクロニング時に付加されたリンカーを包含する。「切断型MyD88」をコードする核酸配列とは、切断型MyD88ペプチドをコードする核酸配列を意味し、この用語はまた、リンカーによってコードされる任意のアミノ酸を含め、クロニングのアーチファクトとして付加される任意のアミノ酸をコードする部分を含めた核酸配列も指す場合がある。

30

40

【0115】

本明細書の方法では、ペプチドの誘導性CD40部分を、誘導性MyD88部分または切断型MyD88ポリペプチド部分の上流に配置することもでき、下流に配置することもできる。また、誘導性CD40部分および誘導性MyD88部分または切断型MyD88アダプタータンパク質部分は、同じベクターにより、シスで細胞にトランスフェクトまたは形質導入することもでき、個別のベクターにより、トランスで細胞にトランスフェクトまたは形質導入することもできる。

【0116】

一部の実施形態では、*ex vivo*において抗原提示細胞に抗原を接触させることも

50

ある。特定の実施形態では、抗原提示細胞が、被験体内にあり、抗原に対して、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）による免疫応答などの免疫応答を発生させる。特定の実施形態では、腫瘍抗原（例えば、PSMA）に対して免疫応答を発生させる。一部の実施形態では、*ex vivo*において核酸を調製し、例えば、皮内投与または皮下投与を介して被験体に投与する。*ex vivo*または*in vivo*において、抗原提示細胞を核酸で形質導入またはトランスフェクトすることもある。一部の実施形態では、核酸が、ポリヌクレオチド配列に作動的に連結されたプロモーター配列を含む。代替的に、核酸は、キメラタンパク質のタンパク質コード領域を含有する、*ex vivo*において転写されたRNAも含む。

【0117】

固形腫瘍の「腫瘍サイズを縮小させること」または「腫瘍成長を阻害すること」とは、例えば、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) 基準などの標準的なガイドラインに従う、処置に対する反応（response to treatment）または疾患の安定化を意味する。例えば、これは、固形腫瘍の直径を、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%縮小させることを包含する場合もあり、腫瘍の数、循環腫瘍細胞、または腫瘍マーカーを、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%低減することを包含する場合もある。腫瘍サイズは、例えば、CTスキャン、MRI、例えば、CT-MRI、胸部X線撮影（肺の腫瘍について）、または分子イメージング、例えば、阻害剤をTROFEX（商標）/MIP-1072/1095とする場合などの、ヨウ素123で標識したPSAリガンド、例えば、PSMAリガンドを投与した後における、例えば、PET走査などの、例えば、PET走査、または分子イメージング、例えば、SPECT、またはPSA抗体、例えば、イリジウム111で標識したPSMA抗体である、カプロマブペンデチド（capromab pendetide）（Prostascint）などのPSMA抗体を用いるPET走査を含めた任意の方法により解析することができる。

【0118】

「腫瘍血管新生を軽減、緩徐化、または阻害すること」とは、処置前における腫瘍血管新生の量と比較した場合に、腫瘍血管新生を、約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%軽減すること、または新たな血管系の出現を約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または100%軽減することを意味する。軽減は、1つの腫瘍を指す場合もあり、複数の腫瘍における血管新生の合計または平均の場合もある。腫瘍血管新生を測定する方法には、例えば、CATスキャン、MRI、例えば、CT-MRI、または分子イメージング、例えば、阻害剤をTROFEX（商標）/MIP-1072/1095とする場合などの、ヨウ素123で標識したPSAリガンド、例えば、PSMAリガンドを投与した後における、例えば、PET走査などの、例えば、PET走査、または分子イメージング、例えば、SPECT、またはPSA抗体、例えば、111-イリジウムで標識したPSMA抗体である、カプロマブペンデチド（capromab pendetide）（Prostascint）などのPSMA抗体を用いるPET走査が含まれる。

【0119】

例えば、腫瘍が、前立腺内に存在するか、または前立腺内の腫瘍に由来したかもしくは前立腺内の腫瘍から転移したか、またはPSAをもたらず場合は、腫瘍を前立腺癌腫瘍と分類する。腫瘍が、例えば、前立腺内の腫瘍から転移した場合、その腫瘍は、被験体の前立腺内の腫瘍と同じであるかまたは類似する、染色体上の切断点を有すると決定される。前立腺癌

米国では、前立腺癌が、男性において最も一般的な固形悪性腫瘍である。2008年には、前立腺癌の推定新規症例186,320例、および28,660例の死亡例を、男性症例が占めると見込まれた（Jemal A, et al., Cancer statistics, 2008. CA Cancer J Clin. 58: 71-

10

20

30

40

50

96, 2008)。一次療法の後でPSAの進行を経過した患者のうちの約70%は、その前立腺癌経過中のある時点で転移を示す(Gittes RF, N Engl J Med. 324: 236-45, 1991)。アンドロゲン枯渇療法(ADT)が、転移性前立腺癌の標準的療法であり、患者のうちの80~85%において、一時的な腫瘍のコントロールまたは退縮を達成している(Crawford ED, et al., N Engl J Med. 321: 419-24, 1989; Schellhammer PF, et al., J Urol. 157: 1731-5, 1997; Scher HI and Kelly WK, J Clin Oncol. 11: 1566-72, 1993; Small EJ and Srinivas S, Cancer. 76: 1428-34, 1995)。ホルモン療法の奏効の持続、ならびにホルモン療法開始後における生存の持続は、元の腫瘍についてのグリーソンスコアの合計、ADT開始後において検出不能な最悪のPSAを達成する可能性、およびADT開始前においてPSAが倍増するのに要する期間を含め、多くの因子に依存することが示されている。ホルモン療法にもかかわらず、転移性前立腺癌を伴う患者の実質的にすべてが、最終的には進行性前立腺癌を発症する(Kelly WK and Slovin SF, Curr Oncol Rep. 2: 394-401, 2000; Scher HI, et al., J Natl Cancer Inst. 88: 1623-34, 1996; Small EJ and Vogelzang NJ, J Clin Oncol. 15: 382-8, 1997)。元の腫瘍についてのグリーソンスコアの合計、またはグリーソンスコアは、腫瘍の顕微鏡法による評価に基づき、男性における前立腺癌レベルを評価する。グリーソンスコアが高いと、癌はより侵襲性となり、拡大する可能性が高くなるので、その癌の予後は悪くなる。評価システムの例は、Gleason DF., The Veteran's Administration Cooperative Urologic Research Group: histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In Tannenbaum M (ed.) Urologic Pathology: The Prostate. Lea and Febiger, Philadelphia, 1977; 171-198において論じられている。

【0120】

ADTを開始した、前立腺癌を伴う大半の患者は、一次療法(例えば、根治的前立腺切除術、小線源療法、対外放射線照射療法、低温焼灼など)が失敗した後でPSAが上昇するために処置を受ける。臨床的転移が見られないこれらの患者は、7~11年間の範囲にある、比較的に長期にわたる無病期間を経過するが、これらの患者の大部分は、血清テストステロンは去勢レベルにありながら、上昇するPSAレベルの再帰により証拠立てられる通り、最終的には、ホルモン抵抗性前立腺癌を発症する。これらの患者もまた、予後が悪く、大部分は、9カ月間以内に臨床的転移を発症し、生存中央値は24カ月間である(Bianco FJ, et al., Cancer Symposium: Abstract 278, 2005)。「前立腺癌」という用語は、例えば、転移性前立腺癌、転移性去勢抵抗性前立腺癌、転移性去勢感受性前立腺癌、局所進行前立腺癌、および限局性前立腺癌を含め、異なる形態または病期を包含する。

【0121】

抗原提示細胞

抗原提示細胞(APC)とは、T細胞を外来抗原に対して、この外来抗原を主要組織適合性複合体(MHC)分子と共にそれらの表面上に提示することによりプライミングすることが可能な細胞である。APCには、プロフェッショナルAPCおよびノンプロフェッショナルAPCの2種類のAPCが存在する。プロフェッショナルAPCは、MHCクラスII分子およびMHCクラスII分子の両方を発現し、ノンプロフェッショナルAPCは、MHCクラスII分子を、構成的に発現するわけではない。特定の実施形態では、本明細書の方法において、プロフェッショナルAPCを用いる。プロフェッショナルAPCに

は、例えば、B細胞、マクロファージ、および樹状細胞が含まれる。

【0122】

活性化した抗原提示細胞と関連する1以上の活性を観察および／または測定しうる場合は、抗原提示細胞が「活性化」している。例えば、本明細書で提示される発現ベクターを接触させた後では、抗原提示細胞が活性化し、この発現ベクターを接触させていないか、または陰性対照ベクターを接触させた抗原提示細胞と比較して、発現ベクターを接触させた細胞における活性化と関連する活性を測定することができる。一例では、活性の増大が、接触させていない細胞の活性、または陰性対照を接触させた細胞の活性の2、3、4、5、6、7、8、9、または10倍以上のレベルでありうる。例えば、発現ベクターを接触させた抗原提示細胞では、以下の活性：抗原提示細胞における共刺激分子の発現、抗原提示細胞におけるNF- κ Bの核転座、例えば、toll様受容体の発現またはCCR7の発現など、DC成熟マーカーの発現、例えば、腫瘍細胞を指向する比溶解活性など、特異的な細胞傷害性Tリンパ球反応、またはサイトカイン（例えば、IL-2）の発現もしくはケモカインの発現のうちの1つが増強されうる。

10

【0123】

抗原提示細胞を活性化するか、または免疫応答を「増強する」組成物の量は、この組成物を添加したときに観察される免疫応答が、この組成物を添加せずに測定した同じ免疫応答と比較した場合に、増大するか、もしくは強化されるか、または何らかの形で偏差する量を指す。例えば、細胞傷害性T細胞の溶解活性は、例えば、組成物を伴う場合、および組成物を伴わない場合の51Cr放出アッセイを用いて測定することができる。CTL溶解活性が、組成物を伴わない場合のCTL溶解活性と比較して増強される場合の物質量を、この抗原に対する動物の免疫応答を増強するのに十分な量という。例えば、免疫応答を、少なくとも約2倍、または、例えば、約3倍以上増強することができる。分泌されるサイトカインの量もまた、変化させることができる。

20

【0124】

増強される免疫応答は、能動的免疫応答の場合もあり、受動的免疫応答の場合もある。代替的に、免疫応答は、抗原提示細胞を被験体（例えば、患者）から得、次いで、これらを、本明細書で提示される発現ベクターまたは構築物を含む組成物で形質導入またはトランスフェクトする、獲得免疫療法の一部でありうる。抗原提示細胞は、例えば、被験体の血液から得ることもでき、被験体の骨髄から得ることもできる。次いで、抗原提示細胞を、同じ動物に投与することもでき、異なる動物に投与することもでき、同じ被験体に投与することもでき、異なる被験体に投与することもできる（例えば、同じドナーに投与することもでき、異なるドナーに投与することもできる）。特定の実施形態では、被験体（例えば、患者）が、例えば、前立腺癌などの癌を有するか、もしくはこれを有することが疑われるか、または感染性疾患を有するか、もしくはこれを有することが疑われる。他の実施形態では、免疫応答を増強する方法を、公知の癌療法、または感染性疾患を処置するための任意の公知の療法と共に実施する。

30

【0125】

樹状細胞

自然免疫系は、微生物中に存在する保存的分子パターンを認識するのに、生殖細胞系列によりコードされる受容体のセットを用いる。これらの分子パターンは、リポ多糖、ペプチドグリカン、リポテイコ酸、ホスファチジルコリン、リポタンパク質を含めた細菌特異的タンパク質、細菌DNA、ウイルス一本鎖RNAおよびウイルス二本鎖RNA、非メチル化CpG-DNA、マンナン、ならびに他の細菌および真菌の多様な細胞壁構成要素を含めた、微生物の特定の構成要素において生じる。このような分子パターンはまた、植物アルカロイドなど、他の分子においても生じうる。これらの自然免疫認識の標的は、微生物によりもたらされ、感染宿主生物によってはもたらされないため、病原体関連分子パターン（PAMP）と呼ばれる（Janeway et al., (1989) Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 54: 1-13; Medzhitov et al., Nature, 388: 394-39

40

50

7, 1997)。

【0126】

PAMPを認識する自然免疫系の受容体は、パターン認識受容体 (PRR) と呼ばれる (Janeway et al., 1989; Medzhitov et al., 1997)。これらの受容体は、構造が異なり、複数の異なるタンパク質ファミリーに属する。これらの受容体のうちの一部 (例えば、CD14、DEC205、コレクチン) が、PAMPを直接的に認識するのに対し、他の受容体 (例えば、補体受容体) は、PAMP認識により発生する生成物を認識する。これらの受容体ファミリーのメンバーは一般に、3つの種類: 1) 血漿中を循環する体液性受容体、2) 免疫細胞の表面上で発現するエンドサイトーシス性受容体、および3) 細胞表面上または細胞内で発現するシグナル伝達受容体に分けることができる (Medzhitov et al., 1997; Fearon et al. (1996) Science 272: 50-3)。

【0127】

細胞性PRRは、獲得免疫においてプロフェッショナル抗原提示細胞 (APC) として機能する細胞を含めた、自然免疫系のエフェクター細胞上で発現する。このようなエフェクター細胞には、マクロファージ、樹状細胞、Bリンパ球、および表面上皮細胞が含まれるがこれらに限定されない。この発現プロファイルにより、PRRが、自然免疫のエフェクター機構を直接的に誘導することが可能となり、また、以下で論じられる炎症性サイトカインおよびケモカインなど、一連の内因性シグナルの発現を誘導することにより、感染性作用物質の存在に対して、宿主生物を警戒させることも可能となる。この後者の機能は、侵入者と戦うためのエフェクター戦力の効果的な移動を可能とする。

【0128】

樹状細胞 (DC) の主要な機能は、末梢組織において抗原を取り込み、二次的なリンパ組織へと遊走し、抗原を、免疫系のエフェクターT細胞へと提示することである (Banchereau, J., et al., Annu Rev Immunol, 2000, 18: p. 767-811; Banchereau, J., & Steinman, R. M., Nature 392, 245-252 (1998))。DCは、免疫応答において、重要な役割を果たし、成熟への変化を受け、これにより、それぞれの環境に適切な機能を果たす (Termeer, C. C., et al., J Immunol, 2000, Aug. 15, 165: p. 1863-70)。DCが成熟する間、抗原の取込み能は失われ、主要組織適合性複合体 (MHC) クラスI分子およびMHCクラスII分子の表面密度は、10~100倍増大し、共刺激分子および接着分子であるCD40の発現もまた大幅に増大する (Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, Science, 2000, 290: p. 92-96)。加えて、他の遺伝子変化により、DCが、T細胞に富む排出リンパ節の傍皮質へと帰巢し、ナイーブT細胞およびメモリーT細胞を誘引するT細胞ケモカインを発現し、抗原特異的なナイーブTH0細胞をプライミングすることも可能となる (Adema, G. J., et al., Nature, 1997, Jun. 12, 387: p. 713-7)。この段階において、成熟DCは、それらのMHC II分子を介して、抗原を、CD4+ヘルパーT細胞へと提示し、T細胞のCD40リガンド (CD40L) の上方制御を誘導し、これが、DCのCD40受容体に結合する。このDC:T細胞間相互作用により、MHC I分子およびMHC II分子、接着分子、共刺激分子 (例えば、B7. 1分子、B7. 2分子)、サイトカイン (例えば、IL-12)、および抗アポトーシスタンパク質 (例えば、Bcl-2タンパク質) のさらなる上方制御を含め、強力なCD8+細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 反応の開始に重要な、さらなるDC分子の迅速な発現が誘導される (Anderson, D. M., et al., Nature, 1997, Nov. 13, 390: p. 175-9; Ohshima, Y., et al., J Immunol, 1997, Oct. 15, 159: p. 3838-48; Sallusto, F., et al., Eur J Immunol, 1998,

Sep. 28: p. 2760-9; Caux, C. Adv Exp Med Biol. 1997, 417:21-5;)。CD8+ T細胞は、リンパ節を離れ、再度循環に入り、元の炎症部位に帰巢し、病原体または悪性細胞を破壊する。

【0129】

DCの機能に影響を与える1つの重要なパラメータが、DCの「オンスイッチ」として用いられるCD40受容体である(Bennett, S. R., et al., Nature, 1998, Jun. 4. 393: p. 478-80; Clarke, S. R., J Leukoc Biol, 2000, May. 67: p. 607-14; Fernandez, N. C., et al., Nat Med, 1999, Apr. 5: p. 405-11; Ridge, J. P., D. R. F, and P. Nature, 1998, Jun. 4. 393: p. 474-8; Schoenberger, S. P., et al., Nature, 1998, Jun. 4. 393: p. 480-3)。CD40とは、TNF受容体スーパーファミリーのうちの、48 kDaの膜貫通受容体メンバーである(McWhirter, S. M., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, Jul. 20. 96: p. 8408-13)。CD40-CD40L間相互作用は、TNF受容体関連因子(TRAF)を伴うシグナル伝達カスケードを開始させるのに必要な、CD40の三量体化を誘導する(Ni, C., et al., PNAS, 2000, 97(19): 10395-10399; Pullen, S. S., et al., J Biol Chem, 1999, May 14. 274: p. 14246-54)。CD40は、これらのシグナル伝達分子を用いて、NF- κ B、AP-1、STAT3、およびp38MAPKを含め、DCにおける複数の転写因子を活性化する(McWhirter, S. M., et al., 1999)。

【0130】

抗原をプロセッシングおよび提示するそれらの固有の方法、ならびに共刺激分子およびサイトカイン分子を高レベルで発現する可能性のために、樹状細胞(DC)は、ナイーブT細胞をプライミングおよび活性化するのに有効な抗原提示細胞(APC)である(Banchereau J, et al., Ann N Y Acad Sci. 2003; 987:180-187)。この特性のために、DCは、多くの臨床試験において、ワクチン接種のための細胞プラットフォームとして広く用いられ、有望な結果をもたらしている(O'Neill DW, et al., Blood. 2004; 104:2235-2246; Rosenberg SA, Immunity. 1999; 10:281-287)。しかし、癌患者におけるDCワクチンの臨床的有効性は、おそらく、活性化が最適レベル未満であること、排出リンパ節への遊走が限定的であること、および寿命の長さがリンパ節環境における最適なT細胞の活性化には不十分であることを含めた、いくつかの重要な欠損のために、満足できないものである。

【0131】

DCベースの癌ワクチンを最適化するときのパラメータは、DCの、CD4+ T細胞、CD8+ T細胞、および制御性T細胞(Treg細胞)などの免疫エフェクター細胞との相互作用である。これらの相互作用では、DCの成熟状態が、結果としてもたらされるエフェクター機能を決定するときの重要な因子となる(Steinman RM, Annu Rev Immunol. 2003; 21:685-711)。Tregの発現を最小化しながら、CD4+ T細胞およびCD8+ T細胞のプライミングを最大化するために、DCは、完全に成熟しており、高レベルの共刺激分子(CD40、CD80、およびCD86などの)、ならびにIL-12p70およびIL-6などの炎症促進性サイトカインを発現する必要がある。同様に重要なことは、DCが、ワクチン接種部位から排出リンパ節へと効果的に遊走して、T細胞相互作用を開始させることが可能でなければならないことである(Vieweg J, et al., Springer Semin Immunopathol. 2005; 26:329-341)。

【0132】

単球由来の未成熟DCをex vivoにおいて成熟させるために、DCベースのトリアル的大半は、TNF-α、IL-1β、IL-6、およびPGE₂を含む標準的な成熟サイトカインカクテル（MC）を用いてきた。標準的な成熟カクテルにおけるプロスタグランジンE₂（PGE₂）の主要な機能は、CCR₇をそのリガンドであるCCR₇リガンド19（CCL19）およびCCL21へと感作し、これにより、DCが排出リンパ節へと遊走する能力を増強することである（Scandella E, et al., Blood. 2002;100:1354-1361; Luft T, et al., Blood. 2002;100:1362-1372）。しかし、PGE₂はまた、T細胞増殖の抑制（Goodwin JS, et al., J Exp Med. 1977;146:1719-1734; Goodwin JS, Curr Opin Immunol. 1989;2:264-268）、炎症促進性サイトカイン生成の阻害（例えば、IL-12p70およびTNF-α（Kalinski P, Blood. 2001;97:3466-3469; van der Pouw Kraan TC, et al., J Exp Med. 1995;181:775-779））、および主要組織適合性複合体（MHC）II表面発現の下方制御（Snyder DS, Nature. 1982;299:163-165）を含めた、免疫応答の刺激に潜在的に有害である多くの特性を示すことも報告されている。したがって、遊走を促進しながらPGE₂を回避する成熟プロトコールが、DCベースのワクチンの治療的有効性を改善する可能性が高い。

10

20

【0133】

リンパ組織内のDCの刺激促進状態を拡張するために、CD40シグナル伝達経路を標的とする一時的な制御に基づくDCの活性化系が開発されている。DCの機能性は、CD40によるシグナル伝達の振幅および持続の両方を増大させることにより改善された（Hanks BA, et al., Nat Med. 2005;11:130-137）。これを達成するため、CD40の細胞質ドメインを、膜ターゲティング配列と共に、合成のリガンド結合ドメインに融合させるように、CD40受容体を再操作した。化学二量体化誘導剤（CID）と称する、脂質透過性の二量体化薬である、AP20187（AP）（Spencer DM, et al., Science. 1993;262:1019-1024）を投与したところ、in vivoにおいて、マウスDCのCD40依存性シグナル伝達カスケードが誘導された。この誘導戦略は、他の活性化モダリティにより達成された免疫原性を超えて、in vivoにおいて明確な抗原および腫瘍の両方に対する免疫原性を著明に増強した（Hanks BA, et al., Nat Med. 2005;11:130-137）。

30

【0134】

その例がToll様受容体（TLR）によるシグナル伝達である、パターン認識受容体（PRR）によるシグナル伝達もまた、DCの成熟および活性化の誘導において重要な役割を果たす（ヒトDCは、複数の異なるTLRを発現する）（Kadowaki N, et al., J Exp Med. 2001;194:863-869）。11の哺乳動物TLRが、多様な病原体に由来する高分子に応答し、獲得免疫の開始と共に、自然免疫応答の活性化に寄与している。リポ多糖（LPS）、および臨床的に重要な誘導体であるモノホスホリル脂質A（MPL）は、細胞表面TLR-4複合体に結合し（Kadowaki N, et al., J Exp Med. 2001;194:863-869）、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ（MAPK）であるp38キナーゼおよびc-Junキナーゼ（JNK）と共に、NF-κBおよびIRF3などの転写因子を最終的に誘導する、多様なシグナル伝達経路をもたらし（Ardeshtna KM, et al., Blood. 2000;96:1039-1046; Ismaili J, et al., J Immunol. 2002;168:926-932）。この過程において、DCは成熟し、IL-6、IL-12、およびI型インター

40

50

フェロンなど、炎症促進性サイトカインを部分的に情報制御する (Rescigno M, et al., J Exp Med. 1998; 188: 2175-2180)。LPSにより誘導される成熟は、DCが、in vitroおよびin vivoにおける抗原特異的T細胞反応を刺激する能力を増強することが示されている (Lapointe R, et al., Eur J Immunol. 2000; 30: 3291-3298)。米国特許第7,404,950号では、抗原提示細胞を活性化する方法であって、この細胞を、CD40ペプチドをコードする核酸で形質導入するステップを含む方法が論じられており、本明細書における参照により本明細書に組み込まれる、WO2008/049113として公開された、2007年10月19日出願の国際特許出願第PCT/US2007/081963号では、抗原提示細胞を活性化する方法であって、この細胞を、誘導性CD40ペプチド、およびパターン認識受容体、またはこの経路における他の下流のタンパク質を含有するキメラタンパク質をコードする核酸でトランスフェクトするステップを含む方法が論じられている。

10

【0135】

誘導性CD40 (iCD40)系は、ヒト樹状細胞 (DC) に適用されており、iCD40シグナル伝達を、パターン認識受容体 (PRR) アダプターのリガンド結合と組み合わせると、ヒトDCの持続的で頑健な活性化がもたらされることが示されている (本明細書における参照により本明細書に組み込まれる、2009年9月21日出願され、関連の国際出願が、WO2010/033949として2010年3月25日に公開されている、Spencerら、US2010/033949)。20

20

【0136】

発現構築物の操作

発現構築物は、全てが作動的に連結された、共刺激ポリペプチドおよびリガンド結合ドメインをコードする。一般に、「作動的に連結された」という用語は、プロモーター配列が、第2の配列に機能的に連結され、この場合、このプロモーター配列が、第2の配列に対応するDNAの転写を開始させ、媒介する。より具体的に述べると、発現構築物では、複数のリガンド結合ドメインを用いる。さらにまた、発現構築物は、膜ターゲティング配列も含有する。適切な発現構築物は、上記のFKBPリガンド結合エレメントのいずれかの側に、共刺激ポリペプチドエレメントを包含しうる。発現構築物は、ベクター、例えば、ウイルスベクターまたはプラスミドに挿入することができる。提供される方法のステップは、任意の適切な方法を用いて実施することができ、これらの方法には、核酸を、本明細書に提示される抗原提示細胞に形質導入するか、核酸で、本明細書に提示される抗原提示細胞を形質転換するか、または核酸を、本明細書に提示される抗原提示細胞に他の形で備える方法が含まれるがこれらに限定されない。一部の実施形態では、切断型MyD88ペプチドが、配列番号5のヌクレオチド配列によりコードされる (DNAリンカーを伴うかもしくは伴わない、または配列番号6のアミノ酸配列を有する)。一部の実施形態では、CD40細胞質ポリペプチド領域が、配列番号1におけるポリヌクレオチド配列によりコードされる。

30

【0137】

共刺激ポリペプチド

共刺激ポリペプチド分子は、T細胞介在性反応を、樹状細胞による抗原提示分子の発現を上方制御することにより増幅することが可能である。意図される共刺激タンパク質には、例えば、腫瘍壊死因子 (TNF) ファミリーのメンバー (すなわち、CD40、RANK/TRANCE-R、OX40、4-1B)、Toll様受容体、C反応性タンパク質受容体、パターン認識受容体、およびHSP受容体が含まれるがこれらに限定されない。

40

【0138】

共刺激ポリペプチドには、NF- κ B経路、Akt経路、および/またはp38経路を活性化する任意の分子またはポリペプチドが含まれる。DC活性化系は、共刺激ポリペプチドが、オリゴマー化を結果としてもたらすリガンド (すなわち、脂質透過性の有機二量体化薬) により活性化および/または制御される、リガンド結合ドメイン (すなわち

50

、低分子結合ドメイン）に融合させた、組換えシグナル伝達分子を用いることに基づく。共刺激ポリペプチドを架橋するか、またはオリゴマー化するのに用いられうる他の系には、抗体、天然リガンド、および／または人工の交差反応性リガンドもしくは合成リガンドが含まれる。さらにまた、意図される他の二量体化系には、クーママイシン／DNAギラーゼB系が含まれる。

【0139】

用いる共刺激ポリペプチドには、NF- κ B経路、ならびに他の多様なシグナル伝達カスケード、例えば、p38経路および／またはAkt経路を活性化するポリペプチドが含まれる。このような共刺激ポリペプチドには、パターン認識受容体、C反応性タンパク質受容体（すなわち、Nod1、Nod2、PtX3-R）、TNF受容体（すなわち、CD40、RANK/TRANSCEND-R、OX40、4-1BB）、およびHSP受容体（Lox-1およびCD-91）が含まれるがこれらに限定されない。パターン認識受容体には、エンドサイトーシスパターン認識受容体（すなわち、マンノース受容体、スカベンジャー受容体（すなわち、Mac-1、LRP、ペプチドグリカン、テイコ酸（teichoic acids）、毒素、CD11c/CR4））、外部シグナルパターン認識受容体（Toll様受容体（TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10）、ペプチドグリカン認識タンパク質（PGRPは、細菌性ペプチドグリカンおよびCD14に結合する））、内部シグナルパターン認識受容体（すなわち、NOD受容体1および2）、RIG1、および図2に示されるPRRが含まれるがこれらに限定されない。本方法および組成物に適するパターン認識受容体にはまた、例えば、Werts C., et al., Cell Death and Differentiation (2006) 13:798-815; Meylan, E., et al., Nature (2006) 442:39-44; and Strober, W., et al., Nature Reviews (2006) 6:9-20において論じられている、例えば、パターン認識受容体も含まれる。

【0140】

特定の実施形態では、共刺激ポリペプチド分子が、CD40である。CD40分子は、（1）ストリンジェントな条件下において、公知のCD40遺伝子の配列を有する核酸にハイブリダイズし、（2）CD40ポリペプチドをコードする核酸分子を含む。特定の例では、CD40ポリペプチドが、細胞外ドメインを欠く場合がある。CD40ポリペプチドをコードする例示的なポリヌクレオチド配列には、配列番号1、および他の分子種に由来するCD40アイソフォームが含まれるがこれらに限定されない。本発明の方法および組成物では、CD40の他の通常の変異体または突然変異体を用いることが意図される。したがって、CD40領域は、天然配列と、1以上のアミノ酸置換、アミノ酸欠失、および／またはアミノ酸挿入だけ異なるアミノ酸配列を有しうる。例えば、1以上のTNF受容体関連因子（TRAF）結合領域を、除去するか、または有効に除去することができる（例えば、TRAFタンパク質が、それに結合しないか、またはそれに結合するときのアフィニティーが天然のCD40配列に結合するときより低下するように、CD40のアミノ酸配列を欠失または変化させる）。具体的な実施形態では、TRAF3結合領域を、除去するか、または有効に除去するように、TRAF3結合領域を欠失または変化させる（例えば、アミノ酸250～254を変化または欠失させる。Hauer et al., PNAS 102(8): 2874-2879 (2005))。

【0141】

特定の実施形態では、本方法が、CD40の誘導性形態（iCD40）をコードする発現構築物をもたらすように、遺伝子物質の操作を伴う。このような方法は、例えば、CD40の細胞質ドメインをコードする異種核酸配列およびそれを発現させるための手段を含有する発現構築物の生成を伴う。適切なヘルパー細胞内でベクターを複製することができ、これによりウイルス粒子を生成させることができ、細胞に組換えウイルス粒子を感染させることができる。

【0142】

したがって、本明細書で提示されるCD40分子は、細胞外ドメインを欠く場合がある。特定の実施形態では、細胞外ドメインが切断または除去される。また、標準的な突然変異誘発、挿入、欠失、または置換を用いて、細胞外ドメインを突然変異させ、機能的な細胞外ドメインを有さないCD40分子を生成させることができることが意図される。CD40の核酸は、配列番号1の核酸配列を有する。CD40の核酸はまた、配列番号1の配列を有する核酸の相同体および対立遺伝子、ならびに前出の核酸の機能的に同等な断片、変異体、および類似体も包含する。誘導性CD40のベクターを構築する方法は、例えば、2008年7月29日に交付された、米国特許第7,404,950号において論じられている。

10

【0143】

遺伝子治療の文脈では、遺伝子が、ベクターの骨格をもたらすウイルスゲノム以外の供給源に由来する、異種ポリヌクレオチド配列である。遺伝子は、細菌、ウイルス、酵母、寄生虫、植物、なおまたは動物など、原核生物供給源または真核生物供給源に由来する。異種DNAはまた、複数の供給源、すなわち、多重遺伝子構築物または融合タンパク質にも由来する。異種DNAはまた、1つの供給源に由来する制御配列と、異なる供給源に由来する遺伝子とを包含する場合もある。

【0144】

リガンド結合領域

発現構築物のリガンド結合（「二量体化」）ドメインは、天然または非天然のリガンド、例えば、非天然の合成リガンドを用いる誘導を可能とする、任意の簡便なドメインでありうる。リガンド結合ドメインは、構築物の性質およびリガンドの選択に応じて、細胞膜に対して内部の場合もあり、外部の場合もある。上記で示した細胞質領域と関連するリガンド結合タンパク質を含め、受容体を含めた多種多様なリガンド結合タンパク質が公知である。本明細書で用いられる「リガンド結合ドメイン」という用語は、「受容体」という用語と互換的でありうる。そのリガンド（例えば、有機低分子リガンド）が公知であるか、またはこれを容易に生成させうるリガンド結合タンパク質が、特に被験体となる。これらのリガンド結合ドメインまたは受容体には、FKBPおよびシクロフィリン受容体、ステロイド受容体、テトラサイクリン受容体、上記で示された他の受容体などのほか、抗体、特に、重鎖サブユニットまたは軽鎖サブユニット、これらが変異した配列、確率的手順により得られる無作為的なアミノ酸配列、組換え合成などから得られうる、「非天然」受容体が含まれる。特定の実施形態では、リガンド結合領域が、FKBPリガンド結合領域、シクロフィリン受容体リガンド結合領域、ステロイド受容体リガンド結合領域、シクロフィリン受容体リガンド結合領域、およびテトラサイクリン受容体リガンド結合領域からなる群から選択される。リガンド結合領域は、Fv'Fvls配列を含むことが多い。Fv'Fvls配列は、さらなるFv'配列をさらに含むこともある。例には、例えば、Kopytek, S. J., et al., *Chemistry & Biology* 7:313-321 (2000) and in Gestwicki, J. E., et al., *Combinatorial Chem. & High Throughput Screening* 10:667-675 (2007); Clackson T (2006) *Chem Biol Drug Des* 67:440-2; Clackson, T., in *Chemical Biology: From Small Molecules to Systems Biology and Drug Design* (Schreiber, s., et al., eds., Wiley, 2007)において論じられている配列が含まれる。

20

30

40

【0145】

大半の場合、リガンド結合ドメインまたは受容体ドメインは、天然ドメインまたはその切断型活性部分として、少なくとも約50アミノ酸であり、約350アミノ酸より少なく、通常は200アミノ酸より少ない。結合ドメインは、二量体化のために構成しうる、例えば、低分子（<25kDaであり、ウイルスベクターにおける効率的なトランスフェク

50

ションを可能とする) リガンドの場合もあり、単量体リガンドの場合もあり、非免疫原性リガンドの場合もあり、合成により結合可能なリガンドを有する場合もあり、細胞透過性リガンドを有する場合もあり、非毒性リガンドを有する場合もある。

【0146】

受容体ドメインは、発現構築物のデザインおよび適切なリガンドの結合可能性に応じて、細胞内の場合もあり、細胞外の場合もある。疎水性リガンドの場合、結合ドメインは、膜のいずれの側の場合もあるが、親水性リガンド、特に、タンパク質リガンドの場合、リガンドを、それが結合可能な形態で内部化するための輸送系が存在しない限り、結合ドメインが、通常は細胞膜の外部にある。細胞内受容体の場合、構築物は、シグナルペプチド、および受容体ドメイン配列の5'側または3'側の膜貫通ドメインをコードする場合もあり、受容体ドメイン配列の5'側に脂質結合シグナル配列を有する場合もある。受容体ドメインが、シグナルペプチドと、膜貫通ドメインとの間にある場合、受容体ドメインは、細胞外ドメインである。

10

【0147】

受容体をコードする発現構築物部分は、各種の理由により、突然変異誘発を受ける可能性がある。突然変異誘発されたタンパク質は、高度な結合アフィニティーをもたらす場合もあり、天然受容体および突然変異誘発された受容体のリガンドによる識別を可能とする場合もあり、受容体ーリガンド対をデザインするための機会をもたらす場合などもある。受容体における変化は、結合部位にあることが公知であるアミノ酸の変化、コンビナトリアル法を用いる無作為突然変異誘発を伴う場合があり、この場合、結合部位と関連するアミノ酸のコドン、または立体構成的変化と関連する他のアミノ酸のコドンを、特定のアミノ酸のコドン(複数可)を公知の変化を伴ってまたは無作為的に変化させ、結果として得られるタンパク質を適切な原核生物宿主において発現させ、次いで、結果として得られるタンパク質を結合についてスクリーニングすることにより、突然変異誘発にかけることができる。

20

【0148】

抗体および抗体のサブユニット、例えば、重鎖もしくは軽鎖、特に、断片、より具体的には、可変領域の全部もしくは一部、または高アフィニティー結合を創出するための重鎖と軽鎖との融合体を、結合ドメインとして用いることができる。意図される抗体には、免疫応答を誘発せず、一般に末梢(すなわち、CNS/脳領域外)では発現しない細胞外ドメインなど、異所性発現させたヒト生成物である抗体が含まれる。このような例には、低アフィニティーの神経成長因子受容体(LNGFR)、および胎児性表面タンパク質(すなわち、癌胎児性抗原)が含まれるがこれらに限定されない。さらにまた、生理学的に許容されるハプテン分子に対する抗体を調製することができ、個々の抗体のサブユニットを、結合アフィニティーについてスクリーニングすることができる。これらのサブユニットをコードするcDNAを単離し、定常領域、可変領域の一部を欠失させること、可変領域を突然変異誘発することなどにより改変し、リガンドに適切なアフィニティーを有する結合タンパク質ドメインを得ることができる。このようにして、生理学的に許容されるほとんど任意のハプテン化合物をリガンドとして用いて、このリガンドに対するエピトープをもたらすことができる。結合ドメインが公知であり、結合に有用なリガンドが存在する場合は、抗体ユニットではなく、天然の受容体を用いることができる。

30

40

【0149】

オリゴマー化

伝達されるシグナルは通常、リガンドを介するキメラタンパク質分子のオリゴマー化の結果として生じる、すなわち、リガンド結合後におけるオリゴマー化の結果として生じるが、他の結合イベント、例えば、アロステリック活性化を用いて、シグナルを誘発することもできる。キメラタンパク質の構築物は、多様なドメインの順序、および個別のドメインの反復配列の数に応じて変化する。

【0150】

受容体を多量化するには、キメラ表面膜タンパク質のリガンド結合ドメイン/受容体ド

50

メインのリガンドを、通常、結合部位の各々がリガンド受容体ドメインに結合することが可能である、少なくとも2つの結合部位をそれが有するという意味で、多量体とする。対象のリガンドは、有機合成低分子の二量体であるか、またはより高次のオリゴマーであるが、通常はおおよそ四量体以下であることが望ましく、個別の分子は、少なくとも約150 kDa～約5 kDa未満であることが典型的であり、通常は約3 kDa未満である。合成リガンドおよび受容体の多様な対を用いることができる。例えば、天然の受容体を伴う実施形態では、二量体FK506をFKBP12受容体と共に用いることができ、二量体化したシクロスポリンAを、シクロフィリン受容体と共に用いることができ、二量体化したエストロゲンを、エストロゲン受容体と共に用いることができ、二量体化したグルココルチコイドを、グルココルチコイド受容体と共に用いることができ、二量体化したテトラサイクリンを、テトラサイクリン受容体と共に用いることができ、二量体化したビタミンDを、ビタミンD受容体と共に用いることなどが可能である。代替的に、より高次のリガンド、例えば、三量体のリガンドも用いることができる。非天然の受容体を伴う実施形態では、例えば、抗体のサブユニット、修飾抗体のサブユニット、可撓性のリンカードメインにより隔てられた、重鎖可変領域および軽鎖可変領域をタンデムで含む単鎖抗体、または修飾受容体、およびこれらが変異した配列など、多種多様な化合物のうちのいずれかを用いることができる。これらのリガンドユニットの著明な特徴は、各結合部位が、高アフィニティーで受容体に結合することが可能であり、これらを化学的に二量体化しうることである。また、リガンドを、血清中に機能的レベルで溶解させるが、大半の適用について、細胞膜を超えて拡散することが可能であるように、リガンドの疎水性／親水性のバランスをとる方法が利用可能である。

10

20

【0151】

特定の実施形態では、本方法が、化学誘導二量体化(CID)法を用いて、条件制御した形で、タンパク質またはポリペプチドを生成させる。この技法は、誘導性であることに加えて、また、不安定性の二量体化剤を分解させるか、または単量体の競合的阻害剤を投与することに起因して、可逆性でもありうる。

【0152】

CID系は、合成の二価リガンドを用いて、リガンド結合ドメインに融合したシグナル伝達分子を迅速に架橋する。この系は、細胞表面タンパク質のオリゴマー化および活性化(Spencer, D. M., et al., Science, 1993, 262: p. 1019-1024; Spencer D. M. et al., Curr Biol 1996, 6: 839-847; Blau, C. A. et al., Proc Natl Acad Sci USA 1997, 94: 3076-3081)、もしくは細胞質ゾルタンパク質のオリゴマー化および活性化(Luo, Z. et al., Nature 1996, 383: 181-185; MacCorkle, R. A. et al., Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95: 3655-3660)、転写因子をDNAエレメントへと動員することによる転写の調節(Ho, S. N. et al., Nature 1996, 382: 822-826; Rivera, V. M. et al., Nat. Med. 1996, 2: 1028-1032)、またはシグナル伝達分子を細胞膜へと動員することによるシグナル伝達の刺激(Spencer D. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92: 9805-9809; Holsinger, L. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 95: 9810-9814)を誘発するのに用いられている。

30

40

【0153】

CID系は、表面受容体の凝集が、下流のシグナル伝達カスケードを効果的に活性化するという概念に基づいている。最も単純な実施形態では、CID系が、脂質透過性免疫抑制薬であるFK506の二量体類似体を用いるが、このFK506は、その通常の生体活性を失う一方で、FK506結合タンパク質であるFKBP12に遺伝子的に融合させた

50

分子を架橋する能力を得る。1以上のFKBPおよびミリストイル化配列を、標的受容体の細胞質シグナル伝達ドメインへと融合させることにより、二量体化薬依存的ではあるが、リガンドおよび細胞外ドメインには依存しない形で、シグナル伝達を刺激することができる。これにより、CID系には、一時的な制御、単量体の薬物類似体を用いる可逆性、および特異性の増強がもたらされる。それらの結合ドメインであるFKBP12に対して高アフィニティーである第3世代のAP20187/AP1903 CIDは、内因性FKBP12による非特異的な副作用を誘導することなく、*in vivo*における組換え受容体の特異的な活性化を可能とする。FKBP12V₃₆など、アミノ酸置換およびアミノ酸欠失を有するFKBP12の変異体であって、二量体化薬に結合する変異体もまた、用いることができる。加えて、合成リガンドは、プロテアーゼによる分解に対して耐性であり、このために、合成リガンドは、送達される大半のタンパク質剤より、*in vivo*において受容体を活性化させるのに効果的となっている。

10

【0154】

用いられるリガンドは、リガンド結合ドメインのうちの2つ以上に結合することが可能である。キメラタンパク質は、複数のリガンド結合ドメインを含有する場合、複数のリガンドに結合することが可能である。リガンドは、非タンパク質または化学物質であることが典型的である。例示的なリガンドには、二量体FK506（例えば、FK1012）が含まれるがこれに限定されない。

【0155】

一部の実施形態では、リガンドが、低分子である。選択されるリガンド結合領域に適切なリガンドを選択することができる。リガンドは、二量体であることが多く、リガンドは、二量体FK506または二量体FK506の類似体であることがある。特定の実施形態では、リガンドが、AP1903（CAS索引名：2-ピペリジンカルボン酸，1-〔（2S）-1-オキソ-2-（3，4，5-トリメトキシフェニル）ブチル]-1，2-エタンジルス〔イミノ（2-オキソ-2，1-エタンジイル）オキシ-3，1-フェニレン〔（1R）-3-（3，4-ジメトキシフェニル）プロピリデン〕〕エステル，〔2S-〔1（R*），2R*〔S*〔S*〔1（R*），2R*〕〕〕〕-（9CI）、CAS登録番号：195514-63-7、分子式：C₇₈H₉₈N₄O₂₀、分子量：1411.65）である。特定の実施形態では、リガンドが、AP20187である。

20

【0156】

このような方法では、多量体分子が、CD40の細胞外ドメインのエピトープに結合する抗体（例えば、ヒト化抗CD40抗体、Tai et al., Cancer Research 64, 2846-2852（2004））の場合もあり、CD40リガンド（例えば、米国特許第6,497,876号（Maraskovskyら））の場合もあり、別の共刺激分子（例えば、B7/CD28分子）の場合もある。本発明でアッセイされる機能に影響しない、配列内の保存的变化は、本特許請求の範囲内にあることが理解される。

30

【0157】

CD40活性化の機構は、根本的に三量体化に基づくので、この受容体は、CID系に特に適する。CIDを制御することにより、CID系には、1）一時的な制御、2）自己免疫反応の徴候が見られるときの、非活性単量体の付加による可逆性、および3）非特異的な副作用の可能性の制限がもたらされる。加えて、*in vivo*において誘導によりDCのCD40を活性化すれば、CD40によるシグナル伝達の完全な誘導に通常必要とされる、第2の「危険」シグナルの必要が回避され、*in situ*におけるDCの存続が潜在的に促進され、T細胞プライミングの増強が可能となる。したがって、iCD40を発現するDCワクチンを操作すると、T細胞介在性殺滅反応が、DCによる抗原提示分子、接着分子、TH1促進サイトカイン、および存続促進因子の発現を上方制御することを介して増幅される。

40

【0158】

意図される他の二量体化系には、クーマイシン/DNAギラーゼB系が含まれる。ク

50

ーママイシン誘導性二量体化は、修飾 R a f タンパク質を活性化し、M A P キナーゼカスケードを刺激する。F a r r a r e t a l . , 1996 を参照されたい。

【0159】

膜ターゲティング

膜ターゲティング配列は、キメラタンパク質の細胞表面膜への輸送をもたらし、ここで、同じ配列または他の配列が、キメラタンパク質の細胞表面膜への結合をコードしうる。細胞膜と会合する分子は、膜会合を促進する特定の領域を含有し、このような領域は、キメラタンパク質分子内に組み込まれて、膜ターゲティング処理された分子を生成させうる。例えば、一部のタンパク質は、アシル化されたN末端またはC末端の配列を含有し、これらのアシル部分により、膜への会合が促進される。このような配列は、アシルトランスフェラーゼにより認識され、特定の配列モチーフに適合することが多い。あるアシル化モチーフは、単一のアシル部分により修飾されることが可能であり（アニオン性の脂質ヘッド基との会合を改善するため、複数の正に帯電した残基を後続させることが多い（例えば、ヒト c-Src: M-G-S-N-K-S-K-P-K-D-A-S-Q-R-R-R））、他のアシル化モチーフは、複数のアシル部分により修飾されることが可能である。例えば、タンパク質チロシンキナーゼである S r c の N 末端配列は、単一のミリストイル部分を含みうる。S r c ファミリーメンバーのサブセット（例えば、Y e s、F y n、L c k）、および G タンパク質のアルファサブユニットなど、特定のタンパク質キナーゼの N 末端領域内には、二重のアシル化領域が位置している。このような二重のアシル化領域は、このようなタンパク質の最初の 18 アミノ酸内に位置することが多く、配列モチーフ M e t - G l y - C y s - X a a - C y s に適合する [配列中、M e t は切断され、G l y は N アシル化され、C y s 残基のうちの 1 つは S アシル化されている]。G l y は、ミリストイル化されていることが多く、C y s はパルミトイル化されうる。G タンパク質のガンマサブユニットおよび他のタンパク質（例えば、W o r l d W i d e W e b a d d r e s s e b i . a c . u k / i n t e r p r o / D i s p l a y I p r o E n t r y ? a c = I P R 0 0 1 2 3 0）の C 末端に由来する C 1 5 または C 1 0 のイソプレニル部分により修飾されうる、配列モチーフ C y s - A l a - A l a - X a a（いわゆる、「C A A X ボックス」）に適合するアシル化領域もまた、用いることができる。これらのアシル化モチーフおよび他のアシル化モチーフには、例えば、G a u t h i e r - C a m p b e l l e t a l . , M o l e c u l a r B i o l o g y o f t h e C e l l 1 5 : 2 2 0 5 - 2 2 1 7 (2004); G l a b a t i e t a l . , B i o c h e m . J . 3 0 3 : 6 9 7 - 7 0 0 (1994) and Z l a k i n e e t a l . , J . C e l l S c i e n c e 1 1 0 : 6 7 3 - 6 7 9 (1997) において論じられているアシル化モチーフが含まれ、これらをキメラ分子に組み込んで、膜への局在化を誘導することができる。特定の実施形態では、アシル化モチーフを含有するタンパク質に由来する天然配列を、キメラタンパク質に組み込む。例えば、一部の実施形態では、L c k、F y n、もしくは Y e s、または G タンパク質のアルファサブユニットに由来する最初の 25 以下の N 末端アミノ酸（例えば、任意選択の突然変異を伴う天然配列のうちの約 5 ～約 20 アミノ酸、約 10 ～約 19 アミノ酸、または約 15 ～約 19 アミノ酸）など、このようなタンパク質の N 末端部分を、キメラタンパク質の N 末端内に組み込むことができる。特定の実施形態では、C A A X ボックスモチーフ配列を含有する G タンパク質のガンマサブユニットに由来する約 25 アミノ酸以下（例えば、任意選択の突然変異を伴う天然配列のうちの約 5 ～約 20 アミノ酸、約 10 ～約 18 アミノ酸、または約 15 ～約 18 アミノ酸）の C 末端配列を、キメラタンパク質の C 末端に連結することができる。一部の実施形態では、アシル部分の l o g p 値が +1 ～ +6 であり、アシル部分の l o g p 値が +3 ～ +4.5 のこともある。l o g p 値は、疎水性の尺度であり、疎水性の高い分子がより高い頻度でオクタノールへと分配され、l o g p 値が高値であると特徴づけられる、オクタノール/水分配研究から導出されることが多い。多くの親油性分子については l o g p 値が公表されており、公知の分配過程を用いて l o g p 値を計算することができる（例えば、登録番号 4493 の分子が、

