(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2012-503019
(P2012-503019A)
(43)公表日　平成24年2月2日(2012.2.2)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
A61K 39/00	***(2006.01)***	A61K	39/00	ZNAH	4B024
A61P 35/00	***(2006.01)***	A61P	35/00		4B065
A61P 31/04	***(2006.01)***	A61P	31/04		4C084
A61K 48/00	***(2006.01)***	A61K	48/00		4C085
A61K 38/00	***(2006.01)***	A61K	37/00		4C087

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 159 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2011-528050 (P2011-528050)
(86)(22)出願日　平成21年9月21日 (2009.9.21)
(85)翻訳文提出日　平成23年4月26日 (2011.4.26)
(86)国際出願番号　PCT/US2009/057738
(87)国際公開番号　WO2010/033949
(87)国際公開日　平成22年3月25日 (2010.3.25)
(31)優先権主張番号　61/181,572
(32)優先日　平成21年5月27日 (2009.5.27)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/153,562
(32)優先日　平成21年2月18日 (2009.2.18)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　61/099,163
(32)優先日　平成20年9月22日 (2008.9.22)
(33)優先権主張国　米国 (US)

(71)出願人　391058060
ベイラー　カレッジ　オブ　メディスン
ＢＡＹＬＯＲ　ＣＯＬＬＥＧＥ　ＯＦ　ＭＥＤＩＣＩＮＥ
アメリカ合衆国，テキサス　７７０３０，ヒューストン，ワン　ベイラー　プラザ　（番地なし）
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＤ４０およびパターン認識受容体アダプターを誘発することによる免疫応答を生成するための方法および組成物

(57)【要約】
誘発性パターン認識受容体アダプターまたはアダプター断片およびＣＤ４０の活性を誘発することによって抗原提示細胞を活性化し、免疫応答を誘導するための方法が提供される。誘発性ＣＤ４０ペプチドおよび誘発性パターン認識受容体アダプターまたはアダプター断片を含むキメラタンパク質をコードする配列を含む核酸組成物もまた提供される。例示的な一実施形態において、上記方法は、抗原提示細胞に、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を形質導入するステップを含み、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドおよびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含む。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原提示細胞を活性化するための方法であって、前記方法は：
抗原提示細胞に、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＭｙＤ８８ペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチド、ＮＯＤ２ペプチド、ＲＩＧ－１ペプチド、およびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含む、ステップと
前記抗原提示細胞を、前記リガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガンドと接触させるステップと
を含み、それにより前記抗原提示細胞が活性化される、方法。
【請求項２】
抗原提示細胞を活性化するための方法であって、前記方法は：
抗原提示細胞に、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、および（ｉｉｉ）ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドを含む、ステップと
前記抗原提示細胞を、前記リガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガンドと接触させるステップと
を含み、それにより前記抗原提示細胞が活性化される、方法。
【請求項３】
前記キメラタンパク質は、細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域をさらに含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記ペプチドは、配列番号６、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、および配列番号１６からなる群より選択されるペプチド配列を有するか、または前記ペプチドは、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、および配列番号１５からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記切断型ＭｙＤ８８は、配列番号６のペプチド配列を有する、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記切断型ＭｙＤ８８ペプチドは、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
前記膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、および受容体膜貫通領域からなる群より選択される、請求項１から６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域である、請求項１から７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号２の細胞質領域のペプチド配列を有する、請求項１または３から８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号１における細胞質ポリペプチド領域をコードするポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項１または３から９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】

前記リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される、請求項１から１０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１２】

前記リガンド結合領域はＦｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む、請求項１から１１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１３】

前記リガンド結合領域はさらなるＦｖ’配列をさらに含む、請求項１２に記載の方法。

【請求項１４】

前記リガンドは小分子である、請求項１から１３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１５】

前記リガンドは二量体である、請求項１から１４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１６】

前記リガンドは二量体ＦＫ５０６または二量体ＦＫ５０６アナログである、請求項１５に記載の方法。

【請求項１７】

前記リガンドはＡＰ１９０３またはＡＰ２０１８７である、請求項１６に記載の方法。

【請求項１８】

前記核酸はウイルスベクター内に含有される、請求項１から１７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項１９】

前記ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである、請求項１８に記載の方法。

【請求項２０】

前記核酸はプラスミドベクター内に含有される、請求項１から１７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２１】

前記抗原提示細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて前記ベクターと接触させる、請求項１８から１９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２２】

前記抗原提示細胞を、抗原と接触させる、請求項１から２１のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２３】

前記抗原提示細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて前記抗原と接触させる、請求項２２に記載の方法。

【請求項２４】

前記抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて前記ベクターでトランスフェクトまたは形質導入され、そして被験体に投与される、請求項２１から２３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２５】

前記ベクターは、前記被験体に皮内投与または皮下投与によって投与される、請求項２４に記載の方法。

【請求項２６】

前記抗原提示細胞が、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて前記核酸で形質導入またはトランスフェクトされる、請求項１８から２０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２７】

前記抗原に対して免疫応答が生成される、請求項２４から２６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項２８】

前記免疫応答は細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答である、請求項２７に記載の

方法。
【請求項２９】
前記免疫応答は腫瘍抗原に対して生成される、請求項２７または２８に記載の方法。
【請求項３０】
前記抗原提示細胞は樹状細胞である、請求項１から２９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３１】
前記抗原提示細胞はヒト樹状細胞である、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
前記核酸は、前記ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、請求項１から３１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３３】
前記抗原提示細胞は、アジュバントを追加せずに活性化される、請求項１から３２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３４】
キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＭｙＤ８８ペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチド、ＮＯＤ２ペプチド、ＲＩＧ－１ペプチド、およびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含む、組成物。
【請求項３５】
キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、および（ｉｉｉ）ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドを含む、組成物。
【請求項３６】
前記キメラタンパク質は細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域をさらに含む、請求項３５に記載の組成物。
【請求項３７】
前記ペプチドは、配列番号６、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、および配列番号１６からなる群より選択されるペプチド配列を有するか、または前記ペプチドは、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、および配列番号１５からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３８】
前記切断型ＭｙＤ８８は配列番号６のペプチド配列を有する、請求項３４から３７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３９】
前記切断型ＭｙＤ８８ペプチドは、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項３４から３８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０】
前記膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、および受容体膜貫通領域からなる群より選択される、請求項３４から３９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４１】
前記膜ターゲティング領域はミリストイル化ターゲティング領域である、請求項３４から４０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４２】
前記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号２の細胞質領域のペプチド配列を有する、請求項３４または３６から４１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４３】
前記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号１における細胞質ポリペプチド領域をコードするポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項３４または３６から４

１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４４】
前記リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される、請求項３４から４３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４５】
前記リガンド結合領域はＦｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む、請求項３４から４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４６】
前記リガンド結合領域はさらなるＦｖ’配列をさらに含む、請求項４５に記載の組成物。
【請求項４７】
前記核酸はウイルスベクター内に含有される、請求項３４から４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４８】
前記ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである、請求項４７に記載の組成物。
【請求項４９】
前記核酸はプラスミドベクター内に含有される、請求項３４から４８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５０】
前記核酸は、前記ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、請求項３４から４９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５１】
請求項３４から５０のいずれか一項に記載の核酸が形質導入された細胞を含む組成物。
【請求項５２】
前記細胞は抗原提示細胞である、請求項５１に記載の組成物。
【請求項５３】
前記細胞は樹状細胞である、請求項５１に記載の組成物。
【請求項５４】
前記細胞はヒト樹状細胞である、請求項５３に記載の組成物。
【請求項５５】
免疫応答を増強することによって被験体の状態を治療するための方法であって、請求項３４から５４のいずれか一項に記載の組成物を前記被験体に投与するステップを含む方法。
【請求項５６】
前記状態は過剰増殖疾患である、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
前記状態は感染症である、請求項５５に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連する特許出願
優先権を、２００９年5月２７日に出願され、表題「Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｒａｔｉｎｇ ａｎ Ｉｍｍｕｎｅ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｂｙ Ｉｎｄｕｃｉｎｇ ＣＤ４０ ａｎｄ Ｐａｔｔｅｒｎ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ａｄａｐｔｅｒｓ」の米国仮出願第６１／１８１，５７２号、２００９年2月１８日に出願され、表題「Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｒａｔｉｎｇ ａｎ Ｉｍｍｕｎｅ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｂｙ Ｉｎｄｕｃｉｎｇ ＣＤ４０ ａｎｄ Ｐａｔｔｅｒｎ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ

Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ａｄａｐｔｅｒｓ」の米国仮出願第６１／１５３，５６２号、および２００８年9月２２日に出願され、表題「Ｍｅｔｈｏｄｓ ａｎｄ Ｃｏｍｐｏｓｉｔｉｏｎｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｒａｔｉｎｇ ａｎ Ｉｍｍｕｎｅ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ ｂｙ Ｉｎｄｕｃｉｎｇ ＣＤ４０ ａｎｄ Ｐａｔｔｅｒｎ Ｒｅｃｏｇｎｉｔｉｏｎ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ Ａｄａｐｔｅｒｓ」の米国仮出願第６１／０９９，１６３号（これらは、全てそれらの全体が参考として本明細書に引用され、そして援用される）に対して主張する。

【０００２】

発明の分野

本発明は、一般的に免疫学の分野、そして特に、抗原提示細胞を活性化する、および免疫応答を誘発するための方法および組成物に関する。

【０００３】

連邦政府によって後援された研究についての声明

本発明は、ＮＩＨ助成金第Ｒ０１－ＣＡ１２０４１１号の下、政府の支援を受けてなされた。政府は、本発明に一定の権利を有し得る。

【背景技術】

【０００４】

背景

抗原を処理し、かつ提示するそれらの特有の方法ならびに副刺激分子およびサイトカイン分子の高レベルの発現に対する潜在能力により、樹状細胞（ＤＣ）は、ナイーブＴ細胞を刺激し、かつ活性化するための、有効な抗原提示細胞（ＡＰＣ）となる（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ Ｊ、Ｐａｃｚｅｓｎｙ Ｓ、Ｂｌａｎｃｏ Ｐら Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ：ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｒｓ ｏｆ ｔｈｅ ｉｍｍｕｎｅ ｓｙｓｔｅｍ ａｎｄ ａ ｎｅｗ ｐｒｏｍｉｓｅ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．Ａｎｎ Ｎ Ｙ Ａｃａｄ Ｓｃｉ．２００３年；９８７巻：１８０～１８７頁）。この特性は、有望な結果を伴う、多くの臨床試験における予防接種のための細胞のプラットフォームとしてのそれらの広範囲の使用に至った（Ｏ’Ｎｅｉｌｌ ＤＷ、Ａｄａｍｓ Ｓ、Ｂｈａｒｄｗａｊ Ｎ．Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｂｉｏｌｏｇｙ ｆｏｒ ｔｈｅ ａｃｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ ｃａｎｃｅｒ．Ｂｌｏｏｄ．２００４年；１０４巻：２２３５～２２４６頁；Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ ＳＡ．Ａ ｎｅｗ ｅｒａ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｔｈｅ ｇｅｎｅｓ ｔｈａｔ ｅｎｃｏｄｅ ｃａｎｃｅｒ ａｎｔｉｇｅｎｓ．Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．１９９９年；１０巻：２８１～２８７頁）。しかしながら、癌患者におけるＤＣワクチンの臨床的有効性は、最適以下の活性化、流入領域リンパ節への限られた遊走、およびリンパ節環境における最適なＴ細胞活性化のための不十分な寿命を含む、おそらく多くの重大な欠失により、不満足なものであった。

【０００５】

ＤＣベースの癌ワクチンの最適化におけるパラメーターは、ＣＤ４＋、ＣＤ８＋Ｔ細胞、および調節性Ｔ（Ｔｒｅｇ）細胞などのような免疫エフェクター細胞とのＤＣの相互作用である。これらの相互作用では、ＤＣの成熟状態は、結果として生じるエフェクター機能を決定する重要な因子である（Ｓｔｅｉｎｍａｎ ＲＭ、Ｈａｗｉｇｅｒ Ｄ、Ｎｕｓｓｅｎｚｗｅｉｇ ＭＣ．Ｔｏｌｅｒｏｇｅｎｉｃ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ．Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００３年；２１巻：６８５～７１１頁）。Ｔｒｅｇ増殖を最小限にしながら、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞刺激を最大限にするために、ＤＣは、完全に成熟し、高レベルの副刺激分子（ＣＤ４０、ＣＤ８０、およびＣＤ８６のような）ならびにＩＬ－１２ｐ７０およびＩＬ－６のような炎症誘発性サイトカインを発現する必要がある。等しく重要なことに、ＤＣは、Ｔ細胞相互作用を開始するために予防接種の部位から流入領域リンパ節まで効率的に遊走することができなければならない（Ｖｉｅｗｅｇ Ｊ、Ｊａｃｋｓｏｎ Ａ．Ｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ａｎｔｉｔｕｍｏｒ ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ ｂｙ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ．Ｓｐｒｉ

nger Semin Immunopathol. ２００５年；２６巻：３２９～３４１頁）。

【０００６】

単球由来未成熟ＤＣのｅｘ ｖｉｖｏ成熟については、大多数のＤＣベースの治験は、ＴＮＦ－アルファ、ＩＬ－１ベータ、ＩＬ－６、およびＰＧＥ$_2$からなる、標準の成熟サイトカインカクテル（ＭＣ）を使用してきた。標準の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、ＣＣケモカイン受容体７（ＣＣＲ７）を、そのリガンド、ＣＣケモカインリガンド１９（ＣＣＬ１９）およびＣＣＬ２１に対して感作し、それにより流入領域リンパ節へのＤＣの遊走性能を増強することである（Ｓｃａｎｄｅｌｌａ Ｅ、Ｍｅｎ Ｙ、Ｇｉｌｌｅｓｓｅｎ Ｓ、Ｆｏｒｓｔｅｒ Ｒ、Ｇｒｏｅｔｔｒｕｐ Ｍ. Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ Ｅ２ ｉｓ ａ ｋｅｙ ｆａｃｔｏｒ ｆｏｒ ＣＣＲ７ ｓｕｒｆａｃｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ ｍｉｇｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｏｎｏｃｙｔｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ. Ｂｌｏｏｄ. ２００２年；１００巻：１３５４～１３６１頁；Ｌｕｆｔ Ｔ、Ｊｅｆｆｏｒｄ Ｍ、Ｌｕｅｔｊｅｎｓ Ｐら Ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌｌｙ ｄｉｓｔｉｎｃｔ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ （ＤＣ） ｐｏｐｕｌａｔｉｏｎｓ ｉｎｄｕｃｅｄ ｂｙ ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｉｃ ｓｔｉｍｕｌｉ： ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ Ｅ（２） ｒｅｇｕｌａｔｅｓ ｔｈｅ ｍｉｇｒａｔｏｒｙ ｃａｐａｃｉｔｙ ｏｆ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ＤＣ ｓｕｂｓｅｔｓ. Ｂｌｏｏｄ. ２００２年；１００巻：１３６２～１３７２頁）。しかしながら、ＰＧＥ２はまた、Ｔ細胞増殖の抑制（Ｇｏｏｄｗｉｎ ＪＳ、Ｂａｎｋｈｕｒｓｔ ＡＤ、Ｍｅｓｓｎｅｒ ＲＰ. Ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ Ｔ－ｃｅｌｌ ｍｉｔｏｇｅｎｅｓｉｓ ｂｙ ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ. Ｅｘｉｓｔｅｎｃｅ ｏｆ ａ ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ－ｐｒｏｄｕｃｉｎｇ ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｃｅｌｌ. Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ. １９７７年；１４６巻：１７１９～１７３４頁；Ｇｏｏｄｗｉｎ ＪＳ. Ｉｍｍｕｎｏｍｏｄｕｌａｔｉｏｎ ｂｙ ｅｉｃｏｓａｎｏｉｄｓ ａｎｄ ａｎｔｉ－ｉｎｆｌａｍｍａｔｏｒｙ ｄｒｕｇｓ. Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ. １９８９年；２巻：２６４～２６８頁）、炎症誘発性サイトカイン産生（例えばＩＬ－１２ｐ７０およびＴＮＦ－アルファ）の阻害（Ｋａｌｉｎｓｋｉ Ｐ、Ｖｉｅｉｒａ ＰＬ、Ｓｃｈｕｉｔｅｍａｋｅｒ ＪＨ、ｄｅ Ｊｏｎｇ ＥＣ、Ｋａｐｓｅｎｂｅｒｇ ＭＬ. Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ Ｅ（２） ｉｓ ａ ｓｅｌｅｃｔｉｖｅ ｉｎｄｕｃｅｒ ｏｆ ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ－１２ ｐ４０ （ＩＬ－１２ｐ４０） ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ ａｎ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｏｆ ｂｉｏａｃｔｉｖｅ ＩＬ－１２ｐ７０ ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒ. Ｂｌｏｏｄ. ２００１年；９７巻：３４６６～３４６９頁；ｖａｎ ｄｅｒ Ｐｏｕｗ Ｋｒａａｎ ＴＣ、Ｂｏｅｉｊｅ ＬＣ、Ｓｍｅｅｎｋ ＲＪ、Ｗｉｊｄｅｎｅｓ Ｊ、Ａａｒｄｅｎ ＬＡ. Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ－Ｅ２ ｉｓ ａ ｐｏｔｅｎｔ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ １２ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ. Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ. １９９５年；１８１巻：７７５～７７９頁））の阻害、ならびに主要組織適合複合体（ＭＨＣ）ＩＩ表面発現のダウンレギュレーション（Ｓｎｙｄｅｒ ＤＳ、Ｂｅｌｌｅｒ ＤＩ、Ｕｎａｎｕｅ ＥＲ. Ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎｓ ｍｏｄｕｌａｔｅ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ Ｉａ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ. Ｎａｔｕｒｅ. １９８２年；２９９巻：１６３～１６５頁）を含む、免疫応答の刺激に対する、潜在的に有害な多数の特性を有することが報告されてきた。そのため、遊走を促進しながら、ＰＧＥ２を回避することができる成熟プロトコールは、おそらく、ＤＣベースのワクチンの治療上の有効性を改善するであろう。

【０００７】

ＣＤ４０シグナル経路の標的一時的制御に基づくＤＣ活性化系は、リンパ組織内のＤＣの刺激誘発性（ｐｒｏ－ｓｔｉｍｕｌａｔｏｒｙ）状態を拡張するために開発されてきた。ＤＣの機能性は、ＣＤ４０シグナル伝達の大きさおよび期間の両方を増加させることによって改善された（非特許文献１）。これを達成するために、ＣＤ４０受容体は、ＣＤ４

０の細胞質ドメインが膜ターゲティング配列と共に合成リガンド結合ドメインに融合されるように再設計された。二量体化の化学的誘発物質（ＣＩＤ）と呼ばれる脂質透過性二量体化薬物ＡＰ２０１８７（ＡＰ）の投与（非特許文献２）は、マウスＤＣにおけるＣＤ４０依存的シグナル伝達カスケードのｉｎ　ｖｉｖｏ誘発に至った。この誘発戦略は、他の活性化様式を用いて達成されるもの以上に、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける、明示される抗原および腫瘍の両方に対する免疫原性を著しく増強した（非特許文献１）。マウスにおけるこのキメラリガンド誘発性ＣＤ４０（ｉＣＤ４０と命名される）の強い効力は、この方法が、ヒトＤＣワクチンの効力を同様に増強するかもしれないことを示唆した。

【０００８】

Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）シグナル伝達がその例であるパターン認識受容体（ＰＲＲ）シグナル伝達もまた、ＤＣの成熟および活性化の誘発における重大な役割を果たし、ヒトＤＣは、多数の別のＴＬＲを発現する（非特許文献３）。１１種の哺乳動物ＴＬＲは、様々な病原体由来巨大分子に応答し、適応免疫の開始と共に自然免疫応答の活性化に寄与する。リポ多糖（ＬＰＳ）および臨床的に関係のある誘導体、モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）は、細胞表面ＴＬＲ－４複合体に結合し（非特許文献３）、マイトジェン活性化プロテインキナーゼ（ＭＡＰＫ）ｐ３８およびｃ－Ｊｕｎキナーゼ（ＪＮＫ）と共にＮＦ－カッパＢおよびＩＲＦ３などのような転写因子の誘発に結果的になる様々なシグナル経路に至る（非特許文献４；非特許文献５）。このプロセスの間に、ＤＣは、成熟し、ＩＬ－６、ＩＬ－１２、およびＩ型インターフェロンのような炎症誘発性サイトカインを部分的にアップレギュレートする（非特許文献６）。ＬＰＳ誘発成熟は、ＤＣがｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏにおいて抗原特異的Ｔ細胞応答を刺激する能力を増強することが示されてきた（非特許文献７）。ＣＤ４０ペプチドをコードする核酸を細胞に形質導入するステップを含む、抗原提示細胞を活性化するための方法は、特許文献１において記載されており、誘発性ＣＤ４０ペプチドおよびパターン認識受容体または経路における他の下流タンパク質を含むキメラタンパク質をコードする核酸を細胞にトランスフェクトするステップを含む、抗原提示細胞を活性化するための方法は、本明細書において参照によってこれによって組み込まれる、特許文献２として公開されている、２００７年１０月１９日に提出された国際特許出願第ＰＣＴ／ＵＳ２００７／０８１９６３号において記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００９】