10

20

30

40

50

log p 値を 4.2 とするラウリン酸を示す、Chemical Reviews, Vol. 71, Issue 6, page 599)。任意のアシル部分を、上記で論じたペプチド組成物に連結し、公知の方法および本明細書の後出で論じる方法を用いて抗微生物活性について調べることができる。アシル部分は、例えば、C1～C20のアルキル、C2～C20のアルケニル、C2～C20のアルキニル、C3～C6のシクロアルキル、C1～C4のハロアルキル、C4～C12のシクロアルキルアルキル(cyclalkylalkyl)、アリール、置換アリール、またはアリール(C1～C4)アルキルのこともある。任意のアシル含有部分は、脂肪酸のこともあり、脂肪酸部分の例は、プロピル(C3)部分、ブチル(C4)部分、ペンチル(C5)部分、ヘキシル(C6)部分、ヘプチル(C7)部分、オクチル(C8)部分、ノニル(C9)部分、デシル(C10)部分、ウンデシル(C11)部分、ラウリル(C12)部分、ミリスチル(C14)部分、パルミチル(C16)部分、ステアリル(C18)部分、アラキジル(C20)部分、ベヘニル(C22)部分、およびリグノセリル(C24)部分であり、各部分は、0、1、2、3、4、5、6、7、または8箇所の不飽和(すなわち、二重結合)を含有しうる。任意のアシル部分は、ホスファチジル脂質(例えば、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン)、スフィンゴ脂質(例えば、スフィンゴミエリン(shingomyelin)、スフィンゴシン、セラミド、ガングリオシド、セラブロシド)、またはこれらの修飾形のことでもある。特定の実施形態では、1つ、2つ、3つ、4つ、または5つ以上のアシル部分を、膜会合領域に連結する。本明細書におけるキメラタンパク質はまた、単回膜貫通配列を含有する場合もあり、複数回膜貫通配列を含有する場合もある(例えば、キメラタンパク質のN末端またはC末端において)。単回膜貫通領域は、特定のCD分子、チロシンキナーゼ受容体、セリン/トレオニンキナーゼ受容体、TGFβ、BMP、アクチビン、およびホスファターゼにおいて見出される。単回膜貫通領域は、シグナルペプチド領域と、約20～約25アミノ酸の膜貫通領域とを包含することが多く、これらのアミノ酸の多くは、疎水性アミノ酸であり、アルファ螺旋を形成しうる。正に帯電したアミノ酸の短い配列が膜貫通部分に後続して、このタンパク質を膜内に固定することが多い。複数回貫通タンパク質には、イオンポンプ、イオンチャネル、および輸送体が含まれ、膜を複数回にわたり貫通する2つ以上の螺旋を包含する。複数回貫通タンパク質の全てまたは実質的に全てが、キメラタンパク質に組み込まれることもある。単回膜貫通領域および複数回膜貫通領域の配列は公知であり、キメラタンパク質分子への組込みについてこれらを選択することができる。

【0160】

宿主において機能性であり、キメラタンパク質の他のドメインのうちの1つと会合する場合もあり、会合しない場合もある、任意の膜ターゲティング配列を用いることができる。一部の実施形態では、このような配列に、ミリスチル化ターゲティング配列、パルミトイル化ターゲティング配列、プレニル化配列(すなわち、ファルネシル化配列、ゲラニル-ゲラニル化配列、CAAXボックス)、タンパク質間相互作用モチーフ、または受容体に由来する膜貫通配列(シグナルペプチドを用いる)が含まれるがこれらに限定されない。例には、例えば、ten Klooster JP et al, Biology of the Cell (2007) 99, 1-12, Vincent, S., et al., Nature Biotechnology 21:936-40, 1098 (2003)において論じられている配列が含まれる。

【0161】

多様な膜におけるタンパク質の貯留を増大させうる、さらなるタンパク質ドメインが存在する。例えば、約120アミノ酸のプレクストリン相同(PH)ドメインは、細胞内シグナル伝達に参与することが典型的な200を超えるヒトタンパク質において見出される。PHドメインは、膜内の多様なホスファチジルイノシトール(PI)脂質(例えば、PI(3, 4, 5)-P3、PI(3, 4)-P2、PI(4, 5)-P2)に結合することが可能であり、これにより、タンパク質を、異なる膜または細胞内区画に動員するのに

重要な役割を果たす。PI 脂質のリン酸化状態は、PI-3キナーゼまたはPTENなどにより制御されることが多く、したがって、膜のPHドメインとの相互作用は、アシル脂質ほど安定的ではない。

【0162】

選択マーカー

特定の実施形態では、発現構築物が、*in vitro*または*in vivo*におけるその発現がマーカーを発現構築物に組み入れることを介して同定される核酸構築物を含有する。このようなマーカーは、細胞に同定可能な変化を付与することから、発現構築物を含有する細胞の容易な同定が可能となる。通常、薬物選択マーカーを組み入れると、形質転換細胞のクローニングおよび選択の一助となる。例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシン、およびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子は、有用な選択マーカーである。代替的には、単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(tk)などの酵素も用いられる。細胞外の非シグナル伝達ドメイン、または多様なタンパク質(例えば、CD34、CD19、LNGFR)を含有する免疫学的表面マーカーもまた用いることができ、磁性抗体を介する分取、または蛍光抗体を介する分取のための簡潔な方法が可能となる。遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現することが可能である限りにおいて、用いられる選択マーカーが重要であるとは考えられない。選択マーカーのさらなる例には、例えば、EGFP、ベクターgal、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)などのレポーターが含まれる。

【0163】

制御領域

1. プロモーター

標的細胞におけるポリヌクレオチドの発現を方向付けることが可能である限りにおいて、対象のポリヌクレオチド配列の発現を制御するのに用いられる具体的なプロモーターが重要であるとは考えられない。したがって、ヒト細胞を標的とする場合、ポリヌクレオチド配列のコード領域を、例えば、ヒト細胞における発現が可能なプロモーターに隣接して配置し、このプロモーターの制御下に置くことができる。一般的に述べると、このようなプロモーターには、ヒトプロモーターまたはウイルスプロモーターが含まれうるであろう。

【0164】

多様な実施形態では、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)即初期遺伝子プロモーター、SV40初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス長末端反復配列、 β -アクチン、ラットインスリンプロモーター、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼを用いて、対象のコード配列の高レベルの発現を得ることができる。発現レベルが所与の目的に十分である限りにおいて、対象のコード配列の発現を達成するための、当技術分野において周知の他のウイルスプロモーター、または哺乳動物細胞プロモーター、または細菌ファージプロモーターの使用も同様に意図される。周知の特性を伴うプロモーターを用いることにより、トランスフェクションまたは形質転換の後における、対象のタンパク質の発現レベルおよび発現パターンを最適化することができる。

【0165】

特定の生理シグナルまたは合成シグナルに応答して制御されるプロモーターを選択することにより、遺伝子産物の誘導性発現が可能となりうる。例えば、導入遺伝子、またはマルチシストロニックのベクターを用いる場合は複数の導入遺伝子の発現が、その中でベクターを生成させる細胞に対して毒性である場合は、これらの導入遺伝子のうちの1以上の発現を阻害または低減することが望ましい。生成細胞系に対して毒性である導入遺伝子の例は、アポトーシス促進性遺伝子およびサイトカイン遺伝子である。導入遺伝子産物が毒性である場合は、ウイルスベクターを生成させるのに、複数の誘導性プロモーター系が利用可能である(より多くの誘導性プロモーターを付加されたい)。

【0166】

エクジソン系(Invitrogen, Carlsbad, CA)は、このような系の

10

20

30

40

50

1つである。この系は、哺乳動物細胞における対象の遺伝子の制御発現を可能とするようにデザインされている。エクジソン系は、導入遺伝子の基礎レベルの発現は事実上まったく許容しないが、200倍を超える誘導性を可能とする、厳密に制御された発現機構からなる。エクジソン系は、*Drosophila*属のヘテロ二量体のエクジソン受容体に基づき、エクジソンまたはムリステロンAなどの類似体がこの受容体に結合すると、この受容体により、下流の導入遺伝子の発現スイッチをオンにするプロモーターが活性化され、高レベルのmRNA転写が達せられる。この系では、ヘテロ二量体受容体の両方の単量体がベクターから構成的に発現するが、対象の遺伝子の発現を駆動するエクジソン応答性プロモーターは、別のプラスミドに存在する。したがって、この種の系を、対象の遺伝子導入ベクターへと遺伝子操作により導入すれば、有用であろう。次いで、対象の遺伝子を含むプラスミドと、生成細胞系内の受容体単量体とを含むプラスミドを共トランスフェクトすれば、潜在的に毒性である導入遺伝子を発現させずに、遺伝子導入ベクターを生成させることが可能となるであろう。適切な時点でならば、導入遺伝子の発現を、エクジソンまたはムリステロンAにより活性化することも可能であろう。

【0167】

有用でありうる別の誘導系は、元はGossenおよびBujard (Gossen and Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551, 1992; Gossen et al., Science, 268:1766-1769, 1995)により開発されたTet-Off (商標)系またはTet-On (商標)系 (Clontech, Palo Alto, CA)である。この系によってもまた、テトラサイクリン、またはドキシサイクリンなど、テトラサイクリン誘導体に応答して、高レベルの遺伝子発現を制御することが可能となる。Tet-On (商標)系では、ドキシサイクリンの存在下で遺伝子発現がスイッチオンとなるのに対し、Tet-Off (商標)系では、ドキシサイクリンの非存在下で遺伝子発現がスイッチオンとなる。これらの系は、*E. coli*のテトラサイクリン耐性オペロンに由来する2つの制御性エレメントに基づく。テトラサイクリンリプレッサーが結合するテトラサイクリンオペレーター配列、およびテトラサイクリンリプレッサータンパク質という2つの制御性エレメントである。その中にテトラサイクリン応答性エレメントを存在させるプロモーターの下流に、対象の遺伝子をクローニングする。第2のプラスミドは、テトラサイクリン制御性トランスアクチベーターと称する制御性エレメントを含有し、このエレメントは、Tet-Off (商標)系の場合、単純ヘルペスウイルスに由来するVP16ドメインと、野生型のテトラサイクリンリプレッサーとからなる。したがって、ドキシサイクリンの非存在下では、転写が構成的にオンとなる。Tet-On (商標)系では、テトラサイクリンリプレッサーが野生型ではなく、ドキシサイクリンの存在下において、転写を活性化する。遺伝子治療用にベクターを生成させる場合は、生成細胞を、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンの存在下で増殖させ、潜在的に毒性である導入遺伝子の発現は防止しうるが、ベクターが患者に導入されると、遺伝子発現が構成的にオンとなるように、Tet-Off (商標)系を用いることができる。

【0168】

状況によっては、遺伝子治療用ベクターにおける導入遺伝子の発現を制御することが望ましい。例えば、所望の発現レベルに応じて、活性強度の異なるウイルスプロモーターを用いる。哺乳動物細胞では、強力な転写活性化をもたらすのに、CMV即初期プロモーターを用いることが多い。CMVプロモーターは、Donnelly, J. J., et al., 1997. Annu. Rev. Immunol. 15:617-48において総説されている。導入遺伝子の発現レベルの低減が望ましい場合にはまた、それほど強力でない、CMVプロモーターの修飾形も用いられている。造血細胞における導入遺伝子の発現が所望される場合は、MLVまたはMMTVに由来するLTRなど、レトロウイルスプロモーターを用いることが多い。所望の効果に応じて用いられる他のウイルスプロモーターには、SV40プロモーター、RSV LTRプロモーター、HIV-1 LTRプロモーターおよびHIV-2 LTRプロモーター、E1A領域、E2

A領域、またはMLP領域に由来するプロモーターなど、アデノウイルスプロモーター、AAV-LTRプロモーター、HSV-TKプロモーター、およびニワトリ肉腫ウイルスプロモーターが含まれる。

【0169】

同様に、標的とされない組織に対する潜在的な毒性または望ましくない影響を軽減するように、組織特異的なプロモーターを用いて、特異的な組織または細胞において転写を実施する。これらのプロモーターは、CMVプロモーターなど、より強力なプロモーターと比較して、発現の低下を結果としてもたらしうるが、また、発現および免疫原性の制限を結果として増強することも可能である(Bojak, A., et al., 2002. Vaccine. 20:1975-79; Cazeaux, N., et al., 2002. Vaccine 20:3322-31)。例えば、適切な場合は、PSA関連プロモーターもしくは前立腺特異的腺カリクライン、または筋肉クレアチンキナーゼ遺伝子など、組織特異的なプロモーターを用いることができる。

【0170】

特定の適応症では、遺伝子治療用ベクターを投与した後の特定の時点において、転写を活性化することが望ましい。これは、ホルモン制御性またはサイトカイン制御性であるプロモーターなどのプロモーターによりなされる。用いるサイトカイン応答性プロモーターおよび炎症性タンパク質応答性プロモーターには、KキニノーゲンおよびTキニノーゲン(Kageyama et al., (1987) J. Biol. Chem., 262, 2345-2351)、c-fos、TNF-α、C-反応性タンパク質(Arcone, et al., (1988) Nucl. Acids Res., 16(8), 3195-3207)、ハプトグロビン(Oliviero et al., (1987) EMBO J., 6, 1905-1912)、血清アミロイドA2、C/EBPα、IL-1、IL-6(Poli and Cortese, (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 8202-8206)、補体C3(Wilson et al., (1990) Mol. Cell. Biol., 6181-6191)、IL-8、アルファ-1酸糖タンパク質(Prowse and Baumann, (1988) Mol Cell Biol, 8, 42-51)、アルファ-1抗トリプシン、リポタンパク質リパーゼ(Zechner et al., Mol. Cell. Biol., 2394-2401, 1988)、アンギオテンシノーゲン(Ron, et al., (1991) Mol. Cell. Biol., 2887-2895)、フィブリノーゲン、c-jun(フォルボールエステル、TNF-α、UV照射、レチノイン酸、および過酸化水素により誘導可能)、コラゲナーゼ(フォルボールエステルおよびレチノイン酸により誘導される)、メタロチオネイン(重金属およびグルココルチコイドにより誘導可能)、ストロメリシン(フォルボールエステル、インターロイキン-1、およびEGFにより誘導可能)、アルファ-2マクログロビン、およびアルファ-1抗キモトリプシンが含まれる。他のプロモーターには、例えば、SV40、MMTV、ヒト免疫不全ウイルス、モロニーウイルス(MV)、ALV、エプスタインバーウイルス、ラウス肉腫ウイルス、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、およびヒトクレアチンが含まれる。

【0171】

単独の、または別のプロモーターと組み合わせた、上記のプロモーターのうちのいずれかが、所望の作用に応じて有用となりうることが想定される。プロモーターおよび他の制御性エレメントは、それらが所望の細胞または組織において機能性となるように選択する。加えて、プロモーターのリストは、網羅的または限定的であるとみなされるべきではなく、他のプロモーターも、本明細書で開示されるプロモーターおよび方法と共に用いられる。

【0172】

2. エンハンサー

10

20

30

40

50

エンハンサーとは、同じDNA分子の遠隔の位置に配置されるプロモーターにより転写を増大させる遺伝子エレメントである。最初の例には、免疫グロブリンと関連するエンハンサーおよびT細胞受容体と関連するエンハンサーであって、いずれもがコード配列に隣接し、複数のイントロン内に存在するエンハンサーが含まれる。CMVプロモーター、SV40プロモーター、およびレトロウイルスLTRプロモーターなど、多くのウイルスプロモーターが、エンハンサー活性と緊密に関連しており、単一のエレメントのように扱われることが多い。エンハンサーも、プロモーターと全く同様に構成されている。すなわち、エンハンサーは、それらの各々が、1以上の転写タンパク質に結合する、多くの個別のエレメントからなる。エンハンサーとプロモーターとの基本的な違いは、作動的なものである。エンハンサー領域は、全体として、遠隔の転写を刺激し、方向に依存しないことが多いが、これは、プロモーター領域またはその構成要素には当てはまらなくともよい。他方、プロモーターが、RNA合成の開始を特定の部位において方向付ける1以上のエレメントを有するのに対し、エンハンサーは、これらの特異性を欠いている。プロモーターとエンハンサーとは、重複および隣接することが多く、極めて類似のモジュール構成を有することが多いと考えられている。エンハンサーのサブセットは、転写活性を増大させるだけでなく、ゲノム内に組み込まれると、(インシュレーターエレメントと共に)隣接する配列から転写エレメントを絶縁する一助ともなりうる遺伝子座制御領域(LCR)である。任意のプロモーター/エンハンサーの組合せ(Eukaryotic Promoter Data Base (EPDB)による)を用いて、遺伝子の発現を駆動しうるが、多くは、発現を、特定の組織型または組織のサブセットに制限する(例えば、Kut

10

20

30

40

50

【0173】

3. ポリアデニル化シグナル

cDNAの挿入配列を用いる場合は、遺伝子転写物の適正なポリアデニル化を実施するように、ポリアデニル化シグナルを組み入れようと所望することが典型的である。ポリアデニル化シグナルの性質が本方法を成功裏に実施するのに重要であるとは考えられず、ヒト成長ホルモンのポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンのポリアデニル化シグナルおよびSV40のポリアデニル化シグナル、ならびにLTRのポリアデニル化シグナルなど、任意のこのような配列が用いられる。非限定的な一例は、pCEP3プラスミド(Invitrogen, Carlsbad, California)に存在するSV40のポリアデニル化シグナルである。また、発現カセットのエレメントとしては、ターミネーターも意図される。これらのエレメントは、メッセージレベルを増強し、発現カセットから他の配列への読み抜けを最小化するのに用いられうる。終結シグナル配列またはポリ(A)シグナル配列は、例えば、mRNAの3'端における保存的配列(AAUA AA)から約11~30ヌクレオチド下流に位置する場合がある(Montgomery, D. L., et al., 1993. DNA Cell Biol. 12: 777-83; Kut

10

20

30

40

50

【0174】

4. 開始シグナルおよび配列内リボソーム結合部位

コード配列を効率的に翻訳するにはまた、特異的な開始シグナルも必要とされうる。これらのシグナルには、ATG開始コドンまたは隣接配列が含まれる。ATG開始コドンを含めた外因性翻訳制御シグナルを備えることが必要でありうる。開始コドンを、所望のコ

10

20

30

40

50

ード配列のリーディングフレームと共にインフレームで配置し、挿入配列全体の翻訳を確保する。外因性の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然の場合もあり、合成の場合もある。適切な翻訳エンハンサーエレメントを組み入れることにより、発現の効率を増強することができる。

【0175】

特定の実施形態では、配列内リボソーム進入部位 (IRES) エレメントを用いて、マルチ遺伝子メッセージまたはポリシストロニックメッセージを創出する。IRESエレメントは、5'メチル化キャップ依存性翻訳のリボソーム走査モデルを回避し、配列内部において翻訳を開始することが可能である (Pelletier and Sonenberg, Nature, 334:320-325, 1988)。ピコルナウイルスファミリーの2つのメンバー (ポリオウイルスおよび脳筋炎ウイルス) に由来する IRES エレメント (Pelletier and Sonenberg, 1988) のほか、哺乳動物メッセージ配列に由来する IRES (Macejak and Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991) も論じられている。IRES エレメントは、異種オープンリーディングフレームに連結することができる。各々を IRES により隔てた複数のオープンリーディングフレームを、併せて転写し、ポリシストロニックメッセージを創出することができる。IRES エレメントにより、各オープンリーディングフレームがリボソームに結合可能となり、効率的な翻訳がもたらされる。単一のメッセージを転写する単一のプロモーター/エンハンサーを用いて、複数の遺伝子を効率的に発現させることができる (各々が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5, 925, 565号および第5, 935, 819号を参照されたい)。

【0176】

配列の最適化

タンパク質の生成はまた、導入遺伝子におけるコドンを最適化することによっても増大させることができる。種特異的なコドンの変化を用いて、タンパク質の生成を増大させることができる。また、コドンを最適化して、RNAを最適化することもでき、この結果として、より効率的な翻訳をもたらすこともできる。RNAに組み込まれるコドンを最適化することにより、不安定性を引き起こす二次構造、例えば、リボソームの結合を阻害する mRNA の二次構造、または mRNA の核外移出を阻害する潜在配列 (cryptic sequence) などのエレメントを除去することができる (Kutzler, M. A., and Weiner, D. B., 2008. Nature Rev. Gen. 9:776-88; Yan, J. et al., 2007. Mol. Ther. 15:411-21; Cheung, Y. K., et al., 2004. Vaccine 23:629-38; Narum, D. L., et al., 2001. 69:7250-55; Yadava, A., and Ockenhouse, C. F., 2003. Infect. Immun. 71:4962-69; Smith, J. M., et al., 2004. AIDS Res. Hum. Retroviruses 20:1335-47; Zhou, W., et al., 2002. Vet. Microbiol. 88:127-51; Wu, X., et al., 2004. Biochem. Biophys. Res. Commun. 313:89-96; Zhang, W., et al., 2006. Biochem. Biophys. Res. Commun. 349:69-78; Deml, L. A., et al., 2001. J. Virol. 75:1099-11001; Schneider, R. M., et al., 1997. J. Virol. 71:4892-4903; Wang, S. D., et al., 2006. Vaccine 24:4531-40; zur Megede, J., et al., 2000. J. Virol. 74:2628-2635)。

【0177】

リーダー配列

リーダー配列を付加して、mRNAの安定性を増強し、より効率的な翻訳を結果としてもたらしることができる。リーダー配列は通常、小胞体へのmRNAのターゲッティングに関与する。例には、その固有の切断を遅延させる、HIV-1エンベロープ糖タンパク質(Env)のシグナル配列、およびIgE遺伝子のリーダー配列が含まれる(Kutzler, M. A., and Weiner, D. B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88; Li, V., et al., 2000. *Virology* 272:417-28; Xu, Z. L., et al., 2001. *Gene* 272:149-56; Malin, A. S., et al., 2000. *Microbes Infect.* 2:1677-85; Kutzler, M. A., et al., 2005. *J. Immunol.* 175:112-125; Yang, J. S., et al., 2002. *Emerg. Infect. Dis.* 8:1379-84; Kumar, S., et al., 2006. *DNA Cell Biol.* 25:383-92; Wang, S., et al., 2006. *Vaccine* 24:4531-40)。IgEリーダー配列を用いて、小胞体への挿入を増強することができる(Tepler, I, et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264:5912)。

10

【0178】

導入遺伝子の発現は、発現を最適化するのに適切な方法を選択することにより最適化および／または制御することができる。これらの方法には、例えば、プロモーターの最適化、送達法、および遺伝子配列が含まれる(例えば、Laddy, D. J., et al., 2008. *PLoS ONE* 3:e2517; Kutzler, M. A., and Weiner, D. B., 2008. *Nature Rev. Gen.* 9:776-88において提示されている)。

20

【0179】

核酸

本明細書で用いられる「核酸」とは一般に、DNA、RNA、または核酸塩基を含むこれらの誘導体もしくは類似体の分子(一本鎖、二本鎖、またはこれを超える鎖)を指す。核酸塩基には、例えば、DNAにおいて見出される天然のプリン塩基もしくはピリミジン塩基(例えば、アデニン「A」、グアニン「G」、チミン「T」、またはシトシン「C」、またはRNAにおいて見出される天然のプリン塩基もしくはピリミジン塩基(例えば、A、G、ウラシル「U」、またはC)が含まれる。「核酸」という用語は、各々が「核酸」という用語の亜属としての、「オリゴヌクレオチド」および「ポリヌクレオチド」という用語を包含する。核酸は、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、95

30

40

50

0、960、970、980、990または1000ヌクレオチド、またはこの中で導出可能な任意の範囲の長さであることも可能であり、少なくともこれらの長さであることも可能であり、多くともこれらの長さであることも可能であり、およそこれらの長さであることも可能である。

【0180】

本明細書で提示される核酸は、別の核酸と同一な領域を有する場合もあり、別の核酸と相補的な領域を有する場合もある。相補的な領域または同一な領域は、少なくとも5つの連続残基でありうるということが意図されるが、この領域は、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、441、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990または1000の連続ヌクレオチドであるか、少なくともこれらの連続ヌクレオチドであるか、多くともこれらの連続ヌクレオチドであるか、またはおよそこれらの連続ヌクレオチドであることがとりわけ意図される。

【0181】

本明細書で用いられる「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイズする」、または「ハイブリダイズすることが可能である」とは、二本鎖分子もしくは三本鎖分子、または部分的に二本鎖もしくは三本鎖の性質を伴う分子を形成することを意味するものと理解される。本明細書で用いられる「アニールする」という用語は、「ハイブリダイズする」と同義である。「ハイブリダイゼーション」、「ハイブリダイズする」、または「ハイブリダイズすることが可能である」という用語は、「ストリンジェントな条件（複数可）」または「高ストリンジェンシー」という用語、および「低ストリンジェンシー」または「低ストリンジェンシー条件（複数可）」という用語を包含する。

【0182】

本明細書で用いられる「ストリンジェントな条件（複数可）」または「高ストリンジェンシー」とは、相補的な配列（複数可）を含有する、1以上の核酸鎖間または核酸鎖内でハイブリダイゼーションを可能とするが、無作為的配列のハイブリダイゼーションは除外する条件である。ストリンジェントな条件は、核酸と標的鎖との間にミスマッチがあったとしてもわずかなミスマッチしか許容しない。このような条件は公知であり、高度な選択性を必要とする適用に用いられることが多い。非限定的な適用には、遺伝子もしくはその核酸セグメントなどの核酸の単離、または少なくとも1つの特異的なmRNA転写物もしくはその核酸セグメントなどの検出が含まれる。

【0183】

ストリンジェントな条件は、摂氏約42度～摂氏約70度の温度で、約0.02M～約0.5MのNaClによりもたらされる条件など、低塩分および／または高温の条件を含む。所望のストリンジェンシーを有する温度およびイオン強度は、部分的に、特定の核酸（複数可）の長さ、標的配列（複数可）の長さおよび核酸塩基含量、核酸（複数可）

の電荷組成、およびハイブリダイゼーション混合物におけるホルムアミド、テトラメチルアンモニウムクロリド、または他の溶媒（複数可）の存在または濃度により決定されることが理解される。

【0184】

ハイブリダイゼーションのためのこれらの範囲、組成、および条件は、非限定的な例だけを目的として言及するものであり、特定のハイブリダイゼーション反応に所望のストリンジェンシーは、1以上の陽性対照または陰性対照と比較することにより経験的に決定されることが多いことが理解される。想定される適用に応じて、ハイブリダイゼーション条件の変化を用いて、標的配列に対する核酸の選択度の変化を達成することができる。非限定的な例では、ストリンジェントな条件下では核酸にハイブリダイズしない類縁の標的核酸の同定および単離を、低温および／または高イオン強度においてハイブリダイズさせることにより達成することができる。このような条件を、「低ストリンジェンシー」または「低ストリンジェンシーの条件」と称し、低ストリンジェンシーの非限定的な例には、約0.15M～約0.9MのNaCl、摂氏約20度～摂氏約50度の温度範囲で実施されるハイブリダイゼーションが含まれる。低ストリンジェンシー条件または高ストリンジェンシー条件をさらに修飾して、特定の適用に適合させることができる。

10

【0185】

核酸の修飾

以下で論じられる修飾のうちのいずれも、核酸に適用することができる。修飾の例には、RNAまたはDNAの骨格、糖または塩基、およびこれらの多様な組合せに対する変化が含まれる。核酸における任意の適切な数の骨格連結、糖、および／または塩基を修飾することができる（例えば、個別に約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、最大100%）。非修飾ヌクレオシドとは、ベーターD-リボフラノースの1'炭素に接合された、アデニン塩基、シトシン塩基、グアニン塩基、チミン塩基、またはウラシル塩基のうちのいずれか1つである。

20

【0186】

修飾塩基とは、1'位における、アデニン、グアニン、シトシン、およびウラシル以外のヌクレオチド塩基である。修飾塩基の非限定的な例には、イノシン、プリン、ピリジン-4-オン、ピリジン-2-オン、フェニル、シュドウラシル（pSEQDOURACIL）、2,4,6-トリメトキシベンゼン、3-メチルウラシル、ジヒドロウリジン、ナフチル、アミノフェニル、5-アルキルシチジン（例えば、5-メチルシチジン）、5-アルキルウリジン（例えば、リボチミジン）、5-ハロウリジン（例えば、5-ブロモウリジン）または6-アザピリミジンまたは6-アルキルピリミジン（例えば、6-メチルウリジン）、プロピンなどが含まれる。修飾塩基の他の非限定的な例には、ニトロピロリル（例えば、3-ニトロピロリル）、ニトロインドリル（例えば、4-, 5-, 6-ニトロインドリル）、ヒポキサントニル、イソイノシニル、2-アザイノシニル、7-デアザイノシニル、ニトロイミダゾリル、ニトロピラゾリル、ニトロベンゾイミダゾリル、ニトロインダゾリル、アミノインドリル、ピロロピリミジニル、ジフルオロトリル、4-フルオロ-6-メチルベンゾイミダゾール、4-メチルベンゾイミダゾール、3-メチルイソカルボスチリル、5-メチルイソカルボスチリル、3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリル、7-アザインドリル、6-メチル-7-アザインドリル、イミジゾピリジニル、9-メチル-イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリル、7-プロピニルイソカルボスチリル、プロピニル-7-アザインドリル、2,4,5-トリメチルフェニル、4-メチルインドリル、4,6-ジメチルインドリル、フェニル、ナプタレニル、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニルなどが含まれる。

30

40

【0187】

一部の実施形態では、例えば、核酸が、リン酸骨格が修飾された修飾核酸分子を含む。骨格修飾の非限定的な例には、ホスホロチオエート修飾、ホスホロジチオエート修飾

50

、メチルホスホネート修飾、ホスホトリエステル修飾、モルホリノ修飾、アミデート修飾、カルバメート修飾、カルボキシメチル修飾、アセトアミデート修飾、ポリアミド修飾、スルホネート修飾、スルホンアミド修飾、スルファメート修飾、ホルムアセタール修飾、チオホルムアセタール修飾、および／またはアルキルシリル修飾が含まれる。特定の場合には、ヌクレオシドにおいて天然であるリボースの糖部分が、ヘキソース糖、多環式ヘテロアルキル環、またはシクロヘキセニル基で置換されている。特定の場合には、ヘキソース糖が、アロース、グルコース、マンノース、グロース、イドース、ガラクトース、タロース、またはこれらの誘導体である。ヘキソースは、D-ヘキソース、グルコース、またはマンノースでありうる。特定の場合には、多環式ヘテロアルキル基が、環中に1つの酸素原子を含有する二環式環でありうる。特定の場合には、多環式ヘテロアルキル基が、ビシクロ[2. 2. 1]ヘプタン、ビシクロ[3. 2. 1]オクタン、またはビシクロ[3. 3. 1]ノナンである。

10

【0188】

ニトロピロリル核酸塩基およびニトロインドイル核酸塩基は、ユニバーサル塩基として公知の化合物クラスのメンバーである。ユニバーサル塩基とは、融解挙動またはオリゴヌクレオチド二重鎖の活性に実質的に影響を与えることなく、4つの天然塩基のうちのいずれかを置換しうる化合物である。天然の核酸塩基と関連する、安定的な水素結合による相互作用とは異なり、3-ニトロピロリル核酸塩基を含有するオリゴヌクレオチド二重鎖は、スタッキング相互作用だけを介して安定化させることができる。ニトロピロリル核酸塩基には、著明な水素結合による相互作用が見られないので、特異的な相補性塩基に対する特異性が除去される。加えて、4-ニトロインドイル、5-ニトロインドイル、および6-ニトロインドイルも、4つの天然塩基に対して極めて小さな特異性しか示さない。Gauber t, G.; Wengel, J. Tetrahedron Letters 2004, 45, 5629では、1-(2'-O-メチル-β-D-リボフラノシル)-5-ニトロインドールを調製するための手順が論じられている。他のユニバーサル塩基には、ヒポキサンチニル、イソイノシニル、2-アザイノシニル、7-デアザイノシニル、ニトロイミダゾリル、ニトロピラゾリル、ニトロベンズイミダゾリル、ニトロインダゾリル、アミノインドイル、ピロロピリミジニル、およびこれらの構造的誘導体が含まれる。

20

【0189】

ジフルオロトリルは、ユニバーサル塩基として機能する、非天然核酸塩基である。ジフルオロトリルは、天然の核酸塩基であるチミンの等量式である。しかし、チミンとは異なり、ジフルオロトリルは、天然塩基のいずれに対しても感知できるほどの選択性を示さない。ユニバーサル塩基として機能する他の芳香族化合物は、4-フルオロ-6-メチルベンズイミダゾールおよび4-メチルベンズイミダゾールである。加えて、比較的疎水性のイソカルボスチリル誘導体である3-メチルイソカルボスチリル、5-メチルイソカルボスチリル、および3-メチル-7-プロピニルイソカルボスチリルも、天然塩基だけを含有するオリゴヌクレオチド配列と比較して、オリゴヌクレオチド二重鎖によるわずかな不安定化を引き起こすに過ぎない、ユニバーサル塩基である。

30

【0190】

他の非天然核酸塩基には、7-アザインドリル、6-メチル-7-アザインドリル、イミジゾピリジニル、9-メチル-イミジゾピリジニル、ピロロピリジニル、イソカルボスチリル、7-プロピニルイソカルボスチリル、プロピニル-7-アザインドリル、2, 4, 5-トリメチルフェニル、4-メチルインドリル、4, 6-ジメチルインドリル、フェニル、ナフタレニル(naphthalenyl)、アントラセニル、フェナントラセニル、ピレニル、スチルベニル、テトラセニル、ペンタセニル、およびこれらの構造的誘導体が含まれる。ジフルオロトリル、4-フルオロ-6-メチルベンズイミダゾール、4-メチルベンズイミダゾール、および上述の他の非天然塩基の合成手順を含めたより詳細な議論については、Schweitzer et al., J. Org. Chem., 59:7238-7242 (1994)を参照されたい。

40

50

【0191】

加えて、化学的置換基、例えば、架橋形成剤を用いて、反応にさらなる安定性または不可逆性を付加することもできる。架橋形成剤の非限定的な例には、例えば、1, 1-ビス(ジアゾアセチル)-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸を伴うエステル、3, 3'-ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)などのジスクシンイミジルエステルを含めたホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタンなどの二官能性マレイミド、およびメチル-3-[(p-アジドフェニル) ジチオ] プロピオイミデートなどの薬剤が含まれる。

【0192】

10

ヌクレオチド類似体にはまた、「ロックト」核酸も含まれる。特定の組成物を用いて、内因性核酸を、特定の構造内に、本質的に「固定」または「ロック」することができる。配列の固定は、核酸複合体の解離を防止するのに用いられ、このため、内因性配列のコピーを防止しうだけでなく、その標識化、修飾、および／またはクローニングも可能としうる。ロックト構造は、遺伝子の発現を制御する(すなわち、転写または複製を阻害または増強する)ことも可能であり、内因性の核酸配列を標識化するかまたは他の形で修飾するのに用いる安定的な構造として用いることもでき、内因性配列を単離する、すなわち、クローニングするのに用いることもできる。

【0193】

核酸分子は、RNAまたはDNAだけを含有する分子に限定されなくともよく、化学修飾されたヌクレオチドおよび非ヌクレオチドもさらに包含する。非ヌクレオチドまたは修飾ヌクレオチドの百分率は、1%~100%(例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、または95%でありうる)。

20

【0194】

核酸の調製

一部の実施形態では、例えば、核酸を、アッセイにおける対照もしくは基準物質、または治療剤として使用するために提供する。核酸は、例えば、化学合成、酵素的生成、または生物学的生成など、当技術分野で公知の任意の技法により作製することができる。核酸は、生物学的試料から回収または単離することができる。核酸は、組換えの場合もあり、細胞に対して天然または内因性の場合(細胞のゲノムから生成させる場合)もある。核酸低分子の回収を増強するような形で、生物学的試料を処理しうることが意図される。一般的には、方法が、細胞を、グアニジニウムおよび洗浄剤を有する溶液で細胞を溶解させるステップを包含しうる。

30

【0195】

核酸の合成はまた、標準的な方法に従い実施することもできる。合成核酸(例えば、合成オリゴヌクレオチド)の非限定的な例には、*in vitro*においてホスホロトリエステル化学反応、亜リン酸化学反応、またはホスホルアミダイト化学反応、および固相法を用いる化学合成により作製される核酸、またはデオキシヌクレオシドH-ホスフェート中間体を介して作製される核酸が含まれる。オリゴヌクレオチド合成の異なる多様な機構については、他所で開示されている。

40

【0196】

核酸は、公知の技法を用いて単離することができる。特定の実施形態では、核酸低分子を単離する方法、および／またはRNA分子を単離する方法を用いることができる。クロマトグラフィーは、タンパク質または他の核酸から核酸を分離または単離するのに用いられる工程である。このような方法は、ゲルマトリックス、フィルターカラム、アルコール沈殿を伴う電気泳動、および／または他のクロマトグラフィーを伴いうる。細胞に由来する核酸を使用または評価する場合、方法は一般に、細胞を、カオトロピック(例えば、イソチオシアン酸グアニジニウム)および／または洗浄剤(例えば、N-ラウロイルサルコシン)で溶解させてから、特定のRNA集団を単離する実装工程を伴う。

50

【0197】

方法は、核酸を単離するための、有機溶媒および／またはアルコールの使用を伴いうる。一部の実施形態では、細胞溶解産物に添加されるアルコールの量により、約55%～60%のアルコール濃度が達成される。異なるアルコールを用いうるが、エタノールが良好に作用する。固相は、任意の構造が可能であり、これには、ビーズ、フィルター、およびカラムが含まれ、これは、電気陰性基を伴う鉱物またはポリマーの支持体を包含しうる。このような単離手順には、ガラスファイバーのフィルターまたはカラムが有効である。

【0198】

核酸単離工程は、a) グアニジニウムを含む溶解溶液により試料中の細胞を溶解させる工程であって、グアニジニウム濃度を少なくとも約1Mとする溶解産物がもたらされる工程、b) フェノールを含む抽出溶液により、溶解産物から核酸分子を抽出する工程、c) 溶解産物にアルコール溶液を添加して溶解産物／アルコール混合物を形成する工程であって、混合物におけるアルコール濃度が約35%～約70%である工程、d) 溶解産物／アルコール混合物を固体の支持体に適用する工程、e) イオン性溶液により、固体の支持体から核酸分子を溶出させる工程、およびf) 核酸分子を捕捉する工程を包含しうる。試料は乾燥させ、後続の操作に適切な液体および容量中に再懸濁させることができる。

【0199】

遺伝子導入法

細胞における導入遺伝子の発現効果を媒介するため、発現構築物を細胞に導入することが必要となる。このような導入は、ウイルス的遺伝子導入法を用いる場合もあり、非ウイルス的遺伝子導入法を用いる場合もある。本節は、遺伝子導入のための方法および組成物についての議論を提示する。発現ベクターを含む形質転換細胞は、細胞内に発現ベクターを導入することにより生成させる。本方法と共に用いられる細胞小器官、細胞、組織、または生物を形質転換するのに適するポリヌクレオチド送達法には、細胞小器官、細胞、組織、または生物にポリヌクレオチド（例えば、DNA）を導入しうる、事実上任意の方法が含まれる。

【0200】

宿主細胞は、ベクターのレシピエントとして用いることができ、そのように用いられてきた。所望の結果が、ベクターの複製であるのか、またはベクターによりコードされるポリヌクレオチド配列の一部もしくは全部の発現であるのかに応じて、宿主細胞は、原核生物に由来する場合もあり、真核生物に由来する場合もある。多くの細胞系および細胞培養物が、宿主細胞としての使用に利用可能であり、生物の培養物および遺伝子物質のアーカイブとして利用されている機構である、American Type Culture Collection (ATCC) を介してこれらを得ることができる。特定の実施形態では、宿主細胞が、抗原提示細胞である樹状細胞である。

【0201】

適切な宿主を決定することができる。一般的に述べると、これは、ベクターの骨格および所望の結果に基づく。例えば、プラスミドまたはコスミドを、原核生物の宿主細胞へと導入して、多くのベクターを複製することができる。ベクターを複製および／または発現させるための宿主細胞として用いられる細菌細胞には、DH5アルファ細胞、JM109細胞、およびKC8細胞のほか、SURE（登録商標）コンピテント細胞およびSOLOPACK Gold Cells（STRATAGENE（登録商標）、La Jolla, CA）など、市販される多くの細菌宿主が含まれる。代替的には、E. coli LE392細胞などの細菌細胞も、ファージウイルスのための宿主細胞として用いられるであろう。宿主細胞として用いられる真核細胞には、酵母細胞、昆虫細胞、および哺乳動物細胞が含まれるがこれらに限定されない。ベクターを複製および／または発現させるための、哺乳動物の真核宿主細胞の例には、HeLa細胞、NIH3T3細胞、Jurkat細胞、293細胞、COS細胞、CHO細胞、Saos細胞、およびPC12細胞が含まれるがこれらに限定されない。酵母細胞株の例には、YPH499株、YPH500株、およ

び Y P H 5 0 1 株が含まれるがこれらに限定されない。

【0202】

核酸ワクチンには、例えば、非ウイルス DNA ベクター、「ネイキッド」DNA および「ネイキッド」RNA、ならびにウイルスベクターが含まれる。細胞をこれらのワクチンで形質転換し、これらのワクチンに包含される遺伝子の発現を最適化する方法は公知であり、本明細書でも論じられる。

【0203】

核酸またはウイルスベクターを導入する方法の例

任意の適切な方法を用いて、抗原提示細胞をトランスフェクトまたは形質転換することもでき、本方法のヌクレオチド配列または組成物を投与することもできる。本明細書では、特定の例が提示され、カチオン性ポリマー、脂質様分子、および、例えば、IN-VIVO-JET PEI など、特定の市販品を用いる送達などの方法がさらに含まれる。

【0204】

1. ex vivo における形質転換

ex vivo 状況において生物から取り出した血管細胞および血管組織をトランスフェクトするには、多様な方法が利用可能である。例えば、イヌ内皮細胞を、in vitro におけるレトロウイルスによる遺伝子導入を介して遺伝子改変し、イヌへと移植した (Wilson et al., Science, 244:1344-1346, 1989)。別の例では、ユカタンミニピッグの内皮細胞を、in vitro におけるレトロウイルスによりトランスフェクトし、動脈内に、ダブルバルーンカテーテルを用いて移植した (Nabel et al., Science, 244(4910):1342-1344, 1989)。したがって、細胞または組織を取り出し、ex vivo において、本明細書で提示されるポリヌクレオチドを用いてトランスフェクトしうることが意図される。特定の態様では、移植された細胞または組織を、生物内に導入することができる。例えば、動物に由来する樹状細胞を、発現ベクターでトランスフェクトし、次いで、トランスフェクトまたは形質転換された細胞を投与して、動物に戻す。

【0205】

2. 注射

特定の実施形態では、抗原提示細胞または核酸もしくはウイルスベクターを、細胞小器官、細胞、組織、または生物に、例えば、皮下注射、皮内注射、筋肉内注射、静脈内注射、前立腺内 (intraprostatic) 注射、腫瘍内注射、腹腔内注射など、1 以上の注射 (すなわち、注射針による注射) を介して送達することができる。注射法には、例えば、生理食塩液を含む組成物の注射が含まれる。さらなる実施形態は、直接的なマイクロインジェクションを介するポリヌクレオチドの導入を包含する。用いられる発現ベクターの量は、用いられる抗原、ならびに細胞小器官、細胞、組織、または生物の性質に応じて変化しうる。

【0206】

皮内注射、リンパ節内注射、またはリンパ内注射が、DC 投与でより一般的に用いられる方法の一部である。皮内注射は、血流内への吸収は低速であるが、リンパ系への取込みは急速であることを特徴とする。真皮において極めて多数のランゲルハンス樹状細胞が存在することにより、完全抗原ならびにプロセッシングされた抗原が、排出リンパ節へと輸送される。これを正確に実施するには、適正な部位の準備が必要である (すなわち、適正な注射針の設置を観察するために、剃毛する)。リンパ節内注射は、抗原の送達を、リンパ組織へと方向付けることを可能とする。リンパ内注射は、DC の直接的な投与を可能とする。

【0207】

3. 電気穿孔

特定の実施形態では、ポリヌクレオチドを、細胞小器官、細胞、組織、または生物へと、電気穿孔を介して導入する。電気穿孔は、細胞および DNA の懸濁液を、高電圧放電へと曝露することを伴う。この方法の一部の変形では、ペクチン分解酵素など、特定の細

10

20

30

40

50

胞壁分解酵素を用いて、標的レシピエント細胞を、電気穿孔による形質転換に対して、非処理細胞より感受性とする（参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,384,253）。

【0208】

電気穿孔を用いる真核細胞のトランスフェクションは、大きな成功を収めている。この方法で、マウスプレBリンパ球が、ヒトカップ免疫グロブリン遺伝子でトランスフェクトされており（Potter et al., (1984) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 81, 7161-7165）、ラット肝細胞が、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子でトランスフェクトされている（Tur-Kaspa et al., (1986) Mol. Cell Biol., 6, 716-718）。

10

【0209】

4. リン酸カルシウム

他の実施形態では、ポリヌクレオチドを細胞に、リン酸カルシウム沈殿を用いて導入する。ヒトKB細胞が、アデノウイルス5 DNAで、この技法を用いてトランスフェクトされている（Graham and van der Eb, (1973) Virology, 52, 456-467）。この方法ではまた、マウスL(A9)細胞、マウスC127細胞、CHO細胞、CV-1細胞、BHK細胞、NIH3T3細胞、およびHeLa細胞も、ネオマイシンマーカー遺伝子でトランスフェクトされ（Chen and Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8):2745-2752, 1987）、ラット肝細胞も、各種のマーカー遺伝子でトランスフェクトされた（Rippe et al., Mol. Cell Biol., 10:689-695, 1990）。

20

【0210】

5. DEAE-デキストラン

別の実施形態では、ポリヌクレオチドを細胞に、DEAE-デキストランの後でポリエチレングリコールを用いて送達する。この方法で、レポータープラスミドが、マウス骨髄腫およびマウス赤白血病細胞へと導入された（Gopal, T. V., Mol Cell Biol. 1985 May; 5(5):1188-90）。

【0211】

30

6. 超音波処理によるローディング

さらなる実施形態は、直接的な超音波ローディングを介するポリヌクレオチドの導入を包含する。LTK線維芽細胞が、チミジンキナーゼ遺伝子で、超音波処理によるローディングを介してトランスフェクトされている（Fechheimer et al., (1987) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 84, 8463-8467）。

【0212】

7. リポソームを介するトランスフェクション

さらなる実施形態では、ポリヌクレオチドを、例えば、リポソームなどの脂質複合体へと封入することができる。リポソームとは、リン脂質二重層膜および内部の水性媒体を特徴とする小胞構造である。多重層リポソームは、水性媒体により隔てられた複数の脂質層を有する。リポソームは、リン脂質を過剰な水溶液中に懸濁させると、自発的に形成される。脂質成分が自己再配置を受けた後に、閉構造が形成され、脂質二重層間に水および溶解した溶質が封入される（Ghosh and Bachhawat, (1991) In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands. pp. 87-104）。また、Lipofectamine（Gibco BRL）またはSuperfect（Qiagen）により複合体化させたポリヌクレオチドも意図される。

40

【0213】

50

8. 受容体を介するトランスフェクション

さらにまた、ポリヌクレオチドを、標的細胞に、受容体を介する送達媒体によっても送達することができる。これらは、標的細胞内で生じる、受容体を介するエンドサイトーシスによる高分子の選択的な取込みを利用する。多様な受容体が細胞型特異的に分布することを考慮すると、この送達法は、さらなる特異性を付加する。

【0214】

ある受容体を介する遺伝子ターゲティング媒体は、細胞受容体特異的リガンドと、ポリヌクレオチド結合剤とを含む。他の受容体を介する遺伝子ターゲティング媒体は、送達されるポリヌクレオチドが作動的に連結されている、細胞受容体特異的リガンドを含む。受容体を介する遺伝子導入には、複数のリガンドが用いられており (Wu and Wu, (1987) J. Biol. Chem., 262, 4429-4432; Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87(9):3410-3414, 1990; Perales et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:4086-4090, 1994; Myers, EPO 0273085)、これにより、この技法の作動性が確立されている。別の哺乳動物細胞型の文脈における特異的な送達も論じられている (参照により本明細書に組み込まれる Wu and Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12:159-167, 1993)。特定の態様では、リガンドを、標的細胞集団において特異的に発現する受容体に対応するように選択する。他の実施形態では、細胞特異的ポリヌクレオチドターゲティング媒体のポリヌクレオチド送達媒体成分が、リポソームと組み合わせた特異的結合リガンドを含みうる。送達されるポリヌクレオチド (複数可) を、リポソーム内に格納し、特異的結合リガンドを、リポソーム膜へと機能的に組み込む。このため、リポソームは、標的細胞の受容体 (複数可) に特異的に結合し、その内容物を細胞に送達する。このような系は、例えば、上皮成長因子 (EGF) を、ポリヌクレオチドを EGF 受容体の上方制御を示す細胞へと受容体を介して送達するのに用いる場合に機能性であることが示されている。

【0215】

なおさらなる実施形態では、ターゲティング処理された送達媒体のポリヌクレオチド送達媒体成分が、例えば、細胞特異的な結合を方向付ける、1以上の脂質または糖タンパク質を含みうる、リポソーム自体でありうる。例えば、ガラクトース末端のアシアロガングリオシドであるラクトシルセラミドが、リポソーム内に組み込まれ、肝細胞によるインスリン遺伝子の取込みの増大が観察されている (Nicolaou et al., (1987) Methods Enzymol., 149, 157-176)。同様の方法で、組織特異的な形質転換構築物を、標的細胞内に特異的に送達しうることを意図される。

【0216】

9. マイクロプロジェクティルボンバードメント

マイクロプロジェクティルボンバードメント法は、ポリヌクレオチドを、少なくとも1つの細胞小器官、細胞、組織、または生物へと導入するのに用いることができる (それらの各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,550,318;米国特許第5,538,880;米国特許第5,610,042;およびPCT出願WO94/09699)。この方法は、DNAでコーティングされたマイクロプロジェクティルを、それらが細胞膜を穿通し、細胞を死滅させることなしに細胞に進入することを可能とする高速まで加速化する能力に依存する (Klein et al., (1987) Nature, 327, 70-73)。当技術分野では、多種多様なマイクロプロジェクティルボンバードメント法が公知であり、それらの多くが、本方法に適用可能である。このマイクロプロジェクティルボンバードメントでは、1以上の粒子を、少なくとも1つのポリヌクレオチドでコーティングし、推進力により細胞内へと送達することができる。小型の粒子を加速化するための複数のデバイスが、開発されている。このようなデバイスの1つは、電流を発生させる高電圧放電に依存し、これが、起動力をもたらす (Yang et

al., (1990) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 87, 9568-9572)。用いられるマイクロプロジェクティルは、タングステン粒子もしくはタングステンビーズ、または金粒子もしくは金ビーズなど、生物学的に不活性な物質からなっている。例示的な粒子には、例えば、ナノ粒子を含めた、タングステン、白金、および、特定の例では、金が含まれる。場合によっては、マイクロプロジェクティルボンバードメントを用いてDNAをレシピエント細胞へと送達するのに、DNAを金属粒子へと沈殿させる必要はないことが意図される。しかしながら、粒子をDNAでコーティングしうるのはではなく、粒子がDNAを含有しうることが意図される。DNAでコーティングした粒子は、粒子ボンバードメントを介するDNA送達のレベルを増大させるが、それ自体において、およびそれ自体が必要なわけではない。