【特許文献１】米国特許第７，４０４，９５０号明細書

【特許文献２】国際公開第２００８／０４９１１３号

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】Ｈａｎｋｓ　ＢＡ、Ｊｉａｎｇ　Ｊ、Ｓｉｎｇｈ　ＲＡら　Ｒｅ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ　ＣＤ４０　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｅｎａｂｌｅｓ　ｐｏｔｅｎｔ　ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ－ｃｅｌｌ　ｃａｎｃｅｒ　ｖａｃｃｉｎｅｓ　ｉｎ　ｖｉｖｏ．　Ｎａｔ　Ｍｅｄ．　２００５年；１１巻：１３０～１３７頁

【非特許文献２】Ｓｐｅｎｃｅｒ　ＤＭ、Ｗａｎｄｌｅｓｓ　ＴＪ、Ｓｃｈｒｅｉｂｅｒ　ＳＬ、Ｃｒａｂｔｒｅｅ　ＧＲ．　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｉｎｇ　ｓｉｇｎａｌ　ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｌｉｇａｎｄｓ．　Ｓｃｉｅｎｃｅ．　１９９３年；２６２巻：１０１９～１０２４頁

【非特許文献３】Ｋａｄｏｗａｋｉ　Ｎ、Ｈｏ　Ｓ、Ａｎｔｏｎｅｎｋｏ　Ｓら　Ｓｕｂｓｅｔｓ　ｏｆ　ｈｕｍａｎ　ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌ　ｐｒｅｃｕｒｓｏｒｓ　ｅｘｐｒｅｓｓ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ　ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ　ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ　ａｎｄ　ｒｅｓｐｏｎｄ　ｔｏ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ　ｍｉｃｒｏｂｉａｌ　ａｎｔｉｇｅｎｓ．　Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ．　２００１年；１９４巻：８６３～８６９頁

【非特許文献４】Ａｒｄｅｓｈｎａ ＫＭ、Ｐｉｚｚｅｙ ＡＲ、Ｄｅｖｅｒｅｕｘ Ｓ、Ｋｈｗａｊａ Ａ. Ｔｈｅ ＰＩ３ ｋｉｎａｓｅ, ｐ３８ ＳＡＰ ｋｉｎａｓｅ, ａｎｄ ＮＦ－ｋａｐｐａＢ ｓｉｇｎａｌ ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ ｐａｔｈｗａｙｓ ａｒｅ ｉｎｖｏｌｖｅｄ ｉｎ ｔｈｅ ｓｕｒｖｉｖａｌ ａｎｄ ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｌｉｐｏｐｏｌｙｓａｃｃｈａｒｉｄｅ－ｓｔｉｍｕｌａｔｅｄ ｈｕｍａｎ ｍｏｎｏｃｙｔｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ. Ｂｌｏｏｄ. ２０００年；９６巻：１０３９～１０４６頁
【非特許文献５】Ｉｓｍａｉｌｉ Ｊ、Ｒｅｎｎｅｓｓｏｎ Ｊ、Ａｋｓｏｙ Ｅら Ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌ ｌｉｐｉｄ Ａ ａｃｔｉｖａｔｅｓ ｂｏｔｈ ｈｕｍａｎ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｔ ｃｅｌｌｓ. Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ. ２００２年；１６８巻：９２６～９３２頁
【非特許文献６】Ｒｅｓｃｉｇｎｏ Ｍ、Ｍａｒｔｉｎｏ Ｍ、Ｓｕｔｈｅｒｌａｎｄ ＣＬ、Ｇｏｌｄ ＭＲ、Ｒｉｃｃｉａｒｄｉ－Ｃａｓｔａｇｎｏｌｉ Ｐ. Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｓｕｒｖｉｖａｌ ａｎｄ ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ ａｒｅ ｒｅｇｕｌａｔｅｄ ｂｙ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ｐａｔｈｗａｙｓ. Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ. １９９８年；１８８巻：２１７５～２１８０頁
【非特許文献７】Ｌａｐｏｉｎｔｅ Ｒ、Ｔｏｓｏ ＪＦ、Ｂｕｔｔｓ Ｃ、Ｙｏｕｎｇ ＨＡ、Ｈｗｕ Ｐ. Ｈｕｍａｎ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ｒｅｑｕｉｒｅ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｓｉｇｎａｌｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｕｍｏｒ ａｎｔｉｇｅｎ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｔ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ. Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ. ２０００年；３０巻：３２９１～３２９８頁

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１１】
誘発性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）アダプター連結と組み合わせることにより、ヒトＤＣの持続性で強い活性化が引き起こされることが実証されてきた。これらの特徴は、例えば、進行ホルモン不応性前立腺癌のような癌を治療するための癌免疫療法の基礎を形成する。したがって、誘発ＣＤ４０および誘発性ＰＲＲアダプターの組合せは、抗原提示細胞を相乗的に活性化し、抗原に対する免疫応答を誘発することが発見された。誘発性ＰＲＲアダプターは、例えば、ＭｙＤ８８およびＴＲＩＦを含み、例えばＮＯＤ様受容体、例えばＮＯＤ１またはＮＯＤ２およびＲＩＧ様ヘリカーゼ、例えばＲＩＧ－ＩまたはＭｄａ－５などのような誘発性パターン認識受容体もまた、誘発性ＣＤ４０と組み合わせて使用されてもよい。抗原提示細胞を活性化するための方法であって、抗原提示細胞に、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を形質導入するステップであって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドおよびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含むステップならびに前記抗原提示細胞を、前記リガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガンドと接触させるステップを含み、それにより前記抗原提示細胞は活性化される方法が本明細書において提供される。
【００１２】
したがって、本明細書において、抗原提示細胞を活性化するための方法であって、抗原提示細胞に、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、前記キメラタンパク質は、膜ターゲティング領域、リガンド結合領域、細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびにＭｙＤ８８ペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチド、ＮＯＤ２ペプチド、ＲＩＧ－１ペプチド、およびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含むステップならびに前記抗原提示細胞を、前記リガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガン

ドと接触させるステップを含み、それにより前記抗原提示細胞は活性化される方法が提供される。方法および組成物の細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域は、例えば、配列番号２の細胞質領域のペプチド配列を有していてもよく、例えば、配列番号１における細胞質ポリペプチド領域をコードするポリヌクレオチド配列によってコードされてもよい。

【００１３】

抗原提示細胞を活性化するための方法であって、抗原提示細胞に、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、前記キメラタンパク質は、膜ターゲティング領域、リガンド結合領域、およびＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドを含むステップならびに前記抗原提示細胞を、前記リガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガンドと接触させるステップを含み、それにより前記抗原提示細胞は活性化される方法もまた提供される。キメラタンパク質は、ＣＤ４０ポリペプチド領域をさらに含んでいてもよい。

【００１４】

キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、膜ターゲティング領域、リガンド結合領域、細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびにＭｙＤ８８ペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチド、ＮＯＤ２ペプチド、ＲＩＧ－１ペプチド、およびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含む組成物がさらに提供される。

【００１５】

抗原提示細胞は、活性化抗原提示細胞と関連する１つまたは複数の活性が、当業者によって観察および／または測定される可能性がある場合、「活性化されている」。例えば、抗原提示細胞は、本明細書において提示される発現ベクターとの接触後に、活性化と関連する活性が、発現ベクターと接触させていない、またはネガティブ対照ベクターと接触させた抗原提示細胞と比較して、発現ベクター接触細胞において測定され得る場合、活性化されている。一実施例では、増加した活性は、非接触細胞またはネガティブ対照と接触させた細胞の２、３、４、５、６、７、８、９、または１０倍以上のレベルであってもよい。例えば、以下の活性のうちの１つは、発現ベクターと接触させた抗原提示細胞において増強されてもよい：抗原提示細胞上の副刺激分子発現、抗原提示細胞におけるＮＦ－カッパＢの核転座、例えばｔｏｌｌ様受容体発現もしくはＣＣＲ７発現などのようなＤＣ成熟マーカー発現、例えば腫瘍細胞に対して向けられる特異的な溶解活性などのような特異的な細胞傷害性Ｔリンパ球応答、またはサイトカイン（例えばＩＬ－２）もしくはケモカイン発現。抗原提示細胞の活性化をアッセイするための方法は、本明細書において、例えば実施例１１～１７において提示される。

【００１６】

免疫応答を「増強する」、抗原提示細胞を活性化する組成物の量は、組成物を追加せずに測定される同じ免疫応答と比較して、組成物の追加により、多少なりとも大きい、または強化された、または並外れた免疫応答が観察される量を指す。例えば、細胞傷害性Ｔ細胞の溶解活性は、例えば、組成物を伴うおよびそれを伴わない^{51}Ｃｒ放出アッセイを使用して測定することができる。組成物を伴わないＣＴＬ溶解活性と比較して、ＣＴＬ溶解活性が増強される、物質の量は、抗原に対する動物の免疫応答を増強するのに十分な量であると表現される。例えば、免疫応答は、少なくとも約２の因子によってまたは例えば約３以上の因子によって増強されてもよい。分泌されるサイトカインの量もまた、変化してもよい。

【００１７】

増強される免疫応答は、能動免疫応答または受動免疫応答であってもよい。その代わりに、応答は、抗原提示細胞が被験体（例えば患者）から得られ、次いで、本明細書において提示される発現ベクターまたは構築物を含む組成物を形質導入されるまたはトランスフェクトされる、適応免疫療法アプローチの一部であってもよい。抗原提示細胞は、例えば被験体の血液または被験体の骨髄から得られてもよい。次いで、抗原提示細胞は、同じもしくは異なる動物または同じもしくは異なる被験体（例えば同じもしくは異なるドナー）

に投与されてもよい。ある実施形態では、被験体（例えば患者）は、例えば前立腺癌などのような癌を有するもしくはそれを有する疑いがあるまたは感染症を有するもしくはそれを有する疑いがある。他の実施形態では、免疫応答を増強するための方法は、公知の癌療法または感染症を治療するための任意の公知の療法と共に実施される。

【００１８】

提供される方法のステップは、当業者に公知で、当業者によって選択される任意の適した方法を使用して実行されてもよく、これらの方法は、限定を伴うことなく、本明細書において提示される抗原提示細胞に核酸を形質導入する、形質転換する、または他の場合には提供するための方法を含む。いくつかの実施形態では、切断型ＭｙＤ８８ペプチドは、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる（ＤＮＡリンカーを有するまたは有していない）。他の実施形態では、ペプチドは、ＴＲＩＦペプチドである。多くの場合、ペプチドは、配列番号９のヌクレオチド配列によってコードされる（ＤＮＡリンカーを有するまたは有していない）。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号１におけるポリヌクレオチド配列によってコードされる。方法または組成物のいくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号６、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、および配列番号１６からなる群より選択されるペプチド配列を有するまたはペプチドは、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、および配列番号１５からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる。ある実施形態では、切断型ＭｙＤ８８は、配列番号６のペプチド配列を有し、例えば、配列番号５のヌクレオチド（ｎｕｃｌｄｏｔｉｄｅ）配列によってコードされてもよい。多くの場合、核酸は、ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む。一般に、用語「作動可能に連結される」は、プロモーター配列が第２の配列に機能的に連結されることを示すことを意味し、プロモーター配列は、第２の配列に対応するＤＮＡの転写を開始し、媒介する。

【００１９】

当業者らは、限定を伴うことなく、本明細書において議論されるプロモーター配列を含む適切なプロモーター配列を選択してもよい。

【００２０】

当業者らは、限定を伴うことなく、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、または受容体膜貫通領域を含む、任意の適切な公知の膜ターゲティング領域を選択してもよい。多くの場合、膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域である。

【００２１】

ある実施形態では、リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される。多くの場合、リガンド結合領域は、Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む。時に、Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列は、さらなるＦｖ’配列をさらに含む。

【００２２】

いくつかの実施形態では、リガンドは、小分子である。当業者らは、選択されるリガンド結合領域に対する適切なリガンドを選択してもよい。多くの場合、リガンドは、二量体であり、時に、リガンドは、二量体ＦＫ５０６または二量体ＦＫ５０６アナログである。ある実施形態では、リガンドは、ＡＰ１９０３である。ある実施形態では、リガンドは、ＡＰ２０１８７である。

【００２３】

いくつかの実施形態では、核酸は、ウイルスベクター内に含有される。当業者らは、適切なウイルスベクターを選択してもよい。ある実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ウイルスベクターとｅｘ　ｖｉｖｏにおいて接触させ、いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ウイルスベクターとｉｎ　ｖｉｖｏにおいて接触させることが理解される。

【００２４】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、樹状細胞、例えば哺乳動物樹状細胞である。多くの場合、抗原提示細胞は、ヒト樹状細胞である。

【００２５】

ある実施形態では、抗原提示細胞はまた、抗原と接触させる。多くの場合、抗原提示細胞は、抗原とｅｘ　ｖｉｖｏにおいて接触させる。時に、抗原提示細胞は、抗原とｉｎ　ｖｉｖｏにおいて接触させる。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、被験体中にあり、免疫応答は、抗原に対して生成される。時に、免疫応答は、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答である。時に、免疫応答は、腫瘍抗原に対して生成される。ある実施形態では、抗原提示細胞は、アジュバントを追加せずに活性化される。

【００２６】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入され、皮内投与によって被験体に投与される。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入され、皮下投与によって被験体に投与される。時に、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入される。時に、抗原提示細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入される。

【００２７】

抗原に対する細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答を誘発するための方法であって、抗原を用いて感作されたヒト抗原提示細胞を、（ａ）本来のＣＤ４０に結合し、その多量体を形成する２つ以上の領域を有する多量体分子および（ｂ）誘発性ＰＲＲアダプター、例えばＭｙＤ８８、切断型ＭｙＤ８８、またはＴＲＩＦと接触させるステップを含み、それによりＣＴＬ免疫応答は、抗原に対して誘発される方法もまた提供される。ＭｙＤ８８によって、骨髄分化一次応答遺伝子８８、例えば、これに限定されないが、ｎｃｂｉ遺伝子ＩＤ４６１５として引用されるヒトバージョンが意味される。ＴＲＩＦによって、ＴＩＲドメイン含有アダプター誘発インターフェロン－ベータが意味される。「切断型」によって、タンパク質が完全長でなく、例えば、ドメインを欠いていてもよいことが意味される。例えば、切断型ＭｙＤ８８は、完全長でなく、例えば、ＴＩＲドメインが欠けていてもよい。切断型ＭｙＤ８８の例は、本明細書においてＭｙＤ８８Ｌとして示され、また配列番号５（核酸配列）および６（ペプチド配列）としても提示される。配列番号５は、サブクローニングの間に追加されたリンカーを含む。当業者らは、「切断型ＭｙＤ８８」をコードする核酸配列によって、切断型ＭｙＤ８８ペプチドをコードする核酸配列が意味され、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む、クローニングの人工産物として追加される、任意のアミノ酸をコードする部分を含む核酸配列を指してもよいことを認識する。そのような方法では、多量体分子は、ＣＤ４０の細胞外ドメイン中のエピトープに結合する抗体とすることができる（例えばヒト化抗ＣＤ４０抗体；Ｔａｉら、Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　６４巻、２８４６～２８５２頁（２００４年））、ＣＤ４０リガンドとすることができる（例えば米国特許第６，４９７，８７６号（Ｍａｒａｓｋｏｖｓｋｙら））、または他の副刺激分子（例えばＢ７／ＣＤ２８）であってもよい。本明細書においてアッセイされるように、機能に影響を与えない、配列における保存的変異は、本発明の請求項の範囲内にあることが当業者らによって理解される。

【００２８】

本明細書において、キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドおよびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含む組成物もまた提供される。いくつかの実施形態では、切断型ＭｙＤ８８ペプチドは、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる。他の実施形態では、ペプチドは、ＴＲＩＦペプチドである。多くの場合、ペプチドは、配列番号９のヌクレオチド配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号１におけるポリヌクレオチド配列によってコードされる。多くの場合、核酸は、ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む。

当業者らは、限定を伴うことなく、本明細書において議論されるプロモーター配列を含む適切なプロモーター配列を選択してもよい。

【００２９】

当業者らは、限定を伴うことなく、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、または受容体膜貫通領域を含む、任意の適切な公知の膜ターゲティング領域を選択してもよい。多くの場合、膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域である。

【００３０】

ある実施形態では、リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される。多くの場合、リガンド結合領域は、Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む。時に、Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列は、さらなるＦｖ’配列をさらに含む。

【００３１】

いくつかの実施形態では、核酸は、ウイルスベクター内に含有される。当業者らは、適切なウイルスベクターを選択してもよい。ある実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ウイルスベクターとｅｘ　ｖｉｖｏにおいて接触させ、いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ウイルスベクターとｉｎ　ｖｉｖｏにおいて接触させることが理解される。

【００３２】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞を活性化するための方法であって、抗原提示細胞に、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を形質導入するステップであって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、ならびに（ｉｉｉ）ＭｙＤ８８ペプチドまたはＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドを含むステップならびに前記抗原提示細胞を、前記リガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガンドと接触させるステップを含み、それにより前記抗原提示細胞は活性化される方法が提供される。多くの場合、ＭｙＤ８８ペプチドは、切断型であり、限定を伴うことなく、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる切断型ＭｙＤ８８ペプチドを含む。提供される方法のステップは、当業者に公知で、当業者によって選択される任意の適した方法を使用して実行されてもよく、これらの方法は、限定を伴うことなく、本明細書において提示される抗原提示細胞に核酸を形質導入する、形質転換する、または他の場合には提供するための方法を含む。多くの場合、核酸は、ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む。当業者らは、限定を伴うことなく、本明細書において議論されるプロモーター配列を含む適切なプロモーター配列を選択してもよい。

【００３３】

当業者らは、限定を伴うことなく、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、または受容体膜貫通領域を含む、任意の適切な公知の膜ターゲティング領域を選択してもよい。多くの場合、膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域である。

【００３４】

ある実施形態では、リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される。多くの場合、リガンド結合領域は、Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む。時に、Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列は、さらなるＦｖ’配列をさらに含む。

【００３５】

いくつかの実施形態では、リガンドは、小分子である。当業者らは、選択されるリガンド結合領域に対する適切なリガンドを選択してもよい。多くの場合、リガンドは、二量体であり、時に、リガンドは、二量体ＦＫ５０６または二量体ＦＫ５０６アナログである。

ある実施形態では、リガンドは、ＡＰ１９０３である。ある実施形態では、リガンドは、ＡＰ２０１８７である。

【００３６】

いくつかの実施形態では、核酸は、ウイルスベクター内に含有される。当業者らは、適切なウイルスベクターを選択してもよい。ある実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ウイルスベクターとｅｘ　ｖｉｖｏにおいて接触させ、いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ウイルスベクターとｉｎ　ｖｉｖｏにおいて接触させることが理解される。

【００３７】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、樹状細胞、例えば哺乳動物樹状細胞である。多くの場合、抗原提示細胞は、ヒト樹状細胞である。

【００３８】

ある実施形態では、抗原提示細胞はまた、抗原と接触させる。多くの場合、抗原提示細胞は、抗原とｅｘ　ｖｉｖｏにおいて接触させる。時に、抗原提示細胞は、抗原とｉｎ　ｖｉｖｏにおいて接触させる。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、被験体中にあり、免疫応答は、抗原に対して生成される。時に、免疫応答は、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答である。時に、免疫応答は、腫瘍抗原に対して生成される。ある実施形態では、抗原提示細胞は、アジュバントを追加せずに活性化される。

【００３９】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入され、皮内投与によって被験体に投与される。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入され、皮下投与によって被験体に投与される。時に、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入される。時に、抗原提示細胞は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入される。

【００４０】

例えば、本発明の方法において使用されてもよい組成物もまた、本明細書において提供される。したがって、キメラタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＭｙＤ８８ペプチドまたはＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドを含む組成物が提供される。いくつかの実施形態では、ＭｙＤ８８ペプチドは、切断型である。時に、切断型ＭｙＤ８８ペプチドは、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる。多くの場合、核酸は、ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む。当業者らは、限定を伴うことなく、本明細書において議論されるプロモーター配列を含む適切なプロモーター配列を選択してもよい。

【００４１】

当業者らは、限定を伴うことなく、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、または受容体膜貫通領域を含む、任意の適切な公知の膜ターゲティング領域を選択してもよい。多くの場合、膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域である。

【００４２】

ある実施形態では、リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される。多くの場合、リガンド結合領域は、Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む。時に、Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列は、さらなるＦｖ’配列をさらに含む。

【００４３】

いくつかの実施形態では、核酸は、ウイルスベクター内に含有される。当業者らは、適切なウイルスベクターを選択してもよい。ある実施形態では、ウイルスベクターは、アデノウイルスベクターである。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ウイルスベクタ

ーとｅｘ　ｖｉｖｏにおいて接触させ、いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ウイルスベクターとｉｎ　ｖｉｖｏにおいて接触させることが理解される。

【００４４】

本明細書において提示される実施形態のいずれかの核酸組成物を形質導入された細胞を含む組成物もまた、提供される。いくつかの実施形態では、細胞は、抗原提示細胞である。多くの場合、細胞は、限定を伴うことなく、哺乳動物細胞、例えば、限定を伴うことなく、ヒト樹状細胞を含む樹状細胞である。

【００４５】

免疫応答を活性化することによる、状態の療法のための医薬の製造におけるキメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＭｙＤ８８ペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチド、ＮＯＤ２ペプチド、ＲＩＧ－１ペプチド、およびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含む組成物の使用もまた、本明細書において提供される。他の実施形態では、免疫応答を活性化することによる、状態の療法のための医薬の製造における、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を形質導入されたまたはトランスフェクトされた細胞を含む組成物の使用であって、キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＭｙＤ８８ペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチド、ＮＯＤ２ペプチド、ＲＩＧ－１ペプチド、およびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含む、使用。組成物は、例えば、抗原提示細胞をトランスフェクトまたは形質導入するために使用されてもよい。ペプチドは、例えば、切断型ＭｙＤ８８ペプチドであってもよい。状態は、例えば、過剰増殖疾患または例えば感染症であってもよい。

【００４６】

本明細書において提示される免疫応答を誘発するための方法において、抗原提示細胞は、キメラタンパク質をコードする核酸をｅｘ　ｖｉｖｏにおいてまたはｉｎ　ｖｉｖｏにおいて形質導入することができる。抗原提示細胞は、抗原提示細胞を多量体リガンドと接触させるのと同時に、抗原に対して感作されてもよいまたは抗原提示細胞は、抗原提示細胞を多量体化リガンドと接触させる前に、抗原に対してあらかじめ感作することができる。いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて抗原と接触させる。ある実施形態では、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入され、皮内投与によって被験体に投与される。時に、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて核酸が形質導入され、皮下投与によって被験体に投与される。抗原は、腫瘍抗原であってもよく、ＣＴＬ免疫応答は、流入領域リンパ節への抗原提示細胞の遊走によって誘発することができる。

【００４７】

本明細書における方法では、ペプチドの誘発性ＣＤ４０部分は、誘発性ＰＲＲアダプタータンパク質部分の上流または下流に位置してもよい。また、誘発性ＣＤ４０部分および誘発性ＰＲＲアダプタータンパク質部分は、シスで同じベクター上でまたはトランスで別個のベクター上で細胞の中にトランスフェクトされてもよいまたは形質導入されてもよい。

【００４８】

リンパ節への抗原提示細胞の遊走を評価するための方法であって、（ａ）検出可能なタンパク質を産生する抗原提示細胞を被験体に注射するステップおよび（ｂ）動物のリンパ節における検出可能なタンパク質の量を決定するステップを含み、それによりリンパ節への抗原提示細胞の遊走は、リンパ節における検出可能なタンパク質の量から評価される方法もまた本明細書において提供される。そのような方法では、動物は、ラットまたはマウス（例えば照射マウス）などのようなげっ歯動物とすることができる。いくつかの実施形態では、検出可能なタンパク質は、コメツキムシ（ｃｈｉｃｋ）（例えばＰｙｒｏｐｈｏ

ｒｕｓ ｐｌａｇｉｏｐｈａｌａｍｕｓ）赤方偏移ルシフェラーゼタンパク質などのようなルシフェラーゼタンパク質である。ある実施形態では、抗原提示細胞は、検出可能なタンパク質をコードするポリヌクレオチド配列を有する核酸を用いて形質導入されている。ある実施形態では、リンパ節は、膝窩リンパ節または鼠径リンパ節である。抗原提示細胞は、ヒト樹状細胞などのような樹状細胞とすることができる。ある実施形態では、リンパ節は、検出可能なタンパク質の量が決定される前に動物から摘出され、時に、Ｄ－ルシフェリンは、摘出されたリンパ節に投与される。検出可能なタンパク質の量は、定質的なものであってもよい（例えば異なる試料にわたって比較される相対量）または定量的なものとすることができる（例えば濃度）。検出可能なタンパク質の量は、タンパク質を直接、検出することによって決定されてもよい。例えば、タンパク質は、蛍光であってもよい（例えば緑色蛍光タンパク質または赤方偏移もしくは青方偏移バージョン）または蛍光標識（例えば、蛍光体に連結された抗体）に結合することができる。その代わりに、検出可能なタンパク質の量は、タンパク質によって検出可能な産物に変換される基質を動物に投与し、検出可能な産物を検出することによって、間接的に決定することができる。例えば、ルシフェラーゼタンパク質の量は、Ｄ－ルシフェリンを動物に投与し、抗原提示細胞において産生されるルシフェラーゼによって生成されるＤ－ルシフェリン産物を検出することによって決定することができる。

【００４９】

ある実施形態では、以下で記載される領域などのような他のタイプの膜貫通標的領域から膜ターゲティング領域を選択することができるが、膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域である。いくつかの実施形態では、リガンドは、小分子であり、時に、分子は、二量体である。二量体分子の例は、二量体ＦＫ５０６および二量体ＦＫ５０６アナログである。ある実施形態では、リガンドは、ＡＰ１９０３またはＡＰ２０１８７である。いくつかの実施形態では、キメラタンパク質は、例えば、２つまたは３つのリガンド結合領域などのような、１つまたは複数のリガンド結合領域を含む。リガンド結合領域は、多くの場合、直列型である。

【００５０】

ある実施形態における核酸は、例えばアデノウイルスベクターなどのようなウイルスベクター内に含有される。いくつかの実施形態における抗原提示細胞は、時にｅｘ ｖｉｖｏにおいて抗原と接触させる。ある実施形態では、抗原提示細胞は、被験体中にあり、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答などのような免疫応答は、抗原に対して生成される。ある実施形態では、免疫応答は、腫瘍抗原（例えばＰＳＭＡ）に対して生成される。いくつかの実施形態では、核酸は、ｅｘ ｖｉｖｏにおいて調製され、例えば、皮内投与または皮下投与によって被験体に投与される。時に、抗原提示細胞は、ｅｘ ｖｉｖｏにおいてまたはｉｎ ｖｉｖｏにおいて核酸を形質導入またはトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、核酸は、ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む。その代わりに、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転写ＲＮＡを含む。

【図面の簡単な説明】

【００５１】

【図１】図１は、ｉＣＤ４０およびヒトＤＣにおける発現の概略図である。Ａは、ヒトＣＤ４０細胞質ドメインが、ミリストイル化ターゲティングドメイン（Ｍ）および２つのタンデムドメイン（Ｆｖ）の下流にサブクローニングできることを示す図である（Ｃｌａｃｋｓｏｎ Ｔ、Ｙａｎｇ Ｗ、Ｒｏｚａｍｕｓ ＬＷら、Ｒｅｄｅｓｉｇｎｉｎｇ ａｎ ＦＫＢＰ－ｌｉｇａｎｄ ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ｔｏ ｇｅｎｅｒａｔｅ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｄｉｍｅｒｉｚｅｒｓ ｗｉｔｈ ｎｏｖｅｌ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１９９８年；９５巻：１０４３７～１０４４２頁）。本明細書において誘導性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）プロモーターの調節下であり得る。Ｂは、ウェスタンブロットにより評価した、ＣＤ４０の内因

性型（ｅＣＤ４０）および組換え誘導型（ｉＣＤ４０）の発現を示す図である。レーン１：野生型ＤＣ（内因性ＣＤ４０対照）、レーン２：１マイクログラム／ｍｌのＬＰＳを用いて刺激したＤＣ、レーン３および４：それぞれ、１０，０００ＶＰ／細胞（ＭＯＩ約１６０）のＡｄ５／ｆ３５－ｉＣＤ４０（ｉＣＤ４０－ＤＣ）を形質導入し、ＡＰ２０１８７二量体化薬物を用いたＤＣおよびＡＰ２０１８７二量体化薬物を用いなかったＤＣ、レーン５：ＬＰＳおよびＡＰ２０１８７を用いて刺激したｉＣＤ４０－ＤＣ、レーン６：ＣＤ４０Ｌ（ＣＤ４０リガンド、ＴＮＦファミリーメンバーのタンパク質）およびＬＰＳを用いて刺激したＤＣ、レーン７：Ａｄ５／ｆ３５－ＧＦＰ（ＧＦＰ－ＤＣ）をＭＯＩ１６０で形質導入し、ＡＰ２０１８７およびＬＰＳを用いて刺激したＤＣ、レーン８：ＡＰ２０１８７を用いて刺激したＧＦＰ－ＤＣ、レーン９：Ａｄ５／ｆ３５－ｉＣＤ４０を形質導入した２９３Ｔ細胞（ＣＤ４０の誘導型に対する陽性対照）。アルファチューブリンの発現レベルを内部対照とした。

【図２】図２は、ｉＣＤ４０の概略図である。脂質透過性二量体化薬物であるＡＰ２０１８７／ＡＰ１９０３[1]の投与は、ＡＰ２０１８７結合性ドメインおよびミリストイル化ターゲティング配列を含有するように改変された、ＣＤ４０の細胞質ドメインのオリゴマー化をもたらす。

【図３】図３は、ＣＩＤ誘導性ＴＬＲの概略図である。

【図４】図４は、ＣＩＤ誘導性複合Ｔｏｌｌ様受容体（ｉｃＴＬＲ）の概略図である。

【図５】図５は、ＣＤ誘導性複合ＴＬＲ（ｉｃＴＬＲ）／ＣＤ４０の概略図である。

【図６】図６は、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）、それらのアダプター、それらに結合しているタンパク質キナーゼおよび下流のシグナル伝達効果の間の主な関係を示す図である。Ｎａｔｕｒｅ　４３０巻、２５７～２６３頁（２００４年７月８日）。

【図７】図７は、２９３細胞中のｉＮｏｄ２およびｉＣＤ４０の図である。２９３細胞に、（６ウェルプレートの）１００万細胞／ウェルの割合で、３マイクログラムのキメラｉＮｏｄ－２のための発現プラスミド、および１マイクログラムのＮＦカッパＢ依存性ＳＥＡＰレポータープラスミド（図においてＲとして示した）を、一過性に共トランスフェクトした。ｉＣＤ４０は、陽性対照として使用した。

【図８】図８は、ＲＡＷ２６４．７細胞中のｉＲＩＧ－１およびｉＭｙＤ８８の図である。ＲＡＷ２６４．７細胞に、３マイクログラムのｉＲＩＧ－１のための発現プラスミドおよび１マイクログラムのＩＦＮガンマ依存性ＳＥＡＰレポータープラスミド；ならびに３マイクログラムのｉＭｙＤ８８および１マイクログラムのＮＦ－カッパＢ依存性ＳＥＡＰレポータープラスミドを一緒に、一過性に共トランスフェクトした。

【図９】図９は、パターン認識受容体の概略図である。

【図１０Ａ】図１０Ａは、例であるｉＰＲＲプラスミドの概略図である。

【図１０Ｂ】図１０Ｂは、例であるｉＰＲＲプラスミドの概略図である。

【図１０Ｃ】図１０Ｃは、例であるｉＰＲＲプラスミドの概略図である。

【図１１】図１１は、ｉＲＩＧ、ｉＮＯＤ２およびｉＣＤ４０をトランスフェクトした２９３細胞におけるＮＦカッパＢ　ＳＥＡＰレポーターの誘導のグラフである。

【図１２】図１２は、ｉＲＩＧ－ＩおよびｉＣＤ４０をトランスフェクトした２９３細胞におけるＮＦカッパＢ　ＳＥＡＰレポーターの誘導のグラフである。

【図１３】図１３は、ｉＲＩＧ、ｉＣＤ４０およびｉＲＩＧ＋ＣＤ４０をトランスフェクトした２９３細胞におけるＮＦカッパＢ　ＳＥＡＰレポーターの誘導のグラフである。

【図１４】図１４は、ｉＲＩＧ－ＩおよびｉＣＤ４０をトランスフェクトしたＪｕｒｋａｔ　Ｔａｇ細胞におけるＮＦカッパＢ　ＳＥＡＰレポーターの誘導のグラフである。

【図１５】図１５Ａおよび１５Ｂは、それぞれ、ｐＳＨ１－Ｓｎ－ＲＩＧＩ－Ｆｖ’－Ｆｖｌｓ－ＥおよびｐＳＨ１－Ｓｎ－Ｆｖ’－Ｆｖｌｓ－ＲＩＧＩ－Ｅに関するプラスミドマップの図である。「Ｓｎ」という用語は、クローニング目的で付加したＮｃｏＩ部位を有する「Ｓ」を表す。「Ｓ」という用語は、非標的という用語を表す。

【図１６】図１６は、誘導性ＣＤ４０およびＭｙＤ８８受容体ならびにＮＦカッパＢ活性の誘導の概略図である。

【図１７】図１７は、誘導性キメラＣＤ４０／ＭｙＤ８８レポーターおよびＮＦカッパＢ活性の誘導の概略図である。
【図１８】図１８は、誘導性ＭｙＤ８８およびキメラＭｙＤ８８－ＣＤ４０受容体による、２９３細胞におけるＮＦカッパＢの活性化のグラフである。ＣＤ４０Ｔは、「ターボ」ＣＤ４０を示し、受容体は、ＦＫＢＰ１２$_{v36}$ドメイン（Ｆｖ’）の３コピーを含む。
【図１９】図１９は、基質と共に３時間インキュベーション後の誘導性切断型ＭｙＤ８８（ＭｙＤ８８Ｌ）およびキメラ誘導性ＭｙＤ８８／ＣＤ４０によるＮＦカッパＢ活性のグラフである。
【図２０】図２０は、基質と共に２２時間インキュベーション後の誘導性切断型ＭｙＤ８８（ＭｙＤ８８Ｌ）およびキメラ誘導性ＭｙＤ８８／ＣＤ４０によるＮＦカッパＢ活性のグラフである。このアッセイにおいて、いくつかのアッセイ飽和が存在する。
【図２１】図２１は、２９３Ｔ細胞のアデノウイルスＭｙＤ８８Ｌ形質導入後のＨＡタンパク質のウェスタンブロットの図である。
【図２２】図２２は、２９３Ｔ細胞のアデノウイルスＭｙＤ８８Ｌ－ＣＤ４０形質導入後のＨＡタンパク質のウェスタンブロットの図である。
【図２３】表示の誘導性ＣＤ４０およびＭｙＤ８８構築体による、ＤＣ由来骨髄のアデノウイルス感染後のＥＬＩＳＡアッセイのグラフである。
【図２４】図２４は、図２３におけるＥＬＩＳＡアッセイと同様のＥＬＩＳＡアッセイの結果のグラフである。
【図２５】図２５は、より多量のアデノウイルスを用いた感染後の、図２３および２４におけるＥＬＩＳＡアッセイと同様のＥＬＩＳＡアッセイの結果のグラフである。
【図２６】図２６は、ｉＲＩＧ－１およびｉＣＤ４０をトランスフェクトした細胞における、ＮＦカッパＢ　ＳＥＡＰレポーターアッセイの結果のグラフである。
【図２７】図２７は、ｉＲＩＧ－１およびｉＴＲＩＦをトランスフェクトした細胞における、ＩＦＮベータＳＥＡＰレポーターアッセイの結果のグラフである。
【図２８】図２８は、トランスフェクトした細胞におけるＮＦカッパＢおよびＩＦＮベータレポーターのｉＴＲＩＦ活性化を比較するグラフである。
【図２９】図２９は、トランスフェクトした細胞におけるＮＦカッパＢレポーターのｉＮＯＤ２活性化のグラフである。
【図３０】図３０は、ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ｉＭｙＤ８８の構築物マップである。
【図３１】図３１は、ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ＣＤ４－ＴＬＲ４Ｌ３－Ｅの構築物マップである。
【図３２】図３２は、ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ｉＭｙＤ８８Ｅ－ＣＤ４０の構築物マップである。
【図３３】図３３は、誘導性ＭｙＤ８８．ＣＤ４０複合構築物を発現する、様々な感染の多重度のアデノウイルスを形質導入したヒト単球由来樹状細胞（ｍｏＤＣ）におけるＩＬ－１２ｐ７０発現の用量依存性誘導の結果を表す棒グラフである。
【図３４】図３４は、さまざまな誘導性構築物を発現するアデノウイルスを形質導入したヒト単球由来樹状細胞（ｍｏＤＣ）における、ＩＬ－１２ｐ７０発現の薬物依存性誘導の結果を表す棒グラフである。
【図３５】図３５は、ワクチン接種前に形質導入した樹状細胞におけるＩＬ－１２ｐ７０レベルを表す棒グラフである。
【図３６Ａ】図３６（ａ）は、形質導入した樹状細胞をワクチン接種したマウスにおけるＥＧ．７－ＯＶＡ腫瘍成長阻害のグラフである。図３６（ｂ）は、代表的なワクチン接種されたマウスの写真である。図３６（ｃ）は、エラーバーを含む３６（ａ）のグラフである。
【図３６Ｂ】図３６（ａ）は、形質導入した樹状細胞をワクチン接種したマウスにおけるＥＧ．７－ＯＶＡ腫瘍成長阻害のグラフである。図３６（ｂ）は、代表的なワクチン接種されたマウスの写真である。図３６（ｃ）は、エラーバーを含む３６（ａ）のグラフである。

【図３６Ｃ】図３６（ａ）は、形質導入した樹状細胞をワクチン接種したマウスにおけるＥＧ．７－ＯＶＡ腫瘍成長阻害のグラフである。図３６（ｂ）は、代表的なワクチン接種されたマウスの写真である。図３６（ｃ）は、エラーバーを含む３６（ａ）のグラフである。
【図３７】図３７（ａ）は、形質導入した樹状細胞により誘導されたＡｇ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の頻度の増強を示す散布図であり、３７（ｂ）は、棒グラフである。
【図３８】図３８は、形質導入した樹状細胞により誘導されたＡｇ特異的ＩＦＮガンマ＋ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＣＤ４＋$Ｔ_{Ｈ}１$細胞の頻度の増強を示す棒グラフである。
【図３９】図３９は、ｉｎ　ｖｉｖｏの細胞傷害性リンパ球アッセイの概略および結果の図である。
【図４０】図４０は、樹状細胞により誘導された、ｉｎ　ｖｉｖｏのＣＴＬ活性の増強によるデータを要約する棒グラフである。
【図４１】図４１は、形質導入した樹状細胞により誘導されたマウスにおけるＣＴＬアッセイの代表的結果の図である。
【図４２】図４２は、形質導入した樹状細胞を接種したマウスにおけるＩＬ－４産生$Ｔ_{Ｈ}２$細胞に関する内部細胞染色の結果である。
【図４３】図４３は、Ａｄ５－ｉＣＤ４０．ＭｙＤ８８を形質導入した細胞を用いて処理したマウスにおける腫瘍成長阻害アッセイの結果である。
【図４４】Ａｄ５－ｉＣＤ４０．ＭｙＤ８８を形質導入した細胞を用いて処理したマウスにおける腫瘍特異的Ｔ細胞アッセイの図である
【図４５】図４５は、エフェクターとして処理マウス由来脾細胞を使用する、ナチュラルキラー細胞アッセイの結果である。
【図４６】図４６は、エフェクターとして処理マウス由来脾細胞を使用する、細胞傷害性リンパ球アッセイの結果である。
【図４７】図４７は、表示のベクターを形質導入した樹状細胞と共培養したＴ細胞を使用する、ＩＦＮガンマＥＬＩＳＰｏｔアッセイの結果である。
【図４８】図４８は、表示のベクターを用いて形質転換した樹状細胞を使用し、アジュバントとしてＬＰＳを用いた、または用いない、ＣＣＲ７上方制御アッセイの結果である。
【図４９】図４９は、図４８に提示されたＣＣＲ７上方制御アッセイの結果を提示し、多数の動物由来のデータが１つのグラフに含まれる。
【発明を実施するための形態】
【００５２】
本明細書において使用されるように、単語「１つの（ａ）」または「１つの（ａｎ）」の使用は、特許請求の範囲および／または明細書において用語「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」と共に使用される場合、「１つの（ｏｎｅ）」を意味してもよいが、それはまた、「１つまたは複数の」、「少なくとも１つの」、および「１つのまたは１つを超える」の意味と一致している。さらに、用語「有する」、「含む（ｉｎｃｌｕｄｉｎｇ）」、「含有する」、および「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」は、交換可能であり、当業者は、これらの用語が制約がない用語であることを認識している。
【００５３】
本明細書において使用される用語「同種異系」は、抗原性が別のＨＬＡ座またはＭＨＣ座を指す。したがって、同じ種から移された細胞または組織は、抗原性が別となり得る。同系マウスは、１つまたは複数の座で異なり得（コンジェニック）、同種異系マウスは、同じバックグラウンドを有し得る。
【００５４】
本明細書において使用される用語「抗原」は、免疫応答を誘発する分子として定義される。この免疫応答は、抗体産生もしくは特異的な免疫適格細胞の活性化またはその両方を含んでいてもよい。抗原は、生物、タンパク質／抗原のサブユニット、死滅または不活性化全細胞または溶解物に由来し得る。例示的な生物は、ヘリコバクター、カンピロバクター、クロストリジウム、Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａｅ、Ｂ

ordetella 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、呼吸器多核体ウイルス、Borrelia burgdorfei、プラスモジウム、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 gonorrheaを含むが、これらに限定されない。そのため、当業者は、事実上すべてのタンパク質またはペプチドを含む任意の巨大分子が抗原として果たし得ることを理解する。さらに、抗原は、組換えまたはゲノムＤＮＡに由来し得る。当業者は、病原性ゲノムのヌクレオチド配列もしくは部分的なヌクレオチド配列または免疫応答を誘導するタンパク質についての遺伝子もしくは遺伝子の断片を含有する任意のＤＮＡは、抗原の合成をもたらすことを理解する。さらに、当業者は、本発明が、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ことを理解する。本発明は、１つを超える遺伝子またはゲノムの部分的な核酸配列の使用を含むが、これらに限定されず、これらの核酸配列が、所望の免疫応答を誘導するために様々な組合せで配置されることは容易に固有のものとなる。