10

【0217】

ウイルスベクターを介する導入法の例

本方法では、被験体における1以上の細胞が、ヌクレオチド配列によりコードされる遺伝子を発現しうるように、ヌクレオチド配列またはヌクレオチド配列を含む組成物を細胞または被験体へと投与するのに適する、任意のウイルスベクターを用いることができる。特定の実施形態では、導入遺伝子をウイルス粒子内に組み込み、細胞への遺伝子導入を媒介する。ウイルスを、生理学的条件下で適切な宿主細胞へと曝露するだけで、ウイルスの取込みが可能となることが典型的である。以下で論じる通り、各種のウイルスベクターを用いて本方法を用いることが有利である。

20

【0218】

1. アデノウイルス

アデノウイルスは、そのDNAゲノムサイズが中程度であること、操作が容易であること、高力価であること、標的細胞の範囲が広いこと、および感染性が高いことのために、遺伝子導入ベクターとして用いるのに特に適する。おおよそ36kbのウイルスゲノムに、100~200塩基対(bp)の逆方向末端反復(ITR; inverted terminal repeats)が結合しており、ここに、ウイルスDNAの複製およびパッケージングに必要なシス作用性エレメントが含有されている。ウイルスDNA複製の開始により、異なる転写単位を含有するゲノムの初期(E)領域と、後期(L)領域とが分割される。

【0219】

E1領域(E1A領域およびE1B領域)は、ウイルスゲノムおよび数個の細胞遺伝子の転写制御の一因となるタンパク質をコードする。E2領域(E2A領域およびE2B領域)の発現は、ウイルスDNAを複製するためのタンパク質の合成を結果としてもたらす。これらのタンパク質は、DNAの複製、後期遺伝子の発現、および宿主細胞のシャットオフに参与する(Renan, M. J. (1990) Radiother Oncol., 19, 197-218)。ウイルスカプシドタンパク質の大半を含め、後期遺伝子(L1遺伝子、L2遺伝子、L3遺伝子、L4遺伝子、およびL5遺伝子)の産物は、主要後期プロモーター(MLP)から発生する単一の一次転写物が著明にプロセシングされた後に限り発現する。MLP(16.8マップ単位に位置する)は、感染後期において特に効果的であり、このプロモーターから発生する全てのmRNAは、5'トリパー

30

40

【0220】

アデノウイルスを遺伝子治療に最適化するには、大型のDNAセグメントを組み入れるように、移送能を最大化することが必要である。また、特定のアデノウイルス生成物と関連する毒性および免疫応答を軽減することも極めて望ましい。アデノウイルス遺伝子の除去はいずれの目標にも資するので、2つの目標は、ある程度、共通の目標である。本方法を実施することにより、治療用構築物を比較的容易に操作する能力を保持しながら、これらの両方の目標を達成することが可能である。

【0221】

50

ウイルスDNAの複製に必要とされるシスエレメントは全て、直鎖状のウイルスゲノムのいずれかの端部のITR (inverted terminal repeats) (100~200bp) に局在化しているので、DNAの大規模な置換が可能である。ITRを含有するプラスミドは、非欠損型アデノウイルスの存在下で複製されうる (Hay, R. T., et al., J Mol Biol. 1984 Jun 5; 175 (4): 493-510)。したがって、これらのエレメントをアデノウイルスベクターへと組み入れることにより、複製が可能となる。

【0222】

加えて、ウイルスを封入するためのパッケージングシグナルは、ウイルスゲノムの左端の194~385bp (0.5~1.1マップ単位) に局在化している (Hearing et al., J. (1987) Virol., 67, 2555-2558)。このシグナルは、バクテリオファージラムダDNAにおけるタンパク質認識部位を模倣し、ここで、左端には近接するが、付着端配列からは外部にある特異的配列が、このDNAを、ヘッド構造へと挿入するのに必要とされるタンパク質への結合を媒介する。AdのE1置換ベクターは、ウイルスゲノムの左端の450bp (0~1.25マップ単位) の断片であれば、293細胞におけるパッケージングを方向付けうることを裏付けている (Levrero et al., Gene, 101:195-202, 1991)。

【0223】

既に、アデノウイルスゲノムの特定の領域を、哺乳動物細胞のゲノム内に組み込むことができ、これによりコードされる遺伝子を発現させることが示されている。これらの細胞系は、これらによりコードされる、アデノウイルス機能を欠損させたアデノウイルスベクターの複製を支援することが可能である。また、「支援」ベクター、例えば、野生型のウイルスまたは条件欠損型の突然変異体を介する、複製欠損型アデノウイルスベクターの補完についても、報告がなされている。

【0224】

複製欠損型アデノウイルスベクターは、トランスにおけるヘルパーウイルスにより補完することができる。しかし、複製機能をもたらしに必要とされるヘルパーウイルスが存在すれば、いかなる調製物も汚染されるので、この観察だけで、複製欠損ベクターの単離が可能となるわけではない。したがって、複製欠損ベクターの複製および／またはパッケージングに特異性を付加する、さらなるエレメントが必要とされた。このエレメントは、アデノウイルスのパッケージング機能に由来する。

【0225】

アデノウイルスのパッケージングシグナルは、従来のアデノウイルスマップの左端に存在することが示されている (Tibbets et al. (1977) Cell, 12, 243-249)。その後の研究は、ゲノムのE1A (194~358bp) 領域において欠失を伴う突然変異体の増殖が、初期 (E1A) 機能を補完した細胞系においてもなお低度であることを示した (Hearing and Shenk, (1983) J. Mol. Biol. 167, 809-822)。補償的アデノウイルスDNA (0~353bp) を、この突然変異体の右端へと組換えにより導入したところ、このウイルスは、正常にパッケージングされた。突然変異についてのさらなる解析により、Ad5ゲノムの左端において、位置依存性の短い反復エレメントが同定された。ゲノムのいずれかの端部に存在する場合は、この反復配列の1つのコピーが、効率的なパッケージングに十分であるが、Ad5 DNA分子の内部へと移動させると、効率的なパッケージングには十分でないことが判明した (Hearing et al., J. (1987) Virol., 67, 2555-2558)。

【0226】

パッケージングシグナルの突然変異形を用いることにより、効率を変化させながらパッケージングされるヘルパーウイルスを創出することが可能である。突然変異は、点突然変異または点欠失であることが典型的である。パッケージング効率の低いヘルパーウイルス

を、ヘルパー細胞内で増殖させる場合、野生型ウイルスと比較して低速度ではあるが、これらのウイルスはパッケージングされ、これにより、ヘルパーウイルスの増殖が可能となる。しかし、これらのヘルパーウイルスを、野生型のパッケージングシグナルを含有するウイルスと共に細胞内で増殖させる場合は、これらの野生型のパッケージングシグナルが、突然変異形より優先的に認識される。パッケージング因子の量が限定的であることを踏まえると、野生型シグナルを含有するウイルスは、ヘルパーウイルスと比較して選択的にパッケージングされる。優先性が十分に大きい場合は、ウイルス株を均質に近づけることができる。

【0227】

特定の組織または種に対するADV構築物の指向性を改善するには、アデノウイルス単離物間で、受容体結合線維配列を置換しうることが多い。例えば、アデノウイルス5において見出されるコクサッキーアデノウイルス受容体(CAR)リガンドを、アデノウイルス35に由来するCD46結合線維配列の代わりに用いて、ヒト造血細胞に対する結合アフィニティーを大幅に改善することができる。結果として得られる「pSEQdotyped」ウイルスであるAd5f35は、臨床開発された複数のウイルス単離物のベースとなっている。さらに、樹状細胞などの標的細胞を再度ウイルスの標的とすることを可能とするように線維を修飾する、多様な生化学的方法も存在する。方法には、二官能性抗体(一方の端部が、CARリガンドに結合し、もう一方の端部が、標的配列に結合する)、およびカスタマイズしたアビジンベースのキメラリガンドとの会合を可能とする、線維の代謝的ビオチニル化が含まれる。代替的に、リガンド(例えば、抗CD205抗体)を、ヘテロ二官能性のリンカー(例えば、PEGを含有するリンカー)を介してアデノウイルス粒子に結合させることもできるであろう。

【0228】

2. レトロウイルス

レトロウイルスとは、それらのRNAを、感染細胞において、逆転写過程により、二本鎖DNAへと転換する能力を特徴とする、一本鎖RNAウイルスの群である(Coffin, (1990) In: Virology, ed., New York: Raven Press, pp. 1437-1500)。次いで、結果として生じるDNAが、プロウイルスとして、細胞内の染色体へと安定的に組み込まれ、ウイルスタンパク質の合成を方向付ける。この組み込みの結果、レシピエント細胞およびその後代細胞にウイルスの遺伝子配列が貯留される。レトロウイルスのゲノムは、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のそれぞれをコードする3つの遺伝子(gag遺伝子、pol遺伝子、およびenv遺伝子)を含有する。gag遺伝子の上流に見出される、psiと称する配列が、ゲノムをビリオンへとパッケージングするためのシグナルとして機能する。ウイルスゲノムの5'端および3'端には、2つの長末端反復配列(LTR)が存在する。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有し、また、宿主細胞ゲノムへの組み込みにも必要とされる(Coffin, 1990)。

【0229】

レトロウイルスベクターを構築するには、プロモーターをコードする核酸を、複製欠損型であるウイルスを生成させる特定のウイルス配列の代わりにウイルスゲノム内に挿入する。ビリオンを生成させるには、gag遺伝子、pol遺伝子、およびenv遺伝子を含有するが、LTR成分およびpsi成分は伴わないパッケージング用細胞系を構築する(Mann et al., (1983) Cell, 33, 153-159)。ヒトcDNAを含有する組換えプラスミドを、レトロウイルスのLTR配列およびpsi配列と共にこの細胞系に導入すると(例えば、リン酸カルシウム沈殿を介して)、psi配列により、この組換えプラスミドのRNA転写物を、ウイルス粒子内にパッケージングし、次いで、これを培養培地中に分泌させることが可能となる(Nicolas, J. F., and Rubenstein, J. L. R., (1988) In: Vectors: a Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Rodriguez and Denhar

dt, Eds.). Nicolas and Rubenstein; Temin et al., (1986) In: Gene Transfer, Kuchelapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188; Mann et al., 1983)。組換えレトロウイルスを含有する培地を回収し、場合によって濃縮し、遺伝子導入に用いる。レトロウイルスベクターは、多種多様な細胞型に感染することが可能である。しかし、多くの種類のレトロウイルスの組み込みおよび安定的な発現には、宿主細胞の分裂が必要とされる (Paskind et al., (1975) Virology, 67, 242-248)。

【0230】

10

ガラクトース残基をウイルスエンベロープに化学的に付加することを介するレトロウイルスの化学修飾に基づき、レトロウイルスベクターの特異的なターゲティングを可能とするようにデザインされた手法が、近年開発された。この修飾によれば、アシアロ糖タンパク質を介する、肝細胞などの細胞に対する特異的な感染が可能となるであろうし、これは所望されうる。

【0231】

レトロウイルスのエンベロープタンパク質および特異的な細胞受容体に対するビオチニル化抗体を用いて、組換えレトロウイルスをターゲティングする異なる手法もデザインされた。ストレプトアビジンを用いることにより、ビオチン成分を介して、抗体を連結した (Roux et al., (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 86, 9079-9083)。主要組織適合性複合体クラスI抗原および主要組織適合性複合体クラスII抗原に対する抗体を用いて、in vitroにおいて、これらの表面抗原を保有する多様なヒト細胞に、同種指向性ウイルスが感染することが裏付けられた (Roux et al., 1989)。

20

【0232】

3. アデノ随伴ウイルス

AAVは、約4700塩基対である、直鎖状の一本鎖DNAを用いる。ゲノムは、逆方向末端反復により挟み込まれている。ゲノム内には、多数の異なる遺伝子産物をもたらす2つの遺伝子が存在する。第1のcap遺伝子は、VP-1、VP-2、およびVP-3と称する、異なる3つのポリオンタンパク質 (VP) をもたらす。第2のrep遺伝子は、4つの非構造的タンパク質 (NS) をコードする。これらのrep遺伝子産物のうちの1または複数が、AAV転写をトランス活性化する一因となる。AAVにおける3つのプロモーターは、ゲノム内におけるマップ単位のそれらの位置により名指される。これらを、左から右へ、p5、p19、およびp40とする。転写により、3つのプロモーターの各々で2つずつの転写が開始され、各対のうちの一方がスプライシングされる、6つの転写物がもたらされる。マップ単位42~46に由来するスプライス部位は、各転写物について同じである。4つの非構造的タンパク質は、明らかに転写物のうちの長い方に由来し、3つのポリオンタンパク質は全て、小さい方の転写物から生じる。

30

【0233】

AAVは、ヒトにおける病態とは関連しない。効率的に複製するには、AAVが、単純ヘルペスウイルスIおよびII、サイトメガロウイルス、pSEQdorbiesウイルス、ならびに、当然ながら、アデノウイルスなどのウイルスに由来する「支援」機能を必要とすることは興味深い。ヘルパーウイルスのうちで最もよく特徴づけられているのが、アデノウイルスであり、このウイルスの多くの「初期」機能が、AAVの複製を支援することが示されている。AAV repタンパク質の発現が低レベルであると、AAVの構造的発現が中止されると考えられており、ヘルパーウイルスの感染は、このブロックを除去すると考えられている。

40

【0234】

AAVベクターの末端反復配列は、AAV、または修飾AAVゲノムを含有する、p201などのプラスミドを、制限エンドヌクレアーゼ消化することにより (Samulsk

50

i et al., J. Virol., 61:3096-3101 (1987))、または公表されているAAVの配列に基づき、この末端反復配列を化学的または酵素的に合成することが含まれるがこれに限定されない他の方法により得ることができる。例えば、欠失解析により、機能、すなわち、安定的で部位特異的な組込みを可能とするのに必要とされるAAV ITRの最小限の配列または一部を決定することができる。また、この末端反復配列が安定的で部位特異的な組込みを方向付ける能力を維持しながらこの配列に対して許容しうるわずかな修飾がどのようなものであるかも決定することができる。

【0235】

AAVベースのベクターは、*in vitro*における遺伝子送達に安全かつ有効な媒体であることがわかっており、これらのベクターは、*ex vivo*および*in vivo*の両方の潜在的な遺伝子治療における広範な適用のために、前臨床段階および臨床段階で開発および試験がなされている (Carter and Flotte, (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci., 770; 79-90; Chatterjee, et al., (1995) Ann. N. Y. Acad. Sci., 770, 79-90; Ferrari et al., (1996) J. Virol., 70, 3227-3234; Fisher et al., (1996) J. Virol., 70, 520-532; Flotte et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90, 10613-10617, (1993); Goodman et al. (1994), Blood, 84, 1492-1500; Kaplitt et al., (1994) Nat'l Genet., 8, 148-153; Kaplitt, M. G., et al., Ann Thorac Surg. 1996 Dec; 62 (6):1669-76; Kessler et al., (1996) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 93, 14082-14087; Koeberl et al., (1997) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 94, 1426-1431; Mizukami et al., (1996) Virology, 217, 124-130)。

【0236】

肺におけるAAVを介する効率的な遺伝子の導入および発現は、嚢胞性線維症の処置についての臨床試験につながっている (Carter and Flotte, 1995; Flotte et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA, 90, 10613-10617, (1993))。同様に、骨格筋へのジストロフィン遺伝子のAAV媒介遺伝子送達による筋ジストロフィーの処置、脳へのチロシンヒドロキシラーゼ遺伝子送達によるパーキンソン病の処置、肝臓への因子IX遺伝子送達によるB型血友病の処置、および心臓への血管内皮増殖因子遺伝子送達による心筋梗塞の潜在的な処置の見通しも、これらの器官におけるAAVを介する導入遺伝子の発現は、極めて効率的であることが近年示されているので、有望であると考えられる (Fisher et al., (1996) J. Virol., 70, 520-532; Flotte et al., 1993; Kaplitt et al., 1994; 1996; Koeberl et al., 1997; McCown et al., (1996) Brain Res., 713, 99-107; Ping et al., (1996) Microcirculation, 3, 225-228; Xiao et al., (1996) J. Virol., 70, 8098-8108)。

【0237】

4. 他のウイルスベクター

本方法および本組成物における発現構築物としては、他のウイルスベクターも用いられる。牛痘ウイルス (Ridgeway, (1988) In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, pp. 467-492; Baichwal and S

ugden, (1986) In, Gene Transfer, pp. 117-148; Coupar et al., Gene, 68:1-10, 1988)、カナリア痘ウイルス、およびヘルペスウイルスなどのウイルスに由来するベクターも用いられている。これらのウイルスは、多様な哺乳動物細胞への遺伝子導入に用いるための複数の特徴をもたらす。

【0238】

構築物を細胞内に送達すると、導入遺伝子をコードする核酸は、異なる部位に配置され、発現する。特定の実施形態では、導入遺伝子をコードする核酸を、細胞のゲノム内に安定的に組み込む。この組込みは、相同組換えを介する同種の位置および方向である（遺伝子置換）か、または無作為的で非特異的な位置でなされる（遺伝子増強）。またさらなる実施形態では、核酸を、細胞内で、DNAの個別でエピソード性のセグメントとして安定的に維持する。このような核酸のセグメントまたは「エピソード」は、宿主の細胞周期には依存しない維持および複製、または宿主の細胞周期と同期する維持および複製を可能とするのに十分な配列をコードする。発現構築物がどのようにして細胞に送達され、細胞のどこに核酸が保持されるかは、用いられる発現構築物の種類に依存する。

【0239】

免疫応答の増強

特定の実施形態では、生物学的経路、例えば、NF- κ B経路、Akt経路、および/またはp38経路など、例えば、免疫学的経路を活性化し、シグナル伝達共刺激ポリペプチドの操作を組み込むDC活性化戦略が意図される。このDC活性化系は、APC活性化時におけるCD4⁺ T細胞による支援の要件を代替するので、免疫応答を増強する標準的なワクチンと共に用いることもでき、これらの標準的なワクチンを伴わずに用いることもできる (Bennett, S. R., et al., Nature, 1998, Jun. 4. 393: p. 478-80; Ridge, J. P., D. R. F., and P. Nature, 1998, Jun. 4. 393: p. 474-8; Schoenberger, S. P., et al., Nature, 1998, Jun. 4. 393: p. 480-3)。したがって、本明細書で提示されるDC活性化系は、免疫応答を、MHCクラスII特異的ペプチドの生成に対する必要を回避することにより増強する。

【0240】

特定の実施形態では、DCの活性化が、CD40の活性化を介する。したがって、内因性のCD40/CD40L相互作用を介するDCの活性化は、迅速に「IL-12バーンアウト効果」をもたらす負のフィードバックに起因する下方制御を受ける可能性がある。CD40活性化の7~10時間以内に、CD40の代替的なスプライシングアイソフォーム (II型) が、分泌因子として生成する (Tone, M., et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(4): p. 1751-1756)。II型CD40は、主要な負の受容体として作用し、CD40Lを介するシグナル伝達を下方制御し、発生した免疫応答の抗力を潜在的に制限する可能性がある。したがって、本方法は、天然のCD40制御を、細胞外ドメインを欠き、代わりに、化学誘導二量体化 (CID) と称される技術を介した合成の二量体化リガンドによって活性化する、CD40の誘導性形態 (iCD40) を創出することにより取り込む (Spencer, D. M., et al., Science, 1993. 262: p. 1019-1024)。

【0241】

被験体における免疫応答を増強する方法であって、発現ベクター、発現構築物、または形質導入された抗原提示細胞をこの被験体に投与するステップを含む方法も包含される。発現ベクターは、iCD40などの共刺激ポリペプチドをコードする。

【0242】

特定の実施形態では、抗原提示細胞が、ヒト、非ヒト霊長動物、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、または齧歯動物などの動物に存在する。被験体は、哺乳動物、

10

20

30

40

50

例えば、ヒト、非ヒト霊長動物、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、または齧歯動物などの動物でありうる。被験体は、例えば、ヒト、例えば、感染性疾患に関する患者の場合もあり、かつ／または免疫障害である被験体の場合もあり、過剰増殖性疾患に罹患する被験体の場合もある。

【0243】

さらなる実施形態では、発現構築物および／または発現ベクターを、抗原提示細胞を活性化する組成物または物質として用いることができる。「抗原提示細胞を活性化する」か、または「抗原提示細胞の活性を増強する」組成物とは、抗原提示細胞と関連する1以上の活性を刺激する能力を指す。例えば、本方法の発現構築物または発現ベクターなどの組成物は、共刺激分子による抗原提示細胞に対する上方制御を刺激することも可能であり、抗原提示細胞におけるNF- κ Bの核転座を誘導することも可能であり、抗原提示細胞におけるtoll様受容体を活性化することも可能であり、サイトカインまたはケモカインを伴う他の活性を活性化することも可能である。

10

【0244】

発現構築物、発現ベクター、および／または形質導入された抗原提示細胞は、ワクチンの有効性を、例えば、高度な精製抗原または組換え抗原など、脆弱な抗原の免疫原性を増強し、免疫応答に必要とされる抗原の量を低減し、防御的免疫をもたらすのに必要とされる免疫化の頻度を低減し、新生児個体、老齢個体、および免疫障害個体など、免疫応答が低下または脆弱化している被験体におけるワクチンの有効性を改善し、粘膜における免疫など、標的組織における免疫を増強することにより増強することも可能であり、これらによりワクチンの有効性に寄与することも可能であり、細胞介在性免疫または体液性免疫を、特定のサイトカインプロファイルを誘発することにより促進することも可能である。

20

【0245】

特定の実施形態ではまた、抗原提示細胞に、抗原も接触させる。抗原提示細胞に抗原を接触させるのは、*ex vivo*においてであることが多い。抗原提示細胞に抗原を接触させるのは、*in vivo*においてのこともある。一部の実施形態では、抗原提示細胞が被験体に存在し、抗原に対して免疫応答を発生させる。免疫応答は、細胞傷害性Tリンパ球（CTL）による免疫応答のこともある。免疫応答を、腫瘍抗原に対して発生させることもある。特定の実施形態では、抗原提示細胞を、アジュバントを添加せずに活性化する。

30

【0246】

一部の実施形態では、*ex vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入し、皮内投与を介して被験体に投与する。一部の実施形態では、*ex vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入し、皮下投与を介して被験体に投与する。*ex vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入することもある。*in vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入することもある。

【0247】

特定の実施形態では、*ex vivo*において、抗原提示細胞を、キメラタンパク質をコードする核酸で形質導入する場合もあり、*in vivo*において、抗原提示細胞を、キメラタンパク質をコードする核酸で形質導入する場合もある。抗原提示細胞に多量体リガンドを接触させるのと同時に、抗原提示細胞を抗原に対して感作する場合もあり、抗原提示細胞に多量体リガンドを接触させる前に、抗原提示細胞を抗原に対して前感作する場合もある。一部の実施形態では、*ex vivo*において抗原提示細胞に抗原を接触させる。特定の実施形態では、*ex vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入し、皮内投与を介して被験体に投与するが、*ex vivo*において抗原提示細胞を核酸で形質導入し、皮下投与を介して被験体に投与することもある。抗原は、腫瘍抗原であることが可能であり、CTLによる免疫応答を、抗原提示細胞を排出リンパ節へと遊走させることにより誘導することができる。腫瘍抗原とは、例えば、宿主における免疫応答を誘発するペプチドまたはポリペプチドなど、任意の抗原である。腫瘍抗原は、新生物性腫瘍細胞と関連する、腫瘍関連抗原でありうる。

40

50

【0248】

一部の実施形態では、免疫障害個体または免疫障害被験体の免疫応答が低下または脆弱化している。このような個体にはまた、化学療法または免疫系を結果として脆弱化させる他の療法を受けた被験体、移植のレシピエント、免疫抑制剤を現在施されている被験体、老齢の個体、またはCD4ヘルパーT細胞が減少および／または損なわれている任意の個体も含まれる。本方法は、免疫障害被験体におけるCD4ヘルパーT細胞の量および／または活性を増強するのに用いることが意図される。

【0249】

標的抗原による感作

特定の実施形態では、形質導入された抗原提示細胞を投与する前に、これらの細胞を、抗原（本明細書ではまた、「標的抗原」とも称する）で感作する。感作した後で、形質導入されて負荷された抗原提示細胞を、被験体に、非経口投与、皮内投与、リンパ節内投与、またはリンパ内投与する。さらなる非経口経路には、皮下法、筋肉内法、腹腔内法、静脈内法、動脈内法、心筋内法、経心内膜法、経心外膜法、髄腔内法、前立腺内（intraprostatic）法、腫瘍内法、および注入法が含まれるがこれらに限定されない。本明細書で用いられる標的抗原とは、抗原またはこの抗原における免疫学的エピトープであり、これは、哺乳動物における疾患原因作用物質または疾患状に対する免疫認識および最終的な除去または制御において重要である。免疫認識は、細胞性の場合もあり、かつ／または体液性の場合もある。細胞内病原体および癌の場合、免疫認識は、例えば、Tリンパ球反応でありうる。

【0250】

標的抗原は、例えば、HIVウイルス（Korber et al., eds HIV Molecular Immunology Database, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, N. Mex. 1977）、インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス、ヒトパピローマウイルス（米国特許第5,719,054号）、B型肝炎ウイルス（米国特許第5,780,036号）、C型肝炎ウイルス（米国特許第5,709,995号）、EBVウイルス、サイトメガロウイルス（CMV）などを含めたウイルスなどの病原性微生物に由来する場合もあり、これらから単離される場合もある。標的抗原は、例えば、Chlamydia属種（米国特許第5,869,608号）、Mycobacteria属種、Legionella属種、Meningiococcus属種、A群Streptococcus属種、Salmonella属種、Listeria属種、Hemophilus influenzae（米国特許第5,955,596号）など、病原性細菌に由来する場合もあり、これらから単離される場合もある。

【0251】

標的抗原は、例えば、Aspergillus属種、侵襲性Candida属種（米国特許第5,645,992号）、Nocardia属種、Histoplasmosis属種、Cryptosporidia属種などを含めた、病原性酵母に由来する場合もあり、これらから単離される場合もある。

【0252】

標的抗原は、例えば、Pneumocystis carinii、Trypanosoma属種、Leishmania属種（米国特許第5,965,242号）、Plasmodium属種（米国特許第5,589,343号）、およびToxoplasma gondiiが含まれるがこれらに限定されない、病原性原虫および病原性寄生虫に由来する場合もあり、これらから単離される場合もある。

【0253】

標的抗原には、前新生物状態または過形成状態と関連する抗原が含まれる。標的抗原はまた、癌と関連する場合もあり、癌の原因となる場合もある。このような標的抗原は、例えば、腫瘍特異的抗原、腫瘍関連抗原（TAA）、または組織特異的抗原、これらのエピトープ、およびこれらのエピトープアゴニストでありうる。このような標的抗原には、癌

胎児性抗原 (CEA)、およびCAP-1、CAP-1-6Dなど、これらのエピトープ (GenBank受託番号第M29540号)、MART-1 (Kawakarni et al., J. Exp. Med. 180:347-352, 1994)、MAGE-1 (米国特許第5,750,395号)、MAGE-3、GAGE (米国特許第5,648,226号)、GP-100 (Kawakami et al Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91:6458-6462, 1992)、MUC-1、MUC-2、点突然変異させたras癌遺伝子、正常のp53癌遺伝子および点突然変異させたp53癌遺伝子 (Hollstein et al Nucleic Acids Res. 22:3551-3555, 1994)、PSMA (Israeli et al Cancer Res. 53:227-230, 1993)、チロシナーゼ (Kwon et al PNAS 84:7473-7477, 1987)、TRP-1 (gp75) (Cohen et al Nucleic Acid Res. 18:2807-2808, 1990; 米国特許第5,840,839号)、NY-ESO-1 (Chen et al PNAS 94:1914-1918, 1997)、TRP-2 (Jackson et al EMBOJ, 11:527-535, 1992)、TAG72、KSA、CA-125、PSA、HER-2/neu/c-erb/B2 (米国特許第5,550,214号)、BRC-I、BRC-II、bcr-abl、pax3-fkhr、ews-flt-1、TAAおよび組織特異的抗原の修飾体、TAAのスプライス変異体、エピトープアゴニストなどが含まれるがこれらに限定されない。他のTAAは、米国特許第4,514,506号において開示されている方法など、当技術分野において公知の方法により、同定、単離、およびクローニングすることができる。標的抗原にはまた、1以上の増殖因子、およびこれら各々のスプライス変異体も含まれる。抗原は、非癌細胞におけるより、癌細胞において発現されることが高頻度である。抗原は、修飾樹状細胞に、前立腺特異的膜抗原、例えば、前立腺特異的膜抗原 (PSMA) またはその断片を接触させる結果として生じうる。

【0254】

前立腺抗原 (PA001) とは、PSMA抗原の細胞外部分からなる組換えタンパク質である。PSMAは、約100kDa (グリコシル化の前には84kDaであり、二量体としては約180kDaである) のII型膜タンパク質で、ニューロペプチダーゼ活性および葉酸ヒドロラーゼ活性を伴うが、現在のところ、PSMAの真の機能は不明である (Carter RE, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 93:749-53, 1996; Israeli RS, et al., Cancer Res. 53:227-30, 1993; Pinto JT, et al., Clin Cancer Res. 2:1445-51, 1996)。

【0255】

発現は、大部分前立腺特異的であるが、もっぱら前立腺特異的であるというわけではなく、進行しておりかつホルモン不応性の疾患では維持される (Israeli RS, et al., Cancer Res. 54:1807-11, 1994)。前立腺以外の正常組織中における微量の検出はまた、唾液腺、脳、小腸、十二指腸粘膜、近位尿細管、および結腸陰窩の神経内分泌細胞においても見られる (Silver DA, et al., Clin Cancer Res. 3:81-5, 1997; Troyer JK, et al., Int J Cancer. 62:552-8, 1995)。さらに、PSMAは、アンドロゲン枯渇療法 (ADT) の後で上方制御される (Wright GL, Jr., et al., Urology. 48:326-34, 1996)。大半のPSMAが、細胞質内タンパク質として発現するのに対し、新生物性前立腺細胞の先端面では、代替的な形でスプライシングされた膜貫通形態が主要な形態である (Su SL, et al., Cancer Res. 55:1441-3, 1995; Israeli RS, et al., Cancer Res. 54:6306-10, 1994)。

【0256】

さらに、PSMAは、架橋形成後に内部化され、結合した抗体、または放射性核種もしくはウイルスおよび他の複合体高分子と複合体化させたリガンドを内部化させるのに用いられている(Liu H, et al., Cancer Res. 58: 4055-60, 1998; Freeman LM, et al., Q J Nucl Med. 46: 131-7, 2002; Kraaij R, et al., Prostate. 62: 253-9, 2005)。Banderらは、腫瘍を微小管阻害剤で前処理すると、異常な基底膜表面のターゲティングおよび抗体を介するPSMAの内部化が増大することを示した(Christiansen JJ, et al., Mol Cancer Ther. 4: 704-14, 2005)。腫瘍のターゲティングは、前立腺腫瘍だけでなく、腎臓腫瘍および他の腫瘍の腫瘍血管内皮細胞におけるPSMAの異所性発現を観察することにより容易とすることができる(Liu H, et al., Cancer Res. 57: 3629-34, 1997; Chang SS, et al., Urology. 57: 801-5, 2001; Chang SS, et al., Clin Cancer Res. 5: 2674-81, 1999)。

10

【0257】

PSMAは、対応する良性組織の血管内皮細胞では見出されない(de la Taille A, et al., Cancer Detect Prev. 24: 579-88, 2000)。転移性前立腺疾患について初期になされた1つの組織学的研究は、骨転移のうちでPSMAを発現したのは約50%(18例中の8例)に過ぎない(8例のうちの7例がリンパ節転移を有する)ことを示唆したが、PSMAの細胞外ドメインを標的とする、より感受性の高い試薬である、177Luで放射性標識したMoAbのJ591は、患者30例中の30例において、骨転移および軟組織転移について公知である全部位を標的とすることが可能であり、進行した前立腺疾患ではほぼ遍在的な発現が示唆された(Bander NH, et al., J Clin Oncol. 23: 4591-601, 2005)。

20

【0258】

前立腺特異的抗原またはPSAとは、PSA、例えば、PSMAに対する、例えば、細胞傷害性Tリンパ球反応などの免疫応答を誘導することが可能であり、任意の抗PSA抗体により特異的に認識されうる任意の抗原を包含することを意味する。従来の方法を用いてアッセイされる通り、本方法において用いられるPSAは、抗原提示細胞に負荷するのに用いることが可能である。したがって、「前立腺特異的抗原」または「PSA」とは、例えば、PSAの野生型のアミノ酸配列を有するタンパク質を指す場合もあり、PSAタンパク質の一部を包含するポリペプチドを指す場合もある。

30

【0259】

前立腺特異的膜抗原またはPSMAとは、PSMAに対して、例えば、細胞傷害性Tリンパ球反応などの免疫応答を誘導することが可能であり、抗PSMA抗体により特異的に認識されうる任意の抗原を包含することを意味する。従来の方法を用いてアッセイされる通り、本方法において用いられるPSMAは、抗原提示細胞に負荷するのに用いることが可能である。したがって、「前立腺特異的膜抗原」または「PSMA」とは、例えば、PSMAの野生型のアミノ酸配列を有するタンパク質を指す場合もあり、配列番号3もしくは配列番号3のヌクレオチド配列の一部によりコードされるPSMAタンパク質の一部、または配列番号4もしくはその一部のポリペプチドを有する、PSMAタンパク質の一部など、PSMAタンパク質の一部を包含するポリペプチドを指す場合もある。PSMAという用語はまた、例えば、配列番号4の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを指す場合もあり、PSMAに対して免疫応答を誘導しうる任意のペプチドも指す場合もある。また、例えば、置換および欠失を有する変異体を含め、前出のうちのいずれかの変異体も包含される。グリコシル化が野生型のPSMAとは異なるなど、翻訳後プロセッシングが野生型のPSMAとは示差的なタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドもまた、本方法にお

40

50

いて用いることができる。さらにまた、P S M Aに対して免疫応答を誘導することが可能である多様な糖分子も意図される。

【0260】

P S Aポリペプチド、例えば、P S M Aポリペプチドは、修飾抗原提示細胞に負荷するのに用いることができる。特定の実施形態では、修飾抗原提示細胞に、配列番号4のアミノ酸配列（例えば、配列番号3のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列）またはその断片を有するP S M Aポリペプチド断片を接触させる。一部の実施形態では、P S Aポリペプチド断片、例えば、P S M Aポリペプチド断片が、シグナルペプチド配列を包含しない。他の実施形態では、修飾抗原提示細胞に、ポリペプチド中にアミノ酸の置換または欠失を含むP S Aポリペプチド断片、例えば、P S M Aポリペプチド断片を接触させ、この断片が、抗原提示細胞に負荷するのに十分である。

10

【0261】

本明細書ではまた、前立腺特異的抗原またはP S Aとも称する、前立腺特異的タンパク質抗原またはP S P Aとは、前立腺特異的タンパク質抗原に対して、例えば、細胞傷害性Tリンパ球反応などの免疫応答を誘導することが可能な任意の抗原を包含することを意味する。P S P Aは、例えば、前立腺特異的タンパク質抗原または前立腺特異的抗原を包含する。従来の方法を用いてアッセイされる通り、本方法において用いられるP S P Aは、抗原提示細胞に負荷するのに用いることが可能である。前立腺特異的抗原またはP S Aとは、例えば、P S Aの野生型のアミノ酸配列を有するタンパク質を指す場合もあり、P S Aタンパク質の一部を包含するポリペプチドを指す場合もある。

20

【0262】

前立腺特異的膜抗原またはP S M Aとは、P S M Aに対して、例えば、細胞傷害性Tリンパ球反応などの免疫応答を誘導することが可能であり、抗P S M A抗体により特異的に認識されうる任意の抗原を包含することを意味する。従来の方法を用いてアッセイされる通り、本方法において用いられるP S M Aは、抗原提示細胞に負荷するのに用いることが可能である。したがって、「前立腺特異的膜抗原」または「P S M A」とは、例えば、P S M Aの野生型のアミノ酸配列を有するタンパク質を指す場合もあり、配列番号3もしくは配列番号3のヌクレオチド配列の一部によりコードされるP S M Aタンパク質の一部、または配列番号4もしくはその一部のポリペプチドを有する、P S M Aタンパク質の一部など、P S M Aタンパク質の一部を包含するポリペプチドを指す場合もある。P S M Aという用語はまた、例えば、配列番号4の一部のアミノ酸配列を有するペプチドを指す場合もあり、P S M Aに対して免疫応答を誘導しうる任意のペプチドも指す場合もある。また、例えば、置換および欠失を有する変異体を含め、前出のうちのいずれかの変異体も包含される。グリコシル化が野生型のP S M Aとは異なるなど、翻訳後プロセッシングが野生型のP S M Aとは示差的なタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドもまた、本方法において用いることができる。さらにまた、P S M Aに対して免疫応答を誘導することが可能である多様な糖分子も意図される。

30

【0263】

P S P Aポリペプチド、例えば、P S M Aポリペプチドは、修飾抗原提示細胞に負荷するのに用いることができる。特定の実施形態では、修飾抗原提示細胞に、配列番号4のアミノ酸配列（例えば、配列番号3のヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列）またはその断片を有するP S M Aポリペプチド断片を接触させる。一部の実施形態では、P S Aポリペプチド断片、例えば、P S M Aポリペプチド断片が、シグナルペプチド配列を包含しない。他の実施形態では、修飾抗原提示細胞に、ポリペプチド中にアミノ酸の置換または欠失を含むP S P Aポリペプチド断片、例えば、P S M Aポリペプチド断片を接触させ、この断片が、抗原提示細胞に負荷するのに十分である。

40

【0264】

腫瘍抗原とは、例えば、宿主において、腫瘍に対する免疫応答を誘発するペプチドまたはポリペプチドなど、任意の抗原である。腫瘍抗原は、新生物性腫瘍細胞と関連する、腫瘍関連抗原でありうる。

50

【0265】

前立腺癌抗原またはPCAとは、例えば、宿主において、前立腺癌腫瘍に対する免疫応答を誘発するペプチドまたはポリペプチドなど、任意の抗原である。前立腺癌抗原は、前立腺癌腫瘍に特異的な場合もあり、前立腺癌腫瘍に特異的でない場合もある。前立腺癌抗原はまた、他の種類の腫瘍または新生物性細胞に対する免疫応答も誘発しうる。前立腺癌抗原には、例えば、前立腺特異的タンパク質抗原、前立腺特異的抗原、および前立腺特異的膜抗原が含まれる。

【0266】

抗原提示細胞に、PSAポリペプチド、例えば、PSMAポリペプチドなどの腫瘍抗原を、例えば、未成熟DCを、未分化腫瘍溶解産物、MHC溶出ペプチド、腫瘍由来熱ショックタンパク質(HSP)、腫瘍関連抗原(TAA(ペプチドまたはタンパク質))でパルスするか、またはDCを、バルクの腫瘍mRNA、もしくはTAAをコードするmRNAでトランスフェクトすることを含めた各種の方法により接触させることができる(Gilboa, E. & Vieweg, J., Immunol Rev 199, 251-63 (2004); Gilboa, E, Nat Rev Cancer 4, 401-11 (2004)において総説されている)。

10

【0267】

DNAゲノムを含有する生物の場合は、標的抗原またはその対象の免疫学的エピトープをコードする遺伝子を、ゲノムDNAから単離する。RNAゲノムを伴う生物の場合は、所望の遺伝子を、ゲノムのcDNAコピーから単離することができる。ゲノムの制限マップが利用可能な場合は、対象の遺伝子を含有するDNA断片を、日常的な方法による制限エンドヌクレアーゼ消化を介して切断する。所望の遺伝子を既にクローニングしている場合には、遺伝子を、利用可能なクローンから容易に得ることができる。代替的に、遺伝子のDNA配列が公知である場合は、遺伝子を、デオキシリボ核酸を合成するための従来の技法のうちのいずれかにより合成することができる。

20

【0268】

例えば、対象の抗原をコードする遺伝子は、この遺伝子を細菌宿主へとクローニングすることにより増幅することができる。この目的には、各種の原核細胞クローニングベクターを用いることができる。例は、プラスミドpBR322、pUC、およびpEMBLである。

30

【0269】

少なくとも1つの標的抗原またはその免疫学的エピトープをコードする遺伝子を調製して、標準的な技法を介する、ウイルスによる組換えのためにデザインされたプラスミドベクターへと挿入することができる。一般に、クローニングされた遺伝子は、原核細胞クローニングベクターから、制限酵素消化により切り出すことができる。大半の場合、切り出された断片は、遺伝子の全コード領域を含有する。クローニングされた遺伝子を保有するDNA断片は、必要に応じて修飾し、例えば、その末端を、ウイルスによる組換えに用いられるDNAベクターの挿入部位と適合性にし、次いで、これらを精製してから、制限エンドヌクレアーゼによる切断部位(クローニング部位)においてベクターに挿入することができる。

40

【0270】

例えば、樹状細胞などの抗原提示細胞に対する抗原のローディングは、例えば、樹状細胞または前駆細胞などの抗原提示細胞に、例えば、抗原を接触させることにより、例えば、これらの細胞を抗原と共にインキュベートすることにより達成することができる。ローディングはまた、例えば、抗原をコードするDNA(ネイキッドDNAまたはプラスミドベクター内のDNA)もしくはRNAをインキュベートすることにより、または抗原を発現する組換え細菌もしくはウイルス(例えば、牛痘ウイルスベクター、鶏痘ウイルスベクター、アデノウイルスベクター、またはレンチウイルスベクター)と共にインキュベートすることによっても達成することができる。ローディングの前に、抗原を、T細胞による支援をもたらす免疫パートナー(例えば、坦体分子)に共有結合的にコンジュゲートする

50

ことができる。代替的に、樹状細胞を、非コンジュゲート免疫パートナーで、個別に、またはポリペプチドの存在下においてパルスすることもできる。細胞またはMHC分子に由来する抗原は、酸溶出法または他の方法により得ることができる（Zitvogel L, et al., J Exp Med 1996, 183:87-97を参照されたい）。抗原提示細胞は、本方法によるキメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列で、これらの細胞に抗原を負荷する前に形質導入またはトランスフェクトすることもでき、抗原を負荷した後に形質導入またはトランスフェクトすることもでき、抗原を負荷すると同時に形質導入またはトランスフェクトすることもできる。特定の実施形態では、抗原のローディングが、形質導入またはトランスフェクションに後続する。

【0271】

10

さらなる実施形態では、形質導入された抗原提示細胞を、腫瘍細胞のmRNAでトランスフェクトする。形質導入およびトランスフェクトされた抗原提示細胞を、動物に投与し、細胞傷害性Tリンパ球およびナチュラルキラー細胞による抗腫瘍抗原免疫応答を生じさせ、二量体FK506および二量体FK506類似体を用いてこれらを制御する。腫瘍細胞のmRNAは、例えば、前立腺腫瘍細胞に由来するmRNAでありうる。

【0272】

一部の実施形態では、形質導入された抗原提示細胞に、腫瘍細胞溶解産物でパルスすることにより負荷することができる。パルスされた形質導入抗原提示細胞を、動物に投与し、細胞傷害性Tリンパ球およびナチュラルキラー細胞による抗腫瘍抗原免疫応答を生じさせ、二量体FK506および二量体FK506類似体を用いてこれらを制御する。腫瘍細胞の溶解産物は、例えば、前立腺腫瘍細胞の溶解産物でありうる。

20

【0273】

免疫細胞および細胞傷害性Tリンパ球による反応

Tリンパ球を、これらに本明細書で論じた発現ベクターを含む抗原提示細胞であって、抗原で感作されるか、トランスフェクトされるか、パルスされるか、または抗原を電気細胞融合させた抗原提示細胞を接触させることにより活性化させることができる。

【0274】

T細胞は、それらの膜において、固有の抗原結合受容体（T細胞受容体）を発現するが、この受容体が認識できるのは、他の細胞の表面において主要組織適合性複合体（MHC）分子と会合した抗原だけである。ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞など、いくつかのT細胞集団が存在する。ヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞は、それぞれ、それらが提示する膜結合糖タンパク質であるCD4およびCD8により主に識別される。ヘルパーT細胞は、B細胞、細胞傷害性T細胞、マクロファージ、および免疫系の他の細胞を活性化するのに重要である多様なリンホカインを分泌する。これに対し、抗原-MHC複合体を認識するナイーブCD8⁺T細胞は、増殖し、細胞傷害性CD8⁺Tリンパ球（CTL）と称するエフェクター細胞へと分化する。CTLは、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞など、抗原を提示する体内の細胞を、細胞の溶解を結果としてもたらす物質を生成させることにより消失させる。

30

【0275】

CTL活性は、例えば、本明細書で論じられる方法により評価することができる。例えば、CTLは、単離されたばかりの末梢血単核細胞（PBMC）において評価することもでき、PBMCから確立されたフィットヘマグルチニン刺激IL-2増殖細胞系（Bernard et al., AIDS, 12(16):2125-2139, 1998）において評価することもでき、以前免疫化された被験体から単離されたT細胞であって、4時間にわたる標準的な51Cr放出によるマイクロ毒性アッセイを用いて、抗原を含有するアデノウイルスベクターを感染させたDCにより6日間にわたり再刺激されたT細胞により評価することもできる。アッセイの1つの種類は、クローニングされたT細胞を用いる。クローニングされたT細胞が、ペルフォリン依存性殺滅およびFasリガンド依存性殺滅の両方を媒介するそれらの能力について、再指向化細胞傷害性アッセイにおいて調べられている（Simpson et al., Gastroenterology

40

50

， 115（4）：849－855， 1998）。クローニングされた細胞傷害性Tリンパ球は、Fas依存性殺滅およびペルフォリン依存性殺滅の両方を示した。近年になって、*in vitro*におけるデヒドロゲナーゼ放出アッセイであって、新規の蛍光増幅系を利用するアッセイが開発された（Page, B., et al., *Anticancer Res.* 1998 Jul-Aug; 18（4A）：2313－6）。この手法は、高感度、迅速、および再現可能であり、混合リンパ球反応（MLR）に用いると有利でありうる。この手法を、細胞膜の完全性を用いる大規模な細胞傷害性試験のためにさらに自動化することは容易に可能であり、したがって、これが考慮される。細胞介在性細胞傷害作用を検出するのに開発された別の蛍光測定アッセイでは、用いられるフルオロフォアが、非毒性分子のAlamarBlueである（Nociari et al., *J. Immunol. Methods*, 213（2）：157－167， 1998）。AlamarBlueは、ミトコンドリアにおいて還元が生じるまでは蛍光が消光されている（すなわち、量子収量が低い）が、次いで、AlamarBlueの蛍光強度は劇的に上昇する（すなわち、量子収量が増大する）。このアッセイは、極めて高感度で、特異的であり、必要とするエフェクター細胞の数が標準的な⁵¹Cr放出アッセイより著明に少ないことが報告されている。

【0276】

本方法により誘導されうる他の免疫細胞には、ナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。NKは、抗原特異的受容体を欠くリンパ球であり、自然免疫系の一部である。感染細胞は通常、細胞表面のMHCに結合した外来粒子により警告されたT細胞により破壊される。しかし、ウイルスに感染した細胞は、感染シグナルを、抗体により認識されるウイルスタンパク質を発現することにより発する。これらの細胞は、NKにより殺滅されうる。腫瘍細胞では、腫瘍細胞がMHC I分子を発現しなくなると、NKに対して感受性となる可能性がある。

【0277】

製剤および患者への投与経路

臨床適用を意図する場合は、医薬組成物（発現構築物、発現ベクター、融合タンパク質、形質導入細胞、活性化DC、形質導入および負荷されたDC）を、意図される適用に適切な形態で調製することが必要となる。一般に、これは、ヒトまたは動物に有害となりうる発熱物質ならびに他の不純物を本質的に含まない組成物を調製するステップを伴う。

【0278】

一般に、送達ベクターを安定的とし、標的細胞による取込みを可能とするのに適切な塩および緩衝液を用いることが所望される。組換え細胞を患者に導入する場合はまた、緩衝液も用いることができる。水性組成物は、細胞に対して有効量のベクターであって、薬学的に許容される担体または水性媒体中に溶解または分散させたベクターを含む。このような組成物はまた、接種物とも称される。「薬学的または薬理学的に許容される」という語句は、動物またはヒトに投与する場合、有害反応、アレルギー反応、または他の望ましくない反応をもたらさない分子実体および組成物を指す。薬学的に許容される担体には、任意および全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。薬学的に活性な物質に応じたこのような媒体および薬剤の使用は公知である。任意の従来の媒体または薬剤がベクターまたは細胞と不適合である場合を除き、治療用組成物におけるその使用が意図される。組成物にはまた、補充有効成分も組み込むことができる。

【0279】

活性組成物は、古典的な医薬調製物を包含しうる。これらの組成物の投与は、標的組織がこの経路を介して利用可能である限りにおいて、任意の一般的な経路を介する。これには、例えば、経口経路、鼻腔内経路、口腔内経路、直腸内経路、膣内経路、または局所経路が含まれる。代替的に、投与は、正所注射、皮内注射、皮下注射、筋肉内注射、腹腔内注射、または静脈内注射を介することも可能である。このような組成物は通常、本明細書で論じられる、薬学的に許容される組成物として投与される。

【0280】

注射用に適する医薬形態には、滅菌水溶液または滅菌分散液、および滅菌注射用溶液または滅菌注射用分散液を即席で調製するための滅菌粉末が含まれる。全ての場合において、医薬形態は滅菌形態であり、容易なシリンジ注入が可能である程度に流体形態である。医薬形態は、製造条件下および保存条件下において安定であり、細菌および真菌など、微生物の汚染作用に対して保護されている。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体のポリエチレングリコールなど）、これらの適切な混合物、および植物油を含有する溶媒または分散媒でありうる。適正な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングを用いることにより、分散液の場合には必要とされる粒子サイズを維持することにより、および界面活性剤を用いることにより維持することができる。微生物作用の防止は、各種の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによりもたらしうることができる。特定の例では、等張剤、例えば、糖または塩化ナトリウムを組み入れることができる。注射用組成物の遅延吸収は、組成物において、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを用いることによりもたらしうることができる。

10

【0281】

経口投与の場合、組成物には、賦形剤を組み込むことができ、内服用ではない口腔洗浄剤および歯磨剤の形態で用いることができる。口腔洗浄剤は、ホウ酸ナトリウム溶液（ドーベル液）などの適切な溶媒中に必要量で有効成分を組み込んで調製することができる。代替的に、ホウ酸ナトリウム、グリセリン、および重炭酸カリウムを含有する消毒洗浄剤中に有効成分を組み込むこともできる。有効成分はまた、例えば、ゲル、ペースト、粉末、およびスラリーを含めた歯磨剤中に分散させることもできる。有効成分は、例えば、水、結合剤、研磨剤、芳香剤、発泡剤、および保湿剤を含みうるペースト状の歯磨剤に、治療有効量で添加することができる。