【００５５】

用語「抗原提示細胞」は、その細胞表面上に（またはそれに）少なくとも１つの抗原または抗原断片を示す、獲得する、提示することができる様々な細胞のいずれかである。一般に、用語「抗原提示細胞」は、抗原または抗原組成物に対する免疫応答（つまり免疫系のＴ細胞またはＢ細胞アーム（ａｒｍ）由来の）の増強を支援することによって本発明の目標を達成する任意の細胞とすることができる。そのような細胞は、本明細書において開示される、当技術分野における方法を使用して、当業者らによって定義することができる。当業者によって理解され（例えば、参照によって本明細書において組み込まれるＫｕｂｙ、２０００年、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、第４増補版、Ｗ．Ｈ．Ｆｒｅｅｍａｎ ａｎｄ ｃｏｍｐａｎｙを参照されたい）、ある実施形態において本明細書において使用されるように、免疫細胞にクラスＩＩ主要組織適合分子または複合体と共に抗原を正常にまたは優先的に示す、または提示する細胞は、「抗原提示細胞」である。ある態様では、細胞（例えばＡＰＣ細胞）は、所望の抗原を発現する組換え細胞または腫瘍細胞などのような他の細胞と融合されてもよい。２つ以上の細胞の融合物を調製するための方法は、例えば、それぞれが参照によって本明細書において組み込まれるＧｏｄｉｎｇ，Ｊ．Ｗ．、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅｓ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ、６５～６６頁、７１～７４頁（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、１９８６年）；Ｃａｍｐｂｅｌｌ、ｉｎ：Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ｉｎ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、１３巻、Ｂｕｒｄｅｎ & Ｖｏｎ Ｋｎｉｐｐｅｎｂｅｒｇ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍ、Ｅｌｓｅｖｉｅｗ、７５～８３頁、１９８４年；Ｋｏｈｌｅｒ & Ｍｉｌｓｔｅｉｎ、Ｎａｔｕｒｅ、２５６巻：４９５～４９７頁、１９７５年；Ｋｏｈｌｅｒ & Ｍｉｌｓｔｅｉｎ、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、６巻：５１１～５１９頁、１９７６年、Ｇｅｆｔｅｒら、Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌ Ｇｅｎｅｔ．、３巻：２３１～２３６頁、１９７７年において開示される方法などのように、当技術分野において周知である。いくつかの場合では、抗原提示細胞が抗原を示す、または提示する免疫細胞は、ＣＤ４＋ＴＨ細胞である。ＡＰＣまたは他の免疫細胞上に発現される、さらなる分子は、免疫応答の増強を支援してもよいまたは改善してもよい。例えばサイトカインおよびアジュバントなどのような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支援してもよいまたは増強してもよい。そのような分子は、当業者に周知であり、様々な例は、本明細書において記載されている。

【００５６】

本明細書において使用される用語「癌」は、独自特性－正常な制御の損失－が、無秩序な成長、分化の欠如、局所的な組織浸潤、および転移をもたらす、細胞の過剰増殖として定義される。例として、黒色腫、非小細胞肺、小細胞肺、肺、肝細胞癌、白血病、網膜芽細胞腫、星状細胞腫、膠芽腫、歯肉、舌、神経芽細胞腫、頭部、頸部、乳房、膵臓、前立

腺、腎臓、骨、精巣、卵巣、中皮腫、子宮頸部、胃腸、リンパ腫、脳、結腸、肉腫、または膀胱を含むが、これらに限定されない。

【００５７】

本明細書において使用される用語「細胞」、「細胞株」、および「細胞培養物」は、区別なく使用されてもよい。すべてのこれらの用語はまた、任意のおよびすべての続く世代となる、それらの子孫を含む。すべての子孫が、故意または偶然の突然変異により同一だとは限らなくてもよいことが理解される。

【００５８】

本明細書において使用されるように、用語「ｉＣＤ４０分子」は、誘発性ＣＤ４０として定義される。このｉＣＤ４０は、内因的なＣＤ４０シグナル伝達を失わせるメカニズムを回避することができる。用語「ｉＣＤ４０」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。さらに、本明細書において使用されるｉＣＤ４０の活性は、ＣＩＤによって駆動されることが理解される。

【００５９】

本明細書において使用されるように、用語「ｃＤＮＡ」は、鋳型としてメッセンジャーＲＮＡ（ｍＲＮＡ）を使用して調製されるＤＮＡを指すことが意図される。ゲノムＤＮＡまたはゲノムの、非処理もしくは部分的に処理されたＲＮＡ鋳型から重合されたＤＮＡとは対照的に、ｃＤＮＡを使用することの利点は、ｃＤＮＡが対応するタンパク質のコード配列を主として含有するということである。非コード領域が最適な発現に必要とされる場合またはイントロンなどのような非コード領域がアンチセンス戦略において標的とされることになっている場合などのように、完全または部分的なゲノムの配列が好ましい場合がある。

【００６０】

用語「「樹状細胞」（ＤＣ）は、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて、または宿主中にもしくは被験体中に存在し、または造血幹細胞もしくは単球に由来し得る抗原提示細胞である。樹状細胞ならびにそれらの前駆型は、様々なリンパ器官、例えば脾臓、リンパ節ならびに骨髄および末梢血から単離することができる。ＤＣは、樹状細胞本体から多数の方向に拡張する薄いシート（ｔｈｉｎ　ｓｈｅｅｔ）（ラメリポディウム）を有する特徴的な形態を有する。典型的に、樹状細胞は、高レベルのＭＨＣならびに副刺激（例えばＢ７－１およびＢ７－２）分子を発現する。樹状細胞は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてＴ細胞の抗原特異的な分化を誘発することができ、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏにおいて一次Ｔ細胞応答を開始することができる。

【００６１】

本明細書において使用されるように、用語「発現構築物」または「導入遺伝子」は、配列をコードする核酸の一部またはすべてを転写することができ、ベクターの中に挿入することができる、遺伝子産物をコードする核酸を含有する、任意のタイプの遺伝子構築物として定義される。転写物は、タンパク質に翻訳されるが、その必要はない。ある実施形態では、発現は、遺伝子の転写および遺伝子産物へのｍＲＮＡの翻訳の両方を含む。他の実施形態では、発現は、対象の遺伝子をコードする核酸の転写のみを含む。用語「治療用構築物」もまた、発現構築物または導入遺伝子を指すために使用されてもよい。当業者は、発現構築物または導入遺伝子が、例えば、癌などのような過剰増殖疾患または障害を治療するための療法として使用されてもよく、したがって、発現構築物または導入遺伝子が、治療用構築物または予防構築物となることを理解する。

【００６２】

本明細書において使用されるように、用語「発現ベクター」は、転写することができる、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。いくつかの場合では、次いで、ＲＮＡ分子は、タンパク質、ポリペプチド、またはペプチドに翻訳される。他の場合では、これらの配列は、例えばアンチセンス分子またはリボザイムの産生において翻訳されない。発現ベクターは、特定の宿主生物における、作動可能に連結されるコード配列の転写およびおそらく翻訳に必要な核酸配列を指す、様々な制御配列を

含有することができる。転写および翻訳を調節する制御配列に加えて、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能を同様に果たし、以下に記載される核酸配列を含有していてもよい。

【００６３】

本明細書において使用されるように、用語「ｅｘ　ｖｉｖｏ」は、体「の外部」を指す。当業者は、ｅｘ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏを区別なく使用することができることを知っている。

【００６４】

本明細書において使用されるように、本明細書において使用される用語「機能的に等価な」は、例えば、それが、ＣＤ４０核酸断片、変異体、またはアナログを指すように、ＣＤ４０ポリペプチドまたは腫瘍もしくは過剰増殖疾患を破壊するために免疫応答を刺激するＣＤ４０ポリペプチドをコードする核酸を指す。「機能的に等価な」は、例えば、細胞外ドメインを欠くが、抗原提示分子の樹状細胞発現をアップレギュレートすることによって、Ｔ細胞媒介腫瘍死滅応答を増幅することができるＣＤ４０ポリペプチドを指す。

【００６５】

用語「過剰増殖疾患」は、細胞の過剰増殖に起因する疾患として定義される。例示的な過剰増殖疾患は、癌または自己免疫疾患を含むが、これらに限定されない。他の過剰増殖疾患は、血管閉塞、再狭窄、アテローム性動脈硬化症、または炎症性腸疾患を含んでいてもよい。

【００６６】

本明細書において使用されるように、用語「遺伝子」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。当業者らによって理解されるように、この機能的な用語は、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、または発現するのに適応したゲノム配列、ｃＤＮＡ配列、およびより小さな操作された遺伝子セグメントを含む。

【００６７】

用語「免疫原性組成物」または「免疫原」は、免疫応答を誘発することができる物質を指す。免疫原の例は、例えば、抗原、自己免疫疾患の誘発において役割を果たす自己抗原、および癌細胞上に発現される腫瘍関連抗原を含む。

【００６８】

本明細書において使用される用語「免疫無防備状態の」は、低下したまたは衰弱した免疫系を有する被験体として定義される。免疫無防備状態の状態は、免疫系の欠損もしくは機能不全または感染症および／もしくは疾患に対する感受性を高める他の因子によるものであってもよい。そのような分類は評価のための概念的な基礎を可能にするが、免疫無防備状態の個人は、多くの場合、１つの群または他の群に完全には適合しない。体の防御メカニズムにおける１つを超える欠損が影響を与えられているかもしれない。例えば、ＨＩＶによって引き起こされる特異的なＴリンパ球欠損を有する個人はまた、抗ウイルス療法のために使用される薬剤によって引き起こされる好中球減少症をも有しているかもしれないまたは皮膚および粘膜の完全性の欠陥のために免疫無防備状態であるかもしれない。免疫無防備状態の状態は、留置しているセントラルラインまたは静脈内薬物乱用による他のタイプの損傷に起因し得る、または二次悪性疾患、栄養失調症によってまたは結核もしくは性感染病、例えば梅毒もしくは肝炎などのような他の感染病原体に感染していることによって引き起こされ得る。

【００６９】

本明細書において使用されるように、用語「薬学的にまたは薬理学的に許容される」は、動物またはヒトに投与された場合に、有害な、アレルギー性の、または他の不都合な反応をもたらさない分子の実体および組成物を指す。

【００７０】

本明細書において使用されるように、「薬学的に許容されるキャリア」は、任意のおよびすべての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤

、ならびにその他同種のものを含む。薬学的に活性な物質に対するそのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野において周知である。いかなる従来の媒体または作用物質も、本明細書において提示されるベクターまたは細胞と不適合性である場合以外は、治療用組成物におけるその使用は、企図される。補充性の活性成分もまた、組成物の中に組み込むことができる。

【００７１】

本明細書において使用されるように、用語「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドの鎖として定義される。さらに、核酸は、ヌクレオチドの多量体である。したがって、本明細書において使用される核酸およびポリヌクレオチドは、交換可能である。当業者は、核酸が、単量体「ヌクレオチド」に加水分解することができるポリヌクレオチドであるという一般知識を有する。単量体ヌクレオチドは、ヌクレオシドに加水分解することができる。本明細書において使用されるように、ポリヌクレオチドは、限定を伴うことなく、組換え手段、つまり、通常のクローニング技術およびＰＣＲ（商標）ならびにその他同種のものを使用する、組換えライブラリーまたは細胞ゲノム由来の核酸配列のクローニングを含む、当技術分野において入手可能な任意の手段によってならびに合成手段によって得られるすべての核酸配列を含むが、これらに限定されない。さらに、当業者は、ポリヌクレオチドがポリヌクレオチドの突然変異を含み、当技術分野において周知の方法によるヌクレオチドまたはヌクレオシドの突然変異を含むが、これらに限定されないことを認識している。

【００７２】

本明細書において使用されるように、用語「ポリペプチド」は、明示される配列を通常有する、アミノ酸残基の鎖として定義される。本明細書において使用されるように、ポリペプチドという用語は、用語「ペプチド」および「タンパク質」と交換可能である。

【００７３】

本明細書において使用されるように、用語「プロモーター」は、遺伝子の特異的な転写を開始するために必要とされる、細胞の合成装置または導入された合成装置によって認識されるＤＮＡ配列として定義される。

【００７４】

本明細書において使用されるように、用語「免疫応答を調節する」または「免疫応答を調整する」は、免疫応答を修飾するための能力を指す。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できる。さらに、組成物はまた、免疫応答を阻害することもできる。調節の形態は、組成物と共に使用されるリガンドによって決定される。例えば、化学物質の二量体アナログは、副刺激ポリペプチドの二量体化をもたらし、ＤＣの活性化に至るが、化学物質の単量体アナログは、副刺激ポリペプチドの二量体化をもたらさず、これは、ＤＣを活性化しないであろう。

【００７５】

用語「トランスフェクション」および「形質導入」は、交換可能であり、外因性ＤＮＡ配列が真核生物宿主細胞の中に導入されるプロセスを指す。トランスフェクション（または形質導入）は、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、遺伝子銃送達、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（ｓｕｐｅｒｆｅｃｔｉｏｎ）、およびその他同種のものを含む、多くの手段のいずれか１つによって達成することができる。

【００７６】

本明細書において使用されるように、用語「同系」は、同一であり、もしくは組織移植を可能にするのに十分に密接に関係し、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、同じ近交系の一卵性双生児または動物。同系および同遺伝子系は、交換可能に使用することができる。

【００７７】

本明細書において使用される用語「被験体」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、雌ウシ、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む哺乳動物；例えば、トリ（例えばニワトリもしくはアヒル）または魚などのような非哺乳動物脊椎動物および非哺乳動物無脊椎動物を含む非哺乳動物を含むが、これらに限定されない。

【００７８】

本明細書において使用されるように、用語「転写制御下」または「作動可能に連結される」は、プロモーターが、ＲＮＡポリメラーゼ開始および遺伝子の発現を制御するために、核酸に関して正確な位置および方向づけにあるように定義される。

【００７９】

本明細書において使用されるように、用語「治療」、「治療する」、「治療される」、または「治療すること」は、予防法および／または療法を指す。例えば、感染症に関して使用される場合、用語は、病原体による感染症に対する被験体の抵抗性を増加させ、または言いかえれば、被験体が病原体に感染し、もしくは感染症に起因する病気の徴候を示す見込みを減少させる予防的治療ならびに被験体が感染した後に、感染症と戦う、例えば、感染症を低下させ、もしくは排除し、またはそれがより悪くなるのを予防するための治療を指す。

【００８０】

本明細書において使用されるように、用語「ワクチン」は、動物に投与することができる形態をしている、本明細書において提示される組成物を含有する製剤を指す。典型的に、ワクチンは、組成物が懸濁または溶解される従来の生理食塩水または緩衝水溶液媒体を含む。この形態では、組成物は、状態を予防する、回復させる、または他の場合には治療するために好都合に使用することができる。被験体への導入に際して、ワクチンは、抗体、サイトカインの産生、および／または他の細胞応答を含むが、これらに限定されない免疫応答を誘発することができる。

【００８１】

樹状細胞

自然免疫系は、微生物中に存在する、保存された分子パターンの認識のために生殖細胞系コード受容体のセットを使用する。これらの分子パターンは、リポ多糖、ペプチドグリカン、リポタイコ酸、ホスファチジルコリン、リポタンパク質を含む細菌特異的タンパク質、細菌ＤＮＡ、ウイルス一本鎖および二本鎖ＲＮＡ、非メチル化ＣｐＧ－ＤＮＡ、マンナン、ならびに様々な他の細菌および菌細胞壁成分を含む、微生物のある種の構成物中に生じる。そのような分子パターンはまた、植物アルカロイドなどのような他の分子中にも生じ得る。自然免疫認識のこれらの標的は、それらが感染宿主生物によってではなく微生物によって産生されるので、病原体関連分子パターン（ＰＡＭＰ）と呼ばれる（Ｊａｎｅｗａｙら（１９８９年）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ．Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．、５４巻：１～１３頁；Ｍｅｄｚｈｉｔｏｖら、Ｎａｔｕｒｅ、３８８巻：３９４～３９７頁、１９９７年）。

【００８２】

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ら、１９８９年；Ｍｅｄｚｈｉｔｏｖら、１９９７年）。これらの受容体は構造が異なり、いくつかの異なるタンパク質ファミリーに属する。これらの受容体のいくつかは、ＰＡＭＰを直接、認識する（例えばＣＤ１４、ＤＥＣ２０５、コレクチン）が、他のもの（例えば補体受容体）は、ＰＡＭＰ認識によって生成される産物を認識する。これらの受容体ファミリーのメンバーは、一般に、３つのタイプ：１）血漿中で循環する体液性受容体、２）免疫細胞表面上に発現されるエンドサイトーシス受容体、および３）細胞表面上にまたは細胞内で発現することができるシグナル伝達受容体に分類することができる（Ｍｅｄｚｈｉｔｏｖら、１９９７年；Ｆｅａｒｏｎら（１９９６年）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２７２巻：５０～３頁）。

【００８３】

細胞のＰＲＲは、適応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む、自然免疫系のエフェクター細胞上に発現される。そのようなエフェ

クター細胞は、マクロファージ、樹状細胞、Ｂリンパ球、および表面上皮（ｓｕｒｆａｃｅ　ｅｐｉｔｈｅｌｉａ）を含むが、これらに限定されない。この発現プロファイルは、ＰＲＲが、自然エフェクターメカニズムを直接、誘発することおよびまた、下記に議論される炎症性サイトカインおよびケモカインなどのような内因的なシグナルのセットの発現を誘発することによって、感染病原体の存在に対して宿主生物に警告することをも可能にする。この後者の機能は、侵入物を退治するためのエフェクター力の効率的な動員を可能にする。

【００８４】

樹状細胞（ＤＣ）の主要な機能は、末梢組織において抗原を獲得し、二次リンパ組織に移動し、免疫系のエフェクターＴ細胞に抗原を提示することである（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ，　Ｊ．ら、Ａｎｎｕ　Ｒｅｖ　Ｉｍｍｕｎｏｌ、２０００年、１８巻：７６７～８１１頁；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ，　Ｊ．，　＆　Ｓｔｅｉｎｍａｎ，　Ｒ．Ｍ．　Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌｓ　ａｎｄ　ｔｈｅ　ｃｏｎｔｒｏｌ　ｏｆ　ｉｍｍｕｎｉｔｙ．　Ｎａｔｕｒｅ　３９２巻、２４５～２５２頁（１９９８年））。ＤＣが免疫応答においてそれらの重大な役割を実行するので、それらは、それらがそれぞれの環境に対して適切な機能を実行することを可能にする成熟変化を受ける（Ｔｅｒｍｅｅｒ，　Ｃ．Ｃ．ら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ、２０００年８月１５日　１６５巻：１８６３～７０頁）。ＤＣの成熟の間に、抗原取り込み潜在能力は、失われ、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）クラスＩおよびクラスＩＩ分子の表面密度は、１０～１００倍増加し、ＣＤ４０、副刺激分子、および接着分子発現もまた、大幅に増加する（Ｌａｎｚａｖｅｃｃｈｉａ，　Ａ．およびＦ．　Ｓａｌｌｕｓｔｏ、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２０００年　２９０巻：９２～９６頁）。さらに、他の遺伝子改変は、ＤＣが、流入領域リンパ節の、Ｔ細胞に富んだ傍皮質に帰り、ナイーブおよび記憶Ｔ細胞を誘引し、抗原特異的ナイーブＴＨ０細胞を刺激するＴ細胞ケモカインを発現することを可能にする（Ａｄｅｍａ，　Ｇ．　Ｊ．ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９７年６月１２日　３８７巻：７１３～７頁）。このステージの間に、成熟ＤＣは、ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞にそれらのＭＨＣ　ＩＩ分子を介して抗原を提示して、ＤＣ　ＣＤ４０受容体に引き続いて結合するＴ細胞ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）のアップレギュレーションを誘発する。このＤＣ：Ｔ細胞相互作用は、ＭＨＣ　Ｉ分子およびＩＩ分子、接着分子、副刺激分子（例えばＢ７．１、Ｂ７．２）、サイトカイン（例えばＩＬ－１２）、ならびに抗アポトーシスタンパク質（例えばＢｃｌ－２）のさらなるアップレギュレーションを含む、強力なＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答の開始に重大である、さらなるＤＣ分子の急速な発現を誘発する（Ａｎｄｅｒｓｏｎ，　Ｄ．Ｍ．ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９７年１１月１３日　３９０巻：１７５～９頁；Ｏｈｓｈｉｍａ，　Ｙ．ら、Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ、１９９７年１０月１５日　１５９巻：３８３８～４８頁；Ｓａｌｌｕｓｔｏ，　Ｆ．ら、Ｅｕｒ　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ、１９９８年９月２８日：２７６０～９頁；Ｃａｕｘ，　Ｃ．　Ａｄｖ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　Ｂｉｏｌ．　１９９７年、４１７巻：２１～５頁；）。ＣＤ８＋Ｔ細胞は、リンパ節を出て、循環に再び入り、病原体または悪性細胞を破壊するために炎症の本来の部位に帰る。

【００８５】

ＤＣの機能に影響を及ぼす重要な１つのパラメーターは、ＤＣの「電源投入スイッチ（ｏｎ　ｓｗｉｔｃｈ）」として果たすＣＤ４０受容体である（Ｂｅｎｎｅｔｔ，　Ｓ．Ｒ．ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９８年６月４日　３９３巻：４７８～８０頁；Ｃｌａｒｋｅ，　Ｓ．Ｒ．、Ｊ　Ｌｅｕｋｏｃ　Ｂｉｏｌ、２０００年５月　６７巻：６０７～１４頁；Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ，　Ｎ．Ｃ．ら、Ｎａｔ　Ｍｅｄ、１９９９年４月５日：４０５～１１頁；Ｒｉｄｇｅ，　Ｊ．Ｐ．、Ｄ．Ｒ．Ｆ、およびＰ．　Ｎａｔｕｒｅ、１９９８年６月４日　３９３巻：４７４～８頁；Ｓｃｈｏｅｎｂｅｒｇｅｒ，　Ｓ．Ｐ．ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９８年６月４日　３９３巻：４８０～３頁）。ＣＤ４０は、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーの４８ｋＤａ膜貫通メンバーである（ＭｃＷｈｉｒｔｅｒ，　Ｓ．Ｍ．ら、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ、１９９９年７月２０日　９６巻：８４０８～１３頁）。ＣＤ４０－ＣＤ４０Ｌ相互作用は、ＴＮＦ受容

体関連因子（ＴＲＡＦ）を含むシグナル伝達カスケードを開始するために必要なＣＤ４０三量体形成を誘発する（Ｎｉ，　Ｃ．ら、ＰＮＡＳ、２０００年、９７巻（１９号）：１０３９５～１０３９９頁；Ｐｕｌｌｅｎ，　Ｓ．Ｓ．ら、Ｊ　Ｂｉｏｌ　Ｃｈｅｍ、１９９９年5月１４日　２７４巻：１４２４６～５４頁）。ＣＤ４０は、ＮＦ－カッパＢ、ＡＰ－１、ＳＴＡＴ３、およびｐ３８ＭＡＰＫを含む、ＤＣ中のいくつかの転写因子を活性化するためにこれらのシグナル伝達分子を使用する（ＭｃＷｈｉｒｔｅｒ，　Ｓ．Ｍ．ら、１９９９年）。

【００８６】

新規なＤＣ活性化系は、ＤＣにおける活性化および／または生存の延長／増加をもたらす、ＤＣのプラスミド膜（ｐｌａｓｍｉｄ　ｍｅｍｂｒａｎｅ）への、シグナル伝達分子または副刺激ポリペプチドの補充に基づいて提供される。副刺激ポリペプチドは、ＮＦ－カッパ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を含む。ＤＣ活性化系は、副刺激ポリペプチドが、オリゴマー化をもたらすリガンド（つまり脂質透過性有機二量体化薬物）により活性化および／または調節される、リガンド結合ドメイン（つまり小分子結合ドメイン）に融合される組換えシグナル伝達分子の利用に基づく。副刺激ポリペプチドを架橋する、またはそれのオリゴマー化のために使用されてもよい他の系は、抗体、天然リガンド、および／または人工交差反応リガンドもしくは合成リガンドを含む。さらに、企図される他の二量体化系は、クーママイシン／ＤＮＡジャイレースＢ系を含む。

【００８７】

使用することができる副刺激ポリペプチドは、ＮＦ－カッパＢおよび他の可変性のシグナル伝達カスケード、例えばｐ３８経路および／またはＡｋｔ経路を活性化するものを含む。そのような副刺激ポリペプチドは、パターン認識受容体、Ｃ－反応性タンパク質受容体（つまりＮｏｄ１、Ｎｏｄ２、ＰｔＸ３－Ｒ）、ＴＮＦ受容体（つまりＣＤ４０、ＲＡＮＫ／ＴＲＡＮＣＥ－Ｒ、ＯＸ４０、４－１ＢＢ）、ならびにＨＳＰ受容体（Ｌｏｘ－１およびＣＤ－９１）を含むが、これらに限定されない。パターン認識受容体は、エンドサイトーシスパターン認識受容体（つまりマンノース受容体、スカベンジャー受容体（つまりＭａｃ－１、ＬＲＰ、ペプチドグリカン、タイコ酸（ｔｅｃｈｏｉｃ　ａｃｉｄ）、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（つまりＮＯＤ受容体１＆２）、ＲＩＧ１、ならびに図８中に示されるＰＲＲを含むが、これらに限定されない。当業者らはまた、例えばＷｅｒｔｓ　Ｃ．ら、Ｃｅｌｌ　Ｄｅａｔｈ　ａｎｄ　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ（２００６年）１３巻：７９８～８１５頁；Ｍｅｙｌａｎ，　Ｅ．ら、Ｎａｔｕｒｅ（２００６年）４４２巻：３９～４４頁；およびＳｔｒｏｂｅｒ，　Ｗ．ら、Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ（２００６年）６巻：９～２０頁において議論されるものを含む、本発明の方法および組成物に適した他のパターン認識受容体を知っている。

【００８８】

発現構築物の操作

すべてが作動可能に連結される、副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発現構築物もまた提供される。より詳細には、１つを超えるリガンド結合ドメインが、発現構築物中に使用される。さらに、発現構築物は、膜ターゲティング配列を含有する。当業者は、適切な発現構築物が、上記のＦＫＢＰリガンド結合エレメントのどちらかの側に副刺激ポリペプチドエレメントを含んでいてもよいことを理解する。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の中に挿入されてもよい。

【００８９】

Ａ．副刺激ポリペプチド

副刺激ポリペプチド分子は、抗原提示分子の樹状細胞発現をアップレギュレートするこ

とによってＴ細胞媒介応答を増幅することができる。企図される副刺激タンパク質は、例えば腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）ファミリーのメンバー（つまり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受容体を含むが、これらに限定されない。典型的に、これらの副刺激ポリペプチド由来の細胞質ドメインは、発現ベクター中に使用される。認識配列が細胞質ドメインと関連する転写の開始に関与するその突然変異体を含む、様々な副刺激ポリペプチドの１つからの細胞質ドメインは、公知であり、またはそのような配列に応答性の遺伝子が公知である。

【００９０】

特定の実施形態では、副刺激ポリペプチド分子は、ＣＤ４０である。ＣＤ４０分子は、（１）公知のＣＤ４０遺伝子の配列を有する核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、（２）ＣＤ４０ポリペプチドをコードする核酸分子を含む。ＣＤ４０ポリペプチドは、ある実施例では、細胞外ドメインを欠いていてもよい。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は、配列番号１および他の種由来のＣＤ４０アイソフォームを含むが、これらに限定されない。ＣＤ４０の他の正常なまたは突然変異体の変異体は、本発明の方法および組成物において使用することができることが企図される。したがって、ＣＤ４０領域は、１つまたは複数のアミノ酸置換、欠失、および／または挿入によって本来の配列と異なるアミノ酸配列を有し得る。例えば、１つまたは複数のＴＮＦ受容体関連因子（ＴＲＡＦ）結合領域は、排除されてもよいまたは有効に排除されてもよい（例えば、ＣＤ４０アミノ酸配列は、ＴＲＡＦタンパク質が結合しないまたはそれが本来のＣＤ４０配列に結合するよりも低い親和性で結合するように欠失し、または改変される）。特定の実施形態では、ＴＲＡＦ３結合領域は、それが排除され、または有効に排除されるように欠失し、または改変される（例えば、アミノ酸２５０～２５４は、改変され、または欠失していてもよい；Ｈａｕｅｒら、ＰＮＡＳ　１０２巻（８号）：２８７４～２８７９頁（２００５年））。

【００９１】

ある実施形態では、本発明の方法は、ＣＤ４０の誘発性形態（ｉＣＤ４０）をコードする発現構築物を産生するための遺伝物質の操作を含む。そのような方法は、例えば、ＣＤ４０細胞質ドメインをコードする異種核酸配列を含有する発現構築物の生成およびその発現のための手段を含む。ベクターは、適切なヘルパー細胞中で複製することができ、ウイルス粒子は、そこから産生されてもよく、細胞は、組換えウイルス粒子に感染されてもよい。

【００９２】

したがって、本明細書において提示されるＣＤ４０分子は、例えば、細胞外ドメインを欠いていてもよい。特定の実施形態では、細胞外ドメインは、切断型であり、または除去される。細胞外ドメインは、機能的な細胞外ドメインを有していないＣＤ４０分子を産生するために標準の突然変異誘発、挿入、欠失、または置換を使用して突然変異させることができることもまた企図される。ＣＤ４０核酸は、配列番号１の核酸配列を有していてもよい。ＣＤ４０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先の核酸の機能的に等価な断片、変異体、およびアナログを含む。誘発性ＣＤ４０ベクターを構築するための方法は、例えば、２００８年７月２９日に発行された米国特許第７，４０４，９５０号において記載されている。

【００９３】

遺伝子療法との関連において、遺伝子は、ベクターのバックボーンを提供する、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となるであろう。遺伝子は、細菌、ウイルス、酵母、寄生生物、植物、またはさらに動物などのような原核生物または真核生物の供給源に由来する。異種ＤＮＡはまた、１つを超える供給源、つまり多重遺伝子構築物または融合タンパク質に由来する。異種ＤＮＡはまた、ある供給源に由来する調節配列および異なる供給源由来の遺伝子を含んでいてもよい。

【００９４】

Ｂ．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、天然または非天然リガンド、例えば非天然合成リガンドを使用する誘発を可能にするであろう任意の好都合なドメインとすることができる。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依存して、細胞の膜に対して内部または外部であってもよい。上記に示される細胞質領域と結合するリガンド結合タンパク質を含む、受容体を含む、種々様々のリガンド結合タンパク質は、公知である。本明細書において使用されるように、用語「リガンド結合ドメインは、用語「受容体」と交換可能とすることができる。リガンド（例えば小さな有機リガンド）が公知であり、または容易に産生されてもよいリガンド結合タンパク質が特に興味深い。リガンド結合ドメインまたは受容体は、ＦＫＢＰおよびサイ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、上記に示される他の受容体、ならびにその他同種のものならびに抗体から得ることができる「非天然」受容体、特に重鎖サブユニットまたは軽鎖サブユニット、その突然変異配列、確率的な手順、コンビナトリアル合成、およびその他同種のものによって得られるランダムアミノ酸配列を含む。例として、例えばＫｏｐｙｔｅｋ，　Ｓ．Ｊ．ら、Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　＆　Ｂｉｏｌｏｇｙ　７巻：３１３～３２１頁（２０００年）およびＧｅｓｔｗｉｃｋｉ，　Ｊ．Ｅ．ら、Ｃｏｍｂｉｎａｔｏｒｉａｌ　Ｃｈｅｍ．　＆　Ｈｉｇｈ　Ｔｈｒｏｕｇｈｐｕｔ　Ｓｃｒｅｅｎｉｎｇ　１０巻：６６７～６７５頁（２００７年）；Ｃｌａｃｋｓｏｎ　Ｔ（２００６年）Ｃｈｅｍ　Ｂｉｏｌ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓ　６７巻：４４０～２頁；Ｃｌａｃｋｓｏｎ，　Ｔ．「Ｃｏｎｔｒｏｌｌｉｎｇ　Ｐｒｏｔｅｉｎ－Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ　Ｕｓｉｎｇ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｃｅｒｓ　ａｎｄ　Ｄｉｓｒｕｐｔｅｒｓ　ｏｆ　Ｄｉｍｅｒｉｚａｔｉｏｎ」ｉｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｂｉｏｌｏｇｙ：　Ｆｒｏｍ　Ｓｍａｌｌ　Ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ　ｔｏ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｂｉｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｄｒｕｇ　Ｄｅｓｉｇｎ（Ｓｃｈｒｅｉｂｅｒ，　ｓ．ら編、Ｗｉｌｅｙ、２００７年））において記載されるものを含む。

【００９５】

大部分については、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、約３５０アミノ酸未満、通常、２００アミノ酸未満であろう。結合ドメインは、例えば、小さくてもよい（＜２５ｋＤａ、ウイルスベクターにおいて効率的なトランスフェクションを可能にするために）、単量体（これはアビジン－ビオチン系を除外する）、非免疫原性であってもよく、二量体化のために構成することができる、合成的に入手可能であり、細胞透過性で、無毒性のリガンドを有するはずである。

【００９６】

受容体ドメインは、発現構築物の設計および適切なリガンドの入手可能性に依存して、細胞内または細胞外のものとすることができる。疎水性リガンドについては、結合ドメインは、膜のどちらの側にもあり得るが、親水性リガンド、特にタンパク質リガンドについては、結合ドメインは、結合に利用可能である形態をしたリガンドを内部移行するための輸送系がない限り、通常、細胞膜に対して外部にあるであろう。細胞内受容体については、構築物は、受容体ドメイン配列の５’または３’にシグナルペプチドおよび膜貫通ドメインをコードすることができ、または受容体ドメイン配列の５’に脂質結合シグナル配列を有していてもよい。受容体ドメインがシグナルペプチドおよび膜貫通ドメインの間にある場合、受容体ドメインは、細胞外のものとなるであろう。

【００９７】

受容体をコードする発現構築物の部分は、様々な理由で突然変異誘発にかけることができる。突然変異誘発されたタンパク質は、より高い結合親和性をもたらすことができる、自然発生の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区別を可能にすることができる、受容体－リガンド対を設計するための自由度を提供する、またはその他同種のことをすることができる。受容体における変化は、結合部位にあることが公知のアミノ酸における変化、コンビナトリアル技術を使用するランダム突然変異誘発を含むことがで

き、結合部位と関連するアミノ酸または立体構造変化と関連する他のアミノ酸についてのコドンは、特定のアミノ酸についてコドン（複数可）を公知の変化を用いてまたはランダムに交換することによって突然変異誘発にかけ、適切な原核生物の宿主において、結果として生じるタンパク質を発現させ、次いで、結合について、結果として生じるタンパク質をスクリーニングすることができる。

【００９８】

抗体および抗体サブユニット、例えば重鎖もしくは軽鎖、特に断片、より詳細には可変領域のすべてもしくは一部、または重鎖および軽鎖の融合物は、高親和性結合を引き起こすために、結合ドメインとして使用することができる。企図される抗体は、免疫応答を引き起こさず、一般に、末梢において（つまりＣＮＳ／脳エリアの外部で）発現されないであろう、細胞外ドメインなどのような、異所的に発現されるヒト産物であるものを含む。そのような例は、低親和性神経増殖因子受容体（ＬＮＧＦＲ）および胚表面タンパク質（つまり癌胎児性抗原）を含むが、これらに限定されない。

【００９９】

さらに、抗体は、生理学的に許容されるハプテン分子に対して調製することができ、個々の抗体サブユニットは、結合親和性についてスクリーニングすることができる。サブユニットをコードするｃＤＮＡは、単離し、リガンドに対して適切な親和性を有する結合タンパク質ドメインを得るために、定常領域、可変領域の部分の欠失、可変領域の突然変異誘発、またはその他同種のものによって修飾することができる。このように、ほぼあらゆる生理学的に許容されるハプテン化合物は、リガンドとしてまたはリガンドに対するエピトープを提供するために用いることができる。抗体単位の代わりに、天然受容体を用いることができ、結合ドメインは、公知であり、結合に有用なリガンドがある。

【０１００】

Ｃ．オリゴマー化

他の結合イベント、例えばアロステリック活性化をシグナルを開始するために用いることができるが、伝達されるシグナルは、通常、キメラタンパク質分子のリガンド媒介オリゴマー化、つまり、リガンド結合後のオリゴマー化の結果に起因するであろう。キメラタンパク質の構築物は、様々なドメインのオーダーおよび個々のドメインの繰り返しの数に関して変わるであろう。

【０１０１】

受容体の多量体を形成するために、キメラ表面膜タンパク質のリガンド結合ドメイン／受容体ドメインに対するリガンドは、それが、少なくとも２つの結合部位を有し、それぞれの結合部位が、リガンド受容体ドメインに結合することができるという意味で、通常、多量体であろう。望ましいように、本発明のリガンドは、二量体またはより高いオーダーの、通常、約四量体を超えないオリゴマーの小さな合成有機分子となり、個々の分子は、典型的に少なくとも約１５０Ｄａかつ約５ｋＤａ未満、通常、約３ｋＤａ未満となるであろう。様々な対の合成リガンドおよび受容体を用いることができる。例えば、天然受容体を含む実施形態では、二量体ＦＫ５０６は、ＦＫＢＰ１２受容体と共に使用することができ、二量体化シクロスポリンＡは、シクロフィリン受容体と共に使用することができ、二量体化エストロゲンは、エストロゲン受容体と共に、二量体化グルココルチコイドは、グルココルチコイド受容体と共に、二量体化テトラサイクリンは、テトラサイクリン受容体と共に、二量体化ビタミンＤは、ビタミンＤ受容体と共に使用することができるなどである。その代わりに、より高いオーダーのリガンド、例えば三量体を使用することができる。非天然受容体、例えば抗体サブユニット、修飾抗体サブユニット、または修飾受容体、およびその他同種のものを含む実施形態については、任意の種々様々の化合物を使用することができる。これらのリガンド単位の重要な特徴は、それぞれの結合部位が高い親和性で受容体に結合することができ、それらが化学的に二量体化することができることである。また、当業者らは、それらが、機能的レベルで血清中に溶解することができ、さらに、ほとんどの適用のために形質膜にわたって拡散することができるように、リガンドの疎水性／親水性の平衡を保つための方法をも知っている。

【０１０２】
ある実施形態では、本発明の方法は、条件的に制御されるタンパク質またはポリペプチドを産生するために、化学的に誘発される二量体化（ＣＩＤ）の技術を利用する。この技術が誘発性であることに加えて、それはまた、不安定な二量体化剤の分解または単量体競合的阻害剤の投与により、可逆的となる。
【０１０３】
ＣＩＤ系は、リガンド結合ドメインに融合されたシグナル伝達分子を急速に架橋するために合成二価リガンドを使用する。この系は、細胞表面タンパク質（Ｓｐｅｎｃｅｒ，Ｄ．Ｍ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、１９９３年、２６２巻：１０１９～１０２４頁；Ｓｐｅｎｃｅｒ Ｄ．Ｍ．ら、Ｃｕｒｒ Ｂｉｏｌ １９９６年、６巻：８３９～８４７頁；Ｂｌａｕ，Ｃ．Ａ．ら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９７年、９４巻：３０７６～３０８１頁）もしくは細胞質タンパク質（Ｌｕｏ，Ｚ．ら、Ｎａｔｕｒｅ １９９６年、３８３巻：１８１～１８５頁；ＭａｃＣｏｒｋｌｅ，Ｒ．Ａ．ら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ １９９８年、９５巻：３６５５～３６６０頁）のオリゴマー化および活性化、転写を調整するための、ＤＮＡエレメントへの転写因子の動員（Ｈｏ，Ｓ．Ｎ．ら、Ｎａｔｕｒｅ １９９６年、３８２巻：８２２～８２６頁；Ｒｉｖｅｒａ，Ｖ．Ｍ．ら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．１９９６年、２巻：１０２８～１０３２頁）、またはシグナル伝達を刺激するための、形質膜へのシグナル伝達分子の動員（Ｓｐｅｎｃｅｒ Ｄ．Ｍ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９５年、９２巻：９８０５～９８０９頁；Ｈｏｌｓｉｎｇｅｒ，Ｌ．Ｊ．ら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ １９９５年、９５巻：９８１０～９８１４頁）を引き起こすために使用されてきた。
【０１０４】
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有効に活性化するという見解に基づく。最も単純な実施形態では、ＣＩＤ系は、脂質透過性免疫抑制薬の二量体アナログ、ＦＫ５０６を使用し、これは、その正常な生物活性を失っているが、ＦＫ５０６結合タンパク質、ＦＫＢＰ１２に遺伝子的に融合された分子を架橋するための能力を獲得している。１つまたは複数の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に融合することによって、二量体化化合物薬剤依存的にではあるが、リガンドおよび外部ドメイン非依存的にシグナル伝達を刺激することができる。これは、一時的な制御を有する系、単量体薬剤アナログを使用する可逆性、および増強された特異性を提供する。それらの結合ドメイン、ＦＫＢＰ１２に対する第３世代ＡＰ２０１８７／ＡＰ１９０３ ＣＩＤの高い親和性は、内因的なＦＫＢＰ１２を通しての非特異的副作用の誘発を伴うことなく、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて組換え受容体の特異的な活性化を可能にする。さらに、合成リガンドは、プロテアーゼ分解に対して抵抗性であり、ほとんどの、送達されるタンパク質作用物質よりも、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて受容体を活性化することにおいてそれらをより効率的にする。
【０１０５】
使用されるリガンドは、２つ以上のリガンド結合ドメインに結合することができる。当業者は、キメラタンパク質が、１つを超えるリガンド結合ドメインを含有する場合、１つを超えるリガンドに結合することができてもよいことを理解する。リガンドは、典型的に、非タンパク質または化学物質である。例示的なリガンドは、二量体ＦＫ５０６（例えばＦＫ１０１２）を含むが、これらに限定されない。
【０１０６】
ＣＤ４０活性化のメカニズムは、三量体形成に基本的に基づくので、この受容体は、ＣＩＤ系に対して特に適用可能である。ＣＩＤ調節は、１）一時的な制御、２）自己免疫反応の徴候に際しての非活性単量体の追加による可逆性、および３）非特異的副作用に対する限られた潜在能力を有する系を提供する。さらに、誘発性ｉｎ ｖｉｖｏ ＤＣ ＣＤ４０活性化は、ＣＤ４０シグナル伝達の完全な誘発のために通常、必要とされる第２の「危険」シグナルの必要を回避し、ｉｎ ｓｉｔｕにおいてＤＣの生存を潜在的に促進し、