20

【0282】

組成物は、中性形態で調合することもでき、塩形態で調合することもできる。薬学的に許容される塩には、例えば、酸添加塩（タンパク質の遊離アミノ基により形成される）が含まれ、これらは、例えば、塩酸もしくはリン酸などの無機塩、または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機塩により形成される。遊離カルボキシル基により形成される塩はまた、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、およびイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基にも由来しうる。

30

【0283】

調合されると、溶液は、投与処方と適合的な形および治療的有效量で投与される。製剤は、注射用溶液、薬物放出カプセルなど、多様な剤形で容易に投与される。例えば、水溶液により非経口投与する場合、溶液は、必要に応じて適切な形で緩衝処理することができる。液体の希釈剤は、まず、十分な生理食塩液またはグルコースで等張とする。これらの特定の水溶液は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、および腹腔内投与にとりわけ適する。この関連で、滅菌水性媒体を用いることができる。例えば、1回分の用量であれば、1 ml の等張性 NaCl 溶液中に溶解させることができ、1000 ml の皮下注入液に添加することもでき、提起される注入部位に注射することもできるであろう（例えば、"Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580を参照されたい）。処置される被験体の状態に応じて、ある程度の用量の変化が必然的に生じることになる。投与の責任者は、いずれにせよ、個別の被験体に適切な用量を決定することになる。さらに、ヒトに投与する場合、調製物は、FDA Office of Biologics 基準により要求される無菌性基準、発熱物質性基準、および一般的な安全性基準および純度基準を満たしうる。

40

【0284】

50

投与スケジュールは、患者に応じて決定することができ、例えば、細胞を0週間目に投与した後、化学二量体化誘導剤の投与を介する誘導に続き、その後、さらなる細胞および誘導剤を、2週間間隔で、例えば、合計2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、または30週間にわたり投与する投与スケジュールを含む。

【0285】

他の投与スケジュールには、例えば、1用量の細胞を投与し、1用量の誘導剤を投与するスケジュールが含まれる。別の例では、投与スケジュールが、細胞および誘導剤を0週間目に投与した後、さらなる細胞および誘導剤を、4週間間隔で、例えば、合計4、8、12、16、20、24、28、または32週間にわたり投与することを含むうる。

10

【0286】

1用量の細胞の投与は、1回のセッションで行う場合もあり、複数回のセッションで行う場合もあるが、用量という用語は、リガンドを投与する前に投与される細胞の総量を指す場合がある。

【0287】

必要な場合、方法は、処置で用いられるより多くの細胞を得るためのさらなる白血球除去療法をさらに包含しうる。

【0288】

疾患を処置する方法

本方法はまた、病原性微生物により引き起こされる疾患および／または過剰増殖性疾患を処置または予防する方法も包含する。

20

【0289】

処置または予防されうる疾患には、ウイルス、細菌、酵母、寄生虫、原虫、癌細胞などにより引き起こされる疾患が含まれる。医薬組成物（形質導入されたDC、発現ベクター、発現構築物など）を、一般的な免疫増強剤（DC活性化組成物またはDC活性化系）として用いることができ、これ自体、疾患の処置において有用である。処置および／または予防されうる例示的な疾患には、HIV、インフルエンザ、ヘルペス、ウイルス性肝炎、エプスタインバーウイルス性疾患、ポリオウイルス性疾患、ウイルス性脳炎、風疹、鶏痘、パピローマウイルス性疾患など、ウイルス性病因による感染症、肺炎、結核、梅毒など、細菌性病因による感染症、またはマラリア、トリパノゾーマ病、リーシュマニア症、トリコモナス症、アメーバ症など、寄生虫性病因による感染症が含まれるがこれらに限定されない。

30

【0290】

医薬組成物（形質導入されたDC、発現ベクター、発現構築物など）を用いて処置または予防されうる前新生物性状態または過形成状態には、結腸ポリープ、クローン病、潰瘍性大腸炎、乳房病変などの前新生物性状態または過形成状態が含まれるがこれらに限定されない。

【0291】

医薬組成物を用いて処置されうる、固形腫瘍を含めた癌には、原発性または転移性の黒色腫、腺癌種、扁平上皮細胞癌腫、腺扁平上皮細胞癌腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌、結腸癌、多発性骨髄腫、神経芽腫、NPC、膀胱癌、子宮頸癌などが含まれるがこれらに限定されない。

40

【0292】

本明細書で提示されるDC活性化系を用いて処置されうる、固形腫瘍を含めた他の過剰増殖性疾患には、関節リウマチ、炎症性腸疾患、骨関節炎、平滑筋腫、腺腫、脂肪腫、血管腫、線維腫、血管閉塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化、前新生物性病変（腺腫性過形成および前立腺上皮内新生物など）、*in situ*における癌腫、口腔内毛様白斑症、または乾癬が含まれるがこれらに限定されない。処置方法では、医薬組成物（発現構築物、発現ベクター、融合タンパク質、形質導入細胞、活性化DC、形質導入および負荷した

50

DC)の投与が、「予防」を目的とする場合もあり、「治療」を目的とする場合もある。予防的に施される場合、医薬組成物は、任意の症状に先立って施される。医薬組成物の予防的投与は、その後における任意の感染症または疾患を予防または改善するのに用いられる。治療的に施される場合、医薬組成物は、感染症または疾患の症状の開始時または開始後において施される。したがって、本明細書で提示される組成物は、予期される疾患原因作用物質または疾患状態への曝露の前に施すこともでき、感染症または疾患の発症後に施すこともできる。

【0293】

本方法を用いて、任意の組織または器官に由来する固形腫瘍であって、例えば、血管系においてPSA、例えば、PSMAを発現する任意の腫瘍、例えば、固形腫瘍であり、例えば、肺、骨、肝臓、前立腺、または脳に存在し、ならびにまた、例えば、乳房、卵巣、腸、精巣、結腸、膵臓、腎臓、膀胱、神経内分泌系、軟部組織、骨状塊(boney mass)、およびリンパ系にも存在する固形腫瘍を含めた固形腫瘍を処置することができる。処置されうる他の固形腫瘍には、例えば、神経膠芽腫および悪性骨髄腫が含まれる。

【0294】

接種物に関する場合の「単位用量」という用語は、単位用量として哺乳動物に適する物理的な個別単位であって、各単位が、必要とされる希釈剤との関連で所望の免疫効果をもたらすように計算された所定量の医薬組成物を含有する単位を指す。接種物の単位用量についての規格は、医薬組成物の固有の特徴、および達成される特定の免疫効果により決定され、これに依存する。

【0295】

医薬組成物の有効量は、免疫応答を増強するという選択された結果を達成する量であり、このような量を決定することができるであろう。例えば、免疫系の欠損を処置するのに有効な量は、免疫系を活性化させ、その結果、抗原に曝露されたときに抗原特異的な免疫応答を発生させるのに必要な量でありうるであろう。この用語はまた、「十分量」とも同義である。

【0296】

任意の特定の適用に有効な量は、処置される疾患もしくは状態、投与される具体的な組成物、被験体の体格、および／または疾患もしくは状態の重症度などの因子に依存して変化しうる。本明細書で提示される特定の組成物の有効量は、不要な実験を必要とすることなく、経験的に決定することができる。

【0297】

A. 遺伝子ベースの療法

特定の実施形態では、細胞に、抗原提示細胞などの細胞にCD40などの共刺激ポリペプチドを供給し、CD40を活性化させることが可能な発現構築物を施す。発現ベクターおよびそこで用いられる遺伝子エレメントについての詳細な議論が、参照により本節に組み込まれる。特定の例では、発現ベクターが、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、牛痘ウイルスベクター、およびレトロウイルスベクターなどのウイルスベクターでありうる。別の例では、ベクターが、リソソームに封入された発現ベクターでありうる。遺伝子送達は、in vivo状況およびex vivo状況のいずれにおいても実施することができる。ウイルスベクターの場合は一般に、ウイルスベクター株を調製することができる。本出願では、ex vivoおよびin vivoにおける、ウイルスベクターを介する遺伝子送達の例が提示される。in vivoにおける送達の場合は、ウイルスの種類および達成可能な力価に応じて、例えば、約1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9×10^4 個、1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9×10^5 個、1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9×10^6 個、1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9×10^7 個、1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9×10^8 個、1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9×10^9 個、1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9×10^{10} 個、1、2、3、4、5、6、7、8、もしくは 9×10^{11} 個、または1、2、3、4、5、6、7、8、もし

10

20

30

40

50

くは 9×10^{12} 個の感染性粒子を患者に送達する。同様の数値を、リポソーム製剤または他の非ウイルス製剤についても、相対的な取込み効率を比較することにより外挿することができる。以下では、薬学的に許容される組成物としての製剤について論じる。例えば、AP1903などの多量体リガンドは、例えば、被験体の体重1kg当たり約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、6、7、8、9、または10mgの用量で送達することができる。

【0298】

B. 細胞ベースの療法

意図される別の療法は、形質導入された抗原提示細胞の投与である。抗原提示細胞は、*in vitro*において形質導入することができる。本明細書では、薬学的に許容される組成物としての製剤について論じる。

【0299】

細胞ベースの療法では、形質導入された抗原提示細胞を、例えば、mRNAもしくはDNAなどの標的抗原核酸、またはタンパク質でトランスフェクトすることもでき、細胞溶解産物、タンパク質、または核酸でパルスすることもでき、細胞を電気細胞融合させることもできる。細胞、タンパク質、細胞溶解産物、または核酸は、腫瘍細胞などの細胞に由来する場合もあり、例えば、ウイルス、細菌、原虫など、他の病原性微生物に由来する場合もある。

【0300】

C. 組合せ療法

本明細書で提示される発現ベクターの有効性を増大させるには、これらの組成物および方法を、疾患の処置において有効な薬剤と組み合わせることが所望でありうる。

【0301】

特定の実施形態では、抗癌剤を、本方法と組み合わせて用いることができる。「抗癌」剤は、例えば、1以上の癌細胞を死滅させることにより、1以上の癌細胞においてアポトーシスを誘導することにより、1以上の癌細胞の増殖速度を低減することにより、転移の発生または数を低減することにより、腫瘍サイズを縮小させることにより、腫瘍成長を阻害することにより、腫瘍または1もしくは複数の癌細胞への血液供給を低減することにより、1もしくは複数の癌細胞または腫瘍に対する免疫応答を促進することにより、癌の進行を防止するか、または癌の進行を阻害することにより、あるいは癌を伴う被験体の生存期間を延長することにより、被験体における癌に負の影響を及ぼすことが可能である。抗癌剤には、例えば、化学療法剤（化学療法）、放射線療法剤（放射線療法）、手術手順（手術）、免疫療法剤（免疫療法）、遺伝子治療剤（遺伝子治療）、ホルモン療法、他の生物学的薬剤（生物療法）、および／または代替的な療法が含まれる。

【0302】

さらなる実施形態では、抗生剤を、医薬組成物と組み合わせて用いて、感染性疾患を処置および／または予防することもできる。このような抗生剤には、アミカシン、アミノグリコシド（例えば、ゲンタマイシン）、アモキシシリン、アンフォテリシンB、アンピシリン、アンチモン剤、アトバクオン、スチボグルコン酸ナトリウム、アジトロマイシン、カプレオマイシン、セフォタキシム、セフォキシチン、セフトリアキソン、クロラムフェニコール、クラリトロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、シクロセリン、ダプソン、ドキシシクリン、エタンブトール、エチオナミド、フルコナゾール、フルオロキノロン、イソニアジド、イトラコナゾール、カナマイシン、ケトコナゾール、ミノサイクリン、オフロキサシン、パラアミノサリチル酸、ペンタミジン、ポリミキシン、デフィンシン、プロチオナミド、ピラジナミド、ピリメタミン、スルファジアジン、キノロン（例えば、シプロフロキサシン）、リファブチン、リファンピン、スパルフロキサシン、ストレプトマイシン、スルホンアミド、テトラサイクリン、チアセタゾン、トリメタプリムスルファメトキサゾール、バイオマイシン、またはこれらの組合せが含まれるがこれらに限定されない。より一般的には、このような薬剤を、癌細胞および／または微生物の増殖

を死滅させるかまたは阻害するのに有効な発現ベクターとの組合せ量で施す。この過程は、細胞（複数可）に、薬剤（複数可）および医薬組成物を、同時に接触させるステップを伴う場合もあり、細胞（複数可）に、薬剤（複数可）および医薬組成物を、ある期間内に接触させるステップであって、医薬組成物および薬剤を細胞、組織、または生物に個別に投与することにより、所望の治療的利益がもたらされるステップを伴う場合もある。これは、細胞、組織、または生物に、単一の組成物、または医薬組成物および1もしくは複数の薬剤の両方を包含する医薬製剤を接触させることにより達成することもでき、細胞に、2つ以上の異なる組成物または製剤であって、一方の組成物が医薬組成物を包含し、他方の組成物が1以上の薬剤を包含する組成物または製剤を接触させることにより達成することもできる。

10

【0303】

本明細書では、細胞、組織、または生物に対して適用される場合の「接触」および「曝露」という用語を、医薬組成物および／または、例えば、化学療法剤もしくは放射線療法剤など、別の薬剤を、標的細胞、標的組織、または標的生物に送達するか、あるいは標的細胞、標的組織、または標的生物と直接的に並置する過程を説明するのに用いる。細胞の殺滅または静穏化を達成するには、医薬組成物および／またはさらなる薬剤（複数可）を、細胞（複数可）を死滅させるか、または細胞（複数可）が分裂することを防止するのに有効な組合せ量で、1以上の細胞に送達する。医薬組成物の投与は、数分間～数週間の範囲の間隔で、他の薬剤（複数可）に先立って行われる場合もあり、他の薬剤（複数可）と共時的に行われる場合もあり、かつ／または他の薬剤（複数可）の後で行われる場合もある。医薬組成物および他の薬剤（複数可）を、細胞、組織、または生物に個別に適用する実施形態では一般に、医薬組成物および薬剤（複数可）が、細胞、組織、または生物に対して有利な組合せ効果を及ぼすことがな可能であるように、各送達時点の間にそれほどの時間が費やされないことを確保することになる。例えば、このような場合には、細胞、組織、または生物に、2つ、3つ、4つ以上のモダリティーを、医薬組成物と実質的に同時に（すなわち、約1分間以内に）接触させることができることが意図される。他の態様では、1以上の薬剤を、発現ベクターを投与するのと実質的に同時に、発現ベクターを投与する前の約1分間～約24時間、約7日間、約1～約8週間以上、およびこの範囲内で導出しうる任意の範囲以内に、ならびに／または発現ベクターを投与した後の約1分間～約24時間、約7日間、約1～約8週間以上、およびこの範囲内で導出しうる任意の範囲以内に投与することができる。さらにまた、本明細書で提示される医薬組成物、および1以上の薬剤による、各種の組合せレジメンも用いることができる。

20

30

【0304】

一部の実施形態では、化学療法剤が、Taxotere（ドセタキセル）の場合もあり、例えば、カバジタキセルなど、別のタキサンの場合もある。化学療法剤は、活性化樹状細胞および誘導剤による処置の前に投与することもでき、活性化樹状細胞および誘導剤による処置時において投与することもでき、活性化樹状細胞および誘導剤による処置の後に投与することもできる。例えば、化学療法剤は、初回用量の活性化樹状細胞を投与する約1年間、11、10、9、8、7、6、5、もしくは4カ月間前、または18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2週間、もしくは1週間前に投与することができる。あるいは、例えば、化学療法剤は、初回用量の活性化樹状細胞を投与した約1週間または2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、もしくは18週間後、または4、5、6、7、8、9、10、もしくは11カ月後、または1年間後に投与することもできる。

40

【0305】

化学療法剤の投与は、複数の化学療法剤の投与を含みうる。例えば、Taxotere、または、例えば、カバジタキセルなど、他のタキサンに加えて、シスプラチンも投与することができる。

【0306】

治療的処置の最適化およびカスタマイズ

50

例えば、前立腺癌を含めた固形腫瘍の処置は、処置期間中の I L - 6 濃度、I L 6 - s R 濃度、または V C A M - 1 濃度を決定することにより最適化することができる。I L - 6 とは、インターロイキン 6 を指す。I L - 6 s R とは、I L - 6 の可溶性受容体を指し、そのレベルは、I L - 6 レベルと緊密に相関することが多い。V C A M - 1 とは、血管細胞接着分子を指す。癌の病期または種類を異にする異なる患者は、各種の療法に対する反応も異なりうる。処置に対する反応は、各種の体液または組織における I L - 6、I L - 6 s R、または V C A M - 1 の濃度またはレベルを追跡することによりモニタリングすることができる。I L - 6、I L - 6 s R、または V C A M - 1 などのポリペプチドの濃度、レベル、または量の決定は、全長ポリペプチド、またはそれらの断片もしくは変異体の検出を包含しうる。断片または変異体は、例えば、免疫学的方法、質量分析、核酸ハイブリダイゼーションなどを介する検出に十分でありうる。個別の患者に応じて処置を最適化することにより、過剰投与の結果としての副作用を回避する一助とすることもでき、処置が効果的でない場合を決定し、処置のコースを変化させる一助とすることもでき、用量を増大させうる場合を決定する一助とすることもできる。本明細書で論じられる技法は、臨床医が、例えば、I L - 6、I L - 6 s R、または V C A M - 1 などのバイオマーカーを追跡し、被験体に投与される薬物またはワクチンの後続用量を維持しうるか、低減しうるか、または増大させうるかどうかを決定し、後続用量のタイミングを決定することを可能とすることにより、固形腫瘍癌を治療するための療法を最適化する。

10

【0307】

例えば、前立腺癌を含めた固形腫瘍癌の処置はまた、処置期間におけるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター受容体 (u P A R)、肝細胞増殖因子 (H G F)、上皮細胞増殖因子 (E G F)、または血管内皮細胞増殖因子 (V E G F) の濃度を決定することによっても最適化することができる。癌の病期または種類を異にする異なる患者は、各種の療法に対する反応も異なりうる。図 5 4 は、被験者 1 0 0 3 の処置期間にわたる、u P A R、H G F、E G F、および V E G F のレベルを示す。被験者 1 0 0 3 は、全身の血清において低酸素因子の摂動を示すが、これは、処置に対する陽性の反応を示すものでありうる。この観察の解釈を限定することなく述べると、これは、処置に反応した腫瘍による低酸素因子の分泌を示しうる。したがって、処置に対する反応は、例えば、各種の体液または組織における u P A R、H G F、E G F、または V E G F の濃度またはレベルを追跡することによりモニタリングすることができる。u P A R、H G F、E G F、または V E G F などのポリペプチドの濃度、レベル、または量の決定は、全長ポリペプチド、またはそれらの断片もしくは変異体の検出を包含しうる。断片または変異体は、例えば、免疫学的方法、質量分析、核酸ハイブリダイゼーションなどを介する検出に十分でありうる。個別の患者に応じて処置を最適化することにより、過剰投与の結果としての副作用を回避する一助とすることもでき、処置が効果的でない場合を決定し、処置のコースを変化させる一助とすることもでき、用量を増大させうる場合を決定する一助とすることもできる。本明細書で論じられる技法は、臨床医が、例えば、u P A R、H G F、E G F、または V E G F などのバイオマーカーを追跡し、被験体に投与される薬物またはワクチンの後続用量を維持しうるか、低減しうるか、または増大させうるかどうかを決定し、後続用量のタイミングを決定することを可能とすることにより、固形腫瘍癌を処置するための治療法を最適化する。

20

30

40

【0308】

例えば、特定のバイオマーカーの量または濃度は、固形腫瘍の処置期間において変化することが決定されている。このようなバイオマーカーの所定の標的レベル、またはバイオマーカーの閾値を、正常の被験体において同定することができ、これらが提示されれば、臨床医が、例えば、前立腺腫瘍などの固形腫瘍を伴う被験体など、それを必要とする被験体に投与される薬物の後続用量を、増大させうるか、低減しうるか、または維持しうるかどうかを決定することが可能となる。特定の実施形態では、臨床医が、このような決定を、バイオマーカーの存在、非存在、または量が、それぞれ、バイオマーカーの閾値未満であるか、閾値を超えるか、または閾値とほぼ同じであるかどうかに基づき行うことができ

50

る。

【0309】

例えば、薬物処置またはワクチン接種の後に、過剰表出されたバイオマーカーレベルが著明に低下し、かつ／または過小表出されたバイオマーカーレベルが著明に上昇することを決定することにより、臨床医に、投与された薬物が治療効果を及ぼしつつあることが示される。「レベル」とは、体液もしくは組織におけるバイオマーカーの濃度、または組織における絶対量を意味する。このようなバイオマーカーの決定に基づけば、臨床医は、投与のタイミングを変更することを含め、後続の薬物用量を維持するか、または後続の用量を増大させるかもしくは低減する決定をなしうるであろう。「薬物」という用語は、低分子など、従来の医薬のほか、核酸、抗体、タンパク質、ポリペプチド、改変細胞などの生物学的薬剤も包含する。別の例では、過剰表出されたバイオマーカーレベルがそれほど低下せず、かつ／または過小表出されたバイオマーカーレベルがそれほど上昇しないことを決定することにより、臨床医に、投与された薬物が治療効果をそれほどは及ぼしつつあるわけではないことが示される。このようなバイオマーカーの決定に基づけば、臨床医は、薬物の後続用量を増大させる決定をなしうるであろう。薬物が被験体に毒性であり、副作用を及ぼす可能性があることを踏まえると、本明細書で提供される方法は、臨床医に、薬物の効果的な用量を「ダイアルイン」し、副作用を最小化する能力を与えるので、処置方法を最適化する。特定の例では、本明細書で提供される方法が、臨床医に、薬物用量を治療的に効果的なレベルまで「ダイアルアップ」することを可能とするが、この場合、このダイアルアップされた用量は、毒性閾値レベル未満である。したがって、本明細書で論じられる処置方法は、有効性を増強し、毒性副作用の可能性を低下させる。

10

20

【0310】

サイトカインとは、多様な起源の細胞により全身で広く生成する多様なポリペプチド制御因子の一大ファミリーである。サイトカインとは、免疫、炎症、および造血作用を媒介および制御する、ペプチドおよび糖タンパク質を含めた、低分子の分泌タンパク質である。サイトカインは、免疫刺激に応答して、新たに生成する。サイトカインは一般に（いつもとは限らないが）、短い距離および短い時間間隔にわたり、低濃度で作用する。サイトカインは一般に、特異的な膜受容体に結合し、次いで、これらが、チロシンキナーゼであることが多い第2のメッセンジャーを介して細胞にシグナル伝達して、細胞の挙動（例えば、遺伝子の発現）を変化させることにより作用する。サイトカインに対する応答には、例えば、膜タンパク質（サイトカイン受容体を含めた）の発現を増大または減少させること、エフェクター分子の増殖および分泌が含まれる。

30

【0311】

「サイトカイン」という用語は、タンパク質および糖タンパク質の一大ファミリーについての一般的な説明である。他の名称には、リンホカイン（リンパ球により作製されるサイトカイン）、モノカイン（単球により作製されるサイトカイン）、ケモカイン（走化活性を伴うサイトカイン）、およびインターロイキン（1つの白血球により作製され、他の白血球に作用するサイトカイン）が含まれる。サイトカインは、それらを分泌する細胞に作用する場合（自己分泌作用）もあり、近接する細胞に作用する場合（傍分泌作用）もあり、場合によっては、遠隔の細胞に作用する場合（内分泌作用）もある。

40

【0312】

サイトカインの例には、インターロイキン（例えば、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18など）、インターフェロン（例えば、IFN-ベータ、IFN-ガンマなど）、腫瘍壊死因子（例えば、TNF-アルファ、TNF-ベータなど）、リンホカイン、モノカイン、およびケモカイン、増殖因子（例えば、形質転換増殖因子（例えば、TGF-アルファ、TGF-ベータなど）、コロニー刺激因子（例えば、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）など）などが含まれるがこれらに限定されない。

【0313】

50

サイトカインは、細胞表面受容体の対応物を介して作用することが多い。次いで、後続の細胞内シグナル伝達カスケードにより、細胞機能が変化する。このシグナル伝達には、他のサイトカインの生成、他の分子の表面受容体の数の増大、またはフィードバック阻害によるそれら自身の作用の抑制を結果としてもたらす、複数の遺伝子およびそれらの転写因子の上方制御および／または下方制御が含まれる。

【0314】

VCAM-1（血管細胞接着分子1であり、また、CD106とも称する）は、6つまたは7つの免疫グロブリンドメインを含有し、内皮細胞がサイトカインにより刺激された後に限り、大血管および小血管の両方において発現する。したがって、VCAM-1の発現は、サイトカイン発現のマーカーである。

10

【0315】

サイトカインは、全長（例えば、全）タンパク質、全長（例えば、全）ポリペプチド、全長（例えば、全）代謝物、全長（例えば、全）メッセンジャーRNA（mRNA）、全長（例えば、全）相補性DNA（cDNA）、ならびに前出の多様な中間体生成物および断片（例えば、切断生成物（例えば、ペプチド、mRNA断片））として検出することができる。例えば、IL-6タンパク質は、完全な全長分子として検出することもでき、多様なレベルの陽性の同定をもたらすのに十分な大きさの任意の断片として検出することもできる。このような断片は、10未満、10～20、20～50、50～100、100～150、150～200およびこれを超える数のアミノ酸を含みうる。同様に、VCAM-1タンパク質は、完全な全長アミノ酸分子として検出することもでき、多様なレベルの陽性の同定をもたらすのに十分な大きさの任意の断片として検出することもできる。このような断片は、10未満、10～20、20～50、50～100、100～150およびこれを超える数のアミノ酸を含みうる。

20

【0316】

特定の実施形態では、サイトカインのmRNAは、完全配列または特異的な検出に十分な任意の断片を標的とすることにより検出することができる。mRNA断片は、10未満のヌクレオチドを包含する場合もあり、任意のより多くの数のヌクレオチドを包含する場合もある。断片は、mRNA鎖の任意の部分を伴うmRNA鎖の3'端、mRNA鎖の任意の部分を伴うmRNA鎖の5'端、およびmRNA鎖の任意の中央部分を含みうる。

【0317】

IL-6、IL-6sR、およびVCAM-1のアミノ酸配列および核酸配列を、配列番号11～16として示す。

30

【0318】

検出は、限定なしに述べると、質量分析（例えば、マトリックス支援レーザー脱着イオン化質量分析（MALDI-MS）、エレクトロスプレー質量分析（ESI-MS））、電気泳動（例えば、キャピラリー電気泳動）、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、核酸アフィニティー（例えば、ハイブリダイゼーション）、核酸増幅、および核酸検出（例えば、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応または逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR））、ならびに抗体アッセイ（例えば、抗体アレイ、酵素免疫測定アッセイ（ELISA））が含まれる、任意の適切な方法を用いて実施することができる。IL-6アッセイおよび他のサイトカインアッセイの例には、例えば、Millipore, Inc. により提供されるアッセイ（Milliplex Human Cytokine/Chemokine Panel）が含まれる。IL-6sRアッセイの例には、例えば、Invitrogen, Inc. により提供されるアッセイ（Soluble IL-6R:（Invitrogen Luminesx（登録商標）Bead-based assay））が含まれる。VCAM-1アッセイの例には、例えば、R&D Systems により提供されるアッセイ（R&D Systems 社製の（CD106）ELISA development Kitである DuoSet（型番：DY809））が含まれる。

40

【0319】

50

バイオマーカーの供給源

バイオマーカーの存在、非存在、または量は、被験体の内部で（例えば、*in situ*において）決定することもでき、被験体の外部で（例えば、*ex vivo*において）決定することもできる。一部の実施形態では、バイオマーカーの存在、非存在、または量を、細胞（例えば、分化細胞、幹細胞）において決定することもでき、特定の実施形態では、バイオマーカーの存在、非存在、または量を、実質的に細胞を含まない培地（例えば、*in vitro*）において決定することもできる。本明細書で用いられる、「被験体におけるバイオマーカーの存在、非存在、または量を同定すること」という用語は、バイオマーカーを評価し、被験体における（例えば、*in situ*法、*ex vivo*法、または*in vitro*法における）存在、非存在、または量を推定するのに当技術分野において公知である任意の方法を指す。

10

【0320】

*ex vivo*においてバイオマーカーの存在、非存在、または量を決定するために、体液試料または組織試料を被験体から得ることが多い。一部の実施形態では、組織試料を得ることが可能な身体の一部に、脚、腕、腹、上背、下背、胸、手、指、手指爪、足、足指、足指爪、首、直腸、鼻腔、咽頭、口腔、頭皮、顔、脊椎、咽頭、心臓、肺、乳房、腎臓、肝臓、腸、結腸、膀胱、子宮頸部、精巣、筋肉、皮膚、毛髪、腫瘍または腫瘍を取り巻く領域などが含まれる。特定の実施形態では、組織試料を、限定なしに述べると、生検（例えば、剃毛生検、パンチ生検、切開生検、切除生検、掻爬生検、微細注射針による吸引生検、スクープ生検、スカロップ生検、コア注射針生検、真空支援生検、手術による開口生検）などが含まれる、当技術分野において公知である任意の適切な方法により得ることができる。一部の実施形態では、被験体から得ることのできる体液の例には、限定なしに述べると、血液、脳脊髄液、脊髄液、洗浄液（例えば、気管支肺胞洗浄液、胃洗浄液、腹腔洗浄液、胆管洗浄液、耳腔洗浄液、関節鏡検査洗浄液）、尿、腸液、糞便、痰、唾液、鼻腔内粘液、前立腺液、洗浄液、精液、リンパ液、胆汁、涙液、汗、母乳、乳腺液、炎症領域に由来する体液、筋肉疲労領域に由来する体液などが含まれる。

20

【0321】

被験体から由来する試料は、バイオマーカーの存在、非存在、または量を決定する前に処理することができる。例えば、被験体から由来する血液試料を処理して、限定なしに述べると、血漿、血清、軟膜、赤血球層などが含まれる特定の画分をもたらすことができ、この画分においてバイオマーカーの存在、非存在、または量を決定することができる。特定の実施形態では、組織試料（例えば、生検試料）を、この組織試料をスライスし、スライスした試料にバイオマーカーを可視化する薬剤（例えば、抗体）を接触させる前／接触させた後においてこの試料を顕微鏡下で観察することにより処理することができる。一部の実施形態では、組織試料を、以下の非限定的な条件：洗浄、塩濃度の高い溶液または塩濃度の低い溶液（例えば、高張液、低張液、等張液）への曝露、せん断条件（例えば、超音波処理、プレス処理（例えば、フレンチプレス））への曝露、ミンチ処理、遠心分離、細胞の分離、組織の分離などのうちの1または複数に曝露することができる。特定の実施形態では、バイオマーカーを組織から分離し、*in vitro*における存在、不在、または量を決定することができる。試料はまた、バイオマーカーの存在、非存在、または量を決定する前に、ある期間にわたり保存することもできる（例えば、試料を、凍結させることもでき、極低温保存することもでき、防腐媒体（例えば、ホルムアルデヒド）中で維持することもできる）。

30

40

【0322】

被験体に薬物を送達した後の任意の適切な回収時点において、試料を被験体から得ることができる。例えば、試料は、被験体に薬物を送達した約1時間後以内（例えば、薬物送達の約5、10、15、20、25、30、35、40、45、55、または60分間以内）に回収することもでき、被験体に薬物を送達した約1日間後以内（例えば、薬物送達の約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、または24時間以内）に回収することもでき

50

、被験体に薬物を送達した約2週間後以内（例えば、薬物送達の約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、または14日間以内）に回収することもできる。回収は、例えば、1時間ごと、毎日、毎週2回、毎週、隔週、毎月、隔月、毎年4回、および毎年などを含めた特定のスケジュールで行うことができる。ある時間にわたり薬物を持続投与（例えば、注入）する場合は、被験体に薬物を導入する最初の時点からの経過時間、薬物投与を中止した時点または中間の時点（例えば、投与時間枠の中間点または他の時点）からの経過時間を決定する。

【0323】

バイオマーカーの検出

当技術分野において公知である任意の適切な方法により、1以上のバイオマーカーの存在、非存在、または量を決定することができ、本明細書でも、非限定的な決定法について論じる。バイオマーカーの存在、非存在、または量の決定は、生物学的アッセイの使用を含むこともある。生物学的アッセイでは、アッセイで検出される1以上のシグナルを、バイオマーカーの存在、非存在、または量へと変換することができる。アッセイで検出されるシグナルの変換は、例えば、検量線、1以上の基準物質（例えば、内部基準物質、外部基準物質）、チャート、シグナルをバイオマーカーの存在、非存在、または量へと変換するコンピュータプログラムなど、および前出の組合せの使用を含むうる。

【0324】

アッセイで検出されるバイオマーカーは、例えば、全長バイオマーカー、バイオマーカー断片、改変バイオマーカーもしくは修飾バイオマーカー（例えば、バイオマーカーの誘導体、バイオマーカーの代謝物）、または前出のうちの2つ以上の和でありうる。修飾バイオマーカーは、本明細書で論じられるバイオマーカーとの実質的な配列同一性を有することが多い。例えば、修飾バイオマーカーと、本明細書で論じられるバイオマーカーとの同一性百分率は、15～20%、20～30%、31～40%、41～50%、51～60%、61～70%、71～80%、81～90%、および91～100%、（例えば、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99および100の同一性百分率）の範囲内にあることが可能である。修飾バイオマーカーは、本明細書で論じられるバイオマーカーの配列と90%以上同一の配列（例えば、アミノ酸配列またはヌクレオチド配列）を有することが多い。配列同一性の百分率は、当技術分野において公知であるアライメント法を用いて決定することができる。

【0325】

バイオマーカーの検出は、限定なしに述べると、質量分析、抗体アッセイ（例えば、ELISA）、核酸アフィニティー、マイクロアレイハイブリダイゼーション、ノーザンブロット、逆転写PCRおよびRT-PCRが含まれる、当技術分野において公知である任意の適切な方法を用いて実施することができる。例えば、RNAの純度および濃度は、Nanodrop 1000において、分光光度法により決定することができる（ $260/280 > 1.9$ ）。RNAの品質は、当技術分野において公知の方法（例えば、Agilent 2100 Bioanalyzer、RNA 6000 Nano LabChip（登録商標）など）を用いて評価することができる。

【0326】

後続の薬物用量を調整または維持するための指標

後続の薬物用量を調整または維持するための指標は、バイオマーカーの存在または非存在に基づきうる。例えば、（i）利用できるバイオマーカーレベルの決定が低感度であり、（ii）薬物に反応したバイオマーカーレベルのシフトが急激であり、（iii）存在

10

20

30

40

50

するバイオマーカーのレベルが低レベルもしくは高レベルであり、かつ／または（i v）投与レベルなら薬物が感知できる程度には毒性でない場合は、後続の薬物用量を調整または維持するための指標を発生させるのに、バイオマーカーの存在または非存在が十分でありうる。

【0327】

後続の薬物用量を調整または維持するための指標は、バイオマーカーの量またはレベルに基づくことが多い。一部の実施形態では、バイオマーカーの量が、平均量、中央値量、名目量、範囲量、区間量、最大量、最小量、または相対量でありうる。特定の実施形態では、バイオマーカーの量が、測定誤差域を伴って表される場合もあり、測定誤差域を伴わずに表される場合もある。一部の実施形態では、バイオマーカーの量を、バイオマーカー濃度、単位重量当たりのバイオマーカー重量、単位容量当たりのバイオマーカー重量、バイオマーカーモル数、単位容量当たりのバイオマーカーモル数、単位重量当たりのバイオマーカーモル数、単位細胞個数当たりのバイオマーカー重量、単位細胞個数当たりのバイオマーカー容量、単位細胞個数当たりのバイオマーカーモル数などとして表すことができる。重量は、例えば、フェムトグラム、ピコグラム、ナノグラム、マイクログラム、ミリグラム、およびグラムとして表すことができる。容量は、例えば、フェムトリットル、ピコリットル、ナノリットル、マイクロリットル、ミリリットル、およびリットルとして表すことができる。モル数は、例えば、ピコモル、ナノモル、マイクロモル、ミリモル、およびモルとして表すことができる。一部の実施形態では、単位重量が、被験体の体重の場合もあり、被験体に由来する試料の重量の場合もあり、単位容量が、被験体に由来する試料の容量（例えば、血液試料の容量）であることが可能であり、単位細胞個数が、細胞1個当たりの場合もあり、特定の細胞個数当たりの場合（例えば、細胞1000個当たりのバイオマーカーマイクログラム）もある。当技術分野において公知の通り、一部の実施形態では、1つの組織または体液から決定されるバイオマーカーの量を、別の体液または組織におけるバイオマーカーの量と相関させることができる。

【0328】

後続の薬物用量を調整または維持するための指標は、被験体において決定されたバイオマーカーレベルを、所定のバイオマーカーレベルと比較することにより作成することが多い。特定の実施形態では、所定のバイオマーカーレベルが、被験体における薬物の治療量または有効量と連関することもあり、薬物の毒性レベルと連関することもあり、状態の存在と連関することもあり、処置の中間評価項目と連関することもあり、処置の評価項目と連関することもある。所定のバイオマーカーレベルは、時間を要素として包含することもあり、一部の実施形態では、閾値が時間依存的な特徴である。例えば、IL-6レベルまたはIL-6-sRレベルが正常レベルの約8倍以上（例えば、正常レベルの約9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74または75倍）であることは、後続の投与において、薬物の用量または投与頻度を増大させうることを示しうる。

【0329】

「用量」という用語は、用量の量、および、例えば、次回の用量のタイミングなどの投与頻度の両方を包含することを意味する。IL-6レベルまたはIL-6-sRレベルが正常レベルの約8倍未満（例えば、正常レベルの約7、6、5、4、3、2、もしくは1倍、または正常レベル以下）であることは、後続の投与において、用量を維持または低減しうることを示しうる。VCAM-1レベルが正常レベルの約8倍以上（例えば、正常レベルの約9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、4

8、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74または75倍)であることは、後続の投与において、薬物の用量を増大させることを示しうる。VCAM-1レベルが正常レベルの約8倍未満(例えば、正常レベルの約7、6、5、4、3、2、もしくは1倍、または正常レベル以下)であることは、後続の投与において、用量を維持または低減しうることを示しうる。正常レベルのIL-6、IL-6sR、またはVCAM-1は、患者における固形腫瘍または患者において処置下にある種類の固形腫瘍を伴わないと診断されている被験体において評価することができる。

【0330】

薬物用量を調整または維持するための他の指標には、例えば、GM-CSF、MIP-10
1アルファ、MIP-1ベータ、MCP-1、IFN-ガンマ、RANTES、EGF、
またはHGFなど、個別の分泌因子の濃度における摂動、または、GM-CSF、MIP-
1アルファ、MIP-1ベータ、MCP-1、IFN-ガンマ、RANTES、EGF
、およびHGFからなる群から選択されるマーカーのうちの2つ以上など、分泌因子のパ
ネルの平均濃度における摂動が含まれる。この摂動は、例えば、個別の分布因子の濃度
における、少なくとも5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、
80%、90%、または100%の上昇または低下からなる場合もあり、分泌因子のパネ
ルの血清濃度の平均相対変化における、少なくとも5%、10%、20%、30%、40
20 %、50%、60%、70%、80%、90%、または100%の上昇または低下からな
る場合もある。この上昇の後、次の投与前にベースラインの血清濃度への復帰が生じる
場合もあり、生じない場合もある。血清濃度の平均相対変化における上昇または低下は、
例えば、パネル内の因子の各々の相対値に重みづけすることを伴いうる。また、上昇また
は低下は、例えば、収集されたデータの時点の各々の相対値に重みづけすることを伴いう
る。各時点の重みづけされた値、または各因子の重みづけされた値は、癌、転移、または
腫瘍負荷の状態または程度に応じて変化しうる。薬物用量を調整または維持するための指
標には、1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回、8回、9回、または10回以上の
投与後における、個別の分泌因子の濃度、または分泌因子のパネルの平均濃度にお
ける摂動が含まれる。例えば、処置期間にわたり、例えば、薬物または本明細書で論じられた
ワクチンもしくは組成物の6回の投与にわたり、少なくとも1回の投与後において個別の
分泌因子の濃度または分泌因子のパネルの平均濃度が摂動することが観察される場合は、
30
これが、投与頻度または後続の用量を維持するか、低減するか、または増大させるための
指標となる場合もあり、例えば、さらなる薬物、アデノウイルスワクチン、またはアデノ
ウイルスをトランスフェクトもしくは形質導入した細胞を調製することにより処置を継続
するための指標となる場合もある。

【0331】

一部の処置方法は、(i)被験体に、1回または複数回の投与(例えば、1、2、3、
4、5、6、7、8、9、または10の用量)により薬物を投与するステップと、(ii)
(i)の後で、被験体におけるバイオマーカーまたは被験体に由来するバイオマーカー
の存在、非存在、または量を決定するステップと、(iii)被験体に行われる後続の薬
物用量を増大させるか、低減するか、または維持するための指標を提示するステップと、
40
(iv)場合によって、被験体に後続用量を投与するステップであって、後続用量が、
(i)における先行用量(複数可)と比べて、増大しているか、低減されているか、または
維持されているステップとを含む。一部の実施形態では、バイオマーカーの存在、非存在
、または量を、薬物の各用量を被験体に投与した後で決定するが、バイオマーカーの存在
、非存在、または量を、薬物の各用量を投与した後で決定しないこともある(例えば、バ
イオマーカーを、1回目、2回目、3回目、4回目、5回目、6回目、7回目、8回目、
9回目、または10回目の用量のうちの1回または複数回の後で評価するが、必ずしも、
各用量を投与した後で毎回評価するわけではない)。

【0332】

後続の薬物用量を調整するための指標は、後続の薬物用量を増大させる必要、または後

10

20

30

40

50

続の薬物用量を低減する必要として考慮することができる。後続の薬物用量を調整または維持するための指標を考慮しうるのは臨床医であるが、特定の実施形態では、臨床医が、この指標について決定を下しうる。一部の実施形態では、臨床医が、指標について決定を下さない選択をする場合もある。したがって、臨床医は、提示される指標に基づき、後続の薬物用量を調整するかまたは調整しないかを選択することができる。

【0333】

後続の薬物用量、および／または後続の薬物用量の調整または維持の指標は、任意の簡便な方法で提供することができる。一部の実施形態では、指標を、表形態（例えば、物理的媒体または電子的媒体による）で提示することができる。例えば、バイオマーカーの閾値を表により提示することができ、臨床医は、被験体について決定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量を、この閾値と比較することができる。次いで、臨床医は、後続の薬物用量についての指標を、この表から同定することができる。特定の実施形態では、指標は、バイオマーカーの存在、非存在、または量がコンピュータに供給された後で（例えば、コンピュータのメモリーに入力された後で）、コンピュータにより提示しうる（例えば、表示される）。例えば、被験体について決定されたバイオマーカーの存在、非存在、または量を、コンピュータに供給する（例えば、使用者がコンピュータメモリーに入力するか、またはコンピュータネットワークにおける遠隔デバイスを介してコンピュータへと送信する）ことができ、コンピュータ内のソフトウェアにより、後続の薬物用量を調整もしくは維持するための指標を作成し、かつ／または後続の薬物用量の量を提示することができる。後続の用量は、例えば、被験体の体重、被験体の1以上の代謝レベル（例えば、肝機能に関する代謝レベル）など、バイオマーカーの存在、非存在、または量以外の特定の因子に基づいて決定することもできる。

【0334】

指標に基づいて後続の用量を決定したら、臨床医は、後続用量を投与することもでき、用量を調整する指示を別の従事者または実体に与えることもできる。本明細書で用いられる「臨床医」という用語は、意思決定者を指すが、特定の実施形態では、臨床医が、医療の専門家である。一部の実施形態では、意思決定者が、コンピュータまたはコンピュータプログラムの出力表示の可能性があり、医療サービス提供者が、コンピュータにより表示された指示または後続の薬物用量について決定を下す可能性がある。意思決定者は、後続用量を直接的に行う（例えば、注入により後続用量を被験体に行う）場合もあり、遠隔的に行う場合もある（例えば、意思決定者がポンプのパラメータを変更する場合もある）。

【0335】

特定のバイオマーカーの存在、非存在、または量を決定しうるかどうかを判定するために、被験体をプレスクリーニングすることができる。プレスクリーンの非限定的な例には、遺伝子マーカー（例えば、多型、特定のヌクレオチド配列）の存在または非存在を同定するステップ、特定の代謝物の存在、非存在、または量を同定するステップが含まれる。臨床医は、プレスクリーンの結果を、バイオマーカーの存在、非存在、または量と組み合わせて用いて、後続の薬物用量を調整または維持しうるかどうかを決定することができる。

【0336】

抗体および低分子

一部の実施形態では、抗体または低分子を、例えば、アッセイにおける対照もしくは基準物質、または治療剤として用いるのに供給することができる。一部の実施形態では、限定せずに述べると、抗体または他の低分子を、IL-6、IL-6sRが含まれるサイトカインまたはサイトカイン受容体に結合し、このサイトカインの作用を変化させるように構成することもでき、VCAM-1に結合するように構成することもできる。特定の実施形態では、抗体または他の低分子が、サイトカインまたは受容体をコードするmRNA構造に結合しうる。

【0337】

本明細書で用いられる低分子という用語は、約800ドルトン以下の有機分子を意味す

る。特定の実施形態では、低分子が、細胞膜を介して拡散し、細胞内の作用部位に到達する。一部の実施形態では、低分子が、タンパク質、核酸、または多糖などの生体ポリマーに高アフィニティーで結合し、この生体ポリマーの活性または機能を変化させることもありうる。多様な実施形態では、低分子が、天然（二次的代謝物など）の場合もあり、人工（抗ウイルス薬など）の場合もあり、疾患に対して有益な効果を及ぼす場合（薬物など）もあり、有害な場合（催奇性物質、発癌物質など）もある。非限定的な例を目的として述べると、低分子には、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチド、アミノ酸、単糖、ならびに、ジヌクレオチドなど、小型のオリゴマー、抗酸化剤であるグルタチオンなどのペプチド、および、スクロースなどの二糖が含まれうる。

【0338】

10

本明細書で用いられる抗体という用語は、脊椎動物の血液中または他の体液中で見出されるガンマグロブリンタンパク質を意味するものとして理解することができ、免疫系が細菌およびウイルスなどの外来対象を同定および中和するのに用いられる。抗体は、2本の大型の重鎖および2本の小型の軽鎖による基本的な構造単位を包含することが典型的である。

【0339】

抗体に特異的な結合には、特定のタンパク質に対するそのアフィニティーについて選択される抗体が必要とされる。例えば、特定のタンパク質、多型変異体、対立遺伝子、オースログ、および保存的修飾変異体、もしくはスプライス変異体、またはこれらの一部を、GM-CSF調節タンパク質、TNF- α 調節タンパク質、もしくはNF- κ B調節タンパク質と特異的に免疫応答性であるが、他のタンパク質と特異的に免疫応答性であるわけではないポリクローナル抗体だけを得るのに選択することができる。この選択は、他の分子と交差反応する抗体を取り去ることにより達成することができる。

20

【0340】

本明細書で提示される方法には、限定なしに述べると、有効量の活性化細胞、核酸、またはこれをコードする発現構築物の送達が含まれる。「有効量」の医薬組成物とは、一般に、言及された所望の結果、例えば、疾患またはその症状の程度を緩和、軽減、最小化、または制限する結果を、検出可能かつ反復された形で達成するのに十分な量として定義される。疾患の消失、根絶、または治癒を含め、より厳密な他の定義も適用することができる。一部の実施形態では、バイオマーカーをモニタリングして、処置の有効性を評価し、毒性を制御するステップが存在しうる。

30

【実施例】

【0341】

下記の実施例は、ある特定の実施形態を例示し、当該技術を限定しない。

【0342】

（実施例1）

材料および方法

後の実施例において考察されている試験において利用する材料および方法について下で考察する。

【0343】

40

腫瘍細胞株およびペプチド

NA-6-Me1細胞株、T2細胞株、SK-Me1-37細胞株およびLNCaP細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, VA) から購入した。HLA-A2-制限ペプチドMAGE-3 p271-279 (FLWGPRA LV)、インフルエンザマトリックス (IM) p58-66 (GILGFVFTL)、および HIV-1 gag p77-85 (SLYNTVATL) を使用して、CD8+ T細胞反応を解析した。Tヘルパー細胞偏極実験では、破傷風トキシイドペプチド TTP30 FNNFTVSFWLRVPKVSASHLE を使用した。ペプチドは全て、Genemed Synthesis Inc (San Francisco, CA) により合成され、HPLCによって決定された純度は>

50

95%であった。

【0344】

ヒト誘導性CD40をコードする組換えアデノウイルス

ヒトCD40細胞質ドメインは、ヒト単球由来DC cDNAから、Xho I 隣接5'プライマー(5hCD40X)、5'-atatactcgagaaaaagggtggccaagaagccaacc-3'、およびSal I 隣接3'プライマー(3hCD40S)、5'-atatagtcgactcactgtctctcctgcactgagatg-3'を使用して増幅されたPfu I ポリメラーゼ(Stratagene、La Jolla、California)であった。PCR断片を、Sal I で消化したpSH1/M-FvFvls-E15にサブクローニングし、配列決定して、pSH1/M-FvFvls-CD40-Eを創出した。その後、誘導性CD40を、サイトメガロウイルス初期/即時プロモーターの下で導入遺伝子を発現している非複製的なE1、E3を欠失したAd5/f35ベースのベクターにサブクローニングした。iCD40をコードする配列を、制限消化および配列決定によって確認した。全てのアデノウイルスの増幅、精製および滴定を、Baylor College of Medicineのウイルスベクターコア施設において行った。

10

【0345】

ウェスタンブロット

総細胞抽出物を、プロテアーゼ阻害剤反応混液(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)を含有するRIPA緩衝液を用いて調製し、界面活性剤適合性タンパク質濃度アッセイ(Bio-Rad、Hercules、CA)を用いて定量化した。12%SDS-PAGEゲルで総タンパク質の10~15マイクログラムを常套的に分離し、タンパク質をニトロセルロースメンブレン(Bio-Rad)に転写した。ブロットを、ヤギ抗CD40(T-20、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)およびマウス抗アルファチューブリン(Santa Cruz Biotechnology)Ab、次いで、それぞれロバ抗ヤギIgG-HRPおよびヤギ抗マウスIgG-HRP(Santa Cruz Biotechnology)とハイブリダイズさせた。ブロットを、SuperSignal West Dura Stable substrate system(Pierce、Rockford、Illinois)を用いて展開した。