Ｔ細胞刺激の増強を可能にするであろう。したがって、ｉＣＤ４０を発現させるためのＤＣワクチンの操作は、抗原提示分子、接着分子、ＴＨ１促進サイトカイン、および生存促進性因子のＤＣ発現をアップレギュレートすることによって、Ｔ細胞媒介死滅応答を増幅する。

【０１０７】

企図される他の二量体化系は、クーママイシン／ＤＮＡジャイレースＢ系を含む。クーママイシン誘発二量体化は、修飾Ｒａｆタンパク質を活性化し、ＭＡＰキナーゼカスケードを刺激する。Ｆａｒｒａｒら、１９９６年を参照されたい。

【０１０８】

Ｄ．膜ターゲティング

膜ターゲティング配列は、細胞膜へのキメラタンパク質の輸送をもたらし、同じまたは他の配列が、細胞膜へのキメラタンパク質の結合をコードすることができる。細胞膜と結合する分子は、膜結合を促進する、ある種の領域を含有し、そのような領域は、膜ターゲティング分子を生成するためにキメラタンパク質分子の中に組み込むことができる。例えば、いくつかのタンパク質は、アシル化されるＮ末端またはＣ末端の配列を含有し、これらのアシル成分は、膜結合を促進する。そのような配列は、アシルトランスフェラーゼによって認識され、多くの場合、特定の配列モチーフと一致する。ある種のアシル化モチーフは、単一アシル成分（その後、陰イオン脂質頭部の基との結合を改善するためのいくつかの正荷電残基が続くことが多い

【０１０９】

【化１】

(例えばヒトc-Src: M-G-S-N-**K**-S-**K**-P-**K**-D-A-S-Q-**R**-**R**-**R**)

）を用いて修飾ことができ、他のものは、多数のアシル成分を用いて修飾することができる。例えば、タンパク質チロシンキナーゼＳｒｃのＮ末端配列は、単一のミリストイル成分を含むことができる。二重のアシル化領域は、Ｓｒｃファミリーメンバーのサブセット（例えばＹｅｓ、Ｆｙｎ、Ｌｃｋ）およびＧ－タンパク質アルファサブユニットなどのようなある種のプロテインキナーゼのＮ末端領域内に位置する。そのような二重のアシル化領域は、多くの場合、そのようなタンパク質の最初の１８アミノ酸内に位置し、配列モチーフ、Ｍｅｔ－Ｇｌｙ－Ｃｙｓ－Ｘａａ－Ｃｙｓに一致し、Ｍｅｔは、切断され、Ｇｌｙは、Ｎ－アシル化され、一方のＣｙｓ残基は、Ｓ－アシル化される。Ｇｌｙは、多くの場合、ミリストイル化され、Ｃｙｓは、パルミトイル化することができる。Ｇ－タンパク質ガンマサブユニットおよび他のタンパク質のＣ末端由来のＣ１５またはＣ１０イソプレニル成分を用いて修飾することができる配列モチーフＣｙｓ－Ａｌａ－Ａｌａ－Ｘａａ（いわゆる「ＣＡＡＸボックス」）に一致するアシル化領域（例えばワールドワイドウェブアドレスｅｂｉ．ａｃ．ｕｋ／ｉｎｔｅｒｐｒｏ／ＤｉｓｐｌａｙＩｐｒｏＥｎｔｒｙ？ａｃ＝ＩＰＲ００１２３０）もまた、利用することができる。これらおよび他のアシル化モチーフは、当業者に公知であり（例えばＧａｕｔｈｉｅｒ－Ｃａｍｐｂｅｌｌら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｅｌｌ １５巻：２２０５～２２１７頁（２００４年）；Ｇｌａｂａｔｉら、Ｂｉｏｃｈｅｍ． Ｊ． ３０３巻：６９７～７００頁（１９９４年）、およびＺｌａｋｉｎｅら、Ｊ． Ｃｅｌｌ Ｓｃｉｅｎｃｅ １１０巻：６７３～６７９頁（１９９７年））、膜局在化を誘発するためにキメラ分子中に組み込むことができる。ある実施形態では、アシル化モチーフを含有するタンパク質由来の本来の配列は、キメラタンパク質の中に組み込まれる。例えば、いくつかの実施形態では、そのようなタンパク質由来の最初の２５Ｎ－末端アミノ酸以下のアミノ酸（例えば、任意の突然変異を有する本来の配列の約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）などのような、Ｌｃｋ、Ｆｙｎ、もしくはＹｅｓまたはＧ－タンパク質アルファサブユニットのＮ末端部分は、キメラタンパク質のＮ末端内に組み込まれてもよい。ある実施形態では、ＣＡＡＸボックスモチーフ配列を含有するＧ－タンパク質ガンマサブユニット由来の約２５アミノ酸以下のアミノ酸（例えば、任意の突然

変異を有する本来の配列の約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末端配列は、キメラタンパク質のＣ末端に連結することができる。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、アシル成分は、＋１～＋６の対数ｐ値を有し、時に、＋３～＋４．５の対数ｐ値を有する。対数ｐ値は、疎水性の指標であり、多くの場合、オクタノール／水分配研究に由来し、より高い度数での、オクタノールの中へのより高い疎水性分配を有する分子は、より高い対数ｐ値を有すると特徴付けられる。対数ｐ値は、多くの親油性分子について公開されており、対数ｐ値は、公知の分配プロセスを使用して計算することができる（例えばＣｈｅｍｉｃａｌ　Ｒｅｖｉｅｗｓ、７１巻、６号、５９９頁、エントリー４４９３は、４．２の対数ｐ値を有するラウリン酸を示す）。任意のアシル成分は、上記に記載されるペプチド組成物に連結することができ、公知の方法および以下に記載されるものを使用して、抗菌活性について試験することができる。アシル成分は、時に、例えばＣ１～Ｃ２０アルキル、Ｃ２～Ｃ２０アルケニル、Ｃ２～Ｃ２０アルキニル、Ｃ３～Ｃ６シクロアルキル（ｃｙｃｌａｌｋｙｌ）Ｃ１～Ｃ４ハロアルキル、Ｃ４～Ｃ１２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）アルキルである。任意のアシル含有成分は、時に、脂肪酸であり、脂肪酸成分の例は、プロピル（Ｃ３）、ブチル（Ｃ４）、ペンチル（Ｃ５）、ヘキシル（Ｃ６）、ヘプチル（Ｃ７）、オクチル（Ｃ８）、ノニル（Ｃ９）、デシル（Ｃ１０）、ウンデシル（Ｃ１１）、ラウリル（Ｃ１２）、ミリスチル（Ｃ１４）、パルミチル（Ｃ１６）、ステアリル（Ｃ１８）、アラキジル（Ｃ２０）、ベヘニル（Ｃ２２）、およびリグノセリル成分（Ｃ２４）であり、それぞれの成分は、０、１、２、３、４、５、６、７、または８つの不飽和（つまり二重結合）を含有することができる。アシル成分は、時に、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、セレブロシド）、またはその修飾バージョンなどのような脂質分子である。ある実施形態では、１、２、３、４、または５以上のアシル成分は、膜結合領域に連結される。

【０１１１】

本明細書におけるキメラタンパク質はまた、単一通過または複数回通過膜貫通配列を含んでいてもよい（例えばキメラタンパク質のＮ末端またはＣ末端に）。単一通過膜貫通領域は、ある種の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、ＴＧＦベータ、ＢＭＰ、アクチビン、およびホスファターゼにおいて見つけられる。単一通過膜貫通領域は、多くの場合、約２０～約２５アミノ酸のシグナルペプチド領域および膜貫通領域を含み、これらの多くは、疎水性アミノ酸であり、αヘリックスを形成する。正荷電アミノ酸の短いトラックは、多くの場合、膜中にタンパク質を固着させるために膜貫通スパンに続く。複数回通過タンパク質は、イオンポンプ、イオンチャネル、および輸送体を含み、複数回、膜をわたる２つ以上のヘリックスを含む。すべてまたは実質的にすべての複数回通過タンパク質は、時に、キメラタンパク質中に組み込まれる。単一通過および複数回通過膜貫通領域についての配列は、公知であり、当業者によって、キメラタンパク質分子の中への組み込みのために選択することができる。

【０１１２】

宿主において機能的であり、キメラタンパク質の他のドメインの１つと結合していてもよいまたは結合していなくてもよい任意の膜ターゲティング配列を、用いることができる。いくつかの実施形態では、そのような配列は、ミリストイ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（つまりファルネシル化、ゲラニル－ゲラニル化（ｇｅｒａｎｙｌａｔｉｏｎ）、ＣＡＡＸボックス）、タンパク質－タンパク質相互作用モチーフ、または受容体由来の膜貫通配列（シグナルペプチドを利用する）を含むが、これらに限定されない。例として、例えばｔｅｎ　Ｋｌｏｏｓｔｅｒ　ＪＰら、

Ｂｉｏｌｏｇｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｅｌｌ（２００７年）９９巻、１～１２頁、Ｖｉｎｃｅｎｔ, Ｓ．ら、Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ２１巻：９３６～４０頁、１０９８頁（２００３年）において記載されるものを含む。

【０１１３】

様々な膜でタンパク質保持を増加させることができるさらなるタンパク質ドメインが存在する。例えば、約１２０アミノ酸プレクストリン相同性（ＰＨ）ドメインは、典型的に細胞内シグナル伝達に関与する２００以上のヒトタンパク質中に見つけられる。ＰＨドメインは、膜内の様々なホスファチジルイノシトール（ＰＩ）脂質に結合することができ（例えばＰＩ（３，４，５）－$Ｐ_3$、ＰＩ（３，４）－$Ｐ_2$、ＰＩ（４，５）－$Ｐ_2$）、したがって、異なる膜または細胞コンパートメントにタンパク質を動員する際に重要な役割を果たす。多くの場合、ＰＩ脂質のリン酸化状態は、ＰＩ－３キナーゼまたはＰＴＥＮによってなどのように、調節され、したがって、ＰＨドメインとの膜の相互作用は、アシル脂質によるものほど安定していない。

【０１１４】

Ｅ．選択可能マーカー

ある実施形態では、発現構築物は、発現が、発現構築物中にマーカーを含むことによってｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｉｎ ｖｉｖｏにおいて同定される核酸構築物を含有する。そのようなマーカーは、細胞に同定可能な変化を与え、発現構築物を含有する細胞の簡単な同定を可能にするであろう。通常、薬剤選択マーカーの包含は、クローニングおよび形質転換体の選択を支援する。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、ｚｅｏｃｉｎ、およびヒスチジノールに対する抵抗性を与える遺伝子は、有用な選択可能マーカーである。その代わりに、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ｔｋ）などのような酵素が用いられる。細胞外非シグナル伝達ドメインまたは様々なタンパク質（例えばＣＤ３４、ＣＤ１９、ＬＮＧＦＲ）を含有する免疫性表面マーカーもまた、用いることができ、磁気または蛍光抗体媒介ソーティングのための簡単な方法を可能にする。用いられる選択可能マーカーは、それが、遺伝子産物をコードする核酸と同時に発現させることができる限り、重要であると考えられない。さらなる選択可能マーカーの例は、当業者に周知であり、ＥＧＦＰ、ベーター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）などのようなレポーターを含む。

【０１１５】

Ｆ．制御領域

１．プロモーター

対象のポリヌクレオチド配列の発現を制御するために用いられる特定のプロモーターは、それが標的細胞においてポリヌクレオチドの発現を指示することができる限り、重要であると考えられない。したがって、ヒト細胞が標的とされる場合、ポリヌクレオチド配列コード領域を、ヒト細胞において発現することができるプロモーターに隣接して、プロモーターの制御下に位置づけることが好ましいかもしれない。概して言えば、そのようなプロモーターは、ヒトまたはウイルスプロモーターを含んでいてもよい。

【０１１６】

様々な実施形態では、ヒトサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）前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、およびグリセリンアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼは、対象のコード配列の高レベルの発現を得るために使用することができる。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または哺乳動物細胞または細菌ファージプロモーターの使用は、同様に企図される、ただし、発現のレベルが所与の目的に十分であることを条件とする。周知の特性を有するプロモーターを用いることによって、トランスフェクションまたは形質転換後の対象のタンパク質の発現のレベルおよびパターンは、最適化することができる。

【０１１７】

特異的な生理的または合成シグナルに応じて調節されるプロモーターの選択は、遺伝子

産物の誘発性発現を可能にすることができる。例えば、多重シストロン（ｍｕｌｔｉｃｉｓｔｒｏｎｉｃ）ベクターが利用される場合の導入遺伝子（複数可）の発現が ベクターが産生される細胞に対して毒性である場合、１つまたは複数の導入遺伝子の発現を妨げ、または低下させることは望ましい。プロデューサー細胞株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およびサイトカイン遺伝子である。いくつかの誘発性プロモーター系は、導入遺伝子産物が毒性であるウイルスベクターの産生のために利用可能である（より誘発性のプロモーター中に追加）。

【０１１８】

エクジソン系（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）は、１つのそのような系である。この系は、哺乳動物細胞における対象の遺伝子の発現の調節を可能にするように設計される。それは、２００倍の誘導性を超えるが、事実上、導入遺伝子の基本レベルの発現を可能にしない、緻密に調節される発現メカニズムから成る。系は、Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａのヘテロ二量体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などのようなアナログが受容体に結合する場合、受容体は、プロモーターを活性化して、下流導入遺伝子の発現をオンにし、高レベルのｍＲＮＡの転写が達成される。この系では、ヘテロ二量体受容体の両方の単量体は、１つのベクターから恒常的に発現されるのに対して、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、他のプラスミド上にある。そのため、対象の遺伝子移入ベクターの中へのこのタイプの系の操作は、有用であろう。プロデューサー細胞株における、対象の遺伝子および受容体単量体を含有するプラスミドの同時トランスフェクションは、次いで、潜在的に毒性の導入遺伝子の発現を伴わないで遺伝子移入ベクターの産生を可能にするであろう。適切な時に、導入遺伝子の発現は、エクジソンまたはムリステロン（ｍｕｒｉｓｔｅｒｏｎ）Ａを用いて活性化することができる。

【０１１９】

有用であろう他の誘発性系は、もともとＧｏｓｓｅｎおよびＢｕｊａｒｄによって開発されたＴｅｔ－Ｏｆｆ（商標）またはＴｅｔ－Ｏｎ（商標）系（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ）である（ＧｏｓｓｅｎおよびＢｕｊａｒｄ、Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ、８９巻：５５４７～５５５１頁、１９９２年；Ｇｏｓｓｅｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２６８巻：１７６６～１７６９頁、１９９５年）。この系もまた、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンなどのようなテトラサイクリン誘導体に応じて高レベルの遺伝子発現が調節されることを可能にする。Ｔｅｔ－Ｏｎ（商標）系では、遺伝子発現は、ドキシサイクリンの存在下においてオンにされるのに対して、Ｔｅｔ－Ｏｆｆ（商標）系において、遺伝子発現は、ドキシサイクリンの非存在下においてオンにされる。これらの系は、Ｅ． ｃｏｌｉのテトラサイクリン抵抗性オペロンに由来する２つの調節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。対象の遺伝子は、その中に存在するテトラサイクリン応答性のエレメントを有するプロモーターの後に、プラスミドの中にクローニングされる。第２のプラスミドは、テトラサイクリン制御トランス活性化因子と呼ばれる調節エレメントを含有し、これは、Ｔｅｔ－Ｏｆｆ（商標）系において、単純ヘルペスウイルス由来のＶＰ１６ドメインおよび野生型テトラサイクリン（ｔｅｒｔｒａｃｙｃｌｉｎｅ）リプレッサーから構成される。したがって、ドキシサイクリンの非存在下において、転写は、恒常的にオンの状態である。Ｔｅｔ－Ｏｎ（商標）系において、テトラサイクリンリプレッサーは、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。遺伝子療法ベクター産生のために、Ｔｅｔ－Ｏｆｆ（商標）系は、プロデューサー細胞が、テトラサイクリンまたはドキシサイクリンの存在下において成長し、潜在的に毒性の導入遺伝子の発現を予防することができるが、ベクターが患者に導入された場合、遺伝子発現が恒常的にオンの状態となるように使用されてもよい。

【０１２０】

いくつかの環境では、遺伝子療法ベクターにおいて導入遺伝子の発現を調節することは

望ましい。例えば、様々な強さの活性を有する異なるウイルスプロモーターは、所望の発現のレベルに依存して利用される。哺乳動物細胞では、ＣＭＶ前初期プロモーターは、多くの場合、強力な転写活性化をもたらすために使用される。ＣＭＶプロモーターは、Ｄｏｎｎｅｌｌｙ，　Ｊ．Ｊ．ら、１９９７年　Ａｎｎｕ．　Ｒｅｖ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．．１５巻：６１７～４８頁において考察されている。それほど強力でない、ＣＭＶプロモーターの修正バージョンもまた、導入遺伝子の発現のレベルの低下が所望の場合、使用されてきた。造血細胞における導入遺伝子の発現が所望の場合、ＭＬＶまたはＭＭＴＶ由来のＬＴＲなどのようなレトロウイルスプロモーターが、多くの場合、使用される。所望の結果に依存して使用される他のウイルスプロモーターは、ＳＶ４０、ＲＳＶ　ＬＴＲ、ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２　ＬＴＲ、Ｅ１Ａ、Ｅ２Ａ、またはＭＬＰ領域などに由来するアデノウイルスプロモーター、ＡＡＶ　ＬＴＲ、ＨＳＶ－ＴＫ、ならびにトリ肉腫ウイルスを含む。

【０１２１】

同様に、組織特異的プロモーターは、非標的組織に対する潜在的な毒性または望ましくない影響を低下させるために特異的な組織または細胞において転写を達成するために使用される。これらのプロモーターは、ＣＭＶプロモーターなどのような、より強力なプロモーターと比較して、発現の低下をもたらしてもよいが、また、より限られた発現および免疫原性をもたらしてもよい（Ｂｏｊａｋ，　Ａ．ら、２００２年　Ｖａｃｃｉｎｅ．　２０巻：１９７５～７９頁；Ｃａｚｅａｕｘ．，　Ｎ．ら、２００２年　Ｖａｃｃｉｎｅ　２０巻：３３２２～３１頁）。例えば、ＰＳＡ関連プロモーターもしくは前立腺特異的腺性カリクレインまたは筋肉クレアチンキナーゼ遺伝子などのような組織特異的プロモーターは、適切な場合、使用されてもよい。

【０１２２】

ある種の適用では、遺伝子療法ベクターの投与の後の特定の時に転写を活性化することが望ましい。これは、ホルモンまたはサイトカイン調節可能なものなどのようなプロモーターを用いて行われる。使用することができるサイトカインおよび炎症性タンパク質応答性プロモーターはＫおよびＴキニノーゲン（Ｋａｇｅｙａｍａら、（１９８７年）Ｊ．Ｂｉｏｌ．　Ｃｈｅｍ．、２６２巻、２３４５～２３５１頁）、ｃ－ｆｏｓ、ＴＮＦ－アルファ、Ｃ－反応性タンパク質（Ａｒｃｏｎｅら、（１９８８年）Ｎｕｃｌ．　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．、１６巻（８号）、３１９５～３２０７頁）、ハプトグロビン（Ｏｌｉｖｉｅｒｏら、（１９８７年）ＥＭＢＯ　Ｊ．、６巻、１９０５～１９１２頁）、血清アミロイドＡ２、Ｃ／ＥＢＰアルファ、ＩＬ－１、ＩＬ－６（ＰｏｌｉおよびＣｏｒｔｅｓｅ、（１９８９年）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８６巻、８２０２～８２０６頁）、補体Ｃ３（Ｗｉｌｓｏｎら、（１９９０年）Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ．　Ｂｉｏｌ．、６１８１～６１９１頁）、ＩＬ－８およびアルファ－１酸性糖タンパク質（ＰｒｏｗｓｅおよびＢａｕｍａｎｎ、（１９８８年）Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ、８巻、４２～５１頁）、アルファ－１抗トリプシン、リポタンパク質リパーゼ（Ｚｅｃｈｎｅｒら、Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ．　Ｂｉｏｌ．、２３９４～２４０１頁、１９８８年）アンギオテンシノゲン（Ｒｏｎら、（１９９１年）Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ．　Ｂｉｏｌ．、２８８７～２８９５頁）、フィブリノーゲン、ｃ－ｊｕｎ（ホルボールエステル、ＴＮＦ－アルファ、ＵＶ照射、レチノイン酸、および過酸化水素によって誘発性）、コラゲナーゼ（ホルボールエステルおよびレチノイン酸によって誘発される）、メタロチオネイン（重金属およびグルココルチコイド誘発性）、ストロメライシン（ホルボールエステル、インターロイキン－１、およびＥＧＦによって誘発性）、アルファ－２マクログロブリン、ならびにアルファ－１抗キモトリプシンを含む。他のプロモーターは、例えば、ＳＶ４０、ＭＭＴＶ、ヒト免疫不全ウイルス（ＭＶ）、モロニーウイルス、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、ミオシン、ヘモグロビン、およびクレアチンを含む。

【０１２３】

上記のプロモーターのいずれも、単独でまたは他のものと組み合わせて、所望の作用に

依存して有用となり得ることが認識される。プロモーターおよび他の調節エレメントは、それらが所望の細胞または組織において機能的となるように、当業者らによって選択される。さらに、プロモーターのこの列挙は、網羅的なまたは限定するものとして解釈されるべきでなく、当業者らは、本明細書において開示されるプロモーターおよび方法と共に使用される他のプロモーターを知っているであろう。

【０１２４】

２．エンハンサー

エンハンサーは、ＤＮＡの同じ分子上の離れた位置に配置される、プロモーターからの転写を増加させる遺伝エレメントである。以前の例は、共に、コード配列の側面に位置し、いくつかのイントロン内に生じる、免疫グロブリンおよびＴ細胞受容体と関連するエンハンサーを含む。ＣＭＶ、ＳＶ４０、およびレトロウイルスＬＴＲなどのような多くのウイルスプロモーターは、エンハンサー活性と密接に関連し、多くの場合、単一エレメントのように処理される。エンハンサーは、プロモーターのように非常に組織化されている。すなわち、それらは、多くの個々のエレメントから構成され、これらのそれぞれは、１つまたは複数の転写タンパク質に結合する。エンハンサーおよびプロモーターの基本的な特徴は、使用可能である。エンハンサー領域は、全体として、離れておよび多くの場合、方向づけと無関係に転写を刺激することができなければならず、これは、プロモーター領域またはその成分エレメントに当てはまる必要はない。他方では、プロモーターは、特定の部位でおよび特定の方向づけでＲＮＡ合成の開始を指示する１つまたは複数のエレメントを有していなければならないが、エンハンサーは、これらの特異性を欠く。プロモーターおよびエンハンサーは、多くの場合、重複し、近接しており、多くの場合、非常に類似するモジュール構造を有するように思われる。エンハンサーのサブセットは、ゲノムの中に統合された場合、転写活性を増加させることができるだけでなく、（インスレーターエレメントを用いて）隣接配列由来の転写エレメントを遮断するのを支援することができる、座制御領域（ＬＣＲ）である。

【０１２５】

任意のプロモーター／エンハンサー組合せ（真核生物プロモーターデータベースＥＰＤＢにより）は、多くが、特定の組織型または組織のサブセットに発現を限るが、遺伝子の発現を駆動するために使用することができる（例えばＫｕｔｚｌｅｒ，　Ｍ．Ａ．およびＷｅｉｎｅｒ，　Ｄ．Ｂ．、２００８年　Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　９巻：７７６～８８頁において考察されている）。例として、ヒトアクチン、ミオシン、ヘモグロビン、筋肉クレアチンキナーゼ配列由来のならびにウイルスＣＭＶ、ＲＳＶ、およびＥＢＶ由来のエンハンサーを含むが、これらに限定されない。当業者らは、特定の適用に適切なエンハンサーを選択することができるであろう。真核細胞は、送達複合体の一部としてまたはさらなる遺伝子発現構築物として適切な細菌ポリメラーゼが提供される場合、ある種の細菌プロモーターからの細胞質転写を支持することができる。

【０１２６】

３．ポリアデニル化シグナル

ｃＤＮＡ挿入物が用いられる場合、遺伝子転写物の適切なポリアデニル化を達成するためのポリアデニル化シグナルを含むことが典型的に望まれるであろう。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明の方法の実施の成功にとって重大であると考えられず、ヒトまたはウシ成長ホルモンおよびＳＶ４０ポリアデニル化シグナルおよびＬＴＲポリアデニル化シグナルなどのような任意のそのような配列が用いられる。非限定的な１つの例は、ｐＣＥＰ３プラスミド中に存在するＳＶ４０ポリアデニル化シグナルである（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）。ターミネーターもまた、発現カセットのエレメントとして企図される。これらのエレメントは、メッセージレベルを増強し、かつカセットから他の配列への読み過ごしを最小限にするように果たし得る。終止またはポリ（Ａ）シグナル配列は、例えば、ｍＲＮＡの３’末端の保存配列（ＡＡＵＡＡＡ）から約１１～３０ヌクレオチド下流に位置づけられてもよい（Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙ，Ｄ．Ｌ．ら、１９９３年　ＤＮＡ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．　１２巻：７７７～８３頁；Ｋ

ｕｔｚｌｅｒ，　Ｍ．Ａ．およびＷｅｉｎｅｒ，　Ｄ．Ｂ．、２００８年　Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖ．　Ｇｅｎ．　９巻：７７６～８８頁）。

【０１２７】

４．開始シグナルおよび内部リボソーム結合部位

特異的な開始シグナルもまた、コード配列の効率的な翻訳のために必要とされてもよい。これらのシグナルは、ＡＴＧ開始コドンまたは隣接配列を含む。ＡＴＧ開始コドンを含む外因性翻訳制御シグナルが提供される必要があってもよい。当業者は、これを容易に決定し、必要なシグナルを提供することができるであろう。開始コドンは、全挿入物の翻訳を確実にするために、所望のコード配列のリーディングフレームと共に、インフレームでなければならないことが周知である。外因性翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然または合成のものとすることができる。発現の効率は、適切な転写エンハンサーエレメントの包含によって増強されてもよい。

【０１２８】

ある実施形態では、内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）エレメントの使用は、多重遺伝子または多シストロン性メッセージを作るために使用される。ＩＲＥＳエレメントは、５’メチル化キャップ依存的翻訳のリボソームスキャニングモデルを回避し、内部部位で翻訳を始めることができる（ＰｅｌｌｅｔｉｅｒおよびＳｏｎｅｎｂｅｒｇ、Ｎａｔｕｒｅ、３３４巻：３２０～３２５頁、１９８８年）。ピコルナウイルスファミリーの２つのメンバー由来のＩＲＥＳエレメント（ｐｏｌｉｏおよびｅｎｃｅｐｈａｌｏｍｙｏｃａｒｄｉｔｉｓ）（ＰｅｌｌｅｔｉｅｒおよびＳｏｎｅｎｂｅｒｇ、１９８８年）、加えて、哺乳動物メッセージ由来のＩＲＥＳ（ＭａｃｅｊａｋおよびＳａｒｎｏｗ、Ｎａｔｕｒｅ、３５３巻：９０～９４頁、１９９１年）が記載されている。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。多数のオープンリーディングフレームは、共に転写することができ、それぞれがＩＲＥＳによって分離され、多シストロン性伝令ＲＮＡを作る。ＩＲＥＳエレメントによって、それぞれのオープンリーディングフレームは、効率的な翻訳のためにリボソームに到達できる。多数の遺伝子は、単一のメッセージを転写するために単一のプロモーター／エンハンサーを使用して効率的に発現することができる（米国特許第５，９２５，５６５号および第５，９３５，８１９号を参照されたい。それぞれが、参照によって本明細書において組み込まれる）。

【０１２９】

Ｇ．配列最適化

タンパク質産生はまた、導入遺伝子中のコドンを最適化することによって増加されてもよい。当業者らに公知の種特異的コドン変化は、タンパク質産生を増加させるために使用されてもよい。また、コドンは、最適化されたＲＮＡを産生するために最適化されてもよく、これは、より効率的な翻訳をもたらしてもよい。ＲＮＡ中に組み込まれることとなるコドンを最適化することによって、不安定性を引き起こす二次構造をもたらすものなどのようなエレメント、例えばリボソーム結合を阻害し得る二次ｍＲＮＡ構造、またはｍＲＮＡの核外輸送を阻害し得る潜在性配列を除去することができる（Ｋｕｔｚｌｅｒ，　Ｍ．Ａ．およびＷｅｉｎｅｒ，　Ｄ．Ｂ．、２００８年　Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖ．　Ｇｅｎ．　９巻：７７６～８８頁；Ｙａｎ．，　Ｊ．ら、２００７年　Ｍｏｌ．　Ｔｈｅｒ．　１５巻：４１１～２１頁；Ｃｈｅｕｎｇ，　Ｙ．Ｋ．ら、２００４年　Ｖａｃｃｉｎｅ　２３巻：６２９～３８頁；Ｎａｒｕｍ．，　Ｄ．Ｌ．ら、２００１年　６９巻：７２５０～５５頁；Ｙａｄａｖａ，　Ａ．およびＯｃｋｅｎｈｏｕｓｅ，　Ｃ．Ｆ．、２００３年　Ｉｎｆｅｃｔ．　Ｉｍｍｕｎ．　７１巻：４９６２～６９頁；Ｓｍｉｔｈ．，　Ｊ．Ｍ．ら、２００４年　ＡＩＤＳ　Ｒｅｓ．　Ｈｕｍ．　Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ　２０巻：１３３５～４７頁；Ｚｈｏｕ，　Ｗ．ら、２００２年　Ｖｅｔ．　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．　８８巻：１２７～５１頁；Ｗｕ，　Ｘ．ら、２００４年　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．　Ｒｅｓ．　Ｃｏｍｍｕｎ．　３１３巻：８９～９６頁；Ｚｈａｎｇ，　Ｗ．ら、２００６年　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｂｉｏｐｈｙｓ．　Ｒｅｓ．　Ｃｏｍｍｕｎ．　３４９巻：６９～７８頁；Ｄｅｍｌ，　Ｌ．Ａ．ら、２００１年　Ｊ．　Ｖｉｒｏｌ．　７５

巻：１０９９～１１００１頁；Ｓｃｈｎｅｉｄｅｒ，Ｒ．Ｍ．ら、１９９７年Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７１巻：４８９２～４９０３頁；Ｗａｎｇ，Ｓ．Ｄ．ら、２００６年Ｖａｃｃｉｎｅ２４巻：４５３１～４０頁；ｚｕｒ Ｍｅｇｅｄｅ，Ｊ．ら、２００年Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．７４巻：２６２８～２６３５頁）。

【０１３０】

Ｈ．リーダー配列

リーダー配列は、ｍＲＮＡの安定性を増強し、より効率的な翻訳をもたらすために、当業者らに公知のものとして、追加されてもよい。リーダー配列は、小胞体にｍＲＮＡを向けることに通常、関与する。例として、それ自体の切断を遅らせる、ＨＩＶ－１外被糖タンパク質（Ｅｎｖ）のためのシグナル配列およびＩｇＥ遺伝子リーダー配列を含む（Ｋｕｔｚｌｅｒ，Ｍ．Ａ．およびＷｅｉｎｅｒ，Ｄ．Ｂ．、２００８年Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｇｅｎ．９巻：７７６～８８頁；Ｌｉ，Ｖ．ら、２０００年Ｖｉｒｏｌｏｇｙ２７２巻：４１７～２８頁；Ｘｕ，Ｚ．Ｌ．ら２００１年Ｇｅｎｅ２７２巻：１４９～５６頁；Ｍａｌｉｎ，Ａ．Ｓ．ら、２０００年Ｍｉｃｒｏｂｅｓ Ｉｎｆｅｃｔ．２巻：１６７７～８５頁；Ｋｕｔｚｌｅｒ，Ｍ．Ａ．ら、２００５年Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７５巻：１１２～１２５頁；Ｙａｎｇ．，Ｊ．Ｓ．ら、２００２年Ｅｍｅｒｇ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．８巻：１３７９～８４頁；Ｋｕｍａｒ．，Ｓ．ら、２００６年ＤＮＡ Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．２５巻：３８３～９２頁；Ｗａｎｇ，Ｓ．ら、２００６年Ｖａｃｃｉｎｅ２４巻：４５３１～４０頁）。ＩｇＥリーダーは、小胞体の中への挿入を増強するために使用されてもよい（Ｔｅｐｌｅｒ，Ｉら（１９８９年）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６４巻：５９１２頁）。

【０１３１】

導入遺伝子の発現は、当業者らに公知の、発現を最適化するための適切な方法の選択によって最適化されてもよいおよび／または制御されてもよい。これらの方法は、例えば、プロモーター、送達方法、および遺伝子配列の最適化を含む（例えば、Ｌａｄｄｙ，Ｄ．Ｊ．ら、２００８年ＰＬｏＳ．ＯＮＥ３巻ｅ２５１７頁；Ｋｕｔｚｌｅｒ，Ｍ．Ａ．およびＷｅｉｎｅｒ，Ｄ．Ｂ．、２００８年Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．Ｇｅｎ．９巻：７７６～８８頁において提示される）。

【０１３２】

遺伝子移入の方法

細胞における導入遺伝子発現の効果を媒介するために、細胞の中に発現構築物を移入することが必要であろう。そのような移入は、遺伝子移入のウイルスまたは非ウイルス方法を用いてもよい。この節は、遺伝子移入の方法および組成物の議論を提供する。

【０１３３】

発現ベクターを含む形質転換細胞は、細胞の中に発現ベクターを導入することによって生成される。現在の方法と共に使用するための、細胞小器官、細胞、組織、または生物の形質転換のためのポリヌクレオチド送達のために適した方法は、本明細書において記載され、または当業者に公知である、ポリヌクレオチド（例えばＤＮＡ）を細胞小器官、細胞、組織、または生物の中に導入することができる任意の方法を事実上、含む。

【０１３４】

宿主細胞は、ベクターのためのレシピエントとして使用することができ、使用されてきた。宿主細胞は、所望の結果が、ベクターの複製またはベクターコードポリヌクレオチド配列の一部もしくはすべての発現かどうかに依存して、原核生物または真核生物に由来してもよい。多数の細胞株および培養物は、宿主細胞として使用するために入手可能であり、それらは、生きている培養物および遺伝物質のための記録保管所として果たす組織であるＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）を通して得ることができる。特定の実施形態では、宿主細胞は、抗原提示細胞である樹状細胞である。

【０１３５】

適切な宿主を決定することは、十分に、当業者の知識および技術の範囲内にある。一般

に、これは、ベクターバックボーンおよび所望の結果に基づく。プラスミドまたはコスミドは、例えば、多くのベクターの複製のために原核生物宿主細胞の中に導入することができる。ベクター複製および／または発現のために宿主細胞として使用される細菌細胞は、ＤＨ５アルファ、ＪＭ１０９、およびＫＣ８ならびにＳＵＲＥ（登録商標） Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ ＣｅｌｌおよびＳＯＬＯＰＡＣＫ Ｇｏｌｄ Ｃｅｌｌ（ＳＴＲＡＴＡＧＥＮＥ（登録商標）、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）などのような、多くの市販で入手可能な細菌宿主を含む。その代わりに、Ｅ．ｃｏｌｉ ＬＥ３９２などのような細菌細胞は、ファージウイルスのための宿主細胞として使用することができる。宿主細胞として使用することができる真核細胞は、酵母、昆虫、および哺乳動物を含むが、これらに限定されない。ベクターの複製および／または発現のための哺乳動物真核生物の宿主細胞の例は、ＨｅＬａ、ＮＩＨ３Ｔ３、Ｊｕｒｋａｔ、２９３、ＣＯＳ、ＣＨＯ、Ｓａｏｓ、およびＰＣ１２を含むが、これらに限定されない。酵母株の例は、ＹＰＨ４９９、ＹＰＨ５００、およびＹＰＨ５０１を含むが、これらに限定されない。

【０１３６】

核酸ワクチンは、当業者らに公知であり、例えば、非ウイルスＤＮＡベクター、「裸の」ＤＮＡおよびＲＮＡ、ならびにウイルスベクターを含む。これらのワクチンを細胞に形質転換し、これらのワクチン中に含まれる遺伝子の発現を最適化するための方法は、公知であり、また、本明細書においても議論される。

【０１３７】

Ａ．核酸またはウイルスベクター移入の方法の例

１．ｅｘ ｖｉｖｏ形質転換

ｅｘ ｖｉｖｏ環境において、生物から摘出される血管細胞および組織にトランスフェクトするための方法は、当業者らに公知である。例えば、イヌ内皮細胞は、レトロウイルス遺伝子移入によってｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて遺伝的に改変され、イヌの中に移植された（Ｗｉｌｓｏｎら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４巻：１３４４～１３４６頁、１９８９年）。他の例において、Ｙｕｃａｔａｎ ｍｉｎｉｐｉｇ内皮細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいてレトロウイルスがトランスフェクトされ、ダブルバルーンカテーテルを使用して、動脈の中に移植された（Ｎａｂｅｌら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４巻（４９１０号）：１３４２～１３４４頁、１９８９年）。したがって、細胞または組織は、摘出され、本明細書において提示されるポリヌクレオチドを使用してｅｘ ｖｉｖｏにおいてトランスフェクトされてもよいことが企図される。特定の態様では、移植細胞または組織は、生物の中に配置されてもよい。したがって、動物から樹状細胞を単離し、発現ベクターを細胞に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動物に投与して戻すことは、十分に、当業者の知識の範囲内にある。

【０１３８】

２．注射

ある実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば皮下に、皮内に、筋肉内に、静脈内に、腹腔内になどのように、１回または複数回の注射（つまり針注射）を介して細胞小器官、細胞、組織、または生物に送達されてもよい。ワクチンの注射の方法は、当業者らに周知である（例えば、食塩水を含む組成物の注射）。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によるポリヌクレオチドの導入を含む。使用される発現ベクターの量は、抗原の性質および使用される細胞小器官、細胞、組織、または生物で変わってもよい。

【０１３９】

皮内注射、結節内（ｉｎｔｒａｎｏｄａｌ）注射、またはリンパ内注射は、ＤＣ投与の、より一般に使用される方法のうちのいくつかである。皮内注射は、血流の中への低い吸収速度であるが、リンパ系の中への急速な取り込みによって特徴付けられる。真皮における、多くのランゲルハンス樹状細胞の存在は、そのままのおよび処理された抗原を流入領域リンパ節に輸送するであろう。適切な部位の処理は、これを正確に実行するのに必要である（つまり、体毛は適切な針の配置を確認するために切られなければならない）。結節

内注射は、リンパ組織への抗原の直接的な送達を可能にする。リンパ内注射は、ＤＣの直接的な投与を可能にする。

【０１４０】

３．エレクトロポレーション

ある実施形態では、ポリヌクレオチドは、エレクトロポレーションを介して細胞小器官、細胞、組織、または生物の中に導入される。エレクトロポレーションは、高電圧放電への細胞の浮遊液およびＤＮＡの曝露を含む。この方法のいくつかの変形では、ペクチン分解酵素などのようなある種の植物細胞壁分解酵素は、未処理細胞よりも、エレクトロポレーションによる形質転換に対して標的レシピエント細胞を、より感受性にするために用いられる（参照によって本明細書において組み込まれる米国特許第５，３８４，２５３号）。

【０１４１】

エレクトロポレーションを使用する真核細胞のトランスフェクションは、完全に成功してきた。このようにして、マウスプレＢリンパ球は、ヒトカッパ免疫グロブリン遺伝子がトランスフェクトされ（Ｐｏｔｔｅｒら、（１９８４年）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８１巻、７１６１～７１６５頁）、ラット肝細胞は、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がトランスフェクトされた（Ｔｕｒ－Ｋａｓｐａら、（１９８６年）Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．、６巻、７１６～７１８頁）。

【０１４２】

４．リン酸カルシウム

他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、リン酸カルシウム沈降を使用して、細胞に導入される。ヒトＫＢ細胞は、この技術を使用してアデノウイルス５　ＤＮＡがトランスフェクトされた（Ｇｒａｈａｍおよびｖａｎ　ｄｅｒ　Ｅｂ、（１９７３年）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、５２巻、４５６～４６７頁）。さらに、このようにして、マウスＬ（Ａ９）、マウスＣ１２７、ＣＨＯ、ＣＶ－１、ＢＨＫ、ＮＩＨ３Ｔ３、およびＨｅＬａ細胞は、ネオマイシンマーカー遺伝子がトランスフェクトされ（ＣｈｅｎおよびＯｋａｙａｍａ、Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．、７巻（８号）：２７４５～２７５２頁、１９８７年）、ラット肝細胞は、様々なマーカー遺伝子がトランスフェクトされた（Ｒｉｐｐｅら、Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．、１０巻：６８９～６９５頁、１９９０年）。