20

30

【0346】

ヒトDCの生成および刺激

健康なドナーからの末梢血単核細胞(PBMC)を、ヘパリン添加血液をLymphoprep(Nycomed、Oslo、Norway)で密度遠心分離することによって単離した。PBMCをPBSで洗浄し、CellGenix DC培地(Freiburg、Germany)に再懸濁させ、37℃、5%CO₂で2時間にわたり培養プレートに接着させた。接着しなかった細胞を大規模な洗浄により除去し、接着した単球を、500U/mlのhIL-4および800U/mlのhGM-CSF(R&D Systems、Minneapolis、MN)の存在下で5日間培養した。形態およびFACS解析によって評価された通り、生じた未成熟のDC(imDC)は、MHCクラスI、Ih iであり、CD40lo、CD80lo、CD83lo、CD86loを発現した。imDCはCD14negであり、<3%の混入CD3+ T、CD19+ B、およびCD16+ NK細胞を含有した。

40

【0347】

24ウェルディッシュで、1ml当たり細胞およそ2×10⁶個を培養し、37℃および5%CO₂で90分間、アデノウイルスを細胞当たりウイルス粒子(vp)10,000個(約160MOI)で用いて形質導入した。形質導入したすぐ後に、DCを、MPL、FSL-1、Pam3CSK4(InvivoGen、San Diego、CA)、LPS(Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)、AP20187(ARIAD Pharmaceuticals、Cambridge、MAからの好意の寄

50

贈品)、または、 10 ng/ml のTNF- α 、 10 ng/ml のIL-1 β 、 150 ng/ml のIL-6 (R&D Systems、Minneapolis、MN) および $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ のPGE2 (Cayman Chemicals、Ann Arbor、MI) を含有する成熟化反応混液 (MC) で刺激した。T細胞アッセイでは、アデノウイルスによる形質導入の24時間前、または24時間後に、DCを $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ のPSMAポリペプチドまたはMAGE3ペプチドでパルスした。

【0348】

表面マーカーおよびサイトカインの産生

蛍光色素とコンジュゲートしたモノクローナル抗体 (BD Biosciences、San Diego、CA) を用いて細胞表面染色を行った。細胞を、FACS Cali 10
bur血球計算器 (BD Biosciences、San Jose、CA) で解析した。培養物の上清において、ヒトIL-6およびIL-12p70に対する酵素結合免疫吸着検定法キット (BD Biosciences) を使用してサイトカインを測定した。

【0349】

IFN- γ マELISPOTアッセイ

HLA-A2陽性の健康なボランティアからのDCを、培養の4日目にMAGE-3 A2.1ペプチド (残基271~279; FLWGPRALV) でパルスし、次いで、Ad-iCD40で形質導入し、5日目に種々の刺激で刺激した。自己T細胞を、負の選択 (Miltentyi Biotech、Auburn、CA) によってPBMCから精製し 20
、DCと、DC:T細胞比1:3で混合した。細胞を、 20 U/ml のhIL-2 (R&D Systems) および $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ のMAGE3 A2.1ペプチドを伴う完全なRPMI中でインキュベートした。培養7日目にT細胞を再刺激し、14日目にアッセイした。

【0350】

ELISPOT定量化

平底の96ウェルニトロセルロースプレート (MultiScreen-HA; Millipore、Bedford、MA) を、IFN- γ マAb ($2\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、1-D1K; Mabtech、Stockholm、Sweden) でコーティングし、 4°C で一晩インキュベートした。0.05%のTWEEN20を含有するPBSで洗浄した後、30
プレートに完全なRPMIを用いて、 37°C で2時間ブロッキングした。合計 1×10^5 個の予備感作した (presensitize) CD8+ Tエフェクター細胞を各ウェルに加え、 $25\text{ }\mu\text{g/ml}$ のペプチドと一緒に20時間インキュベートした。次いで、プレートを、0.05%のTWEEN20を含有するPBSで徹底的に洗浄し、抗IFN- γ マAb (0.2 $\mu\text{g/ml}$ 、7-B6-1-ビオチン; Mabtech) を各ウェルに加えた。 37°C で2時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (1 $\mu\text{g/ml}$; Mabtech) を用いて室温で1時間展開した。洗浄した後、基質 (3-アミノ-9-エチルカルバゾール; Sigma-Aldrich) を加え、5分間インキュベートした。プレートメンブレンは濃い淡紅色のスポットを示し、それをZellNet Consulting 40
Inc. (Fort Lee、NJ) でスキャンし、解析した。

【0351】

クロム放出アッセイ

抗原認識を、クロム-51 (Amersham) を用いて 37°C で1時間標識し、3回洗浄した標的細胞を使用して評価した。次いで、標識した標的細胞 (50マイクロリットル中、細胞5000個) を、示されている濃度で、V底のマイクロウェルプレート中、エフェクター細胞 (100マイクロリットル) に、示されているエフェクター: 標的細胞比で加えた。 37°C で6時間インキュベートした後、上清を回収し、MicroBeta Trilux 計数器 (Perkin-Elmer Inc、Torrance CA) を使用してクロムの放出を測定した。LNCaP細胞を伴うアッセイを、18時間実行した 50

。特異的な溶解の百分率を、 $100 * [(\text{実験的な放出} - \text{自然発生的な放出}) / (\text{最大の放出} - \text{自然発生的な放出})]$ として算出した。

【0352】

四量体染色

MAGE-3. A2ペプチド (FLWGPRA LV) で組み立てられたHLA-A2四量体を、Baylor College of Medicine Tetramerコア施設 (Houston, TX) から得た。0.5%のFCSを含有するPBS50 μ l中の予備感作したCD8+ T細胞を、PE標識した四量体を用いて、氷上で15分間染色した後、FITC-CD8 mAb (BD Biosciences) を加えた。洗浄した後、結果をフローサイトメトリーによって解析した。

10

【0353】

ナイーブTヘルパー細胞の偏光

HLA-DR11.5陽性ドナーからのナイーブCD4+ CD45RA+ T細胞 (FASTYPE HLA-DNA SSP タイピングキット; BioSynthesis, Lewisville, TX) を使用して遺伝子型決定した) を、ナイーブCD4+ T細胞単離キット (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を使用して負の選択によって単離した。T細胞を、破傷風トキソイド (5FU/ml) でパルスした自己DCで刺激し、種々の刺激を刺激器対応答者比1:10で用いて刺激した。7日後に、T細胞をHLA-DR11.5制限ヘルパーペプチドTTP30でパルスした自己DCで再刺激し、アデノベクターAd-iCD40で形質導入した。細胞を、PE-抗CD4 Ab (BD Biosciences) で染色し、固定し、BD Cytotfix/Cytopermキット (BD Biosciences) を使用して透過処理し、次いで、hIFN- γ ガンマmAb (eBioscience, San Diego, CA) で染色し、フローサイトメトリーによって解析した。上清を、ヒトTH1/TH2 BD Cytometric Bead Array Flex Set on BD FACSArray Bioanalyzer (BD Biosciences) を使用して解析した。

20

【0354】

PSMAタンパク質の精製

PSMAの細胞外部分 (残基44~750) のcDNAを含有するバキュロウイルス移入ベクター、pAcGP67A (BD Biosciences) は、Dr Pamela J. Bjorkman (Howard Hughes Medical Institute, California Institute of Technology, Pasadena, CA) から好意で提供された。PSMAを、疎水性分泌シグナル、第Xa因子切断型部位、およびN末端6x-Hisアフィニティータグと融合した。Baylor College of Medicineのバキュロウイルス/モノクローナル抗体コア施設により力価の高いバキュロウイルスが作製された。PSMAタンパク質を、組換えウイルスを感染させたHigh5細胞に産生させ、タンパク質を細胞の上清から、Ni-NTAアフィニティーカラム (Qiagen, Chatsworth, CA) を以前考察されている通り (Cisco RM, Abdel-Wahab Z, Dannull J, et al. Induction of human dendritic cell maturation using transfection with RNA encoding a dominant positive toll-like receptor 4. J Immunol. 2004;172:7162-7168) 使用して精製した。PSMAポリペプチドの約100kDaの孤立したバンドを精製した後、アクリルアミドゲルの銀染色によってタンパク質を検出した。

30

40

【0355】

分泌アルカリホスファターゼ (SEAP) アッセイ

ヒトジャーカット-TAg (T細胞) または293 (胎児腎臓上皮) 細胞またはマウスRAW264.7 (マクロファージ) 細胞においてレポーターアッセイを行った。対数期

50

の成長中のジャーカッターTAg細胞（107）に、発現プラスミド2mgおよびレポータープラスミドであるNF-κB-SEAPまたはIFNβ-TA-SEAP（上記を参照されたい）2mgを電気穿孔（950mF、250V）した。対数期の293細胞またはRAW264.7細胞（35mmのディッシュ当たり細胞約 2×10^5 個）に、増殖培地中6mlのFuGENE-6をトランスフェクトした。24時間後に、形質転換された細胞をCIDで刺激した。さらに20時間後、上清を、SEAP活性について以前考察されている通り（Spencer, D. M., et al., Science 262, 1019-1024（1993））アッセイした。

【0356】

組織培養

ジャーカッターTAg細胞およびRAW264.7細胞を、RPMI1640培地、10%ウシ胎児血清（FBS）、10mMのHEPES（pH7.14）、ペニシリン（100U/ml）およびストレプトマイシン（100mg/ml）中で成長させた。293細胞を、ダルベッコ改変イーグル培地、10%のFBSおよびpen-strep中で成長させた。

【0357】

データ解析

結果は、平均±標準誤差として表されている。試料サイズを、0.05の片側アルファレベルを用いて0.8の検定力で決定した。実験群間の差異をスチューデントt検定によって決定した。

【0358】

構築物

化学誘導二量体化（CID）に基づき、内在性のCD40の活性化後にパターン化された誘導性CD40受容体を、DCを特異的に標的にするように作製した（図1A）。iCD40と称される組換えCD40受容体を、精製されたマウス骨髄由来DC（95%超のCD11c+）由来の228bpのCD40細胞質内シグナル伝達ドメインをrt-PCR増幅し、生じたDNA断片を、二量体化薬結合ドメイン、FKBP12（V₃₆）のタンデムなコピーの下流（すなわち、M-FvFvlsCD40-E）または上流（M-CD40-FvFvls-E）のいずれかにサブクローニングすることによって構築した（図1B）。ミリスチル化ターゲティングドメイン（M）を用いて膜局在化を実現し、同定を容易にするためにHAエピトープ（E）タグを存在させた。転写物が、NFκBを活性化することができるかどうかを決定するために、構築物を、ジャーカッターT細胞に一過性にトランスフェクトし、用量設定した二量体化薬、AP20187の存在下でNFκBレポーターアッセイを実施した（図1C）。図1Cにより、AP20187のレベルが増加することにより、NFκB転写活性が、CD40配列を欠く対照ベクター、M-FvFvls-Eと比較して有意に上方制御されることが示された。iCD40の膜近位型であるM-CD40-FvFvls-Eは、このアッセイ系ではAP20187に対する反応性が低かったため、さらなる試験では、M-FvFvlsCD40-E構築物を使用し、これまで「iCD40」と称されていた。この決定は、異種タンパク質をそのカルボキシル末端に融合することによって有害に変化し得るヘアピンコンフォメーションを示す（Ni2000）CD40細胞質尾部の結晶学的構造によって補強された。このデータにより、薬物結合ドメインの飽和に起因すると思われる、100nMを超える高薬物用量抑制も示された。これと同じ現象が、限られたレベルのiCD40受容体を発現している他の細胞型において観察された。これらの結果により、iCD40がNFκB転写因子のCID依存性の核移行を誘導することができることが示唆された。

【0359】

誘導性のiMyD88：ヒトTIRを含有する誘導性のPRRアダプターMyD88（約900bp）を、293のcDNAから、XhoI/SalIをリンカーとしたプライマー5MyD88S（5'-acatcaactcgagatggctgcaggagggtcccgg-3'）および3MyD88S（5'-actcatagtcgaccag

10

20

30

40

50

ggacaaggccttggaag-3')を用いてPCR増幅し、pSH1/M-Fv'-Fvls-EのXhoI部位およびSalI部位にサブクローニングして(Xie, X. et al., Cancer Res 61, 6795-804. (2001); Fan, L., et al., Human Gene Therapy 2273-2285 (1999))、それぞれpSH1/M-MyD88-Fv'-Fvls-EおよびpSH1/M-Fv'-Fvls-MyD88-Eを得た。全ての挿入断片を配列決定によって確認し、適切なサイズについて、3'血球凝集素(hemagglutinin)(HA)エピトープ(E)に対するウェスタンブロットによって確認した。

【0360】

10

(実施例2)

iCD40の発現およびDC成熟化の誘導

ヒトCD40細胞質内シグナル伝達ドメインを、ミリストイル化ターゲティングドメインおよび二量体化薬AP20187に結合する2つのタンデムなドメイン(ヒトFKBP12(V₃₆))由来、「Fv'」と称される)の下流にクローニングした(Clackson T, et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1998; 95:10437-10442)。未成熟のDCは内在性のCD40を発現し、これは、LPSおよびCD40Lによって誘導した。Ad-iCD40の形質導入により、内在性のCD40発現に干渉しない別個のサイズのiCD40の発現が導かれた。興味深いことに、iCD40の発現も、LPS刺激によって有意に増強され、これは、遍在する、「構成的な」CMVプロモーターに結合する転写因子の誘導能に起因すると思われる。

20

【0361】

成熟化の状況は、免疫寛容誘発性の状態から活性化した免疫原性の状態への移行に関連づけられるので、完全に成熟し、活性化されたDCを得ることが、DCベースのワクチンの設計に関する問題の1つである(Steinman RM, et al., Annu Rev Immunol. 2003; 21:685-711; Hanks BA, et al., Nat Med. 2005; 11:130-137; Banchereau J, et al., Nature. 1998; 392:245-252)。マウス変異体Ad-iCD40を発現させることにより、マウス骨髄由来DCの成熟化を誘導することができることが示されている(Hanks BA, et al., Nat Med. 2005; 11:130-137)。ヒト化iCD40が、DCにおける成熟化マーカーの発現に影響を及ぼすかどうかを決定するために、DCをAd-iCD40で形質導入し、成熟化マーカーCD40、CD80、CD83、およびCD86の発現を評価した。LPSまたはその誘導体によって媒介されるTLR-4シグナル伝達MPLは、DC成熟化の強力な誘導因子である(Ismaili J, et al., J Immunol. 2002; 168:926-932; Cisco RM, et al., J Immunol. 2004; 172:7162-7168; De Becker G, Moulin V, Pajak B, et al. The adjuvant monophosphoryl lipid A increases the function of antigen-presenting cells. Int Immunol. 2000; 12:807-815; Granucci F, et al., Microbes Infect. 1999; 1:1079-1084)。内在性のCD40シグナル伝達により、ヒトDCにおけるCD83の発現が特異的に上方制御されることも以前報告された(Megioanni A M, et al., Eur Cytokine Netw. 2004; 15:126-134)。以前の報告と一致して、Ad-iCD40が形質導入されるとCD83の発現レベルが上方制御され、LPSまたはMPLを加えた後にCD83の発現がさらに上方制御された。

30

40

【0362】

50

(実施例 3)

誘導性CD40およびMyD88および複合性MyD88-CD40は293細胞においてNF- κ Bを活性化する

TIIRDメインを欠くMyD88の切断型を含めた誘導性の受容体を発現させるために構築物のセットを設計した。293細胞に、NF- κ Bレポーターを同時トランスフェクトし、SEAPレポーターアッセイを基本的にSpencer, D. M., et al., Science 262, 1019-1024 (1993)において考察されている通りに実施した。最初に設計したベクターは、pBJ5-M-MyD88L-Fv'Fvls-Eであった。pShuttleX-M-MyD88L-Fv'Fvlsを使用して、アデノウイルスを作出した。これらのベクターの両方を、SEAPアッセイにおいて試験した。24時間後に、AP20187を加え、さらに20時間後に、細胞の上清を、SEAP活性について試験した。これらのキメラ構築物および活性化に関する図表が図3および図4に提供されている。図5に結果が示されている。

【0363】

構築物：

対照：NF- κ Bレポーターのみでトランスフェクトする。

TLR4on：pShuttleX-CD4/TLR4-L3-E：CD4/TLR4L3-Eは、マウスCD4の細胞外ドメインを、ヒトTLR4の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインとタンデムに含有し(Medzhitov R, et al, Nature. 1997 Jul 24; 388(6640): 394-7において考察されている)、その次に3つの6アミノ酸のリンカーおよびHAエピトープが続く、TLR4の構成的な型である。

iMyD88：M-MyD88L-Fv'Fvls-Eを含有する

iCD40：M-Fv'-Fvls-CD40-Eを含有する

iCD40T：M-Fv'-Fv'-Fvls-CD40-Eを含有する - iCD40Tは、追加のFv' (バリンにおけるゆらぎを伴うFKBP) を含有する

iMyD88：CD40：M-MyD88L-CD40-Fv'Fvls-Eを含有する

iMyD88：CD40T：M-MyD88LCD40-Fv'Fv'Fvls-Eを含有する - iMyD88：CD40と比較して追加のFv' を含有する。

【0364】

(実施例 4)

誘導性CD40、CD40-MyD88、CD40-RIG-1、およびCD40：NOD2

以下の構築物を設計し、NF- κ Bレポーター系においてアッセイした。293細胞に、NF- κ Bレポーターおよび構築物のうちの1つを同時トランスフェクトした。24時間後に、AP20187を加え、さらに3時間後(図6)または22時間後(図7)に、細胞の上清を、SEAP活性について試験した。トランスフェクションから約20~24時間後、細胞を、二量体化薬AP20187で処理した。二量体化薬で処理した約20~24時間後、細胞を、SEAPの基質である4-メチルウンベリフェリルホスフェート(MUP)で処理した。一晚(16時間から22時間までのいずれかの時間)インキュベートした後、FLUOStar OPTIMAマシンでSEAP計数を記録した。

【0365】

MyD88L-Fv'Fvls-CD40：はMyD88Lから上流にミリストイル化配列を有するpBJ5骨格で構成された。

【0366】

Fv'Fvls-CD40-MyD88L：はFv'から上流にミリストイル化配列を有するpBJ5骨格で構成された。

【0367】

MyD88LCD40-Fv'Fvls：はMyD88Lから上流にミリストイル化配列

10

20

30

40

50

を有する2つのベクターの骨格 (p B J 5) で構成された。

【0368】

CD40Fv'FvlsMyD88L: はCD40から上流にミリストイル化配列を有するpBJ5骨格で構成された。

【0369】

Fv'2FvlsCD40stMyD88L: はCD40の後ろの終止配列により、MyD88Lの翻訳が妨げられる構築物である。iCD40T'とも称される。

【0370】

Fv'2Fvlsは、gtcga g配列によって分離された2コピーのFv'を含む。

【0371】

MyD88LFv'Fvls

Fv'FvlsMyD88L: はFv'から上流にミリストイル化配列を有するpBJ5骨格で構成された。

【0372】

Fv'FvlsCD40: はpBJ5およびpShuttleXにおいて利用可能である。

【0373】

CD40Fv'Fvls: はCD40から上流にミリストイル化配列を有するpBJ5骨格において利用可能である。

【0374】

MFv'Fvls: : はMによって示されるミリストイル化配列を有するpBJ5骨格において利用可能である。

【0375】

Fv'FvlsNOD2: 2つのFKBP、その後ろにNOD2の2つのCARDドメインおよびHAエピトープを含有する、ミリストイル化配列を有さないpBJ5骨格内のpBJ5-Sn-Fv'Fvls-NOD2-E。

【0376】

Fv'FvlsRIG-1: 2つのFKBP、その後ろにRIG-Iの2つのCARDドメインおよびHAエピトープを含有する、ミリストイル化配列を有さないpBJ5骨格内のpBJ5-Sn-Fv'Fvls-RIG-I-E。

【0377】

アデノウイルスを作製するために使用するpShuttleX型の構築物マップの例が図13、図14、および図15に示されている。

【0378】

(実施例5)

293T細胞のMyD88Lアデノウイルスによるトランスフェクションによりタンパク質の発現がもたらされる

アデノウイルス作製のために以下のpShuttleX構築物を構築した:

pShuttleX-MyD88L-Fv'Fvls-E

pShuttleX-MyD88LCD40-Fv'Fvls-E

pShuttleX-CD4/TLR4-L3-E

L3は、DNA配列: GGAGGCGGAGGCAAGCGGAGGTGGCGGTTCG
GGAGGCGGAGGTTCT

タンパク質配列: GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer

を有する3つの6アミノ酸のリンカーを示し、

EはHAエピトープである。

【0379】

基本的にHe, T. C., et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (5): 2509-14において考察されている

10

20

30

40

50

通りの方法を用いて組換えアデノウイルスを得た。

【0380】

アデノウイルスアッセイのそれぞれについて、いくつかのウイルスブランクからの粗溶解産物を、タンパク質の発現についてウエスタンブロット法によってアッセイした。Baylor College of Medicine（世界的なウェブアドレス <http://vector.bcm.tmc.edu/>）におけるベクターコアから供給される細胞ペレットから、ペレットを3回凍結融解することによってウイルス粒子を放出させた。293T細胞を、6ウェルプレートにウェル当たり細胞 1×10^6 個で播いた。24時間培養した後、細胞を、抗生物質を伴う無血清DMEM培地で2回洗浄し、次に、無血清培地500マイクロリットル中の細胞単層にウイルス溶解産物25マイクロリットルまたは100マイクロリットルを加えた。2時間後、血清を補充したDMEM2.5mlを6ウェルプレートの各ウェルに加えた。

10

【0381】

24～48時間後、細胞を回収し、 $1 \times \text{PBS}$ で2回洗浄し、RIPA溶解緩衝液（100マイクロモルのPMSFを含有する）（例えば、MilliporeまたはThermo Scientificから入手可能である）に再懸濁させた。細胞を、10分ごとに混合しながら氷上で30分間インキュベートし、次に、 4°C 、10,000gで15分間急速回転させた。上清を、ベーターメルカプトエタノールを加えたSDS Laemmli緩衝液と1:2の比率で混合し、 100°C で10分間インキュベートし、SDSゲルにローディングし、ニトロセルロースメンブレン上で、HAエピトープに対する抗体を使用してプローブした。図8および図9に結果が示されている。残りの細胞溶解産物は後で使用するために -80°C で貯蔵した。細胞に、ウイルスであるviz.、Ad5-iMyD88およびAd5-TLRonのそれぞれを別々に用いて別々に形質導入した。

20

【0382】

（実施例6）

CD40およびMyD88L-アデノウイルスによって形質導入された細胞におけるIL-12p70の発現

骨髄由来の樹状細胞（BMDC）を、抗生物質を伴う無血清RPMI培地で2回洗浄した後に、48ウェルプレートにウェル当たり細胞 0.25×10^6 個で播いた。細胞を、無血清培地125マイクロリットル中、6マイクロリットルの粗ウイルス溶解産物で形質導入した。2時間後、血清を補充したRPMI375マイクロリットルを48ウェルプレートの各ウェルに加えた。48時間後、上清を回収し、マウスIL-12p70ELISAキット（BD OptEIA（BD BioSciences、New Jersey））を使用して解析した。各試料について、100nMのAP21087を加えて、または加えずに2連のアッセイを行った。CD40-Lは、CD40受容体に結合する、TNFファミリーのメンバーのCD40リガンドである。LPSはリポ多糖である。図10に結果が示されている。粗アデノウイルス溶解産物を細胞25万個当たり6.2マイクロリットル加えたアッセイの反復の結果が図11に示されている。図12は、より多くのウイルス溶解産物、細胞25万個当たり12.5マイクロリットルを使用してBMDCを感染させた追加的なアッセイ結果を示す。

30

40

【0383】

（実施例7）

MyD88L-アデノウイルスにより形質導入したヒト単球由来樹状細胞におけるIL-12p70の発現

未成熟のヒト単球由来樹状細胞（moDC）を、抗生物質を伴う無血清RPMI培地で2回洗浄した後に、48ウェルプレートにウェル当たり細胞 0.25×10^6 個で播いた。細胞を、アデノウイルスAd5-iMyD88、CD40を異なる感染多重度（MOI）で用いて形質導入し、100nMの二量体化薬AP20187で刺激した。使用したウイルスは、以前の実施例において使用したウイルス溶解産物の最適化された型であった。48時間後、上清を回収し、IL12p70ELISAアッセイにおいてアッセイした。

50

図16は、この滴定の結果を示す。

【0384】

未成熟のヒトmoDCを、抗生物質を伴う無血清RPMI培地で2回洗浄した後、48ウェルプレートにウェル当たり細胞 0.25×10^6 個で播いた。次いで、細胞を、Ad5f35-iCD40(10,000VP/細胞)；Ad5-iMyD88.CD40(100MOI)；Ad5.iMyD88(100MOI)またはAd5-TLR4on(100MOI)のいずれかで形質導入し、記載がある場合は1マイクログラム/ミリリットルのLPSおよび図17に記載がある場合100nMの二量体化薬AP20187で刺激した。48時間後、上清を回収し、IL12p70ELISAアッセイにおいてアッセイした。

10

【0385】

pShuttleX-ihCD40(M-Fv'-Fvls-hCD40；pShuttleX-M-Fv'-Fvls-hCD40としても公知である)を使用してAd5f35-iCD40を作製した。図16および図17に示されているMyD88は、本明細書においてMyD88Lとして示されている型と同じMyD88の切断型である。Ad5.iMyD88で示されるアデノウイルスを、pShuttleX-MyD88L-Fv'-Fvls-Eを使用して作製した。Ad5-iMyD88.Cd40で示されるアデノウイルスを、pShuttleX-MyD88LCD40-Fv'-Fvls-Eを使用して作製した。Ad5-TLR4Onで示されるアデノウイルスを、pShuttleX-CD4/TLR4-L3-Eを使用して作製した。

20

【0386】

(実施例8)

樹状細胞のウイルスによらない形質転換

Fv'Fvls配列に作動可能に連結したiMyD88-CD40配列を含むプラスミドベクター、例えば、pShuttleX-MyD88LCD40-Fv'Fvls-E挿入断片などを構築する。プラスミド構築物は、MyD88LCD40-Fv'Fvls-E配列に作動可能に連結した以下の調節エレメントも包含する：プロモーター、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル。ベクターは、エンハンサー配列も含んでよい。MyD88L、CD40、およびFvFvls配列も、当技術分野で公知の合成法を用いて、最適化されたコドンを含むように修飾することができる。

30

【0387】

未成熟のヒト単球由来樹状細胞(MoDC)を、抗生物質を伴う無血清RPMI培地で2回洗浄した後、48ウェルプレートにウェル当たり細胞 0.25×10^6 個で播く。細胞に、任意の適切な方法、例えば、AMAXAキットを使用したヌクレオフェクション(nucleofection)、電気穿孔、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン、超音波ローディング(sonication loading)、リポソーム媒介トランスフェクション、受容体媒介トランスフェクション、または微粒子銃などを用いてプラスミドベクターで形質導入する。

【0388】

DNAワクチンは、例えば、2008年11月6日に公開された米国特許公報第20080274140号において考察されている。Fv'Fvls配列に作動可能に連結したiMyD88-CD40配列を、例えば、宿主組織においてiMyD88-Cd40 Fv'Fvlsキメラタンパク質を発現させるために必要な調節エレメントも含むDNAワクチンベクターに挿入する。これらの調節エレメントとしては、これらに限定されないが、プロモーター、開始コドン、終止コドン、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーが挙げられ、キメラタンパク質をコードするコドンを最適化することができる。

40

【0389】

(実施例9)

CD40およびMyD88CD40で形質転換された樹状細胞の、マウス腫瘍モデルを用いたin vivoでの評価

50

骨髄樹状細胞に、本明細書の実施例に示されている通りアデノウイルスベクターを使用して形質導入した。これらの形質導入されたBMD Cを、E G. 7-O V Aモデルにおいて腫瘍の成長を阻害するそれらの能力について試験した。E G. 7-O V A細胞（1 0 0 m l 当たり細胞 5×10^5 個）を雌のC 5 7 B L / 6 マウスの右側腹部に接種した。全群のBMD Cを、5 0 マイクログラム / m l のオポアルブミンタンパク質でパルスし、上記の通り活性化した。腫瘍細胞を接種したおよそ7日後に、BMD Cを解凍し、マウスの後足蹠に皮下注射した。

【0390】

全群のマウスにおいて腫瘍の成長を週2回モニターした。全群の無作為のマウスからの末梢血を、四量体染色によって、および *in vivo* C T L アッセイによって解析した。表1は、形質導入されていない樹状細胞（群1および群2）、対照アデノウイルスベクターで形質導入された樹状細胞（群3）、C D 4 0 細胞質内領域をコードするベクターで形質導入された樹状細胞（群4）、切断型M y D 8 8 ベクターで形質導入された樹状細胞（群5および群6）、およびキメラC D 4 0 -切断型M y D 8 8 ベクターで形質導入された樹状細胞（群7および群8）を含む実験計画を示している。細胞を、A P - 1 9 0 3、L P S、またはC D 4 0 リガンドを用いて、示されている通り刺激した。

【0391】

【表1】

表1

群	処置	用量 レベル	ADV vp/ 細胞	[LPS]	[AP1903] (<i>in vitro</i>)	他の試薬 (<i>in vitro</i>)	投与経路 (ワクチン)	投与経路 (AP1903)	N
1	PBS	NA			N/A		SC	N/A	6
2	DCs + CD40L + LPS	細胞 1.5×10^6 個		200 ng/ml	N/A	CD40L 2 μ g/ml	SC	N/A	6
3	DCs + Ad-Luc + LPS + AP1903	細胞 1.5×10^6 個 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ	200 ng/ml	100 nM		SC	IP	6
4	DCs + Ad-iCD40 + LPS + AP1903	細胞 1.5×10^6 個 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ	200 ng/ml	100 nM		SC	IP	6
5	DCs + Ad-iMyD88 + AP1903	細胞 1.5×10^6 個 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ		100 nM		SC	IP	6
6	DCs + Ad-iMyD88	細胞 1.5×10^6 個	20K wGJ		N/A		SC	N/A	6
7	DCs + Ad- iMyD88.CD40 + AP1903	細胞 1.5×10^6 個 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ		100 nM		SC	IP	6
8	DCs + Ad- iMyD88.CD40	細胞 1.5×10^6 個	20K wGJ		N/A		SC	N/A	6

【0392】

腫瘍を接種したマウスにワクチン接種する前に、形質導入された樹状細胞のI L - 1 2 p 7 0 のレベルを *in vitro* で測定した。図18にI L - 1 2 p 7 0 のレベルが示されている。図19は、形質導入されたマウスにおいて観察された腫瘍の成長阻害のチャートを示す。M y D 8 8 で形質導入され、A P 1 9 0 3 で処理された樹状細胞を接種することにより、治癒速度が1 / 6 になり、一方、M y D 8 8 - C D 4 0 で形質導入され、A P 1 9 0 3 なしの樹状細胞を接種することにより、治癒速度が4 / 6 になり、これは、二量体化剤に依存しない効果の潜在性を示している。アスタリスクは、L u c + L P S + A P と i C D 4 0 M y D 8 8 + L P S + / - A P 1 9 0 3 の比較を示す。図19は、代表的なワクチン接種したマウス写真も提供する。

【0393】

図20は、i M y D 8 8 - C D 4 0 で形質導入された樹状細胞で処置したマウスにおけるA g 特異的なC D 8 + T 細胞の誘導の頻度の増大の解析を示す。処置したマウスからの末梢骨髄細胞を、7日目にワクチン接種した10日後に回収した。P B M C を抗m C D 8 - F I T C およびH 2 - K b - S I I N F E K L - 四量体 - P E で染色し、フローサイトメトリーによって解析した。

【0394】

図21は、iMyD88-CD40で形質導入された樹状細胞で処置した後にマウスにおいて誘導されたAg特異的なCD8+ T細胞およびCD4+ TH1細胞の頻度の増大を示す。全ての実験群の3匹のマウスを、ワクチン接種の18日後に屠殺した。群当たり3匹のマウスの脾細胞を一緒に「プール」し、IFN-ガンマELISPOTアッセイによって解析した。Millipore Multiscreen-HAプレートを、10マイクログラム/mlの抗マウスIFN-ガンマAN18抗体(Mabtech AB, Inc., Nacka, Sweden)でコーティングした。脾細胞を加え、完全ELISPOT培地(RPMI、10%のFBS、ペニシリン、ストレプトマイシン)中、5%CO₂下、37℃で20時間培養した。脾細胞を、2マイクログラム/mlのOT-1 (SIINF EKL)、OT-2 (ISQAVHA AHA EINEAGR)またはTRP-2ペプチド(対照の標識していないペプチド)と一緒にインキュベートした。洗浄した後、マウスIFN-ガンマに対する第2のビオチン化モノクローナル抗体(R4-6A2、Mabtech AB)を1マイクログラム/mlの濃度でウェルに適用し、その後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ複合体(Vector Laboratories, Ltd., Burlingame, CA)と一緒にインキュベートした。次いで、プレートを、アルカリホスファターゼの基質である3-アミノ-9エチルカルバゾール(Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO)を用いて展開した。ウェル中のスポットの数は、ZellNet Consulting, Inc.で自動ELISPOTリーダーシステム(Carl Zeiss, Inc, Thornwood NY)を用いてスコア化した。

10

20

【0395】

図22は、in vivo細胞傷害性リンパ球アッセイの概略図および結果を示す。DCワクチン接種の18日後にin vivo CTLアッセイを実施した。同系のナイーブな脾細胞を、in vivo標的細胞として使用した。それらを、6マイクロモルのCFSE (CFSEhi細胞)または0.6マイクロモルのCFSEのいずれかと一緒にCTL培地(CFSElo細胞)中、37℃で10分間インキュベートすることによって標識した。CFSEhi細胞を、OT-1SIINF EKLペプチドでパルスし、CFSElo細胞を対照TRP2ペプチドと一緒にインキュベートした。CFSEhi細胞4×10⁶個とCFSElo細胞4×10⁶個の混合物を、尾静脈から静脈内注射した。in vivoで16時間インキュベートした後に、脾細胞を採取し、CFSE標識された細胞を検出し定量化するために、単一の細胞懸濁液を解析する。図23は、接種されたマウスにおいて、iMyD88-CD40で形質導入された樹状細胞によって誘導されるCTL活性の増強を示すチャートである。図24は、iMyD88-CD40で形質導入された樹状細胞によって誘導されるin vivo CTL活性の増強を示す試料を選択するための未加工のCTLヒストグラムを示す。

30

【0396】

図25は、形質導入された細胞を用いてワクチン接種したマウスにおけるIL-4産生TH2細胞についての細胞内染色の結果を示す。マウスの脾細胞(3匹のマウス由来のプールされた細胞)を、2マイクログラム/mlのOT-2ペプチドを用いて再構成した。細胞を、分泌を抑制するために10マイクログラム/mlのブレフェルジンAと一緒に6時間インキュベートした。次いで、細胞を固定し、透過処理し、抗mIL-4-APCおよび抗mCD4-FITCを用いて細胞内染色することによって解析した。

40

【0397】

iCD40-MyD88配列を含むアデノウイルスベクターを、マウスモデルにおいて腫瘍の成長を阻害するその能力について再度評価した。第1の実験では、誘導性CD40-切断型MyD88ベクター(Ad-iCD40-MyD88)で改変された樹状細胞を接種した後の薬物依存性の腫瘍の成長阻害を測定した。C57BL/6マウスからの骨髓由来の樹状細胞を、10マイクログラム/mlのオボアルブミンでパルスし、細胞当たりウイルス粒子(VP/c)20,000個の、アデノウイルス構築物Ad5-iCD40

50

．MyD88、Ad5-iMyD88またはAd5-Luc（対照）で形質導入した。細胞を、2マイクログラム／mlのCD40L、200ng／mlのLPS、または50nMのAP1903二量体化薬のいずれかを用いて活性化した。E．G7-OVA胸腺腫細胞 5×10^5 個を、C57BL／6マウス（N=6／群）の背中に接種した。腫瘍が直径約5mmに達したときに（接種の8日後）、マウスに、BMD C 2×10^6 個を皮下注射処置した。次の日に、細胞性のワクチン接種をした後、マウスに、5mg／kgのAP1903を腹腔内注射処置した。腫瘍の成長を週2回モニターした。図26Aに結果が示されている。実験の別のセットでは、E．G7-OVA腫瘍を上記の通り確立した。マウス（N=6／群）を、BMD C 2×10^6 個で処置し（オボアルブミンでパルスした）、Ad5-iCD40．MyD88を20,000VP／cまたは1,250VP／cのいずれかで用いて形質導入した。AP1903群のBMD Cを、in vitroで50nMのAP1903を用いて処置した。次の日に、細胞性のワクチン接種をした後、AP1903群のマウスに、5mg／kgのAP1903を腹腔内注射処置した。図26Bに結果が示されている。図26Cは、種々のワクチン細胞を凍結保存する前に一晚培養した後に産生された相対的なIL-12p70のレベルを示す。IL-12p70をELISAアッセイによってアッセイした。

10

【0398】

改変された骨髄樹状細胞を用いて免疫化したマウスからの血液を、腫瘍特異的T細胞の頻度および機能について四量体染色を用いて解析した。図27Aは、マウス（N=3～5）を、オボアルブミンをパルスしたBMD Cを用いて皮下免疫化し、図26に記載の通り活性化した実験の結果を示す。ワクチン接種した1週間後、末梢血単核細胞（PBMC）を抗mCD8-FITCおよびSINFEKL-H2-Kb-PEで染色し、フローサイトメトリーによって解析した。図27Bは、上記の通りBMD Cを用いてワクチン接種したマウスにおいて実施したin vivo CTLアッセイの結果を示す。BMD Cによる免疫化の2週間後に、同系のC57BL／6マウスからの脾細胞を、TRP-2対照ペプチドであるSVYDFFWL、または標的ペプチドであるSINFEKL標的のいずれかでパルスし、in vivo標的として使用した。脾細胞の半分を、6マイクロモルのCFSE（CFSEhi細胞）または0.6マイクロモルのCFSE（CFSElo細胞）で標識した。CFSEhi細胞を、OT-1（SINFEKL）ペプチドでパルスし、CFSElo細胞を、対照TRP-2（SVYDFFWL）ペプチドと一緒にインキュベートした。CFSEhi細胞 4×10^6 個とCFSElo細胞 4×10^6 個の混合物を、尾静脈から静脈内注射した。次の日に、脾細胞を採取し、単一の細胞懸濁液を、CFSE標識された細胞を検出し定量化するために解析した。図27Cおよび図27Dは、IFN-ガンマアッセイの結果を示す。図26に記載の通り処置したE．G7-OVA担持マウスからの末梢血単核細胞（PBMC）を、1マイクログラム／mlのSINFEKLペプチド（OT-1）、ISQAVHAHAHAINEAGR（OT-2）およびTRP-2（無関連H2-Kb-制限）ペプチドを用いてIFN-ガンマELISpotアッセイにおいて解析した。IFN-ガンマ産生リンパ球の数を3連のウェルで評価した。群当たり3匹のマウスからの細胞をプールし、IFN-ガンマELISpotによって3連のウェルで分析した。アッセイを2回実施した。

20

30

40

【0399】

図28は、本実施例に示されている通り処置したマウスからの脾細胞を使用して実施した天然キラー細胞アッセイの結果を示す。マウス（群当たり3匹）から得た脾細胞をエフェクター（E）として使用した。Yac-1細胞を51Crで標識し、標的（T）として使用した。EL-4細胞株を無関連の対照として使用した。

【0400】

図29は、抗原特異的な細胞傷害性リンパ球を検出するためのアッセイの結果を示す。マウス（群当たり3匹）から得た脾細胞をエフェクターとして使用した。EG．7-Ova細胞を51Crで標識し、標的（T）として使用した。EL-4細胞株を無関連の対照として使用した。

50

【0401】

図30は、誘導性CD40-切断型MyD88(iCD40.MyDD)アデノウイルスベクターで形質導入したヒト細胞の活性化の結果を示す。3つの異なるHLA-A2+ドナーからの樹状細胞(培養5日目)をプラスチック-接着法によって精製し、10,000VP/細胞の、Ad5-iCD40.MyD88、Ad5-iMyD88またはAd5-Lucで形質導入した。細胞を、100nMのAP1903または0.5マイクログラム/mlのCD40Lおよび250ng/mlのLPSまたは、TNF-アルファ、IL-1ベータ、IL-6、およびプロスタグランジンE2(PGE2)を含有する標準の成熟化反応混液(MC)を用いて活性化した。自己CD8+ T細胞を、マイクロビーズを使用して負の選択によって精製し、10マイクログラム/mlのHLA-A2-制限FLWGPRALV MAGE-3ペプチドでパルスしたDCと、1:5(DC:T)の比率で7日間共培養した。DC(7日目)を用いた第2ラウンドの刺激の5日後に、T細胞を標準のIFN-ガンマELISPotアッセイにおいてアッセイした。細胞を、1マイクログラム/mlのMAGE-3または無関連のHLA-A2-制限PSMAポリペプチド(PSMA-P2)でパルスした。実験を3連で実施した。

10

【0402】

図31および図32は、細胞遊走アッセイの結果を示す。mBMDCを、Gene Jammer(Stratagene、San Diego、California)の存在下で、10,000VP/細胞のAd5.ルシフェラーゼまたはAd5.iMyD88.CD40で形質導入し、100nMのAP1903(AP)またはLPS(1マイクログラム/ml)を用いて48時間刺激した。CD11c+樹状細胞の表面におけるCCR7の発現を、PerCP.Cy5.5とコンジュゲートした抗体を用いた細胞内染色によって解析した。図31は、この実験の結果を示し、各アッセイが別々に示されている；図32は、結果を同じグラフに提供している。

20

【0403】

(実施例10)

特定の核酸配列およびアミノ酸配列の例

【0404】

【化 1】

配列番号 1 (ヒトCD40をコードする核酸配列; Genbank 受託番号 NM_001250
; 細胞質内領域が太字で示されている)。

```

1 gccaaaggctg gggcagggga gtcagcagag gcctcgctcg ggcgcccagt ggtcctgccg
61 cctggtctca cctcgctatg gttcgtctgc ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc
121 tgaccgctgt ccatccagaa ccaccactg catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca
181 gtcagtgtcg ttctttgtgc cagccaggac agaaactggg gagtgactgc acagagttca
241 ctgaaacgga atgccttctt tgcggtgaaa gcgaattcct agacacctgg aacagagaga
301 cacactgcc aacagacaaa tactgcgacc ccaacctagg gcttcgggtc cagcagaagg
361 gcacctcaga aacagacacc atctgcacct gtgaagaagg ctggcactgt acgagtgagg
421 cctgtgagag ctgtgtctcg caccgctcat gctcgcccgg ctttggggtc aagcagattg
481 ctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc cctgcccagt cggcttcttc tccaatgtgt
541 catctgcttt cgaaaaatgt cacccttga caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc
601 aacaggcagg cacaacaag actgatgttg tctgtggtcc ccaggatcgg ctgagagccc
661 tgggtggtgat ccccatcatc ttggggtacc tgttgccat cctctgggtg ctggtcttta
721 tcaaaaagggt ggccaagaag ccaaccaata aggccccca cccaagcag gaacccagg
781 agatcaattt tcccgacgat cttcctggct ccaacactgc tgctccagtg caggagactt
841 tacatggatg ccaaccggtc acccaggagg atggcaaaga gagtcgcatc tcagtgcagg
901 agagacagtg aggtcgacc caccaggag tgtggccacg tgggcaaaca ggcagtggc
961 cagagagcct ggtgtgtctg ctgtgtggc gtgagggtga ggggctggca ctgactgggc
1021 atagctcccc gcttctgcct gcaccctgc agtttgagac aggagacctg gcactggatg
1081 cagaaacagt tcacctgaa gaacctctca ctcaccctg gagcccatcc agtctccaa
1141 cttgtattaa agacagaggc agaagtttg tgggtggtgt gttggggat ggttagtaa
1201 tatccaccag acctccgat ccagcagttt ggtgccaga gaggcacat ggtggcttc
1261 ctgcgcccag gaagccatat acacagatgc ccattgcagc attgtttgtg atagtgaaca
1321 actggaagct gcttaactgt ccatcagcag gagactggct aaataaaatt agaatatatt
1381 tatacaacag aatctcaaaa acactgttga gtaaggaaaa aaaggcatgc tgctgaatga
1441 tgggtatgga actttttaa aaagtacatg ctttatgta tgtatattgc ctatggatat
1501 atgtataaat acaatatgca tcatatattg atataacaag ggttctggaa gggtagacag
1561 aaaaccaca gctcgaagag tggtagcgtc tgggtggggg aagaagggtc tggggg

```

【 0 4 0 5 】

【化 2】

配列番号2(ヒトCD40をコードするアミノ酸配列;細胞質内領域が太字で示されている)。

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECPLCGES
EFLDTWNRETHCHQHXYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLHRSCSPGF
GVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTDVVCQPQDRLR
ALVVIPIIFGILFAILLVLFIKKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTAAPVQETLHGCQPV
TQEDGKESRISVQERQ

10

20

30

40

50

【0406】

【化3】

配列番号 3 (PSMA をコードするヌクレオチド配列)

キー： シグナルペプチド (大文字、太字、下線) (gp67), BamHI 部位 / スペース (大文字、下線), 6xHis (大文字)、第Xa因子切断型部位 (大文字および小文字、太字)、PSMA (小文字) (44-750)

ATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAGCAAGATGGTAAGCGCTATTGTTTTATA
TGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTGCGGCGGATCCGCATCATCATCATCACAGCtccggaATCGAG
 GGACGTGGTaaatcctccaatgaagctactaacattactccaaagcataatatgaaagcatttttgatgaattgaaagctgagaacatcaagaagtt
 cttatataattttacacagataccacatttagcaggaaacagaaacaaactttcagcttgcaaagcaaattcaatcccagtggaagaatttggcctggattc
 tgttagctagcacattatgatgtcctgtgtcctaccaaataagactcatccaaactacatctcaataattaatgaagatggaaatgagattttcaacaca
 tcattatttgaaccacctctccaggatagaaaatgtttcgatattgtaccaccttcagtgctttctcctcaaggaatgccagagggcgatctagtgtat
 gttaactatgcacgaactgaagacttcttaaatggaaacgggacatgaaaatcaattgctctgggaaaattgtaattgccagatatgggaaagttttcaga
 ggaaataagggttaaaaatgccagctggcaggggcaaaggagtcatttctactccgacctgctgactactttgctcctggggtgaagtctatccagat
 ggttgaatcttctggagggtggtgtccagcgtggaaatatcctaaatcgaatggtgcaggagaccctctcacaccaggttaccagcaaatgaatatgct
 tataggcgtggaattgcagaggctgttggtcttccaagtattcctgttcatccaattggatactatgatgcacagaagctcctagaaaaatgggtggctca
 gcaccaccagatagcagctggagaggaagtcctaaagtccctacaatgttggacctggcttactggaaactttctacacaaaaagtcagatgcacat
 ccactctaccaatgaagtgaagaatttacaatgtgataggtactctcagaggagcagtggaaccagacagatatgtcattctgggaggtcaccgggact
 catgggtgttgggtgattgacctcagagtgagcagctgttggatcgaatgtgaggagcttggaaactgaaaaaggaaggggtggagacctaga
 agaacaattttgttgaagctgggatgcagaagaatttggctcttctggttctactgagtgaggagaggaattcaagactccttcaagagcgtggcgtg
 gcttatattaatgtgactcatatagaaggaaactacactctgagagtgattgtacaccgctgatgtacagcttggtacacaacctaacaaaagagctg
 aaaagccctgatgaaggcttgaaggcaaatctcttatgaaagtggactaaaaaagtcctccagagttcagtggtgcatgccaggataagcaaat
 gggatctggaaatgattttgaggtgttcttcaacgacttgaatgcttcaggcagagcacggtatactaaaaattgggaaacaaacaaattcagcggct
 atccactgtatcacagtgctatgaacatatgattggtggaaaagttttatgatccaatgtttaaatatcacctcactgtgcccaggttcgaggaggat
 ggtgtttgagctagccaattccatagtgctcccttttattgtctgagattatgctgtattttaagaaagtatgctgacaaaatctacagtattttatgaaca
 tccacaggaaatgaagacatacagtgatcatttgattcatttttctgcagtaagaattttacagaaattgctccaagttcagtgagagactccaggac
 ttgacaaaagcaaccaatagatttaagaatgatgaatgatcaactcatgttctggaaagagcatttattgatccattagggttaccagacaggcctttt
 ataggcatgtcatctatgctccaagcagccacaacaagtatgcaggggagtcattcccaggaaattatgatgctctgtttgatattgaaagcaagtgacc
 ctccaaggcctggggagaagtgaagagacagatttatgttcagccttcacagtgcaggcagctgctgagactttgagtgaagtagcctaa

10

20

【0407】

【化4】

配列番号 4 (PSMA のアミノ酸配列)

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFLEL
 KAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINE
 DGNEIFNTSLFEP PPPGYENVSDIVPPFAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGK
 IVIARYGKVFRGNKVKNALAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGA
 GDPLTPGYPAN EYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGG SAPPDSSWRGSLKV PYNV
 GPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAV
 VHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEGNY
 TLRVDCTPLMYSLVHNLTKEKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFF
 QRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETVELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFE LAN
 SIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDLSFSAVKNFTEIASKF SERLQDFDKS
 KHVIYAPSSH NKYAGESFP GIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVA AFTVQAAAETLSEVA

30

40

【0408】

【化 5】

配列番号 5 (Sall リンカーを伴う MyD88L のヌクレオチド配列)

gtcgacatggctgcaggaggtcccgcgcggggtctcgggccccggtctcctccacatctccctccctggctgctctcaacatgcgag
tgcggcgccgcctgtctctgtttgaacgtgcggacacaggtggcgccgactggaccgcgtggcggaggagatggactttgagtactt
ggagatccggcaactggagacacaagcggaccccactggcagggtgctggacgcctggcagggacgccctggcgccctgttaggcc
gactgctcgagctgcttaccagctgggcccgcgacgacgtgctgctggagctgggaccagcattgaggaggattgccaaaagtatatct
tgaagcagcagcaggaggagggtgagaagcctttacagggtggccgctgtagacagcagtgctccacggacagcagagctggcgggc
atcaccacacttgatgacccctggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcatctgctattgccccagcgacatcgtcgac

10

【 0 4 0 9 】

【化 6】

配列番号 6 (MYD88L のアミノ酸配列)

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIRQLE
TQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRILLELLTKLGRDDVLELGPSIEEDCQKYILK
QQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITLDDPLGHMPERFDAFICYCPSDI

20

【 0 4 1 0 】

【化 7】

配列番号 7 (XhoI/Sall リンカーを伴う Fv'Fvls のヌクレオチド配列 (Fv' の小文字はゆらぎコドンである))

ctcgagGGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAtGGcaGaACaTTtCCtAAaaGgGGaCAaACaTGt
GTcGTcCAITAtACaGGcATGtTgGAgGAcGGcAAaAAgGTgGAcagtagtaGaGAtcGcAAIAaACtTTc
AAaTTcATGtTgGGaAAaCAaGAaGTcATtaGgGgATGGGAgGAgGGcGTgGCtCAaATGtccGTcGGc
CAacGcGCtAAgCTcACcATcagcCCcGAcTAcGCaTAcGGcGCtACcGGaCAtCCcGGaATtATtCCcC
CtCAcGCtACcTgGTgTTtGAcGTcGAaCTgtTgAAgCTcGAagtcgagggagtgagggtggaaccatctccccag
gagacgggcgccaccttcccaagcgcgccagacctgctgggtgactacacgggatgcttgaagatggaagaaagtgtattcctc
ccgggacagaaacaagccctttaagtttatgctaggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggtgcccagatgagtg
ggtcagagagccaaactgactatatctccagattatgcctatggtgccactgggacccaggcacatcccaccacatgccactctcgtctt
cgatgtggagcttctaaaactggaatctggcggtggatccggagtcgag

30

【 0 4 1 1 】

【化 8】

配列番号 8 (FV'FVLS のアミノ酸配列)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThrGlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGlnGluValIleA
rgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrG
lyHisProGlyIlelleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGlu (ValGlu)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThrGlyMe
tLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGlnGluValIleA
rgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrAlaTyrGlyAlaThrG
lyHisProGlyIlelleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGluSerGlyGlyGlySerGly

10

【 0 4 1 2 】

【化 9】

配列番号 9 (MyD88 のヌクレオチド配列)

atggctgcaggaggtcccggcgcggggtctgcggccccgggtctctccacatctcccttcccctggctgctctcaacatgcgagtgccgc
gccgcctgtctctgttctgaacgtgcggacacaggtggcgccgactggaccgcgctggcggaggagatggactttgagtacttgagat
ccggcaactggagacacaagcggacccccactggcaggctgtctggacgcctggcagggacgccctggcgccctctgtaggccgactgct
cgagctgcttaccagctgggcccgcgacgacgtgctgctggagctgggacccagcattgaggaggattgccaaaagtatacttgaagc
agcagcaggaggagggtgagaagccttacaggtggccgctgtagacagcagtgctccacggacagcagagctggcgggcatcacc
acactgatgacccccctggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcatctgctattgccccagcgacatccagtttgtagcaggagatgatcc
ggcaactggaacagacaaactatcgactgaagttgtgtgtctgacccgcgatgtcctgacctggcacctgtgtctggtctattgtagtgagct
catcgaaaagagggtgccgccgatgggtgggtgtctctgatgattacctgcagagcaaggaatgtgacttcagaccaaatttgactc
agcctctctccaggtgccatcagaagcgactgatccccatcaaglacaaaggcaatgaagaaagagttcccagcatcctgaggttcac
actgtctgcgactacaccaacccctgcaccaaattctggttctggactgccttgccaaggcctgtccctgccc

20

30

【 0 4 1 3 】

【化 1 0】

配列番号 10 (MyD88 のアミノ酸配列)

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAAD
WTALAEEMDFEYLEIRQLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLEL
LTKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYILKQQQEEAEKPLQVAAVDSSVP
RTAELAGITTLDPLGHMPERFDAFICYCPSDIQFVQEMIRQLEQTN
YRLKLCVSDRDVLPGTCVWSIASELIEKRCRMVVVVSDDYLSKE
CDFQTKFALSLSPGAHQKRLIPIKYKAMKKEFPSILRFITVCDYTNPC
TKSWFWTRLAKALSLP

40

【 0 4 1 4 】

【化 1 1】

配列番号 11 (VCAM-1 のヌクレオチド配列 : NM_001078)

atgcctgggaagatggctgctgacccctgagcctcaaatatacttggataatgttgcagcttctcaagctttaaaaatcgagaccacccag
aatctagatacttctcagattgggtgactccgtctcattgacttgcagcaccacaggctgtgagctcccatcttcttggagaacccagata
gatagtcactgaatgggaaggtagcgaatgagggaccacatctacgtgacaatgaatcctgtagtttgggaacgaacactcttacc
tgtgcacagcaactgtgaaatcaggaattggaaaaaggaatccagggtggagatctactctttcctaaggatccagagattcattgagt
gcccctgagggtgggaagccgacacagtcagtggtcagttgctgagtataccattgacaggctggagatagacttactgaaagg
agatcatctcatgaagagtcaggaattctggaggatgcagacaggaagtcctggaaaccaagagtttgaagtaaccttactctgtc
attgaggatattggaaaagtcttctgttgcgagctaaattacacattgatgaaatggattctgtgccacagtaaggcaggctgtaaaagaa
ttgcaagctacatatcaccacaagaatacagttattctgtgaatccatccacaaagctgcaagaagggtgctctgtgacctgacctgtcc
agcagggtctaccagctccagagatttctggagtaagaaattagataatgggaatctacagcaccttctggaaatgcaactctcacct
aattgctatgaggatggaagattctggaattatgtgtgtgaaggagtaattgattgggaaaaacagaaaagaggtggaattaatgttca
agagaaaccatttactgtgagatctccctggaccccgattgctgctcagattggagactcagtcattgtgacatgtagtcatgggctgt
gaatcccatcttctcctggagaaccagatagacagccctctgagcgggaagggtgaggagtgggggaccaattccacgctgacct
gagccctgtgagtttggagaacgaacactcttctgtgcacagtgacttggacataagaaactggaaaagggatccagggtggagctc
tactattccctagagatccagaaatcgagatgagtggtggcctcgtgaatgggagctctgtcactgtaagctgcaaggttcttagcgtga
ccccctgaccggctggagattgaattacttaagggggagactattctggagaatatagagtttggaggatcggatatgaaatctctaga
gaacaaaagtggaaatgacctcatccctaccattgaagatactggaaaagctctgttgcaggctaagttacatattgatgacatgga
attcgaacccaaacaaaggcagagtagcgaacactttatgtcaatgttgcacccagagatacaaccgtcttggtcagccctctccatc
ctggaggaaaggcagttctgtgaatgacatgcttgagccagggtcttctgctccgaaaaatcctgtggagcaggcagctccctaacgggg
agctacagcctcttctgagaatgcaactctcaccttaatttctacaaaaatggaagattctggggttattatgtgaaggaaatccagggt
ggaagaagcagaaagggaagtggaaatcaatcaagttactccaaaagacataaaactacagcttttctctgagagtgtaaaagaa
ggagacactgtcatctcttctgtacatgtggaaatgttccagaacatggataatcctgaagaaaaagcggagacaggagacacagt
actaaaatctatagatggcgccctatccatccgaaaggccagttgaaggatcgggagtagatgaatgtaacttaaaaaacaaagtgg
ctcacaattaagaagtttaacacttgatgttcaaggaaagaaaaacaaagactatttctcctgagctctctgtgctctatttgcacctc
cttaataatcctgccattggaatgataatttacttgcagaaaaagccaacatgaaggggcatatagctgtgtagaacacagaaatcaa
aagtg

10

20

【 0 4 1 5】

【化 1 2】

配列番号 12 (VCAM-1 のアミノ酸配列)

MPGKMMVILGASNLWIMFAASQAFKIETTPESRYLAQIGDSVS
LTCSTTGCESPFFSWRTQIDSPNGKVTNEGTTSTLTMPVSVFGNEHSYLCTATCESR
KLEKGIQVEIYSFPKDPKPEIHLSPLEAGKPITVKCSVADVYPDRLEIDLLKGDHLMK
SQEFLEDADRKSLETKSLEVTFTPIEDIGKVLVCRALHIDEMDSVPTVRQAVKELQ
VYISPKNTVISVNPSTKLQEGSVTMTCSSEGLPAPEIFWSKLDNGNLQHLSGNATL
TLIAMRMEDSGIYVCEGVNLIGKNRKEVELIVQEKPFVEISPGPRIAAQIGDSVMLT
CSVMGCESPSFSWRTQIDSPSGKVRSEGTNSTLTLSPVSFENEHSYLCTVTGHHKL
EKGIQVELYSFPRDPEIEMSGGLVNGSSVTVSKVPSVYPLDRLEIELLKGETILENI
EFLEDTDMKSLENKSLEMTFIPTIEDTGKALVCQAKLHIDMEFEPKQRQSTQTLVNV
VAPRDITVLVSPSSILEEGSSVNMTCLSQGFAPKILWSEQLPNEGELQPLSENATLTL
ISTKMEDSGVYLCEGINQAGRSRKEVELIQVTPKDIKLTAFPSSESVKEGDTVIICT
CGNVPETWILKKKAETGDTVLSIDGAYTIRKAQLKDAGVYECESKNKVGSQLRSLT
LDVQGRENNKDYFSPPELLVLYFASLIIPAIGMIYFARKANMKGSYSLVEAQSKSV

30

【 0 4 1 6】

【化 1 3】

40

配列番号 13 (IL-6 のヌクレオチド配列 : NM_000600)

atgaactccttctccacaagcgccttgggtccagttgccttctccctggggctgctcctggtgttgcctgctgccttccctgcccagtacccc
aggagaagattccaagatgtagccgccccacacagacagccactcacctcttcagaaacgaattgacaaacaaatcggtacatcctcg
acggcatctcagccctgaaaggagacatgtaacaagagtaacatgtgtgaaagcagcaaaaggagcactggcagaaaaacacactg
aaccttcaaagatggctgaaaaagatggatgctccaatctggattcaatgaggagacttgcctgggtgaaatcatcactggtctttggag
tttgaggatatacttagagtacctccagaacagatttgagagtagtgaggaaacagccagagctgtgcagatgagtacaaaagtctgac
cagttctgcagaaaaaggcaagaatctagatgcaataaccacccctgaccaaccacaaatgccagcctgtgcaggaagctgcag
gcacagaaccagtggtgctcaggacatgacaactcatctcattctgcgcagctttaaggagttcctgcagtcagcctgagggtcttccggc
aatg

【 0 4 1 7】

50

【化 1 4】

配列番号 14 (IL-6 のアミノ酸配列)

MNSFSTSAFGPVAFLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHR
 QPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGC
 FQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKN
 LDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

【0 4 1 8】

【化 1 5】

10

配列番号 15 (IL-6R のヌクレオチド配列 : IL-6R: NM_000565) IL-6sR は、IL-6R 配列に由来する。

atgctggccgctcggtgctgcgctgctggctgccctgctggccgcccgggagcggcgtggccccaaggcgtgccctgctgcaggagg
 tggcgagaggcgtgctgaccagctgccaggagacagcgtgactctgacctgccgggggtagagccggaagacaatgccactgttca
 ctgggtgctcaggaagccggctgcaggctcccacccagcagatgggctggcatgggaaggaggctgctgctgaggtcggtgcagctc
 cagactctggaactattcatgctaccgggcccggcccagctgggactgtgacttctggtgatgtcccccgaggagccccag
 ctctctgcttccggaagagccccctcagcaatgtgtgtgagtggtgctcggagcaccatccctgacgacaaaggctgctcttg
 gtgaggaagtccagaaacagtcggccgaagactccaggagccgtgccagtattccaggagtccagaagtctcctgccagttagca
 gtcccgaggaggagacagctctttctacatagtgccatgtgctgctgagtagtgctgggagcaagttcagcaaaactcaaaccttcagg
 gttgtggaatcttgacgctgatccgctgccaacatcacagtcactgcccgtggccagaaacccccgctggctcagtgctacctggcaag
 accccactctggaactcatctttctacagactacggtttgagctcagatatcggtgtaacggtcaaagacattcacaactggatggtc
 aaggacctccagcatcactgtgctacccagcgcctggagcggcctgaggcacgtggtgcagctcgtgcccaggaggaggtcgggca
 aggcgagtgaggcagtgaggcccgaggccatgggacgcctggacagaatccaggagtctccagctgagaacgaggtgtcca
 ccccatgcaggcacttactactaataaagacgatgataatattctctcagagattctgcaaatgcgacaagcctccagtgcaagattctt
 ctctcagtaacctgccacattcctggtgctggaggagcctggccttcggaacgctcctctgcatgtccattgttctgaggtcaagaagac
 gtggaagctgcgggctctgaaggaaggcaagacaagcatgcatccgctactcttggggcagctggtccggagaggcctcgaccc
 acccagtgctgttctctcatctccccaccggtgtcccccagcagcctggggtctgacaatacctcgagccacaaccgaccagatgcca
 gggaccacggagcccttatgacatcagcaatacagactacttctccccaga

20

【0 4 1 9】

【化 1 6】

配列番号 16 (IL-6sR のアミノ酸配列) IL-6sR は、IL-6R 配列に由来する。

30

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVT
 LTCPGVEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSCYRAGR
 AGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPLSNVVCEWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAED
 FQEPCQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSTQTFQGCGLQPDP
 PANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHH
 CVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQAL
 TTNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLICIAIVLRFKKTW
 KLRALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHNRPA
 RDPRSPYDISNTDYFFPR

40

【0 4 2 0】

(実施例 1 1)

i C D 4 0 をトランスフェクトされた樹状細胞を用いた患者の臨床処置

方法の要約

進行性転移性去勢抵抗性前立腺癌の男性を、B P X - 1 0 1 を評価する 3 + 3 用量漸増
 第 I / I I a 相試験に登録した。B P X - 1 0 1 は、単一の白血球除去生成物から、水簸
 、単球の D C への分化、A d 5 f 3 5 誘導性ヒト (i h) - C D 4 0 を用いた形質導入、
 リポ多糖を用いた簡単な処理、および抗原を P S M A ポリペプチド (前立腺特異的膜抗原

50

）の形態で負荷することによって作製する。BPX-101を、2週間ごとに6用量皮内投与した。各用量の24時間後に、活性化剤であるAP1903（0.4 mg/kg）を1用量注入した。急性期の間に探索的臨床評価および免疫学的評価を実施し、これは、4週間ごとの血清PSA、12週間ごとのCT/MRIおよび放射性核種骨スキャン、第5週における注射部位のDTH皮膚生検および抗原特異的な免疫応答についてのアッセイ、ならびに週に1回の、全身免疫応答に関する血清サイトカインおよびIL-6の測定を含んだ。試験に登録された被験体12人に関して、平均のハラビの予測生存（Halabi-predicted survival）は13.8カ月であった。

【0421】

ワクチン

10

Ad5f35-ihCD40

誘導性のヒトCD40受容体を、アデノウイルス血清型35（Ad35）に由来する複製欠損性Ad5ベースのベクターにクローニングした。Ad5f35アデノウイルスは、多用途のAdEasyシステム（Gittes, R. F., New England Journal of Medicine 324, 236-45（1991））にクローニングされており、Ad5線維尾部ドメインおよびAd35線維シャフトドメインおよびノブドメイン（shaft and knob domains）からなる遺伝子操作された遺伝子を含む。Ad5f35ウイルスは、宿主細胞に侵入するための受容体として、普遍的に発現されるCD46を利用するので、造血性起源の細胞に対する効率的な向性を有する（Crawford, E. D. et al., [erratum appears in N Engl J Med 1989 Nov 16; 321(20):1420]. New England Journal of Medicine 321, 419-24（1989））。

20

【0422】

Ad5f35-ihCD40は、多数の成分：

- ・ヒトc-Src由来のミリスチル化ターゲティングドメインの1つのコピー（Myr）
- ・「ゆらいだ」コドンを含むヒトFKBP12（V36）の1つのコピー（Fv'）
- ・FKBP12（V36）の1つのコピー（Fv）
- ・短いG-S リンカー（ls）
- ・ヒトCD40の細胞質ドメイン（CD40c）

30

を含む単一の導入遺伝子をコードする。

【0423】

導入遺伝子の発現は、サイトメガロウイルス（CMV）由来のプロモーターによって制御される。

【0424】

c-Src（14アミノ酸）のN末端がミリスチル化された膜局在化ドメインを使用して、iCD40受容体を細胞内の膜に局在化させる。c-Src由来のミリスチル化ターゲティング配列を、最初に、サブクローニングし、FKBPドメインにつなぐために都合のよい制限部位を含むPCRオリゴヌクレオチドとして設計した。

40

【0425】

FKBP12（V36）：F36がVに置換された、ヒトの12kDaのFK506結合性タンパク質は、完全な成熟コード配列（アミノ酸1~107）であり、合成の二量体化薬であるAP1903の結合部位をもたらす（Jemal, A. et al., CA Cancer J. Clin. 58, 71-96（2008）； Scher, H. I. and Kelly, W. K., Journal of Clinical Oncology 11, 1566-72（1993））。このタンパク質の2つのタンデムなコピーを構築物に含めて、AP1903によって架橋すると高次のオリゴマーが誘導されるようにする； CD40の活性化は、通常、受容体三量体

50

の形成を必要とする。

【0426】

F36V'-FKBP:F36V'-FKBPは、F36V-FKBPのコドンがゆらいだ型である。F36V'-FKBPは、F36V-FKBPと同一のポリペプチド配列をコードするが、ヌクレオチドレベルでは、わずかに62%の相同性のみを有する。レトロウイルスベクターにおける組換えを低下させるためにF36V'-FKBPを設計した(Schellhammer, P. F. et al., J. Urol. 157, 1731-5 (1997))。F36V'-FKBPを、PCR組み立て手順によって構築した。導入遺伝子は、F36V-FKBPの1つのコピーに直接連結したF36V'-FKBPの1つのコピーを含有する。

10

【0427】

CD40:CD40受容体のcDNA配列は、ヒトCD40遺伝子(188アミノ酸)の62アミノ酸細胞質ドメイン全体をコードする。この領域は、TNFファミリーの受容体を下流のシグナル伝達分子、例えば、NF-κBなどと架橋するアダプタータンパク質であるTNF受容体関連因子2、3および6(TRAFF2、3および6)のための多数の結合部位を含む(Small, E. J. & Vogelzang, N. J., Journal of Clinical Oncology 15, 382-8 (1997); Scher, H. I., et al., Journal of the National Cancer Institute 88, 1623-34 (1996))。

20

【0428】

その後、Center for Cell and Gene Therapyのベクターコア施設において誘導性CD40を非複製的なE1、E3-欠失Ad5f35ベースのベクターにサブクローニングし、その後、関連するGMPベクター作製施設において再プラーク精製し、増幅した。図44は、CD40発現ベクターのマップを示し、図33は、プラスミドAd5f35ihCD40のマップを示す。

【0429】

P SMA

P SMAタンパク質の細胞外ドメインを使用してMoDCをパルスする。最初に、P SMAの細胞外部分の大部分を、P SMAクローンID520715(Invitrogen)からPCR増幅して、2100bpを得た。この断片を、バキュロウイルス由来のプロモーターおよび豊富な外被表面糖タンパク質であるgp67由来のアミノ末端の疎水性分泌シグナルペプチドを含有する移入ベクターにサブクローニングした。潜在的な追加的な免疫原性エピトープを含有するP SMAの前立腺形態に見出されるエクソン18を付加するために、ヒトLNCaP細胞由来のcDNAをPCR増幅して、P SMAの3'末端(約残基620~750)を含有する408bpの断片を得た。この断片をサブクローニングして、全長のpAcGP67.XP SMAx18を得、それを、オープンリーディングフレーム全体を通して配列決定した。組換えファージを作出するために、プラスミドpAcGP67.XP SMAx18を、Sf9昆虫細胞(Invitrogen、11496~015)にBD BaculoGold(商標)DNA(BD Pharmingen)と同時トランスフェクトした。ウイルスストックを回収し、2ラウンドのプラーク精製に供した。1つのプラークを選択し、P1ウイルスストックのレンダリングを拡大し、それを増幅して、力価の高いストックを生成するために使用するP2ウイルスストックを生成した。細胞を、常時無血清の昆虫培地(Sf900 IISFM, Gibco)中で成長させた。P SMAを発現しているバキュロウイルスストックを使用して、Waveバイオリアクター内のexpressSf+(Protein Sciences Corp.)細胞の無血清培養物に感染させた。一度発現し、翻訳後修飾を受けたら、アミノ酸配列は、もはやシグナルペプチド配列を含まない。上清を回収し、清澄化し、次いで、接線限外濾過(UF)によって濃縮し、後のステップにおいて使用するカラム用のローディング緩衝液中にダイアフィルトレーションし、0.2μmの膜を通して濾過し、ニッケル

30

40

50

アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。溶出したPSMAを採取し、緩衝液をPBSと交換した。この材料をナノ濾過し、滅菌濾過し、およそ0.4 mg/mLの濃度でバイアルに分注し、-80℃で貯蔵した。

【0430】

LPS

LPSは、TLR-4リガンドであり、BPGMAX-CD1を完全に機能的活性化するための重大な成分である。Salmonella typhosa由来のLPS (Sigma-Aldrich)を、ゲル濾過クロマトグラフィーによって精製し、γ照射し、細胞培養試験する。単一のロットを使用してBPX-101のMoDCを同時活性化する。

10

【0431】

自己細胞プロセッシング

ドナー単核細胞を、アフエレーシスによって得、樹状細胞前駆体を水籤によって選択する。培養物中の前駆細胞を800 U/mLのヒトGM-CSFを用いて、および無血清のCell Genix DC培地については500 U/mLのヒトIL-4で刺激することによってMoDCを生成する。未成熟のDCを回収し、PSMAタンパク質(約10 μg/mL)でパルスし、次いで、Ad5f35-ihCD40で形質導入し、LPSおよびAP1903二量体化薬で活性化する。その後、成熟MoDCを広範囲にわたって洗浄し、回収し、最終生成物BPX-101として凍結保存する。

20

【0432】

完全なBPX-101活性化の後(LPSを加えた24時間後)、内部移行しなかったLPSを大規模な洗浄によって除去する。BPX-101原薬の各バッチの放出検査は、純度の評価として内毒素の定量化を含んだ。

【0433】

安定性および貯蔵

製剤ワクチンであるBPX-101は、原薬細胞懸濁液を、臨床で使用するまで凍結し細胞の完全性を維持しやすい処方に調整することによって直接、即座に調製する。これは、適量の保存料(HSA)、Cryoserveジメチルスルホキシド(DMSO)およびPlasmaLyteを慎重に加え、最終的な細胞懸濁液を制御された凍結手順に供することによって実現される。完全に活性化された細胞調製物(原薬)の処方の第1のステップは、3%のHSAを含有するPlasmaLyte-Aを加えることによって濃度を調整して、総細胞計数および生存能力データ(原薬放出試験)に基づく標的用量(1 mL当たり生存細胞 4×10^6 個、 12.5×10^6 個または 40×10^6 個)を実現することである。次いで、細胞調製物を、モニターされている冷蔵庫中で少なくとも15分間にわたって1~6℃に冷却する。冷却した凍結保護物質溶液(DMSO/25%のHSA/PlasmaLyte-A、15:35:50 v/v/v)を細胞生成物に、制御された速度、1:1の体積比(最終的に体積で7.5%のDMSO)で加える。冷却した細胞調製物を、前標識したcryobags(Cryocyte(商標)、Baxter、現在はFenwall Blood TechnologiesまたはVueLife(商標)、American Fluoroseal Corporation)中の個々の用量に適切に分注する。この最終生成物を、標準の速度制御凍結プロセスを用いて凍結保存し、次いで、使用するために診療所に送るまで、蒸気相で貯蔵するために連続的にモニターされる液体窒素貯蔵チャンバーに移す。

30

40

【0434】

BPX-101の調製および投与

白血球除去およびAPC前駆体の採取：最初の6回のワクチン接種の4週間前に、患者に対して、標準の、最大12 L(約1.5~2.5×血液体積)の白血球除去手順をおよそ4時間にわたって行い、末梢血単核細胞(リンパ球および単球)を回収し、 $1 \sim 30 \times 10^9$ 個の範囲の末梢血単核細胞(PBMC)を得る。

【0435】

50

白血球除去手順に先立って、リンパ芽球様細胞株（LCL）を樹立するために使用するために血液約5mLを抜き取った。

【0436】

患者には、白血球除去の予約日の朝にはカルシウムが豊富な食物を食べるように指示することができる。白血球除去した後、生成物を細胞プロセッシングセンターに輸送する。白血球除去生成物からBPX-101を調製し、その後、白血球除去手順のおよそ4週間後に、投与するために放出する。

【0437】

採取したすぐ後に、白血球除去生成物を、BPX-101にプロセッシングするために細胞プロセッシングセンターに輸送する。BPX-101は、抗原提示細胞（APC）で構成され、Ad5f35-ihCD40で形質導入され、ヒト前立腺特異的膜抗原（PSMA）の細胞外ドメインを含有するPA001（PSMA）10マイクログラム/mLで抗原を負荷され、次いで、100nMのAP1903二量体化薬および250ng/mLのリポ多糖（LPS）を用いて活性化される。ワクチン調製後、PA001が負荷された遺伝子改変された単球由来DC（MoDC、BPX-101の生物活性のある成分）を、PlasmaLyte-A/HSA/DMSOで希釈して、生存可能なMoDC 4×10^6 個、 12.5×10^6 個または 40×10^6 個の個々の標的用量を実現し、これを、それぞれ200μLの一定分量（それぞれ、200μLの一定分量当たり細胞 0.8×10^6 個、 2.5×10^6 個および 3.1×10^6 個の濃度）5つまたは8つに分ける。

【0438】

その後、白血球除去手順のおよそ4週間後に、投与するためにBPX-101を放出する。細胞生成物を放出する前に、その品質管理検査を実施する（すなわち、生存能力、滅菌、内毒素、汚染物質）。

【0439】

BPX-101は、外来患者の白血球除去手順の間に採取された単球由来の成熟した、抗原を発現しているDCで構成される。中心的なGMPプロセッシング施設において行われる6日間のプロセスの終わりに、これらの細胞を、iCD40をコードするアデノベクターで形質導入し、組換えPSMAと一緒にインキュベートし、AP1903およびLPSを用いて予備活性化（pre-activate）した。生じたワクチン細胞を洗浄し、個々の用量（約1年の処置のために十分な用量）で凍結保存する。各投薬事象は、多数回の皮内注射によるBPX-101ワクチン投与、次いでその24時間後の静脈内注入によるAP1903の投与からなる。

【0440】

貯蔵および生成物の安定性：投与する前に、BP-GMX-CD1ワクチンを -70°C で凍結して貯蔵する。

【0441】

BPX-101の投与

患者に、ワクチン投与する30分前に、アセトアミノフェン（1,000mg）を経口で、およびジフェンヒドラミン（ベナドリルまたはジェネリック、25~50mg、経口）を前投薬する、または施設の標準に従う。BPX-101を使用する直前に35~39°Cのウォーターバス中で解凍し、次いで、2~8°Cで貯蔵し、解凍した後できるだけ早く投与する。

【0442】

処置は細胞 4×10^6 個（コホート1）で開始し、隔週で、次に細胞 12.5×10^6 個（コホート2）で開始し、次に細胞 25×10^6 個（コホート3）で開始した。BPX-101をコホート1および2については総用量1mLを投与し、コホート3については総用量1.6mLを投与し、200μLの増加量で、コホート1および2については、背側の前腕、上腕および太ももに、上腕と背側の前腕に交互に、および両側間に交互に各ワクチンの追加免疫を伴い；コホート3については、背側の前腕、上腕および太ももに、両側に交互に各ワクチンの追加免疫を伴う。各注射は少なくとも2cm離して投与する。各

位置に少なくとも2回注射する；すなわち、1つの位置に4回注射し、別の位置に1回注射することは許容されない。ワクチンは、各注射部位において3つの角度から投与して、最大の体積の受容を確実にする。

【0443】

各注射部位を丸で囲み、消えないマーカーで番号を付すことができる。最低でも2cm離して注射する。1回の来診時に同じ位置に注射し、次の来診時には別の位置に交代する。

【0444】

患者を、注射した後30分間、不都合な有害作用について観察する。

【0445】

10

注射用AP1903

AP1903 APIはAlphora Research Inc.により製造され、注射用のAP1903製剤はFormatech Inc.により作出された。注射用のAP1903製剤は、非イオン性の可溶化剤であるSolutol HS 15 (250mg/mL、BASF)の25%溶液中5mg/mLのAP1903溶液として処方する。この処方、室温で透明でわずかに黄色の溶液である。冷蔵に際して、この処方は可逆的な相転移を受け、乳状の溶液になる。この相転移は、室温に再加温すると逆転する。一杯の量は、3mLのガラスバイアル中2.33mLである（バイアル当たりの注射の総計に対するAP1903は約10mgである）。

【0446】

20

AP1903を、患者に投薬する前夜に冷蔵庫から取り出し、およそ21℃の温度で一晩貯蔵し、溶液が希釈前に清澄化されるようにする。ガラスまたはポリエチレンのビンまたは非DEHPバッグへの注入を開始した30分以内に溶液を調製し、投薬する前におよそ21℃で貯蔵する。

【0447】

全ての試験薬物を2℃から8℃の間の温度で維持し、過剰な光および熱から保護し、立ち入りが制限された鍵のかかった区域において貯蔵する。

【0448】

投与

各ワクチン接種サイクルの24時間（±4時間）後に、患者に、単一の固定用量の注射用AP1903（0.4mg/kg）を、非DEHP、非エチレンオキシドの滅菌注入セットを使用して2時間にわたってIV注入によって投与する。AP1903の用量は患者全てについて個別に算出し、体重が10%以上上下する場合を除き、再算出しない。注入する前に、算出された用量を0.9%の通常の生理食塩水100mL中に希釈する。

30

【0449】

患者を、注入が終わった後、不都合な有害作用について15分間観察する。

【0450】

試験における全患者は、第13週までに、またはその後に進行を示されなければ、合計11回のワクチン接種を受ける。患者は、第51週の時点でその患者の最後の用量を受ける。第1週は、BPX-101を用いた1回目のワクチン接種をした週と定義される。

40

【0451】

BPX-101は、細胞 4×10^6 個または 12.5×10^6 個の総ワクチン接種用量レベルに対して合計 $5 \times 200 \mu\text{L}$ のID注射で投与する、または細胞 25×10^6 個の最大総ワクチン接種用量レベルに対して合計 $8 \times 200 \mu\text{L}$ のID注射で投与する。最大の用量を、アフエレーシス生成物の水簾およびGM-CSF/IL-4に媒介される単球前駆体の分化の後に最大 5.4×10^8 個のDCを生成することができる、標準約12Lの白血球除去から得ることができるDCの最高レベルとして選択した。試験のために選択される最大用量（1kg当たり細胞約 0.53×10^6 個）は、マウス薬理学モデルにおいて使用される改変されたDCの最高用量（1kg当たり細胞 80×10^6 個）のおよそ240分の1である。

50

【0452】

以前のAP1903の第I相試験において、健康なボランティア24人を、0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kgおよび1.0mg/kgの用量レベルの注射用AP1903を2時間にわたってIV注入する単回用量で処置した。AP1903の血漿レベルは、用量に正比例し、0.01～1.0mg/kgの用量範囲にわたり、平均Cmax値はおよそ10～1275ng/mLの範囲であった。最初の注入期間の後、血中濃度は急速な分布相を実証し、投与後0.5時間、2時間および10時間において、血漿レベルがそれぞれ最大濃度のおよそ18%、7%、および1%に低下した。注射用AP1903は、全用量レベルにおいて安全であり、耐容性がよいことが示され、好都合な薬物動態プロファイルが実証された。Iuliucci JD, et al., J Clin Pharmacol. 41: 870-9, 2001。

10

【0453】

この試験において使用する注射用AP1903の固定用量は、2時間にわたって0.4mg/kgの静脈内注入である。in vitroで細胞の有効なシグナル伝達のために必要なAP1903の量は10～100nM (MW1600Da)である。これは、16～160μg/Lまたは約0.016～1.6mg/kg (1.6～160μg/kg)と等しい。上記のAP1903の第I相試験では1mg/kgに至るまでの用量が、耐容性がよかった。したがって、0.4mg/kgは、この第I相試験に関して、BPX-101と組み合わせて安全かつ有効なAP1903の用量でありうる。

20

【0454】

臨床的な研究デザイン

臨床試験には3つのコホートが含まれる。

【0455】

用量レベル：

コホート1：BPX-101、1.0mL中細胞 4×10^6 個

コホート2：BPX-101、1.0mL中細胞 12.5×10^6 個

コホート3：BPX-101、1.6mL中細胞 25×10^6 個

BPX-101治療的ワクチンを、ID注射5回で細胞 4×10^6 個もしくは 12.5×10^6 個、またはID注射8回で細胞 25×10^6 個の用量で投与する。

30

【0456】

(実施例12)

臨床的な評価

アッセイ

方法：各ワクチン接種の直前および1週間後に血液を採取した。遠心分離した(1500g)血清試料を分注し、後のバッチ検査のために液体窒素中に貯蔵した。希釈していない試料を、GM-CSF、IFN-γ、IL-10、IL-12(p70)、IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1α、MIP-1β、RANTES、およびTNF-αについての分析物を含むMilliplex Human Cytokine/Chemokine Panel キット(Millipore, Inc)を2連で解析した。データを、Bio-Plexソフトウェア(Bio-Rad Laboratories, Inc)を使用して解析した。少なくとも部分的に標準範囲(3.2～10,000pg/mL)の内側に入った全てのマーカーを各チャートに含めた。

40

【0457】

インターフェロンガンマ(IFN-ガンマ)

IFN-ガンマ産生T細胞の段階的なレベルを、ELISpotアッセイによって決定する。記述的な分析(descriptive analysis)を使用して、IFN-ガンマ産生T細胞データを要約する。これらの分析は、以下の測定に基づく：各評価時間におけるベースラインからの変化、各評価時間における、ベースラインを引いた平均の

50

曲線下面積（AAUCMB）、最初の6回のワクチン接種についてのAAUCMB、全ての評価についてのAAUCMB、最初の6回のワクチン接種後および全ての評価の中の最大値、ならびに最大値までの時間。

【0458】

統計学的モデリングを実施して、IFN-ガンマ産生T細胞と客観的奏効率の依存関係を評価する。コックス比例ハザード回帰モデルを使用して、この依存関係を評価する。「事象」は、CRまたはPRの確認の最初の実現であり、この事象までの時間は、試験薬物の初回投与から測定する。この解析において使用されるIFN-ガンマ産生細胞のデータは、試験処置を開始した後、客観的奏効率を最後に有効評価するまでに収集された値に限られる；奏効の事象では、事象日までおよび事象日の細胞のデータのみを使用する。モデルは、用量、ベースラインのIFN-ガンマ細胞レベル、およびIFN-ガンマ産生細胞のレベルの時間依存性の共変量についての項目を含むようにパラメータ化する。

10

【0459】

さらに興味深いのは、それにより奏効が予測される、単一のIFN-ガンマ産生細胞の値を同定することである。ログランク統計値に基づくカットポイント解析を適用して、全患者の中からこの単一の値を選択することに役立つ（Cristofanilli M, et al., N Engl J Med. 351: 781-91, 2004.）。最良の客観的反応が結果変数であり、最良の反応日までおよび最良の反応日の細胞計数のベースラインからの最大の変化が、対象とする「危険」因子である。試料サイズが小さいので、カットポイントの選択においてp値0.10を使用する。

20

【0460】

CTL反応

CTL反応は、従来の方法によって決定することができる。本実施例では、PSMAポリペプチドでパルスした自己LCLを、細胞傷害性アッセイにおいて、ならびにin vitroでT細胞を再刺激することを必要とするアッセイにおいて、APCとして使用する。各患者に対して、B95-8細胞株によって産生されるEpstein Barrウイルス含有上清を使用することにより、末梢性のB細胞を外因性ウイルスで形質転換することによってLCLを樹立する。LCLをRPMI 1640、10%のFBS中で維持する。LCLの生成には、臨床試験への登録時に得た血液5mlが必要である。

30

【0461】

特異的な溶解の百分率によって算出されるCTL反応を、各試験時点において決定し、ベースラインレベルと比較する。これらのデータの解析は、記述統計値に基づき、各評価時間において要約されている。非欠損の程度に応じて、客観的奏効率のCTL反応に対する依存性を評価するための探索的解析を、IFN-ガンマ産生細胞のデータに対して提唱されたものと同様に行う。

【0462】

任意選択のアッセイ：HLA-A2+患者のみがこの任意選択のアッセイに含まれる。LNCAp細胞（HLA-A2+/PSMA+）を標的細胞として使用し、SK-Mel-37細胞（A2+/PSMA-）が陰性対照としての機能を果たす。PSMA抗原認識を、51Cr（Amersham）を用いて37℃で1時間標識し、3回洗浄した標的細胞を使用して評価する。標識した標的細胞（50μL中細胞5000個）をエフェクターCD8+細胞（100μL）に、エフェクター：標的細胞比5：1、10：1、25：1、および50：1で加える。37℃で4時間インキュベートした後回収した上清においてクロムの放出を測定する。特異的な溶解の百分率を： $100 \times \left[\frac{\text{（実験的な放出 - 自然発生的な放出）}}{\text{（最大の放出 - 自然発生的な放出）}} \right]$ として算出する。

40

【0463】

BPX-101+AP1903を投与した後、コホート1の患者6人中6人が、1つまたは複数のワクチン接種部位において遅延型の過敏症（DTH）反応を示す紅斑症および硬結を発症した。3回目のワクチン接種の1週間後に採取した単一の注射部位の生検（6mm）からT細胞を増大させた。IL-2を含有する培地中で4週間培養した後、フロー

50

サイトメトリーにより、約30～60%のCD4+ T細胞および2～10%のCD8+ T細胞が明らかになった。抗原特異的な反応を、(a) PSMAまたは(b) オボアルブミン(対照)タンパク質(10mg/ml)または(c) Ad5f35-空のアデノウイルス(ウイルス粒子(VP)500個/LCL)の存在下で、T細胞と、抗原提示細胞としてのEBVで形質転換された自己リンパ芽球様細胞株(LCL)を種々の比率にして解析した。上清を、GM-CSF、IFN- γ 、IL-10、IL-12(p70)、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IP-10(CXCL10)、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、RANTES、およびTNF- α についての解析物を含むMilliplex Human Cytokine/Chemokine Panel(Millipore, Inc)を使用して2連で解析した。チャートは、T細胞、LCLおよび抗原を含有する群におけるサイトカインのレベルが、抗原を伴わないT細胞およびLCLと比較して倍に増加したことを示す。各抗原について、一元配置ANOVAによって、T+LCL+抗原とT+LCLの間のボンフェローニの多重比較事後検定を用いてP値を算出する。

【0464】

サイトカイン

各ドナーからのBPM-101を、自己T細胞と7日間共培養し(DC:T細胞比1:10)、(8日目にBPM-101で再刺激する)。上清を回収し、Th1(IFN- γ 、TNF- α)およびTh2(IL-4、IL-5、およびIL-10)サイトカインを発現させるためのBD Cytometric Bead Array Flex Setによって解析する。

【0465】

異なる時点で採取した患者からの血清を、Human Cytokine LINCOPlex Kit(Millipore Inc)を使用して解析して、Th1/Th2サイトカイン、例えば、(IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、IL-4、IL-5、IL-6、およびIL-10)などのレベルを、Luminex100 IS(Bio-Rad Laboratories)で決定する。被験体6人中4人からの生検材料が抗原特異性について評価可能であり、全てが陽性であった。被験体#1004(上記)および#1001では、TH1反応を示唆するサイトカインの増加が引き出され、一方、被験体1005および1006では、TH2反応が示唆された。しかし、このデータは、全被験体においてTH1反応を引き出すには不十分でありうる3回の用量の後に生成された。

【0466】

活性化マーカー

末梢血白血球をBPM-101と一緒に24時間インキュベートし、T細胞の種類(CD4[ヘルパー]またはCD8[細胞傷害性])および活性化の状態(CD25[初期の活性化およびTREGサブセット]、CD45RO[活性化および記憶サブセット]、およびCD69[初期の活性化])に特異的な抗体のパネルを用いて染色した後、フローサイトメトリー解析する。

【0467】

これらのデータの解析は、記述統計値に基づき、各評価時間において要約する。グラフィカルな方法を使用して、変化をある期間にわたってさらに探究する。評価される測定値は、以下のT細胞の種類のベースラインからの実際の変化を含む: CD4(ヘルパー)、CD8(細胞傷害性)および活性化の状態(CD25[初期の活性化およびTREGサブセット]、CD45RO[活性化および記憶サブセット]、およびCD69[初期の活性化])。

【0468】

他の免疫学的マーカー

患者の末梢血中の天然キラー(NK)細胞の活性を、単純なNK細胞アッセイによって決定する。患者の白血球を、異なる希釈度で、普遍的なNK標的であるK562細胞と一

10

20

30

40

50

緒に2～4時間培養する。次いで、K562の死滅の程度を、フローサイトメーターを使用してヨウ化プロピジウム排除の損失によって決定する。

【0469】

注射部位の紅斑症（もしあれば）の程度も、炎症組織の直径の直接的な測定値として決定する。4回目のワクチン接種の2～3日後に、大部分の炎症を示す部位のいずれかから取得するパンチ生検を行うことを予定する。炎症が観察されない、または確認される炎症がわずかである（＜1cm）場合、生検材料は、注射部位のうちの任意の1つから取得する。リンパ球の浸潤を組織学的検査および免疫組織学的検査によって決定する。得られた生検材料を2つのおよそ均等な切片に分割する。1つの部分は、抗CD8、抗グランザイムB、および他の可能性のあるマーカーを使用する免疫組織学的検査のために凍結保存する。第2の部分は、小さな小片に切り、RPMI1640、10%のFBSと一緒に培養する。これらの組織小片から遊出した白血球をIL-2と一緒に培養する。2週間培養した後、T細胞を、自己APCで刺激した際のTh1/Th2サイトカインの産生について試験する。

10

【0470】

各患者からの週に1回の定期的な採血を、血清サイトカイン/ケモカインの広範なパネルにおいて評価した。被験体6人中4人（#1003（パネルA）、#1004（パネルC）、#1005および#1006を含む）において、各ワクチン接種の1週間後にIFN- γ 、GM-CSF、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β およびMCP-1の全身的な上方制御が実証された。TNF- α およびIP-10は、全被験体において検出可能であったが、いずれの被験体においても、最小の、用量に関連する変化が示される。

20

【0471】

被験体6人中2人（#1001（パネルB）および#1002）において、検出可能な血清サイトカインの変化の一貫したパターンは実証されなかった、しかし、これらの被験体は、最低の全体的な腫瘍負荷量を有し、少なくとも1人（#1001）では抗原特異的な反応が実証された（#1002は、評価不可能であった）。これは、低体積疾患の患者における腫瘍特異的な反応が血清サイトカインレベルに影響を及ぼさない可能性があることを示唆している可能性がある。

【0472】

用量に関連するサイトカインの変化を、全サイトカインおよび6用量全てについて、各用量の投与後のサイトカインのレベルの、重みをかけられていない平均的变化を算出することによって数量化した。この解析により、平均の投与後の変化がそれぞれ-2%および-6%であるが、#1001においても#1002においても、一貫した血清の変化のパターンが示されなかったことが確認される。また、中間用量コホートの被験体3人中3人が、各用量の投与の1週間後に血清サイトカインの有意な増加を示した（平均的变化の範囲+42%～+72%）。さらに、被験体1003は、劇的な血清サイトカインの攪乱（平均的变化+283%）を示した。MCP-1のレベルは、ワクチン接種#1、2、3、および5の1週間後に、ベースラインレベルに対してそれぞれ17.5倍、17.2倍、4.2倍および6.8倍に急上昇し、それぞれの場合において、翌週にベースラインレベルの8～30%に戻った。IFN- γ およびGM-CSFのレベルは同様のパターンに従った；GM-CSFは、ワクチン接種#1、2、3、および5の1週間後に、検出不可能なベースラインレベルから、それぞれ22.0pg/ml、16.2pg/ml、9.9pg/ml、および11.7pg/mlに急上昇し、翌週に検出不可能なレベルに戻った。パネルにおける分泌された因子の用量に関連する変化は図45～50に示されている。このパネルは、GM-CSF、MIP-1アルファ、MIP-1ベータ、MCP-1、IFN-ガンマ、RANTES、EGFおよびHGFを含む。

30

40

【0473】

薬物動態のエンドポイント

AP1903の平均血漿濃度を各時点で決定する。AP1903の血漿濃度は試験期間中の限られた数の時点で決定するので、薬物動態パラメータの決定はできない。

50

【0474】

バイオマーカーのエンドポイント

PSAベースの転帰

PSA反応（30%以上の低下を実現する患者および50%以上の低下を実現する患者の割合）を、3カ月の時点で、各患者のベースラインからの最大の変化を用いて要約する。ウォーターフォールプロットを使用してPSAの変化を示すことができる。PSAの動態（速度の変化および倍加時間）を、記述統計値を用いて要約する。さらに、処置後のPSAの倍加時間を、処置前のPSAの倍加時間と比較する；PSAの倍加時間（PSA勾配／PSA速度の変化）において25%以上の増加を示す患者の割合を表にする。測定された場合、PSAの他の形態も要約する。

10

【0475】

PSA疾患進行

療法後にPSAの減退を経験した患者について、最下点の値からのPSAレベルの25%以上の上昇および2 ng/mL以上の絶対的増加である最初のPSA増加を、少なくとも3週間離して少なくとも1つの追加的な決定に際して文書に記録する。一度確認されたら、最初にPSAがこの進行の判定基準に適合した日が、PSAが進行した日になる。

【0476】

ベースラインからの減退がない場合、処置前の値からのPSAレベルの25%以上の上昇および2 ng/mL以上の絶対的増加を、療法の開始から少なくとも12週間目に文書に記録する。

20

【0477】

PSA倍加時間：PSA倍加時間は以下の方程式を使用して算出する：PSA倍加時間 = $[\log(2) \times t] \div [\log(\text{最終的なPSA}) - \log(\text{最初のPSA})]$ 、 $[\log]$ は自然対数関数であり、「t」は最初のPSAレベルから最終的なPSAレベルまでの時間である。試験処置を開始する前に測定された最後のPSAレベルが、最初のPSAと定義される。最終的なPSA値は、試験処置を開始した後、被験体の時点の前に測定された最後のレベルである。PSA倍加時間は、療法の前、ならびに療法を開始した後の全ての時点で評価する。患者が、PSA進行を有するとみなされた時間を用いて追加的な解析を実施する。

【0478】

30

PSAの速度および勾配：処置前の年間のPSA速度（1年当たりのPSAの変化の速度）および勾配を、試験中の療法の前の3つ以上のPSA測定値から、単純な線形回帰によって算出する。完全な日付を伴うPSA測定値を生じさせて処置前のPSA速度および勾配を決定する。試験の最初の3カ月の間の処置後のPSA速度は、線形回帰を使用して（ベースラインの測定値に加えて、2つ以上のPSA測定値を有する患者）、およびPSAの対数の比率の変化によって（ベースラインの測定値に加えて、ただ1つのPSA値を有する患者）コンピュータで計算する。生じた適合が最良である株の勾配を使用して、PSA速度を決定し、PSA速度を評価し、勾配を、療法の前、ならびに療法を開始した3カ月後に評価する。

【0479】

40

循環腫瘍細胞（CTC）

インタクトな（かつアポトーシス性の）CTCを、PCa患者の新鮮な末梢血から濃縮し、上皮細胞の存在について、EpCAM+細胞を免疫磁気捕捉するためのCellSearch技法、次に有核のCD45陰性およびサイトケラチン（8、18、19）陽性細胞について免疫染色を用いて解析する（Shaffer DR, et al., Clin Cancer Res. 13: 2023-9, 2007）。一般には、健康なボランティアにおいては5 CTC/10 mL未満の血液試料が見出され、PCa患者においては5超が見出される。CellSearch法は、乳癌の出現および進行の診断において首尾よく用いられている（Scher HI, et al., J Clin Oncol. 2008 Mar 1; 26(7):1148-59）。CellSe

50

arch法は、乳癌に関して、およびつい最近前立腺癌に関してFDAに承認されており、Quest Diagnosticsから市販されている。どちらもEpCam+細胞であるので、PCaについてのアッセイは乳癌と基本的に同一である。

【0480】

CTCの、ベースラインからの実際の変化および平均の変化を、各評価時点で決定し、説明的に要約する。さらに、データにより可能な場合、50%以上の低下を有する患者および90%以上の低下を有する患者の割合を決定する。患者を、ベースラインを確立するために処置前、4回目のワクチンの前、最初の6回のワクチンの後、4～6カ月（すなわち1～2回の追加免疫）後、および10カ月後に試験する。

【0481】

有効性の解析

主要有効性解析を、FASを使用して実施する；PPSを使用して実施した解析は、いずれも捕捉的なものとみなされる。

【0482】

最大尤法を使用して、処置効果の点推定および区間推定を算出する。RECIST判定基準に従って、処置を開始する前4週間以内にベースライン評価を実施するべきである；しかし、この第I相試験の効力のエンドポイントは単に探索的なものである。したがって、スクリーニングスキンの結果をベースラインとして使用する。最良の客観的奏効率および第13週の奏効率を、CRまたはPRが確認された患者の総数をFAS（または捕捉的な解析としてPPS）で割ったものとして算出する。CRが確認された被験体については個別解析も行う。処置を開始した後に評価できない患者は、FASデータセットにおいて処置不成功に分類する。

【0483】

CRまたはPRを有する患者についてのみ、TTRおよび奏効期間を算出する。TTRは、試験薬物を投与した最初の日と客観的奏効判定基準に適合した最初の日の間の差異（日数単位）を反映する。奏効期間は、どちらの事象が早くても、奏効判定基準に適合した最初の日と疾患進行または死亡についての客観的判定基準に適合した最初の日の間の差異（日数単位）を反映する。進行判定基準に適合しない患者は、有効な評価によって疾患進行がないことが確認された最終日にその患者の事象時間を打ち切る（censor）ことができる。

【0484】

処置後の腫瘍の評価を欠く患者は、試験薬物を投与した最初の日とその患者のPFS時間を打ち切ることができる。感受性解析を行って、失敗したまたは予定から外れた評価と比較した、推定値の頑強性を評価する。FAS患者集団とPPS患者集団の両方についてPFSを推定する。

【0485】

OSを、試験薬物を受けた最初の日と死亡日の間の差異として算出する。最後の経過観察時に死亡していない患者については、最後の公知の接触日にその患者の時間を打ち切ることができる。OSは、FAS集団について要約する；処置の開始以降の生存データを欠く患者は、1日目にその患者の観察を打ち切る。ChoiのGIST基準（付録D）を、奏効についての第2の判定基準として使用する。客観的奏効（CRまたはPR）を示す患者の割合を要約する。

【0486】

奏効期間、無進行生存、および全生存を算出するために、各算出に1日を加える。 Kaplan-Meier統計値を使用してこれらのデータを解析し、事象プロセスの成熟化に応じて、平均事象率の点推定および中央値の95%信頼区間がもたらされる。

【0487】

略語の一覧

本明細書または図において以下の略語が用いられ得る：

略語 定義

AAUCMB	ベースラインを引いた曲線下面積	
ADT	アンドロゲン遮断療法	
AE	有害事象	
ALT	アラニントランスアミナーゼ	
ANC	絶対好中球数	
APC	抗原提示細胞	
AST	アスパラギン酸トランスアミナーゼ	
BP	結合性タンパク質	
BPI	簡易疼痛調査票	
BUN	血中尿素窒素	10
CAGT	細胞および遺伝子療法の中央	
CD	表面抗原分類	
CFR	連邦規則集	
CI	信頼区間	
CR	完全奏効	
CRF	症例報告書	
CRPC	去勢抵抗性前立腺癌	
CT	コンピュータ断層撮影法	
CTC	循環性腫瘍細胞	
CTCAE	有害事象共通用語基準	20
CTL	細胞傷害性Tリンパ球	
DC	樹状細胞	
DLT	用量制限毒性	
DSMB	データ安全性監視委員会	
EW	隔週	
FAS	最大の解析対象集団	
FDA	食品医薬品局	
GCP	医薬品の臨床試験の実施の基準	
GM-CSF	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子	
HBsAg	B型肝炎表面抗原	30
HCV	C型肝炎ウイルス	
HIV	ヒト免疫不全ウイルス	
HTLV	ヒトTリンパ球向性ウイルス	
ID	皮内	
IEC	独立倫理委員会	
IL	インターロイキン	
IND	治験薬	
IRB	治験審査委員会	
IV	静脈内	
KPS	カルノフスキーのパフォーマンスステータス	40
LDH	乳酸デヒドロゲナーゼ	
LN	リンパ節	
LPS	リポ多糖	
MedDRA	医薬品規制用語集	
MRI	磁気共鳴画像法	
mRNA	メッセンジャーリボ核酸	
MTD	最大耐用量	
NK	天然キラー	
NOEL	最大無作用量	
OS	全生存	50

P A O O 1 前立腺抗原
 P A P 前立腺酸性ホスファターゼ (P r o s t a t i c A c i d P h o s p h a t e)
 P B M C 末梢血単核細胞
 P D 進行 (p r o g r e s s i v e d i s e a s e)
 P F S 無進行生存
 P O 経口
 P S M A 前立腺特異的膜抗原
 P P S 治験実施計画書に適合した対象集団
 P R 部分奏効
 P S A 前立腺特異的抗原
 R B C 赤血球
 R E C I S T 固形腫瘍の治療効果判定基準
 S A E 重篤な有害事象
 S A S 統計解析システム
 S D 安定 (s t a b l e d i s e a s e) / 標準偏差
 S O C 器官別大分類
 T E A E 治療下で発現した有害事象
 T T R 効果発現までの期間
 U L N 基準値上限
 W B C 白血球

10

20

【0488】

(実施例13)

暫定的な臨床的データの概要

結果の要約

結果：結果：現在まで登録された被験体6人のうち、低用量コホートの3人中3人および中間用量コホートの3人中2人は、少なくとも12週間の療法を完了し（中央値26、範囲12～36）、また、4人は用量制限毒性が観察されない安定であり、試験に残った。中間用量コホートの1人の患者は、疾患進行により切迫脊髄圧迫を発症し、4用量を投与した後、第7週で試験から外れ、第2の患者は処置の急性期の最後に疾患進行を有すると思われ、試験から外れた。図34に要約されている通り、患者を、臨床プロトコールの方法に従って、放射線学的変化、生化学的変化、免疫学的変化、および症状の変化について評価した。

30

【0489】

低用量コホートおよび中間用量コホートの両方において臨床的なバイオマーカー反応が明らかであった。8週間で約50%の血清PSA減退が実現された1人の被験体（#1003）を含め、被験体6人中4人において10%以上の最大血清PSA減退が実現された。また、患者6人中5人で、PSADTが有意に延長された。ベースラインにおいて測定可能な転移性疾患を有する被験体3人中2人においてRECIST1.1に従った臨床反応が観察され、1人の被験体（#1003）は3カ月の時点で測定可能な疾患に20%の減退を示し、6カ月の時点で25%の減退にさらに改善され、部分奏効に向かっている。図41は、被験体1003における軟組織における部分奏効に関するグラフを示す。被験体1003は、ベースラインにおいて測定可能なリンパ節の病変を8つ有し、8つのリンパ節全てにおいて、1年超にわたって定常の減少が実証された。1年の時点でRECIST判定基準に従った部分奏効（PR）が見出された。減少の最大速度は誘導処置期の間に見られた。被験体はベースラインと初回用量（7週間）の間に腫瘍の成長を有した可能性がある。第3の被験体は測定可能な進行を有するが、その患者のPSAは用量#5の後に安定化した。

40

【0490】

疾患が進行している患者を含めた、測定可能な転移性疾患を有する被験体3人中3人に

50

において腫瘍血管系の縮小が観察された。図42は、抗血管系効果を実証している種々の血清マーカーに関するグラフを示す。CTコントラスト増強により、MMDの全被験体において血管分布の減少が示された。これらの被験体における血清解析により、低酸素の因子の用量に関連する上方制御が明らかになった。PSMAは、固形腫瘍の血管系において発現され、抗血管系の標的として提唱されている。リンパ節反応の例が図40に示されており、サイズおよび血管分布が縮小した2つの節を含み、それはベースラインにおいて $36 \times 29 \text{ mm}$ (RECIST 1.1による、異常な 15 mm 超の短い軸) および 122 ハウンスフィールド単位 (HU) ならびに第26週において $29 \times 24 \text{ mm}$ および 40 HU が測定され (実施例1)、ベースラインにおいて $25 \times 23 \text{ mm}$ および 120 HU ならびに第26週において $17 \times 14 \text{ mm}$ および 41 HU が測定され (実施例2) ; 1つの節は完全奏効を示し、ベースラインにおいて $24 \times 17 \text{ mm}$ および第26週において $12 \times 6 \text{ mm}$ (RECIST 1.1による、正常な 10 mm 未満の短い軸) が測定された (実施例3)。

10

【0491】

被験体6人中4人において、各ワクチン接種の1週間後に、IFN- γ 、GM-CSF、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β およびMCP-1の全身的な上方制御が実証された。TNF- α およびIP-10は全被験体において検出可能であったが、いずれの被験体においても、最小の、用量に関連する変化が示された。被験体6人中2人において、検出可能な血清サイトカインの変化の一貫したパターンは実証されなかったが、これらの被験体の全体的な腫瘍負荷量は最低であった。評価可能な被験体6人中4人は、3回の投与後に抗原特異的な免疫応答を示し、2人ではTH1反応が示唆され、2人ではTH2反応が示唆された。

20

【0492】

結論：BPX-101およびAP1903を用いた処置により、臨床的な全身免疫応答および抗原特異的な全身免疫応答の両方が引き出される。臨床反応は、血清サイトカインにおける用量に関連する有意な攪乱、およびPSAの減退と相関すると思われる。最低用量での12週間の療法を完了した被験体3人中2人において、血清中の炎症性サイトカインレベルの劇的な急上昇は、両方の患者におけるPSAの減退および1人における測定可能な疾患の減退と相関した。測定可能な転移性疾患を有する患者3人中3人において腫瘍血管新生も減少した。

30

【0493】

解析

患者6人を、臨床プロトコールの方法に従って処置を受けた後の進行について評価した。患者を、図34に要約されている通り、臨床プロトコールの方法に従って、放射線学的変化、生化学的变化、免疫学的変化、および症状の変化について評価した。

【0494】

図34は、探索的効力評価を示すチャートである。図36は、測定可能な転移性疾患、血管分布、およびPSAの12週間の変化の解析の要約を示す。

【0495】

放射線学的解析

図40は、患者1003のCTスキャンの結果を示す (スキャン例1)。

40

【0496】

ベースラインにおいて測定可能な転移性疾患を有する被験体3人中2人において、客観的な臨床反応 (軟組織、RECIST 1.1に従って) が観察された：

- ・1人の被験体は、6カ月超安定のままである。

【0497】

・第2の被験体 (#1003) は、3カ月の時点で測定可能な疾患が20%減退し、6カ月の時点で25%の減退にさらに改善され、部分奏効に向かっている。

【0498】

被験体1003は、第0週においてワクチン接種の急性期を開始する7週間前にベース

50

ラインスキャンを受けた。第12週、療法を開始した19週間後において得られた処置の急性期の最後の繰り返しスキャンにより、測定可能な標的疾患（2つのリンパ節）および非標的疾患（5つのリンパ節）の20%の減少が示された。第26週のスキャン、ベースラインスキャンの8カ月後までに、7つの測定可能な病変全てが、サイズのさらなる縮小を示し、全体的な測定可能な疾患の縮小が25%に達した。リンパ節反応の3つの例が上記されており、それには、ベースラインにおいて 24×17 mm（RECIST 1.1による、異常な15 mm超の短い軸）および第26週において 12×6 mm（RECIST 1.1による、正常な10 mm未満の短い軸）が測定された、完全奏効を示した1つの節（実施例3）が含まれる。

【0499】

10

生化学的解析

図38は、VCAM-1血清解析の結果を示す。処置後にVCAM-1濃度の低下が観察された。

【0500】

前立腺特異的抗原（PSA）の存在も評価した。図39は、12週間の時点におけるPSAレベルのウォーターフォールプロットを示す。

【0501】

免疫学的解析

患者を、種々の免疫学的マーカーについて評価した。各マーカーについて有意性および所望の転帰が下に要約されている。

20

【0502】

GM-CSF；幹細胞の、マクロファージおよびDCにさらに分化することができる顆粒球および単球への分化を刺激する。所望の転帰：増加。

【0503】

IFN-ガンマ：主に活性化NK、NKT、Tヘルパー1およびCTLによって産生される。免疫賦活性、抗ウイルス性、および抗腫瘍性である。所望の転帰：増加。

【0504】

MCP-1：単球、記憶T細胞およびDCの、傷害部位または炎症部位への動員を助ける。所望の転帰：増加

【0505】

30

MIP-1 α 、 β ：活性化マクロファージによって産生されて、顆粒球および他の白血球における走化性を活性化し、また他の炎症促進性サイトカイン（例えば、IL-1、IL-6、TNF- α ）を誘導する。所望の転帰：増加

【0506】

図35は、12週間の免疫学的反応および臨床反応の概要を示す。

【0507】

図45～50は、それぞれ患者1001～1006における血清マーカー解析に関するグラフである。

【0508】

臨床的バイオマーカー

40

低用量コホートと中間用量コホートの両方において臨床的バイオマーカーの反応が明らかであった。被験体6人中4人において、8週間で約50%の血清PSA減退が実現された1人の被験体（#1003）を含め、最大血清PSAの10%以上の減退が実現された。

【0509】

低用量コホートの被験体3人中3人においてPSAの減退が観察され、その全員が、ベースラインにおいて比較的長いPSA倍加時間（4.9～7.3カ月）を有し、対照的に、中間の用量の被験体は、その全員が2カ月未満（1.4～1.7カ月）ベースラインPSADTを有した。

【0510】

50

症状

図52は、KPSおよびCTCの評価に関するグラフを示す。

【0511】

BPX-101およびAP1903を用いた処置により、以下の免疫学的反応および臨床反応が引き出される：

- ・患者4人中4人のDTH生検において観察された抗原（PSMA）特異的T細胞反応。生成されるサイトカインは、3用量後のTH1への偏りまたはTH2への偏りを反映する。

- ・IFN- γ 、GM-CSF、RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β およびMCP-1の変化を含めた患者6人中4人におけるいくつかの可溶性の因子の定期的な、周期的な上方制御

客観的な臨床反応は、血清サイトカインにおける用量に関連する有意な攪乱およびPSAの減退と関連すると思われる。

【0512】

暫定的結論

高PSA（300超）、グリーソンスコア9、13.3pg/mL超の血清IL-6レベル、および先のドセタキセルによる化学療法の失敗を含めた、危険性の高い進行性のmCRPCの特徴を有する低用量コホートに登録された被験体#1003は、ちょうど2回ワクチン接種した後に始まったPSAの約50%の降下、ならびに測定可能な疾患の、12週間の療法の最後の20%の減退および6カ月の時点における25%の減退を含めた、急速な臨床反応を示し、部分奏効に向かっている（RECIST1.1）。この反応は、血清サイトカインの急増と関連し、各ワクチン接種サイクルによって生じる全身免疫応答と一致した。この被験体において抗原特異性は決定されなかった。

【0513】

中間用量コホートに登録された、大規模な骨転移、グリーソンスコア8、および急速に上昇しているPSA（PSADTが1.4カ月）を有する被験体#1005は、最初の2回の用量だけでサイトカインの攪乱を示し、TH2に偏った。この被験体のPSA軌道に変化はなかった。この患者は、7週間後によくなった。

【0514】

この患者および他の患者のデータは、本方法により、短期間の疾患反応が誘導され、処置に関連する毒性を伴わずにより有意な生存利益が導かれ得ることを示唆している。

【0515】

（実施例14）

併用療法

転移性去勢抵抗性前立腺癌の患者は、化学療法薬の組み合わせを用いて処置されている。ドセタキセルおよびエストラムスチンホスフェート、それに加えて他の薬剤の組み合わせを用いて処置すると、処置された転移性去勢抵抗性前立腺癌の患者の29%が、90%超のPSAの降下を有した。Nakagami, Y., et al., Safety and efficacy of docetaxel, estramustine phosphate and hydrocortisone in hormone

Int. J. Urology (early view, April 26, 2010, digital object identifier 10.1111/j.1442-2042.2010.02544.x)。ドセタキセルと、ドセタキセルおよびそれに加えてエストラムスチンとを比較する無作為化試験において、41%で4ng/mL未満のPSAが実現されたが、ドセタキセル単独に対して生存は改善されなかった。Machiels, J.-P. et al., 2008, J. Clin.

Oncol. 32: 5261-68。化学療法薬、例えばタキサンなど、およびステロイド性ホルモン剤は、ワクチン療法と組み合わせて、ワクチン療法の前、またはその後に使用することができる。

【0516】

被験体#1006に、この実施例において考察されている化学療法薬とワクチン療法の組み合わせを投与した。被験体#1006は、疾患進行の症状を示した後にワクチン療法を中断した。次いで、患者を、ドセタキセル、ならびにカルボプラチン、エストラムスチンホスフェート、サリドマイド、デカドロン、プロスカール、アボダートおよびロイキン（Leukine）を含めた化学療法剤で処置した。療法後に、PSAの濃度は、 0.2 ng/ml 未満に有意に降下し、99%を超える血清のレベルの降下であった。図53に処置期間にわたる血清PSAの濃度が示されている。

【0517】

被験体1003は、図43に示されている通り、タキソテール、その次にワクチン療法で処置した。KPS90を有するこの被験体は、ワクチン療法の21カ月後生存していた。

10

【0518】

被験体1007は、ワクチン療法の前に非ステロイド性ホルモン剤であるアビラテロン（Abiraterone）で処置し、ワクチン処置後に化学療法に反応した。

【0519】

グリーンソン9のmCRPCの病歴を有し、広範にわたる骨転移およびLN転移を有し、先のドセタキセルによる化学療法に失敗した後であり、 1000 ng/ml 超の急速に上昇しているPSA（PSADT1.8カ月）を有し、CTC49であり、KPS80である被験体1010（図61および図62）を登録した。この患者は、1用量の後に、KPSが60に急速に減退したので中止し、LHRHアゴニスト以外のさらなる活性な療法を伴わずに在宅ホスピスケアを受けた。この患者は、1カ月以上生存しないと予測された。しかし、4カ月後に、患者の状況は改善し、自己歩行が増し、食欲、体重増加が伴い、およびKPSが80～90に戻り、この患者のPSAは 169 ng/mL に降下した（84%の減退）。この患者の状態は、継続して改善され、3カ月後に、この患者のPSAはさらに 104.3 ng/mL に落ちた（90%の減退）。32週間の時点における骨スキャンにより、肋骨、左肩甲骨および左上腕骨におけるびまん性転移の有意な改善が示され、いかなる新しい病変も伴わなかった。その後すぐに、この患者は突然の発熱を発症し、Oxford, Englandのこの患者の家族のPCPにより、尿路性敗血症と診断された。この患者を、経口的な抗生物質で処置したが、急速に悪化し、33週間の時点で、自宅で亡くなった。

20

30

【0520】

図63は、タキサンの化学療法とワクチン療法を含む併用療法の解析について示している。投与量および療法の順序付けのいくつかの例を用いて2つの療法の間の相乗作用が示されている。

【0521】

これは、潜在的な単一またはそれ以上の限定された投薬活性、およびドセタキセルとの相乗作用を実証している。

【0522】

被験体1011に、この実施例において考察されている化学療法薬とワクチン療法の組み合わせを行った。図60に示されている通り、被験体1011をタキソテールおよびケトコナゾールで処置した後にワクチン療法を行い、ワクチン療法の後にカバジタキセルで処置した。

40

【0523】

（実施例15）

第2の暫定的な臨床的データの概要

高用量コホート（被験体1007～1012）（ 1.6 mL 中細胞 25×10^6 個）を含むさらなる臨床試験を実施した。低用量コホート（被験体1001～1003）（ 1.0 mL 中細胞 4×10^6 個）および中間用量コホート（被験体1004～1006）（ 1.0 mL 中細胞 12.5×10^6 個）からも追加的な試験を得た。図55は、低用量コホ

50

ートおよび中間用量コホートからの安全性および反応の要約を示し、図56は、高用量コホートからの安全性および反応の要約を示す。図57には全被験体についての患者の人口統計が示されている。図58には2010年12月現在の患者の臨床試験の状況が示されている。

【0524】

結果の要約

結果：結果：低用量コホートに登録された被験体3人全員は、試験開始後12カ月の時点で安定または部分奏効のいずれかを有した。3人全員について、進行が12カ月遅延した。中間用量コホートの被験体1006は、臨床試験、その後に化学療法に参加した後、完全奏効を有した。被験体1006は、ドセタキセルで処置されており、これは、併用療法からの相乗的な反応の可能性を示している。高用量コホートの被験体1008は、肺腫瘍に対して完全奏効を有し、12週間の時点で測定したところ安定を維持した（図59）。被験体1008における処置後のサイトカインの急上昇のパターンが図37に示されている。高用量コホートの被験体1007および1009も、12週間の時点で測定したところ安定を有した。

【0525】

グリーソンスコア：現在までに試験に登録された被験体12人のうち、10人が7を超えるグリーソンスコアを有した。グリーソンスコアが9である被験体1003では、BPX-101で処置した後に部分奏効が得られた。図40は、被験体1003について示されている、処置の腫瘍縮小効果を示す写真を示す。処置の26週間後に、拡大した大動脈前リンパ節のベースラインにおけるスキャン（33週間前）と比較して、節のサイズが縮小し、固体の増強性塊から非増強性嚢胞性病変への変化があり、増強性腫瘍組織の縁は、腫瘍の壊死と一致した。グリーソンスコアが8の被験体1006では、BPX-101、その後のドセタキセル（doctaxel）ベースの併用化学療法レジメンを用いた併用療法の後に完全奏効が得られた。被験体1006は、ベースラインにおいて、大規模な生検により診断された前立腺癌の肝臓への転移を示した。被験体の肝機能は、ワクチン療法の15週間後までに正常に戻った。34週間の時点で、ベースラインにおける肺病変、LN病変および骨病変を含め、検出可能な生存可能な腫瘍はなかった（図64）。図53は、被験体1006における処置期間にわたる血清PSAのレベルを示す。グリーソンスコアが10の被験体1008では、6つの別々の肺転移のほぼ排除を伴う肺における完全奏効、および安定な前立腺疾患が得られた。登録時に前立腺癌は肺、リンパ節および骨に広がっていた。被験体1008は、ベースラインスキャンの6週間後に開始した6用量のBPX-101で処置した（化学療法なし）。肺における腫瘍は12週間の処置期間の終わりに排除され、他の部位における転移は安定なままであった。患者は、20週間の時点で臨床的に安定であり、体重がいくらか減少し、疼痛はなく、腎機能の安定により両側性の尿管ステントを除去した。

【0526】

併用療法

被験体1003、1004、1008、1010、1011、および1012は、タキソテールで処置された後に、臨床試験に参加した。この群のうち、被験体1003では試験終了時に部分奏効が得られ、被験体1008では肺における完全奏効および安定な前立腺疾患が得られた。被験体1011および1012は、12週の時点で安定を有した。

【0527】

臨床的バイオマーカーの反応

3つのコホート全てにおいて、臨床的バイオマーカーの反応が明らかであった。被験体1010では、1用量後に、血清PSAレベルの85%の降下が実現された。この患者は、臨床試験の前にタキソテールで処置されていた。この患者は、臨床的進行があり、動作の状況が急速に劣化しているので、処置を終結する前に単回用量のBPX-101を受けた。試験の原理研究者は、この患者の平均余命は約1カ月であると推定した。しかし、他の処置はせず単回用量のBPX-101の後、患者は改善し、現在は6カ月経って安定な

経過で、P S Aが8 5 %低下した。患者の希望により、スキャンまたは他の腫瘍評価は実施しなかった。

【0 5 2 8】

測定可能な軟組織疾患を有する大部分の被験体において腫瘍血管系の縮小が観察され、被験体1 0 0 3では有意な腫瘍の縮小および抗血管系効果が得られた。

【0 5 2 9】

大部分の評価可能な患者において、抗原特異的な免疫応答が見出された。

【0 5 3 0】

結論：

P S M Aを標的とする新規の、薬物によって活性化される自己D CワクチンであるB P X-1 0 1の第I相／I I相臨床試験に従った臨床的な観察の要約。1つの先立つ化学療法レジメンに対して経過観察中の進行性m C R P Cの男性を、B P X-1 0 1およびC D 4 0活性化剤であるA P 1 9 0 3を評価する3 + 3用量漸増試験に登録した。6回用量のB P X-1 0 1を、誘導期の間に2週間ごとに皮内投与し、非進行患者については、維持期の間8週間ごとに最大5回用量であった。各B P X-1 0 1用量の24時間後にA P 1 9 0 3 (0. 4 m g / k g)を注入した。放射線学的な評価を12週間ごとに実施した。1用量当たり細胞 4×10^6 個および細胞 12.5×10^6 個についてそれぞれ3人、および1用量当たり細胞 25×10^6 個の6人を含めた、被験体12人の計画登録が完了した。ワクチン製品は全て放出可能であった。ハラビの予測生存 (H a l a b i - p r e d i c t e d s u r v i v a l) の中央値は13. 8カ月であった。2人の被験体は、進行したために誘導の終わりの前にプロトコルをやめ、8人は誘導の終わりに到達し、2人は誘導の達成に近づいた。毒性 (例えば、注射部位反応) は概して穏やかであった。高用量被験体の1人において、2回目のワクチン接種の際にA P 1 9 0 3を注入している間に単一の急性サイトカイン反応があったが、さらなる薬物に関連する有害事象を伴わずに誘導が継続された。特に、1人の低用量コホートのドセタキセル後の被験体では、R E C I S T P Rが実現され、大規模な内臓転移、結節転移および骨転移がある1人の中間用量コホートの化学療法ナイーブな被験体では、ドセタキセルベースの化学療法を伴い、誘導後にR E C I S T C Rが得られ、検出不可能な超高感度のP S A (0. 009 n g / m L) が登録後10カ月維持された。高用量のコホートの第3の被験体では、誘導の終わりに多数の肺転移がほぼ完全に排除され、その他については安定が得られた。3人全てにおいて頑強な免疫応答が見られた。B P X-1 0 1は、確実に製造し、続いて少なくとも細胞 25×10^6 個の用量でA P 1 9 0 3で安全に投与することができる。癌ワクチン療法により、短期間の反応を伴わずに生存が改善されるという知見に反して、B P X-1 0 1で処置された患者では、危険性の低い内臓疾患のほぼ排除を含めた、測定可能な疾患反応があった。

【0 5 3 1】

キメラタンパク質 (B P X-1 0 1) を発現している改変抗原提示細胞を用いてワクチン接種した後の抗原特異的な免疫および腫瘍炎症の観察の要約：m C R P Cに対する、薬物により活性化されるD CワクチンであるB P X-1 0 1の第I相～I I a相臨床試験に登録された患者において、ワクチン接種後に抗原特異的な免疫および重篤な前立腺癌の炎症および壊死が観察された。進行性m C R P Cの男性12人を、B P X-1 0 1および活性化剤であるA P 1 9 0 3を評価する3 + 3用量漸増試験に登録した。前立腺特異的膜抗原 (P S M A) を標的とする6用量のB P X-1 0 1を、2週間ごとに皮内投与し、その後、各用量の24時間後にA P 1 9 0 3 (0. 4 m g / k g)を注入した。4回目のワクチン接種の後に注射部位の皮膚生検材料を実施した。皮膚生検材料からe x v i v oで培養したT細胞をP S M Aタンパク質または対照抗原で刺激し、L u m i n e x ミクロスフェアを使用して炎症性のサイトカイン／ケモカイン30種について解析した。インタクトな前立腺を有する1人の患者 (# 1 0 0 7) では、5回目のワクチン接種後に下部尿路の出血が発生し、出血した前立腺癌組織の経尿道的切除術を行った。パラフィン包埋ブロックをヘマトキシリン・エオシン (H & E) 染色した。C D 3、C D 4、C D 8およびC

10

20

30

40

50

D 3 4 についての免疫組織化学的染色も実施した。評価可能な注射部位の生検結果を有する被験体 5 人のうち、全員が P S M A 特異的な免疫を示した（3 人は T H 1 に偏り、および 2 人は T H 2 に偏った）。被験体 1 0 0 7 の注射部位の生検により、P S M A による刺激後に、オボアルブミンによる刺激と比較して I F N-γ ガンマおよび I L-2 において 1 0 倍を超える有意な増加が実証され、これは強力な P S M A 特異的 C T L または T H 1 に偏った免疫応答の誘導と一致した。H & E 染色された切除前立腺組織により、グリーソン 8（4 + 4）前立腺腺癌が、浸潤性の形質細胞および C D 4 + T 細胞および C D 8 + T 細胞からなる重篤な炎症反応を示すことが実証された。炎症前立腺癌組織に近接して広い領域の壊死が見られた。B P X-1 0 1、次いで A P 1 9 0 3 を用いたワクチン接種により、強力な、P S M A 特異的免疫応答を誘導することができる。さらに、複数用量の B P X-1 0 1 の後に、強力な P S M A 特異的免疫応答に関連づけられる重篤な前立腺癌特異的な炎症および壊死の証拠が観察された。

10

【0 5 3 2】

B P X-1 0 1 で処置された患者における血清サイトカインと臨床反応の相関の観察の要約。進行性 m C R P C の男性を、B P X-1 0 1 および活性化剤である A P 1 9 0 3 を評価する 3 + 3 用量漸増試験に登録した。6 用量の B P X-1 0 1 を、誘導期の間に 2 週間ごとに皮内投与し、非進行性患者については、維持期の間に 8 週間ごとに最大 5 用量であった。各 B P X-1 0 1 用量の 2 4 時間後に A P 1 9 0 3（0. 4 m g / k g）を注入した。免疫をモニターするための血液試料を、誘導期の間に週に 1 回、ならびに各維持用量の前およびその 1 週間後に採取した。G M- C S F、T N F-α、I F N-γ、I P-1 0、M C P-1、M I P-1 α、M I P-1 β、および R A N T E S のレベルを L u m i n e x ミクロスフェアによって測定し、I L-6 のレベルを E L I S A によって測定した。1 回の用量当たり細胞 4×10^6 個および $12. 5 \times 10^6$ 個をそれぞれ 3 人、および細胞 25×10^6 個の 6 人を含めた被験体 1 2 人の計画登録を完了する。疾患負荷量が大きい被験体において、翌週にベースラインに戻る、各用量の 1 週間後の血清サイトカインの急上昇のレベルのパターンが観察された。試験に入った 1 年後に P R を得た 1 人の低用量の被験体では、パネルサイトカインは誘導期の各用量の用量後に平均で 4 倍に急上昇し、最初に 2 回の追加免疫後には 2 倍未満に急上昇し、最終的な 3 回の追加免疫の後には 6 倍から 5 6 倍の間に急上昇した。多数の肺転移のほぼ C R、その他については安定を得た第 2 の高用量の被験体（# 1 0 0 8）では、パネルサイトカインは誘導期に平均で 1 5 0 倍に急上昇した。どちらの場合でも、被験体 1 0 0 8 についての T N F-α の 1, 0 0 0 倍を超える平均急上昇を含めて、T N F-α、M I P-1 α および M I P-1 β が最も急上昇した。サイトカインの急上昇は、A E を伴わなかった。結論：B P X-1 0 1 は、各用量後のサイトカイン上昇の急上昇パターンを誘導する。測定可能な疾患が低下した患者では、血清中の炎症性サイトカインレベルのより劇的な急上昇が見られた。

20

30

【0 5 3 3】

B P X-1 0 1 および A P 1 9 0 3 を用いた処置により、臨床的な全身免疫応答および抗原特異的な全身免疫応答の両方が引き出される。処置により、グリーソンスコアが 7 を超える被験体においてさえ、部分奏効または完全奏効、または進行の遅延のいずれかの有意な結果が得られた。B P X-1 0 1 および A P 1 9 0 3 による処置の前、またはその後に化学療法を組み合わせた処置が相乗効果を有すると思われた。特定の被験体において、肺、肝臓、骨、およびリンパ節における転移性前立腺癌の病変の軽減と同様に腫瘍血管系および腫瘍サイズの縮小が明らかであった。

40

【0 5 3 4】

（実施例 1 6）

癌患者の生活の質の改善

末期癌患者は、通常、その生活の質の著しい低下を経験する。生活の質の問題としては、例えば、悪液質、疲労、および貧血が挙げられる。貧血、疲労、または貧血の症状を減少させるために、患者の生活の質を改善することができる。

【0 5 3 5】

50

消耗症候群としても公知の悪液質は、末期癌の患者において度々起こる。この用語は、癌患者において見られる体重減少、筋萎縮、疲労、および衰弱を説明するために使用され、また、死亡についての正の危険因子である。患者における悪液質のレベルを決定するために使用される臨床的測定としては、例えば、握力、ヘモグロビンのレベル、アルブミン、C反応性タンパク質、および疲労（例えば、FACIT-F、疲労を評価する質問表によって測定する）が挙げられる。

【0536】

IL-6を遮断する化合物の使用は、悪液質の特定の症状を緩和することが報告されている。IL-6は、多くの癌および炎症性疾患、例えば、関節リウマチなどに関係づけられる。化合物ALD-518は、臨床試験において進行癌の患者に与えると、疲労を逆転させ、ヘモグロビンを増加させ、かつアルブミンを増加させることが報告されたヒト化抗IL-6モノクローナル抗体である。握力の増加傾向も示された。C反応性タンパク質のレベルの低下も示された。Clarke, S. J., et al., 2009, J. Clin. Oncol. 27:15s (suppl.; abstr. 3025)。癌に関連した貧血、悪液質、および疲労に使用するALD-518のより大規模な臨床研究では、ALD-518の投与により、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均小体ヘモグロビン、およびアルブミンが増加することが報告された。M. Schuster, et al., 2010, J. Clin. Oncol. 28-7s (suppl.; abstr. 7631)。

【0537】

関節リウマチについての臨床試験における他の抗IL-6抗体としては、例えば、エルシリモマブ(elsilimomab)およびCNT0136が挙げられる。IL-6を遮断する他の方法は、IL-6受容体(IL-6R)を遮断することを含む。アトリズマブ(atlizumab)としても公知のトシリズマブは、IL-6Rを対象とするヒト化モノクローナル抗体である。炎症性疾患、例えば、関節リウマチなどを処置するための化合物が示されている。

【0538】

本方法の形質導入またはトランスフェクトされた細胞、化合物、または核酸、およびリガンドを投与することにより、癌患者の生活の質が向上し得る。

【0539】

生活の質の改善とは、貧血、悪液質、または疲労の少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの症状が、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%緩和されることを意味する。例えば、患者のヘモグロビンレベルがxである場合、生活の質の改善としては、例えば、処置後に患者のヘモグロビンが少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%上昇することが挙げられる。症状の緩和としては、例えば、ヘモグロビンが上昇すること、ヘマトクリットが上昇すること、体重が増加すること、アルブミンが上昇すること、C反応性タンパク質が減少すること、疲労が低下すること、および握力が増加することが挙げられる。

【0540】

生活の質の指標である症状を測定することとは、貧血、悪液質、または疲労の症状を測定することまたは評価することを意味する。例えば、患者のヘモグロビンレベル、または患者の握力を測定することができる。

【0541】

本明細書において参照されている特許、特許出願、刊行物および文書のそれぞれの全体が、本明細書によって参照により組み込まれる。上記の特許、特許出願、刊行物および文書を引用することは、前述のいずれもが先行技術に関係することを認めるものではなく、これらの刊行物または文書の内容または日付に関してどんな容認も構成するものでもない。

【0542】

当該技術の基本的な態様から逸脱することなく前述のものに改変を行うことができる。当該技術は、1つまたは複数の特定の実施形態を参照してかなり詳細に記載されているが、当業者は、本出願に詳細に開示されている実施形態に変化を生じさせてよく、それでもこれらの改変および改良は当該技術の範囲および主旨であることを理解されよう。

【0543】

本明細書において適切に例示的に記載されている技術は、本明細書に詳細に開示されていない要素（複数可）のいずれがなくとも実施することができる。したがって、例えば、本明細書の各例において「含む」、「から本質的になる」および「からなる」という用語はいずれも、他の2つの用語のいずれかと交換することができる。使用されている用語および表現は、説明する用語として使用され、限定ではなく、そのような用語および表現を使用することによって、示され、記載されている特徴の等価物またはその部分はいずれも排除されず、特許請求された技術の範囲内で種々の改変が可能である。「a（1つの）」または「an（1つの）」という用語は、要素のうちの1つ、または要素のうちの2つ以上のいずれかについて記載されていることが文脈上明らかでない限り、それが修飾する要素のうちの1つまたは複数（例えば、「a（1つの）試薬」は、1つまたは複数の試薬を意味し得る）。本明細書で使用される「約」という用語は、基になるパラメータの10%以内の値（すなわち、プラス10%またはマイナス10%）を指し、一連の値の最初に「約」という用語を使用することにより、値のそれぞれが修飾される（すなわち、「約1、2および3」とは、約1、約2および約3を指す）。例えば、「約100グラム」の体重は、90グラムから110グラムの間の体重を含んでよい。さらに、値の列挙が本明細書に記載されている場合（例えば、約50%、60%、70%、80%、85%または86%）その列挙は、それらの中間の値および小数値の全てを含む（例えば、54%、85.4%）。したがって、本技術は代表的な実施形態および任意選択の特徴によって詳細に開示されているが、当業者は本明細書に開示されている概念の改変および変形を用いることができ、そのような改変および変形は本技術の範囲内であるとみなされることが理解されるべきである。

【0544】

当該技術のある特定の実施形態は、続く請求項（複数可）に記載されている。

10

20

【図 1】



FIG. 1A

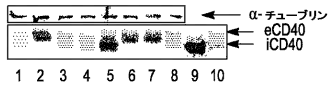


FIG. 1B

【図 2】

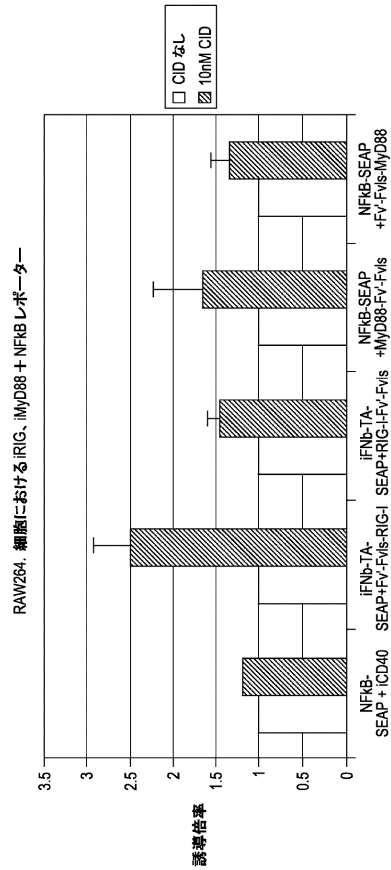


FIG. 2

【図 3】

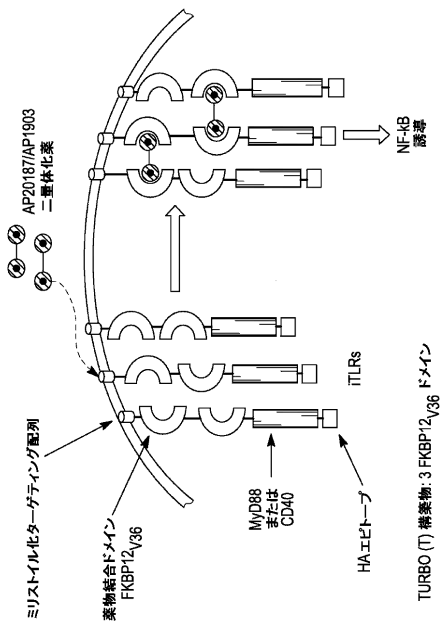


FIG. 3

【図 4】

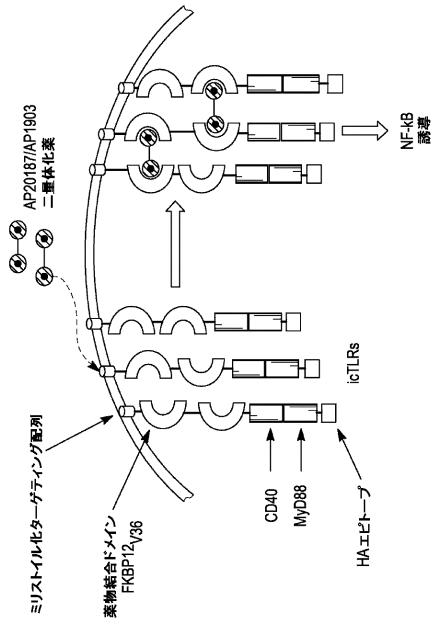
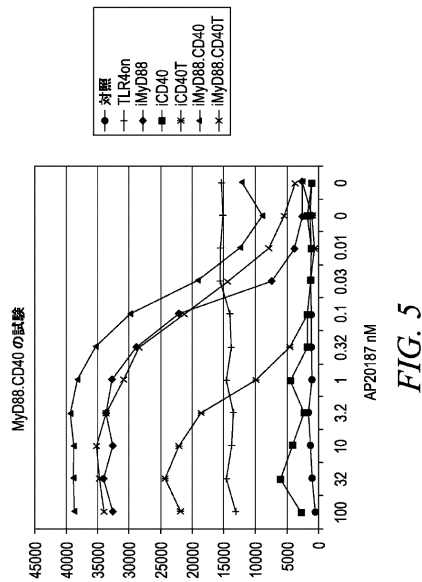
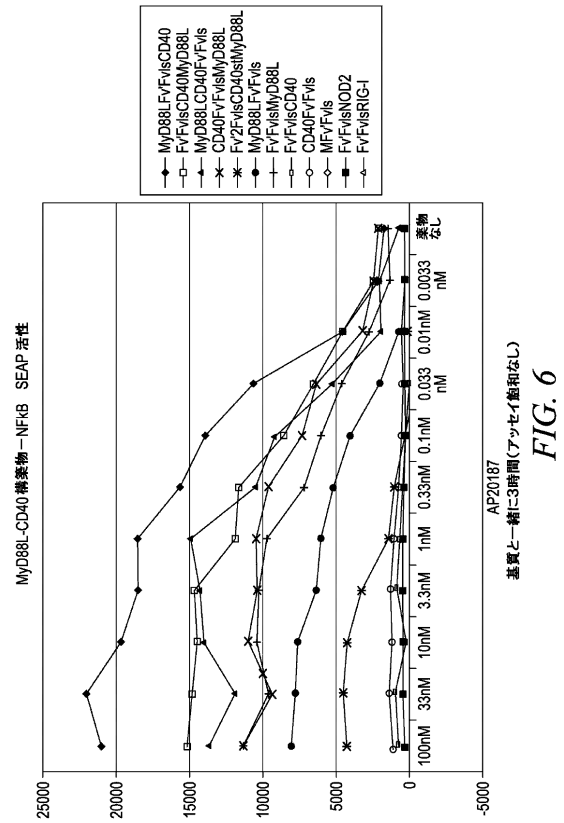


FIG. 4

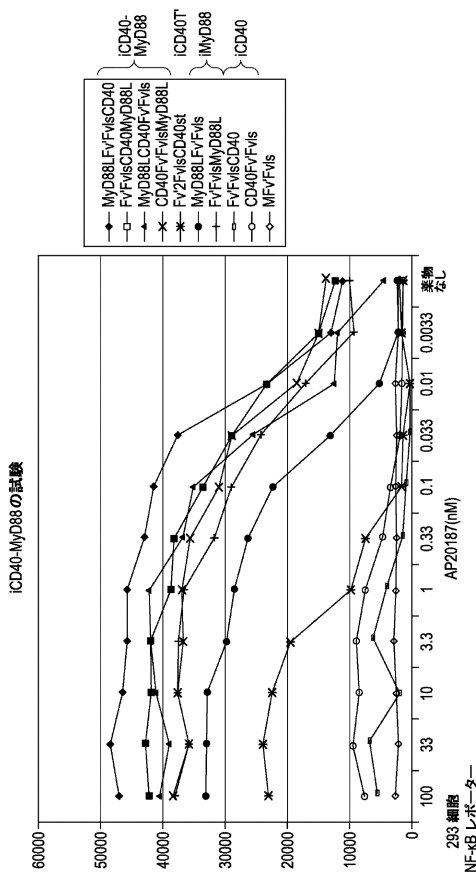
【図 5】



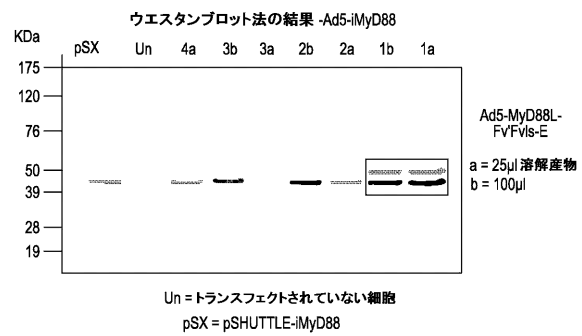
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図 9】

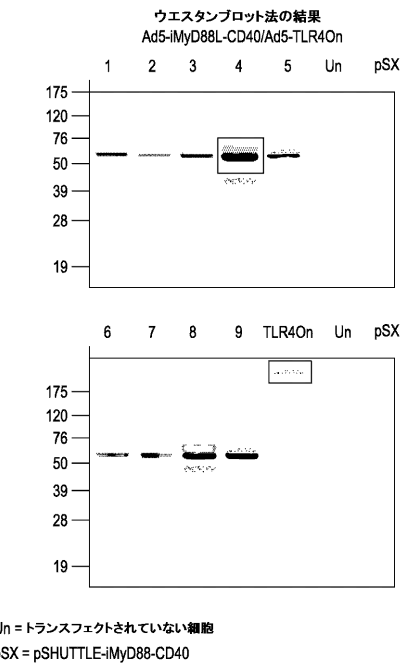


FIG. 9

【図 10】

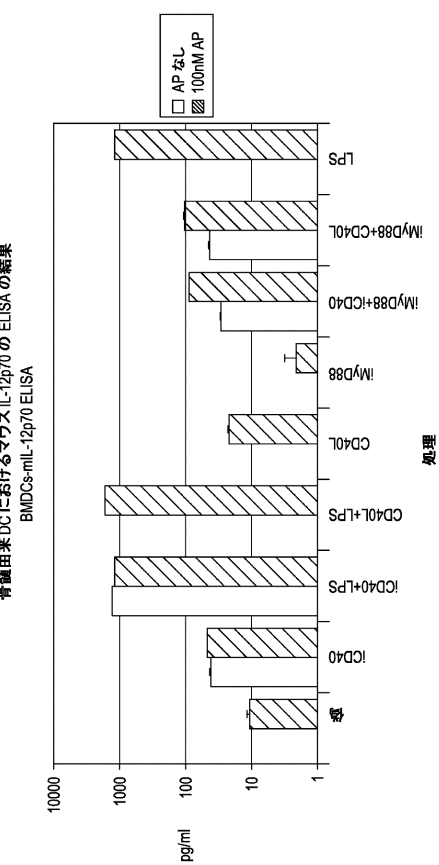


FIG. 10

【図 11】

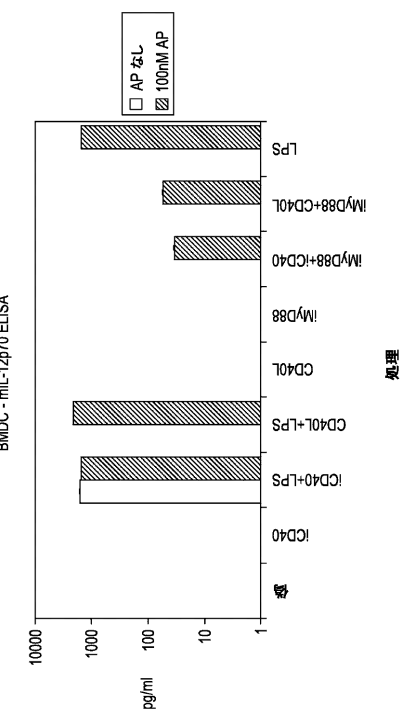


FIG. 11

【図 12】

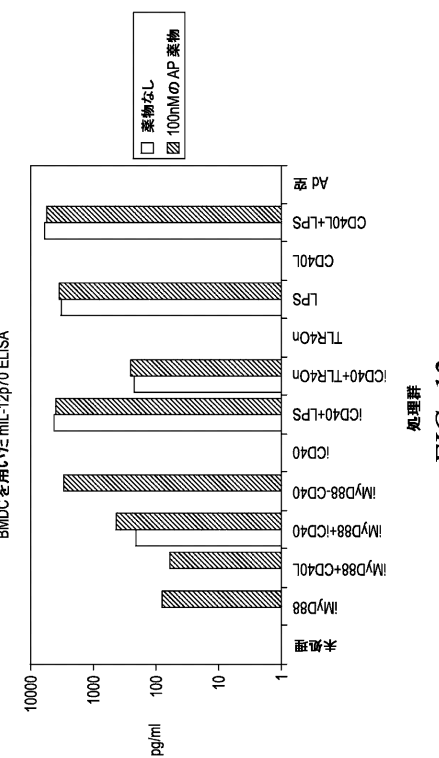


FIG. 12

【図 13】

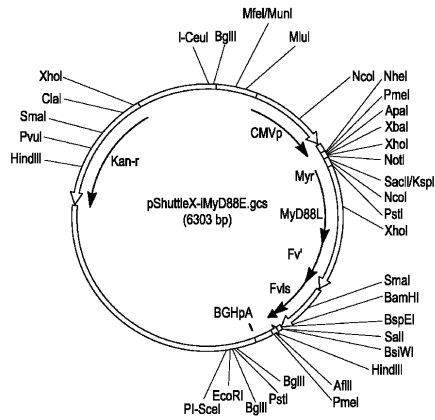


FIG. 13

【図 14】

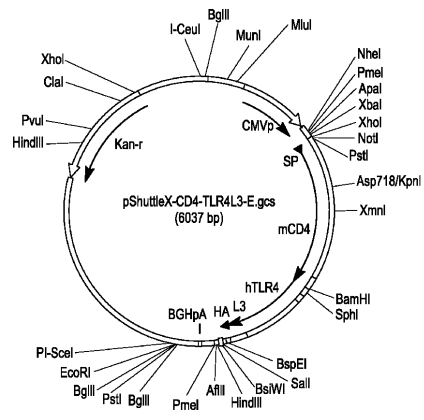


FIG. 14

【図 15】

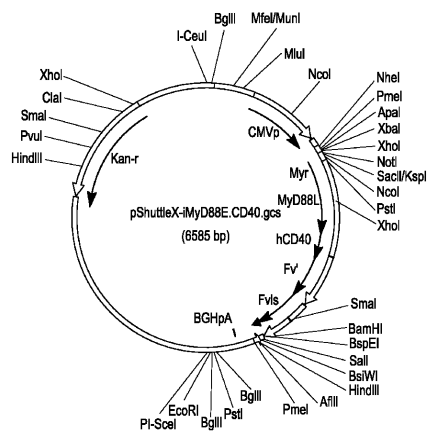


FIG. 15

【図 16】

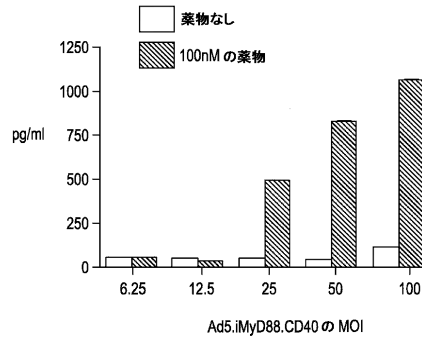
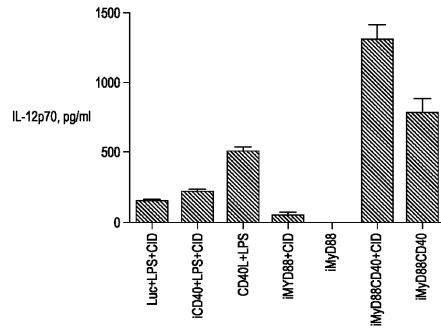


FIG. 16

【図 18】



【図 19 A】



【図 20】

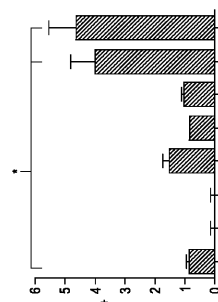
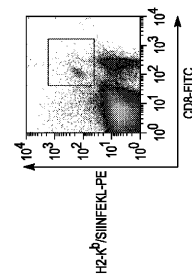


FIG. 20

[illegible]

FIG. 19C



【図 2 1】

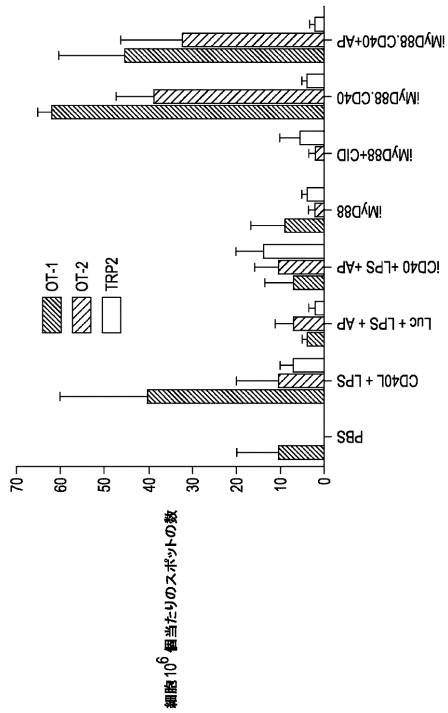


FIG. 21

【図 2 2】

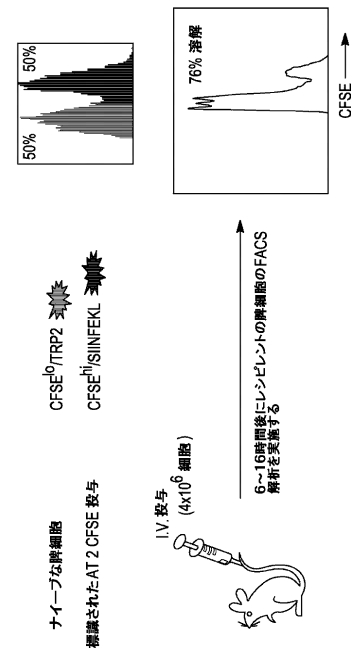


FIG. 22

【図 2 3】

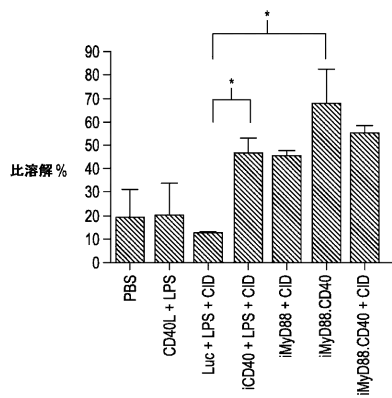


FIG. 23

【図 2 4 - 1】

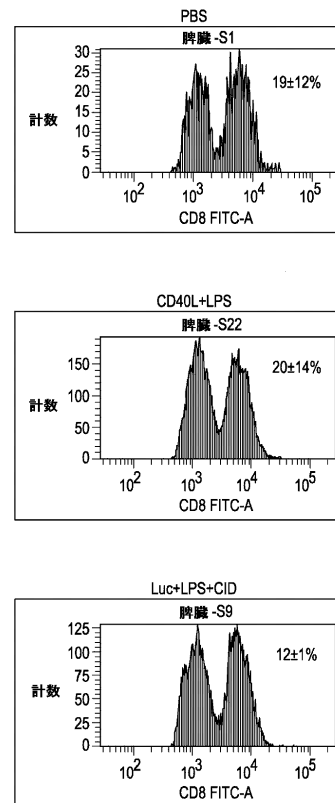


FIG. 24

【図 24 - 2】

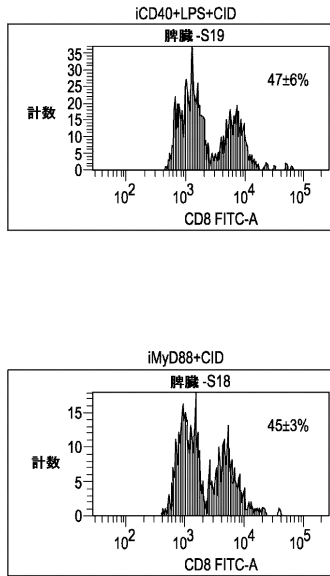


FIG. 24 続き

【図 24 - 3】

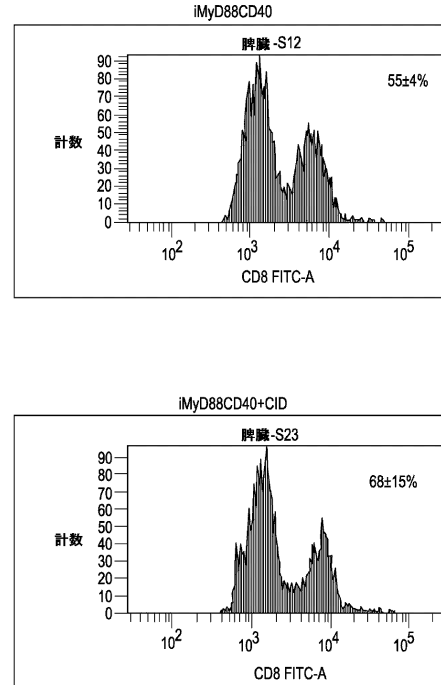


FIG. 24 続き

【図 25 - 1】

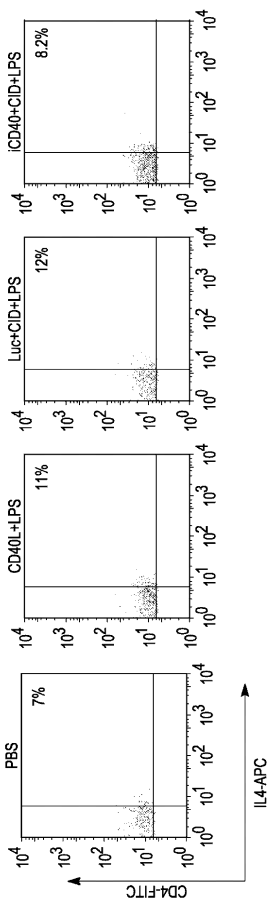


FIG. 25

【図 25 - 2】

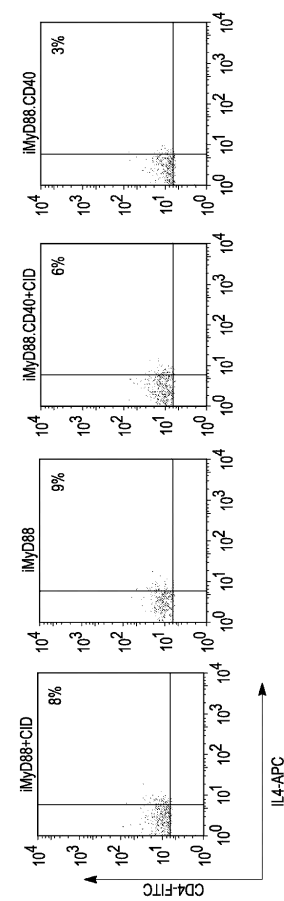
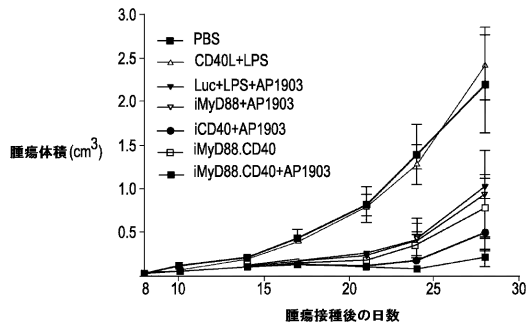
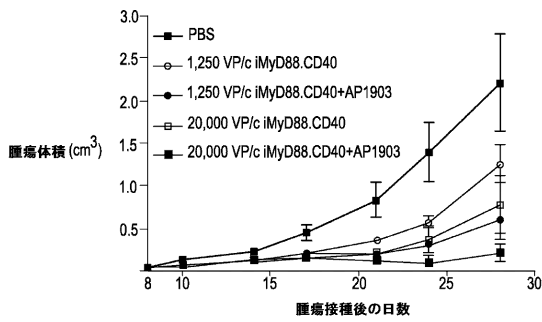


FIG. 25 続き

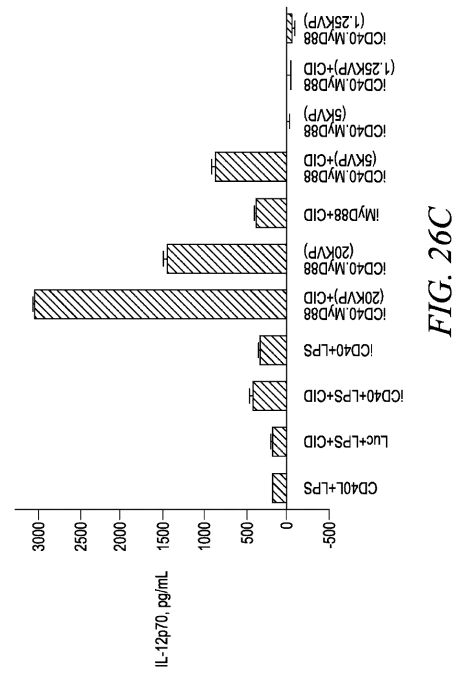
【図 26 A】



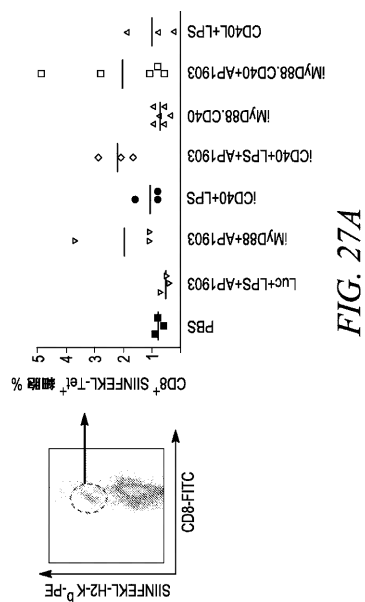
【図 26 B】



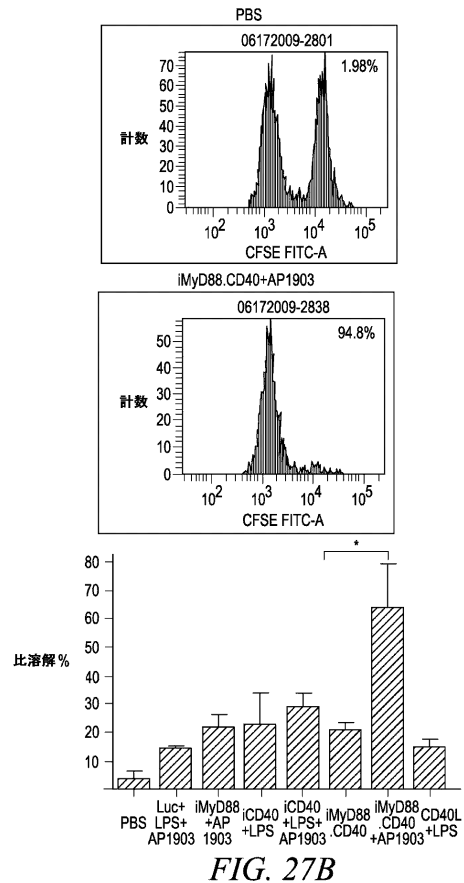
【図 26 C】



【図 27 A】



【図 27 B】



【図 27 C】

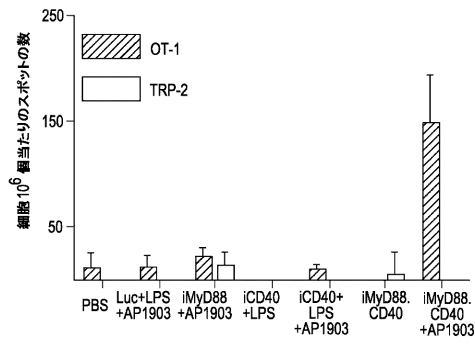


FIG. 27C

【図 27 D】

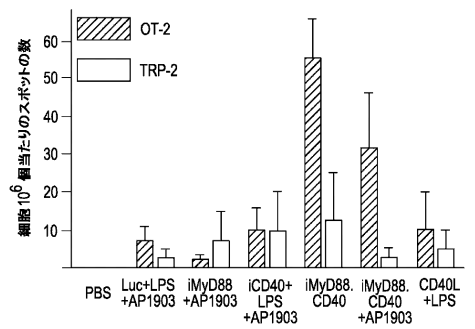


FIG. 27D

【図 28】

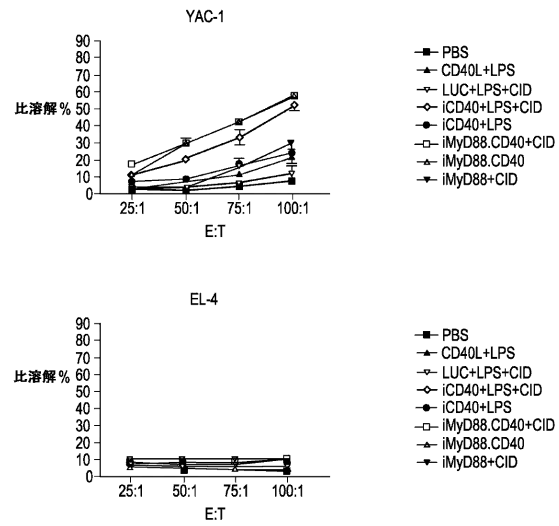


FIG. 28

【図 29】

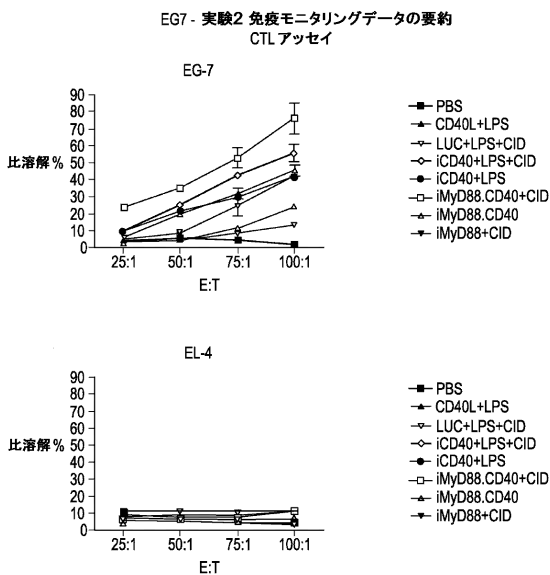


FIG. 29

【図 30】

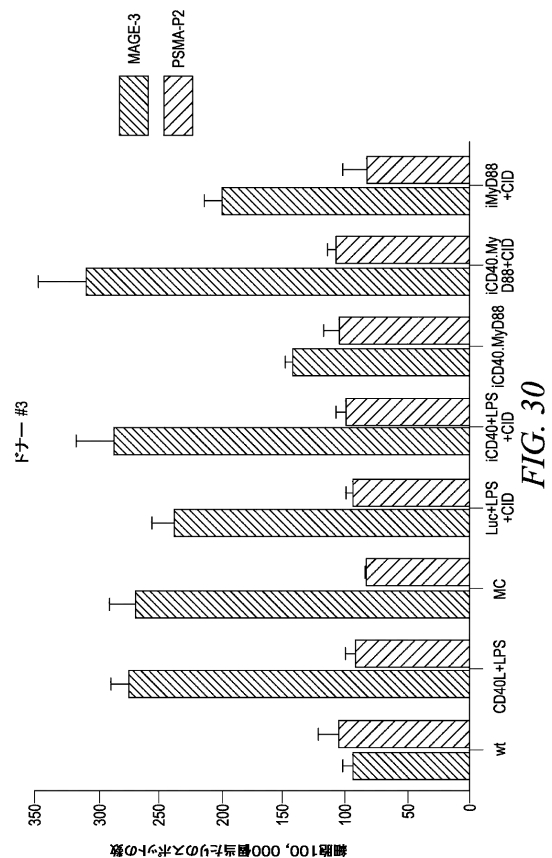


FIG. 30

【図 3 1 - 1】

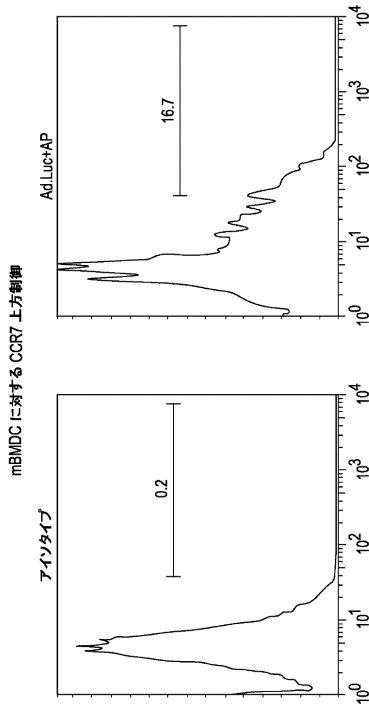


FIG. 31

【図 3 1 - 2】

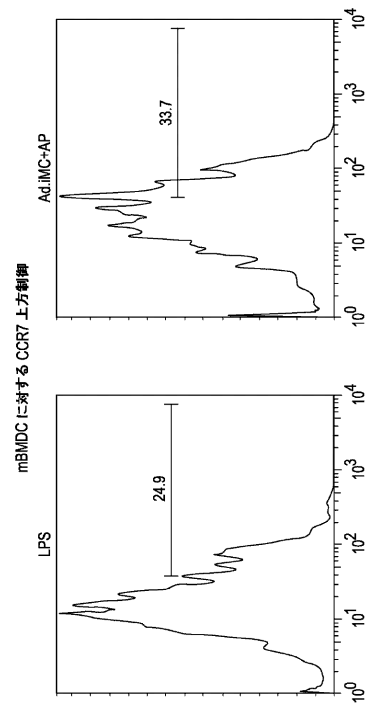


FIG. 31 続き

【図 3 2】

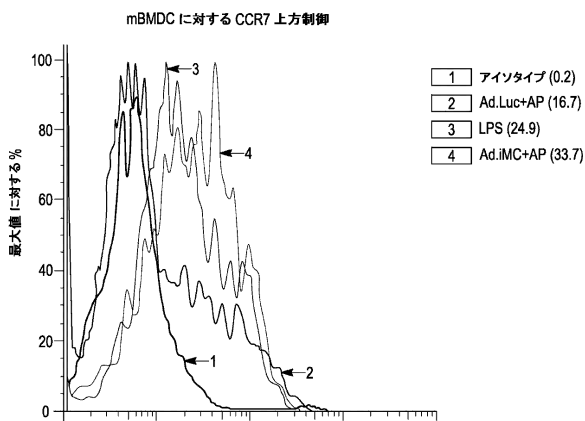


FIG. 32

【図 3 3】

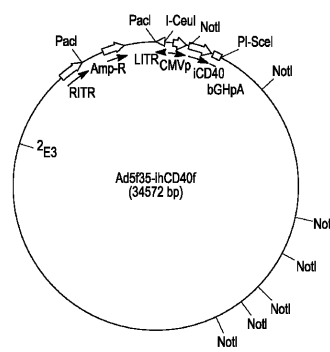


FIG. 33

ウォーターフォールプロット-ベースラインからの12週の変化

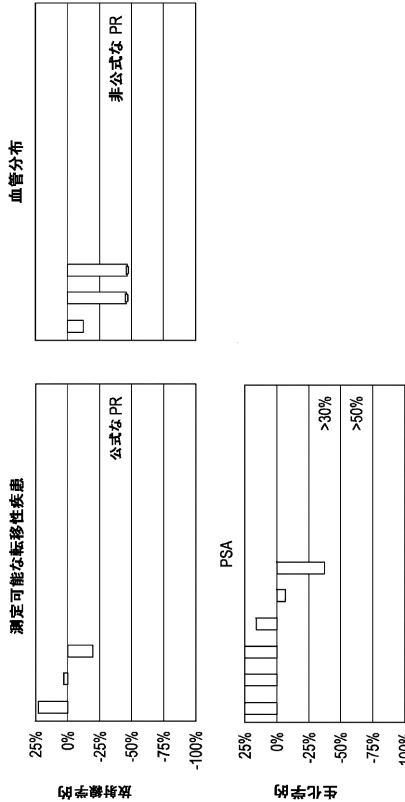


FIG. 36

探索的効力評価

モダリティー	評価	分類
放射線検査	軟組織 (CT, MRI) 骨 (骨スキャン, MRI)	病変サイズ: 血管分布 SD または PD ¹ SD または PD ²
生化学	PSA PSADT	ウォーターフォールプロット ³ 25%未満の増加または25%を超える増加: 減少 好都合または不都合 ⁴ 好都合または不都合 ⁵
免疫学	循環腫瘍細胞 IL-6 免疫反応のプロファイル KPS、疼痛スコア	7.5 mL あたりの細胞 ベースラインに対する変化 CTL、サイトカイン、ELISPOT ベースラインに対する変化

1. REGIST 1.1 および PROSTATE CANCER WORKING GROUP 2 (PCWG2) に従った病変サイズ: 完全奏効 (腫瘍量の排除): 部分奏効 (腫瘍量の30%を超える減少): 病状安定: 病状進行 (腫瘍量の20%を超える増加)。
CTコントラスト増強に基づく、未検証のCR、PR、SD、PDの分類に従った血管分布 (後のスライドで考察している)
2. PCWG2 による。病状安定 (新しい病変が1つ以下) または病状進行 (新しい病変が2つ以上)。信頼性高く測定することができない反応
3. PCWG2 では、PSA 反応を評価するためにウォーターフォールプロットを使用し、PSAの進行が最下点から 25% 以上の上昇として定義される
4. 7.5 mL 当たり細胞5個を下回る CTC 値は、予期全生存率の増加と相関することが示された。
5. 13.3 PG/mL を下回る IL-6 値は、CRPC における予期全生存率の増加と相関することが示された (CLIN. CAN. RES., 2005 年)

FIG. 34

サイトカインの急上昇 - 被験体 1008

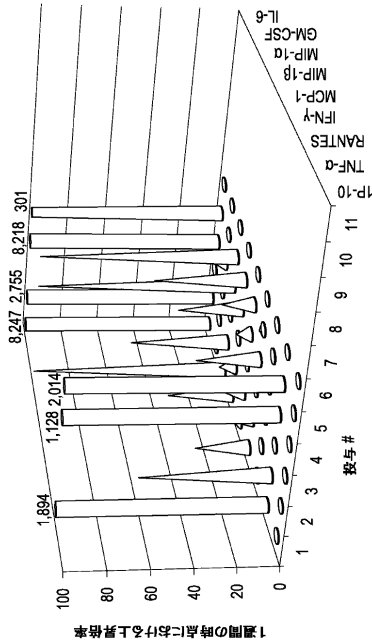


FIG. 37

12週間の免疫学的反応および臨床応用の要約

被験体 #	1001	1002	1003	1004	1005	1006
年齢	73	72	81	80	66	73
KPS (スクリーニング時)	90%	90%	80%	80%	100%	90%
グリフスコア	N/A	7	9	10	8	8
先行化学療法	なし	なし	タキソテール	タキソテール	なし	なし
腫瘍サブタイプ	4	5	3	4	4	5
ベースラインの PSA (ng/mL)	5.8	11.1	312.8	46.5	66.0	30.9
処置前の PSADT (MOS)	4.9	7.3	5.0	1.7	1.4	1.6
12週間の時点における免疫学的応答						
AG 特異的免疫応答	IFN-γ, IP-10	決定されず	IFN-γ, IP-10	IL-6, MCP-1	IL-6, MCP-1	
平均投与後サイトカイン Δ	-2%	-6%	283%	66%	72%	43%
第12週における IL-6 の濃度	-98%	-65%	-100%	-16%	+139%	-75%
12週間の時点における安全性 および 臨床応答						
最大 AE グレード	1	2	2	1	1	2
REGIST 1.1 - 軟組織	-	SD	SD	-	N/A	PD
REGIST 1.1 - 骨	SD	SD	SD	SD	PD	PD
処置後の PSADT (MOS)	19.5	PSA	PSA	PSA	3.7	2.9
PSADT の上昇	298%	∞	∞	118%	N/A	80%

FIG. 35

【図 38】

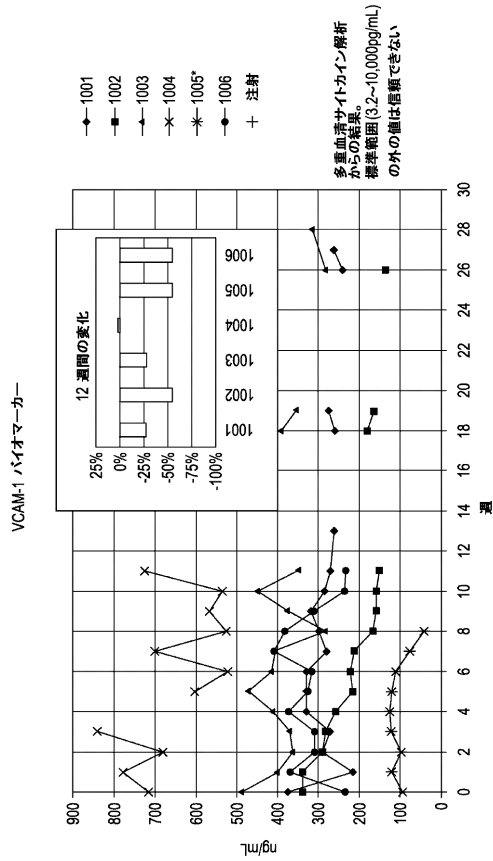


FIG. 38

【図 39】

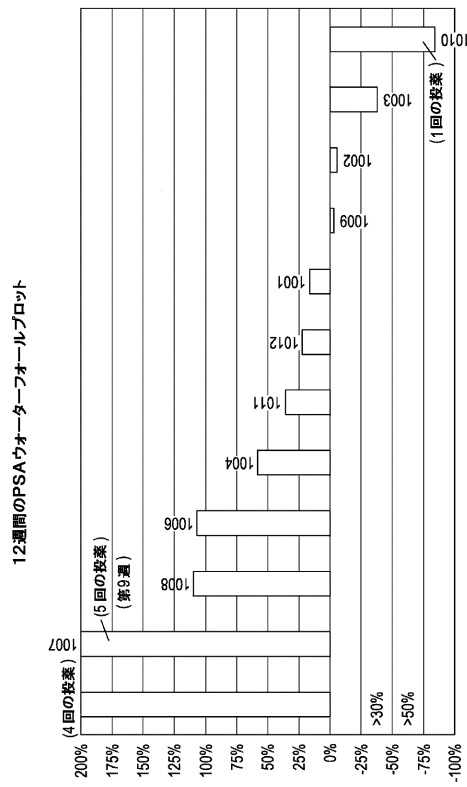


FIG. 39

【図 41】

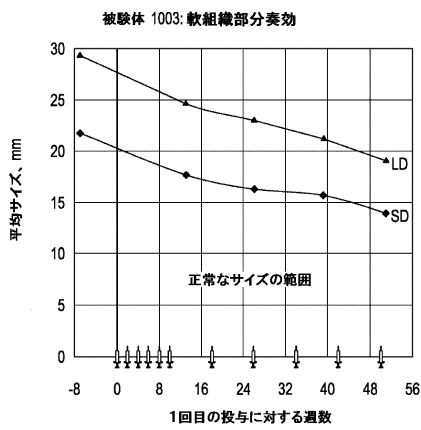


FIG. 41

【図 42】

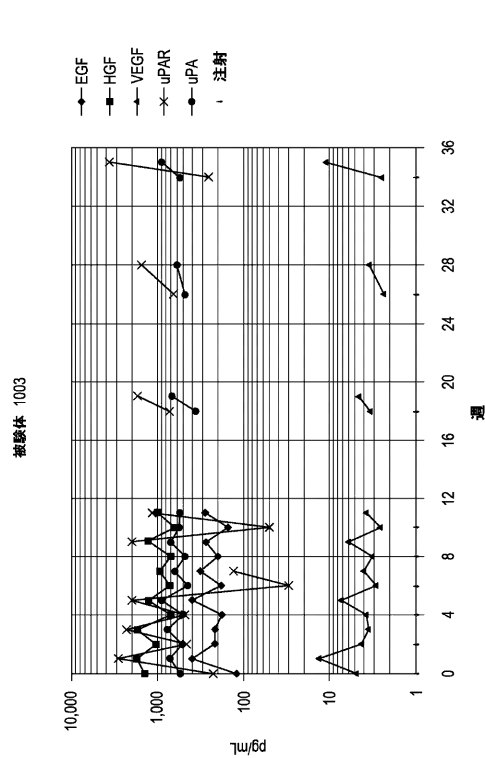


FIG. 42

【図 4 3】

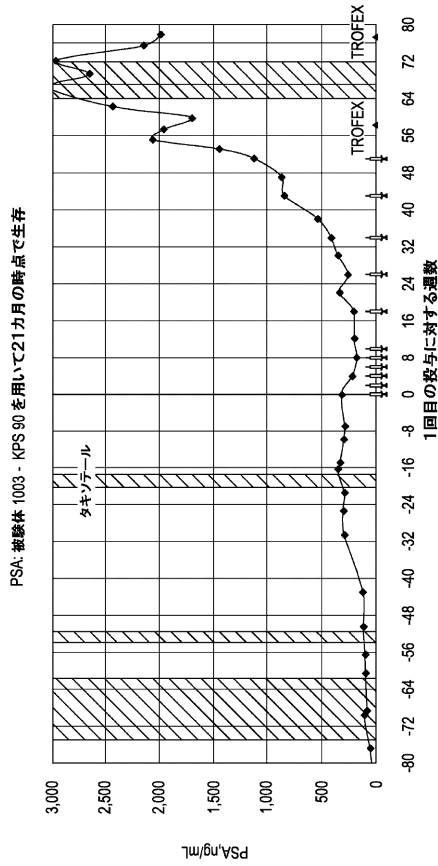


FIG. 43

【図 4 4】

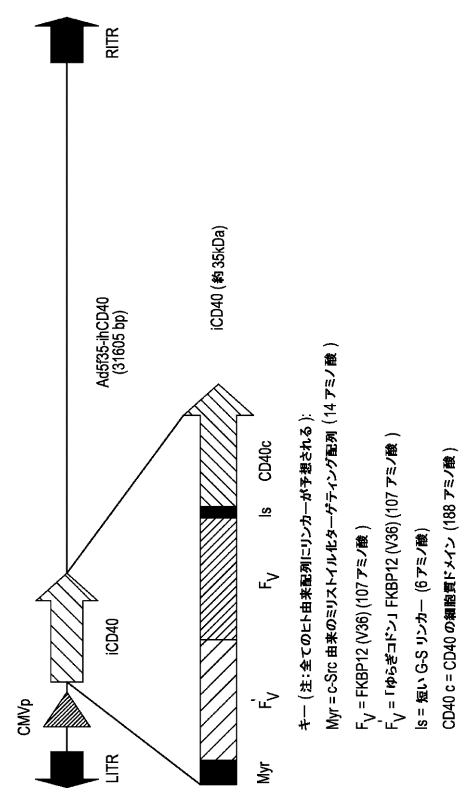


FIG. 44

【图 4 5】

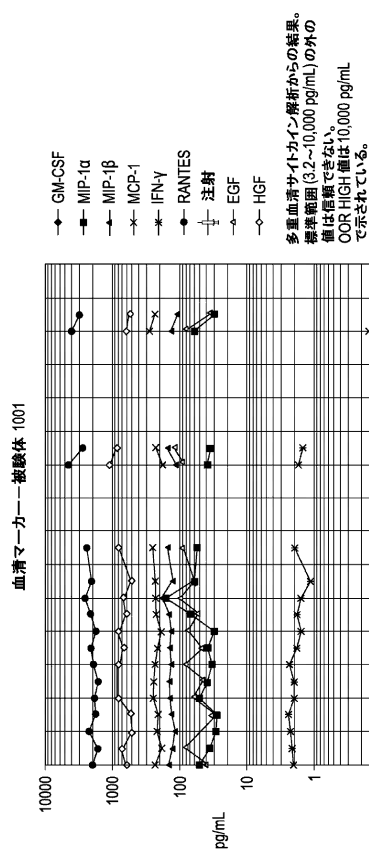


FIG. 45

【図 4 6】

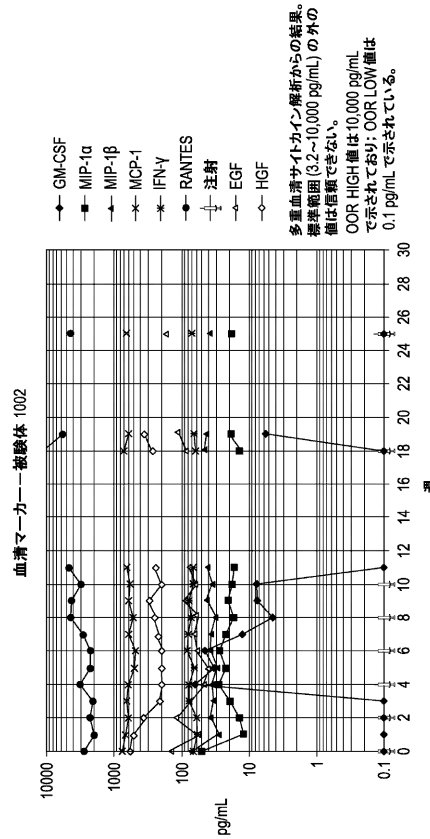


FIG. 46

【図 47】

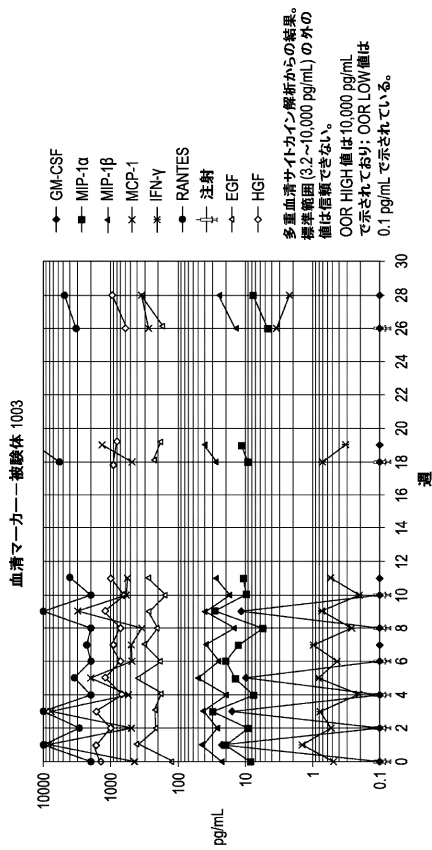


FIG. 47

【図 48】

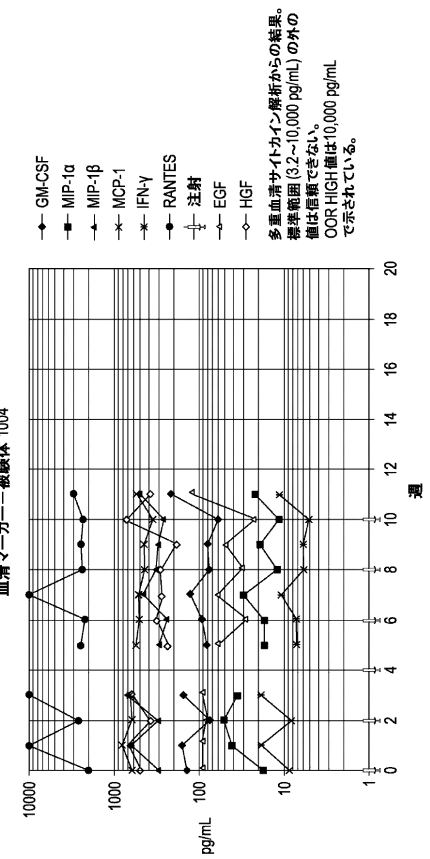


FIG. 48

【図 49】

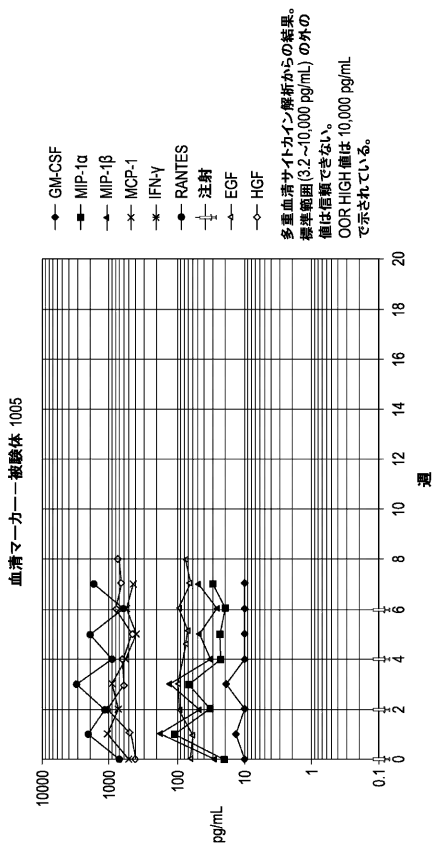


FIG. 49

【図 50】

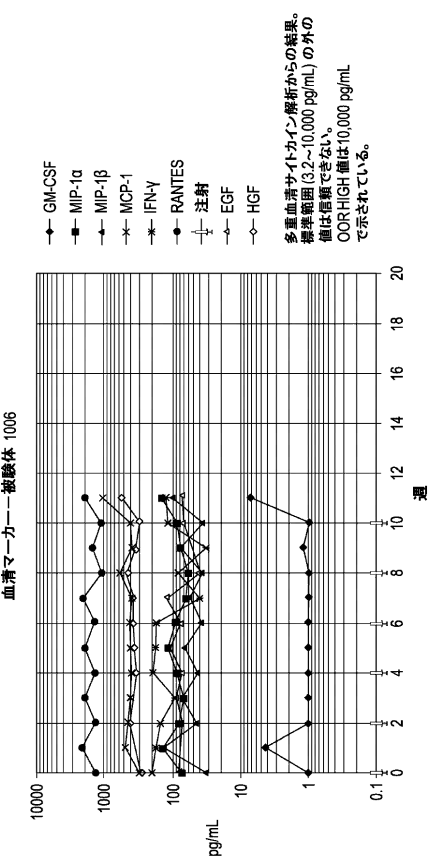
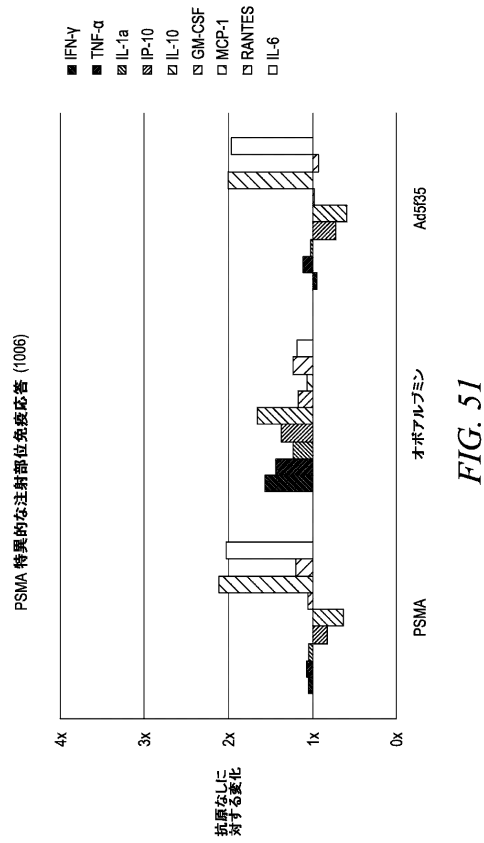
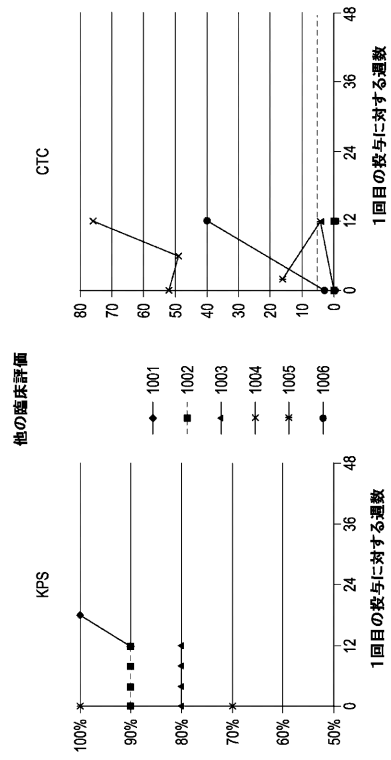


FIG. 50

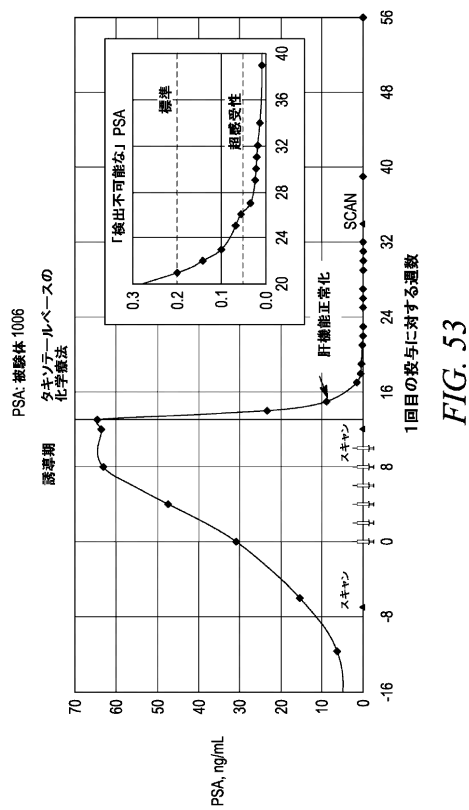
【図 5 1】



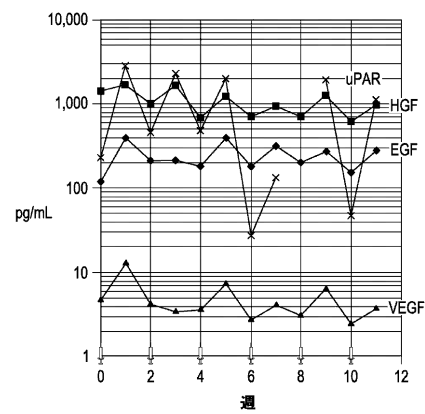
【図 5 2】



【図 5 3】



【図 5 4】



タキサンベンベースの化学療法法の順序付け

被験体	化学療法後の BPX に対する応答	BPX 後の化学療法に対する応答
1003	最大 PSA の 46% の減速、LN における PR	PSA の 30% 超の減速(ドセタキセル3サイクル後)、軟組織および骨転移の混合型の応答(BPX 前の最小の応答に対して)
1004	症状の改善	N/A
1006	N/A	PSA の 99% 超の減速 (ドセタキセル/カルボプラチンベンベースの化学療法 2 サイクル後)、長続きする内臓、LN、骨におけるOR
1007	N/A (アビラテロン)	MMD の低下(ドセタキセル/カルボプラチン)
1008	肺における CR	N/A
1010	単回の投与後にPSAの90%の減速	N/A
1011	SD	PSA の 60% 超の減速(カバジタキセル2サイクル後)
1012	SD	N/A

FIG. 63

【図 6 3】

【図 6 0】

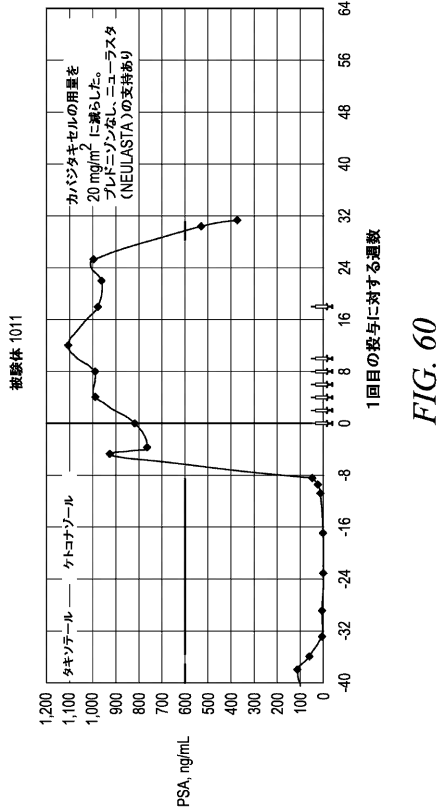


FIG. 60

【図 4 0】

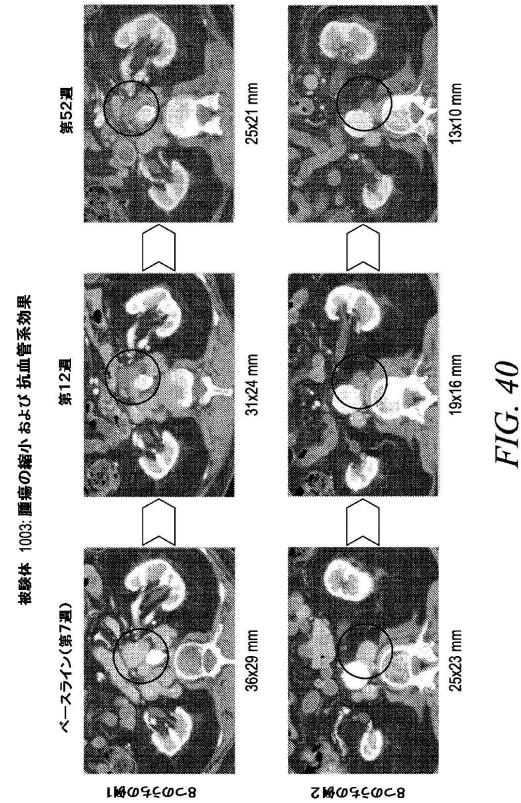


FIG. 40

【図 6 1】

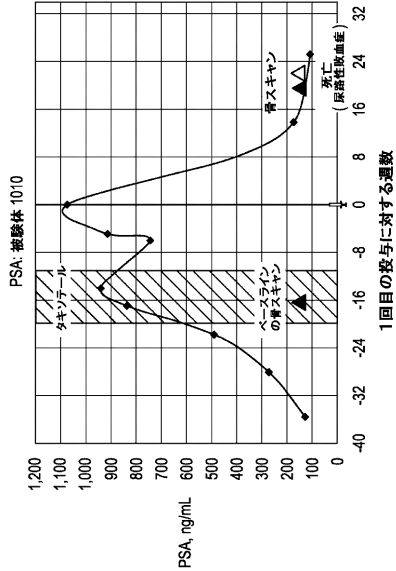
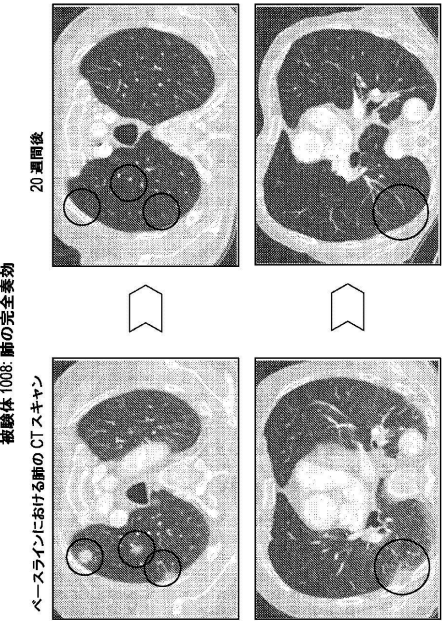
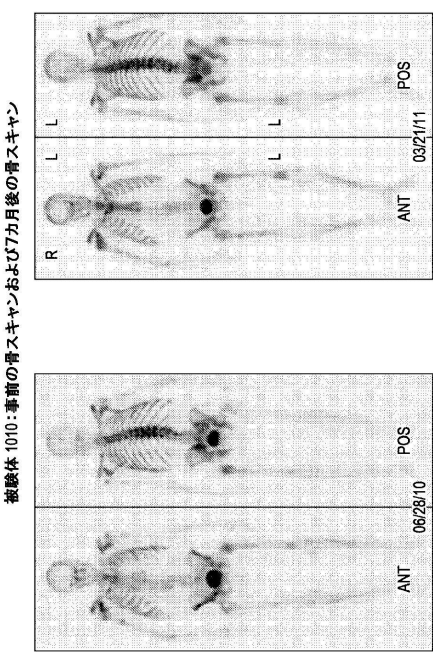


FIG. 61

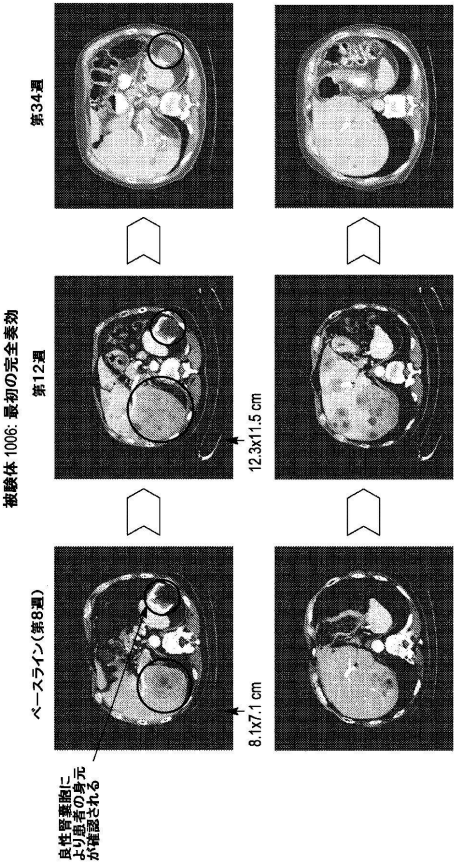
【図 5 9】



【図 6 2】



【図 6 4】



【配列表】

0005975983000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/337	(2006.01)	A 6 1 K 31/337
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

(31)優先権主張番号 61/351,760
(32)優先日 平成22年6月4日(2010.6.4)
(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策
(72)発明者 スローウィン, ケビン
アメリカ合衆国 テキサス 77030, ヒューストン, アンダーウッド ブールバード 2
336
(72)発明者 スペンサー, デイビッド
アメリカ合衆国 テキサス 77025, ヒューストン, プレスコット ストリート 281
1
(72)発明者 ラプティエバ, ナタリア
アメリカ合衆国 テキサス 77074, ヒューストン, シャドー クレスト 6119

審査官 砂原 一公

(56)参考文献 国際公開第2010/033949 (WO, A1)
国際公開第2008/049113 (WO, A1)
国際公開第2009/061996 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
A 6 1 K
A 6 1 P
C 1 2 N
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)