【０１４３】

５．ＤＥＡＥ－デキストラン

他の実施形態では、ポリヌクレオチドは、ＤＥＡＥ－デキストラン、その後にポリエチレングリコールを使用して、細胞の中に送達される。このようにして、レポータープラスミドは、マウス骨髄腫および赤白血病の細胞の中に導入された（Ｇｏｐａｌ，　Ｔ．Ｖ．、Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．　１９８５年５月；５巻（５号）：１１８８～９０頁）。

【０１４４】

６．超音波処理負荷（ｓｏｎｉｃａｔｉｏｎ　ｌｏａｄｉｎｇ）

さらなる実施形態は、直接的な音波負荷（ｓｏｎｉｃ　ｌｏａｄｉｎｇ）によるポリヌクレオチドの導入を含む。ＬＴＫ線維芽細胞は、超音波処理負荷によってチミジンキナーゼ遺伝子がトランスフェクトされた（Ｆｅｃｈｈｅｉｍｅｒら、（１９８７年）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８４巻、８４６３～８４６７頁）。

【０１４５】

７．リポソーム媒介トランスフェクション

さらなる実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えばリポソームなどのような脂質複合体中に封入されてもよい。リポソームは、リン脂質二重層膜および内部水性媒体によって特徴付けられる小胞構造である。多重膜リポソームは、水性媒体によって分離される、多数の脂質層を有する。リン脂質が過剰な水溶液中に懸濁される場合、それらは、自然に形成される。脂質成分は、閉鎖構造の形成前に自己再配列を受け、脂質二重層の間に水およ

び溶解された溶質を封入する（ＧｈｏｓｈおよびＢａｃｈｈａｗａｔ、（１９９１年）Ｉｎ：Ｌｉｖｅｒ Ｄｉｓｅａｓｅｓ，Ｔａｒｇｅｔｅｄ Ｄｉａｇｎｏｓｉｓ ａｎｄ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｕｓｉｎｇ Ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ ａｎｄ Ｌｉｇａｎｄｓ．８７～１０４頁）。Ｌｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）またはＳｕｐｅｒｆｅｃｔ（Ｑｉａｇｅｎ）と複合体を形成したポリヌクレオチドもまた、企図される。

【０１４６】

８．受容体媒介トランスフェクション

さらに、ポリヌクレオチドは、受容体媒介送達媒介物を介して標的細胞に送達されてもよい。これらは、標的細胞中に生じるであろう受容体媒介エンドサイトーシスによる巨大分子の選択的な取り込みを利用する。様々な受容体の細胞型特異的分布を考慮して、この送達方法は、他の特異性を付加する。

【０１４７】

ある種の受容体媒介遺伝子ターゲティング媒介物は、細胞受容体特異的リガンドおよびポリヌクレオチド結合剤を含む。他のものは、送達されることとなるポリヌクレオチドが作動可能に結合された細胞受容体特異的リガンドを含む。いくつかのリガンドは、受容体媒介遺伝子移入のために使用されており（ＷｕおよびＷｕ、（１９８７年）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．、２６２巻、４４２９～４４３２頁；Ｗａｇｎｅｒら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８７巻（９号）：３４１０～３４１４頁、１９９０年；Ｐｅｒａｌｅｓら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９１巻：４０８６～４０９０頁、１９９４年；Ｍｙｅｒｓ、ＥＰＯ ０２７３０８５）、これは、技術の操作性を確立する。他の哺乳動物細胞型との関連における特異的な送達が記載されてきた（ＷｕおよびＷｕ、Ａｄｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖｅｒｙ Ｒｅｖ．、１２巻：１５９～１６７頁、１９９３年；参照によって本明細書において組み込まれる）。ある態様では、リガンドは、標的細胞集団上に特異的に発現される受容体に対応させるように選ばれる。

【０１４８】

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介物のポリヌクレオチド送達媒介物成分は、リポソームと組み合わせた特異的な結合リガンドを含んでいてもよい。送達されることとなるポリヌクレオチド（複数可）は、リポソーム内に含まれ、特異的な結合リガンドは、リポソーム膜の中に機能的に組み込まれる。したがって、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、細胞に内容物を送達するであろう。そのような系は、例えば、上皮増殖因子（ＥＧＦ）が、ＥＧＦ受容体のアップレギュレーションを示す細胞へのポリヌクレオチドの受容体媒介送達において使用される系を使用して、機能的であることが示されてきた。

【０１４９】

さらなる実施形態において、標的とされる送達媒介物のポリヌクレオチド送達媒介物成分は、例えば、細胞特異的結合を指示する１つまたは複数の脂質または糖タンパク質を含んでいてもよいリポソーム自体であってもよい。例えば、ラクトシルーセラミド、ガラクトース末端アシアロガングリオシドは、リポソームの中に組み込まれ、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加が確認されてきた（Ｎｉｃｏｌａｕら、（１９８７年）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．、１４９巻、１５７～１７６頁）。組織特異的形質転換構築物は、類似する方法で標的細胞の中に特異的に送達されてもよいことが企図される。

【０１５０】

９．微粒子銃

微粒子銃技術は、少なくとも１つの細胞小器官、細胞、組織、または生物の中にポリヌクレオチドを導入するために使用することができる（米国特許第５，５５０，３１８号；米国特許第５，５３８，８８０号；米国特許第５，６１０，０４２号；およびＰＣＴ出願ＷＯ ９４／０９６９９；それぞれが参照によって本明細書において組み込まれる）。この方法は、ＤＮＡコート微粒子を高速度まで加速するための能力に依存し、それらが細胞

膜を貫通し、かつそれらを死滅させることなく細胞に入ることを可能にする（Ｋｌｅｉｎら、（１９８７年）Ｎａｔｕｒｅ、３２７巻、７０～７３頁）。当技術分野において公知の種々様々の微粒子銃技術があり、これらの多くは、本発明の方法に適用可能である。

【０１５１】

この微粒子銃では、１つまたは複数の粒子は、少なくとも１つのポリヌクレオチドを用いてコートされ、推進力によって細胞の中に送達されてもよい。小さな粒子を加速するためのいくつかのデバイスが、開発されている。そのような１つのデバイスは、電流を生成するために高電圧放電に依存し、これは、引き続いて原動力を提供する（Ｙａｎｇら、（１９９０年）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８７巻、９５６８～９５７２頁）。使用される微粒子は、タングステンもしくはゴールド粒子またはビーズなどのような生物学的に不活性の物質から成った。例示的な粒子は、タングステン、白金、およびある例ではゴールドから成るものを含む。いくつかの実例では、金属粒子上へのＤＮＡ沈降は、微粒子銃を使用する、レシピエント細胞へのＤＮＡ送達に必要ではないであろうということが企図される。しかしながら、ＤＮＡを用いてコートされるのではなく、粒子がＤＮＡを含有していてもよいことが企図される。ＤＮＡコート粒子は、粒子銃を介してのＤＮＡ送達のレベルを増加させてもよいが、それら自身およびそれらだけでは必要とならない。

【０１５２】

Ｂ．ウイルスベクター媒介移入の方法の例

ある実施形態では、導入遺伝子は、細胞への遺伝子移入を媒介するために、ウイルス粒子の中に組み込まれる。典型的に、ウイルスは、生理的条件下で適切な宿主細胞に単に曝露され、ウイルスの取り込みを可能にするであろう。本発明の方法は、下記に議論されるように、様々なウイルスベクターを使用して有利に用いられる。

【０１５３】

１．アデノウイルス

アデノウイルスは、その中型のＤＮＡゲノム、操作の容易性、高い力価、広い標的細胞範囲、および高い感染力のために遺伝子移入ベクターとしての使用に特に適している。約３６ｋｂのウイルスゲノムは、１００～２００塩基対（ｂｐ）逆位末端配列（ＩＴＲ）によって境界をつけられ、ウイルスＤＮＡ複製およびパッケージングに必要なシス作用エレメントが含有されている。異なる転写単位を含有するゲノムの初期（Ｅ）および後期（Ｌ）領域は、ウイルスＤＮＡ複製の開始によって分けられる。

【０１５４】

Ｅ１領域（Ｅ１ＡおよびＥ１Ｂ）は、ウイルスゲノムおよび少数の細胞遺伝子の転写の調節を担うタンパク質をコードする。Ｅ２領域（Ｅ２ＡおよびＥ２Ｂ）の発現は、ウイルスＤＮＡ複製のためのタンパク質の合成をもたらす。これらのタンパク質はＤＮＡ複製、後期遺伝子発現、宿主細胞の停止に関与する（Ｒｅｎａｎ，　Ｍ．　Ｊ．（１９９０年）Ｒａｄｉｏｔｈｅｒ　Ｏｎｃｏｌ．、１９巻、１９７～２１８頁）。大多数のウイルスカプシドタンパク質を含む後期遺伝子（Ｌ１、Ｌ２、Ｌ３、Ｌ４、およびＬ５）の産物は、主な後期プロモーター（ＭＬＰ）によって生じた単一の主要な転写物の著しい処理の後にのみ発現される。ＭＬＰ（１６．８マップ単位の位置する）は、感染症の後期の間に特に効率的であり、このプロモーターから生じたｍＲＮＡはすべて、５’三連リーダー（ｔｒｉｐａｒｔｉｔｅ　ｌｅａｄｅｒ）（ＴＬ）配列を有し、これは、それらを翻訳に有用にする。

【０１５５】

アデノウイルスが遺伝子療法のために最適化されるために、ＤＮＡの大きなセグメントを含むことができるように運搬能を最大限にすることが必要である。ある種のアデノウイルス産物と関連する毒性および免疫反応を低下させることもまた非常に望ましい。２つの目標は、アデノウイルス遺伝子の除去が両方の目的を果たすという点で、ある程度、一致している。本発明の方法の実施によって、比較的容易に、治療用構築物を操作するための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。

【０１５６】
ＤＮＡの大規模な置換は、ウイルスＤＮＡ複製に必要とされるシスエレメントが、すべて、線状ウイルスゲノムのどちらかの末端の逆位末端配列（ＩＴＲ）（１００～２００ｂｐ）中に局在化するので、可能である。ＩＴＲを含有するプラスミドは、非欠損アデノウイルスの存在下において複製することができる（Ｈａｙ，　Ｒ．Ｔ．ら、Ｊ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ．　１９８４年6月5日；１７５巻（４号）：４９３～５１０頁）。そのため、アデノウイルスベクターにおけるこれらのエレメントの包含は、複製を可能にするはずである。
【０１５７】
さらに、ウイルス封入の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）の間に局在化する（Ｈｅａｒｉｎｇら、Ｊ．（１９８７年）Ｖｉｒｏｌ．、６７巻、２５５５～２５５８頁）。このシグナルは、バクテリオファージラムダＤＮＡ中のタンパク質認識部位に似ており、左端に近いが、付着末端配列の外部の特異的配列が、頭部構造の中へのＤＮＡの挿入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）断片が２９３細胞においてパッケージングを指示することができたことを実証した（Ｌｅｖｒｅｒｏら、Ｇｅｎｅ、１０１巻：１９５～２０２頁、１９９１年）。
【０１５８】
以前に、アデノウイルスのゲノムのある種の領域を、哺乳動物細胞のゲノムの中に組み込むことができ、それによって、コードされた遺伝子を発現させることができたことが示された。これらの細胞株は、細胞株によってコードされるアデノウイルスの機能が欠乏したアデノウイルスベクターの複製を支持することができる。ベクター、例えば野生型ウイルスまたは条件的に欠損の突然変異体を「支援する」ことによる、複製欠乏アデノウイルスベクターの補完の報告もまたある。
【０１５９】
複製欠乏アデノウイルスベクターは、ヘルパーウイルスによってトランスで補完することができる。しかしながら、複製機能を提供するために必要であるヘルパーウイルスの存在が、あらゆる調製物を汚染するので、この知見のみでは、複製欠乏ベクターの単離を可能にしない。したがって、複製欠乏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追加する、さらなるエレメントが必要であった。そのエレメントは、アデノウイルスのパッケージング機能に由来する。
【０１６０】
アデノウイルスのため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中に存在することが示された（Ｔｉｂｂｅｔｔｓら（１９７７年）Ｃｅｌｌ、１２巻、２４３～２４９頁）。後の研究は、ゲノムのＥ１Ａ（１９４～３５８ｂｐ）領域中に欠失を有する突然変異体が、初期（Ｅ１Ａ）機能を補完した細胞株中でさえ不十分にしか成長しなかったことを示した（ＨｅａｒｉｎｇおよびＳｈｅｎｋ（１９８３年）Ｊ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．　１６７巻、８０９～８２２頁）。代償アデノウイルスＤＮＡ（０～３５３ｂｐ）が突然変異体の右端の中に組換えられた場合、ウイルスは正常にパッケージされた。さらなる突然変異分析により、Ａｄ５ゲノムの左端中に短く、繰り返される、位置依存的エレメントが同定された。繰り返しの１つのコピーは、ゲノムのどちらかの末端に存在するが、Ａｄ５　ＤＮＡ分子の内部の方に移動しない場合、効率的なパッケージングに十分であることが分かった（Ｈｅａｒｉｎｇら、Ｊ．（１９８７年）Ｖｉｒｏｌ．、６７巻、２５５５～２５５８頁）。
【０１６１】
パッケージングシグナルの突然変異バージョンを使用して、様々な効率でパッケージされるヘルパーウイルスを作ることが可能である。典型的に、突然変異は、点突然変異または欠失である。低効率パッケージングを有するヘルパーウイルスが、ヘルパー細胞中で成長する場合、野生型ウイルスと比較して低下した速度にもかかわらず、ウイルスは、パッ

ケージされ、それによってヘルパーの増殖を可能にする。しかしながら、これらのヘルパーウイルスが野生型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中で成長する場合、野生型パッケージングシグナルは、突然変異バージョンに対して優先的に認識される。限られた量のパッケージング因子を考慮すると、野生型シグナルを含有するウイルスは、ヘルパーと比較した場合、選択的にパッケージされる。優先度が十分に大きい場合、均質に近づく株が達成されるはずである。

【０１６２】

特定の組織または種に対するＡＤＶ構築物のトロピズムを改善するために、受容体結合ファイバー配列は、多くの場合、アデノウイルスの分離株の間で置換することができる。例えばアデノウイルス５において見つけられたコクサッキー－アデノウイルス受容体（ＣＡＲ）リガンドは、アデノウイルス３５由来のＣＤ４６結合ファイバー配列と置換し、ヒト造血細胞に対する非常に改善された結合親和性を有するウイルスを作製することができる。結果として生じる「シュードタイプ」ウイルス、Ａｄ５ｆ３５は、いくつかの臨床的に開発されたウイルス分離株の基礎となってきた。さらに、様々な生化学的方法が、樹状細胞などのような標的細胞に対するウイルスの再ターゲティングを可能にするためにファイバーを修飾するために存在する。方法は、二機能性抗体の使用（ＣＡＲリガンドに結合する一方の末端および標的配列に結合する一方の末端）ならびに注文生産されたアビジンベースのキメラリガンドとの結合を可能にするための、ファイバーの代謝性のビオチン化を含む。その代わりに、リガンド（例えば抗ＣＤ２０５）をヘテロ二機能性リンカー（例えばＰＥＧ含有）によってアデノウイルス粒子に結合することができる。

【０１６３】

２．レトロウイルス

レトロウイルスは、逆転写のプロセスによってそれらのＲＮＡを感染細胞中で二本鎖ＤＮＡに変換するための能力によって特徴付けられる一本鎖ＲＮＡウイルスのグループである（Ｃｏｆｆｉｎ、（１９９０年）Ｉｎ：Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｒａｖｅｎ　Ｐｒｅｓｓ編、１４３７～１５００頁）。次いで、結果として生じるＤＮＡは、プロウイルスとして細胞の染色体の中に安定して統合し、ウイルスタンパク質の合成を指示する。統合は、レシピエント細胞およびその子孫におけるウイルス遺伝子配列の保持をもたらす。レトロウイルスゲノムは、カプシドタンパク質、ポリメラーゼ酵素、および外被成分をそれぞれコードする３つの遺伝子－ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ－を含有する。ｐｓｉと称される、ｇａｇ遺伝子の上流に見つけられる配列は、ビリオンの中へのゲノムのパッケージングのためのシグナルとして機能する。２つの末端反復配列（ＬＴＲ）配列は、ウイルスゲノムの５’および３’末端に存在する。これらは、強力なプロモーターおよびエンハンサー配列を含有し、宿主細胞ゲノム中への統合に必要とされる（Ｃｏｆｆｉｎ、１９９０年）。

【０１６４】

レトロウイルスベクターを構築するために、プロモーターをコードする核酸は、複製欠損のウイルスを産生するために、ある種のウイルス配列の場所のウイルスゲノムの中に挿入される。ビリオンを産生するために、ｇａｇ、ｐｏｌ、およびｅｎｖ遺伝子を含有するが、ＬＴＲおよびｐｓｉ成分を有していないパッケージング細胞株が、構築される（Ｍａｎｎら、（１９８３年）Ｃｅｌｌ、３３巻、１５３～１５９頁）。レトロウイルスＬＴＲおよびｐｓｉ配列と一緒にヒトｃＤＮＡを含有する組換えプラスミドが、この細胞株の中に導入される場合（例えばリン酸カルシウム沈降によって）、ｐｓｉ配列は、組換えプラスミドのＲＮＡ転写物がウイルス粒子の中にパッケージされることを可能にし、次いで、これらは、培養培地の中に分泌される（Ｎｉｃｏｌａｓ，　Ｊ．Ｆ．およびＲｕｂｅｎｓｔｅｉｎ，　Ｊ．Ｌ．Ｒ．、（１９８８年）Ｉｎ：　Ｖｅｃｔｏｒｓ：　ａ　Ｓｕｒｖｅｙ　ｏｆ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｖｅｃｔｏｒｓ　ａｎｄ　Ｔｈｅｉｒ　Ｕｓｅｓ、ＲｏｄｒｉｑｕｅｚおよびＤｅｎｈａｒｄｔ編）．ＮｉｃｏｌａｓおよびＲｕｂｅｎｓｔｅｉｎ；Ｔｅｍｉｎら、（１９８６年）Ｉｎ：　Ｇｅｎｅ　Ｔｒａｎｓｆｅｒ、Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉ（編）、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ：Ｐｌｅｎｕｍ　Ｐｒｅｓｓ、

１４９～１８８頁；Ｍａｎｎら、１９８３年）。組換えレトロウイルスを含有する媒体は、収集され、任意選択で濃縮され、遺伝子移入に使用される。レトロウイルスベクターは、広く様々な細胞型に感染することができる。しかしながら、多くの型のレトロウイルスの統合および安定した発現は、宿主細胞の分裂を必要とする（Ｐａｓｋｉｎｄら、（１９７５年）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、６７巻、２４２～２４８頁）。

【０１６５】

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にするように設計されたアプローチは、最近、ウイルス外被へのガラクトース残基の化学的追加によるレトロウイルスの化学的修飾に基づいて最近、開発された。これが所望される場合、この修飾は、アシアロ糖タンパク質受容体を介しての、肝細胞などのような細胞の特異的感染を可能にすることができる。

【０１６６】

レトロウイルス外被タンパク質および特異的な細胞受容体に対するビオチン化抗体が使用される、組換えレトロウイルスのターゲティングに対する異なるアプローチが、設計された。抗体は、ストレプトアビジンを使用することによってビオチン成分を介して結合された（Ｒｏｕｘら、（１９８９年）Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔ’ｌ　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ、８６巻、９０７９～９０８３頁）。主要組織適合複合体クラスＩおよびクラスＩＩ抗原に対する抗体を使用して、それらの表面抗原を運ぶ、様々なヒト細胞の感染は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、エコトロピックウイルスを用いて実証された（Ｒｏｕｘら、１９８９年）。

【０１６７】

３．アデノ随伴ウイルス

ＡＡＶは、約４７００塩基対の線状一本鎖ＤＮＡを利用する。逆位末端配列は、ゲノムの側面に位置する。ゲノム内に２つの遺伝子が存在し、多くの別の遺伝子産物を誘発する。第１のｃａｐ遺伝子は、ＶＰ－１、ＶＰ－２、およびＶＰ－３と命名される、３つの異なるビリオンタンパク質（ＶＰ）を産生する。第２のｒｅｐ遺伝子は、４つの非構造タンパク質（ＮＳ）をコードする。１つまたは複数のこれらのｒｅｐ遺伝子産物は、ＡＡＶ転写をトランス活性化することを担う。

【０１６８】

ＡＡＶ中の３つのプロモーターは、ゲノム中のマップ単位中のそれらの位置によって命名される。これらは、左から右に、ｐ５、ｐ１９、およびｐ４０となる。転写は、６つの転写物を誘発し、２つは、３つのプロモーターのそれぞれで開始され、それぞれの対の一方は、スプライスされている。マップ単位４２～４６に由来するスプライス部位は、それぞれの転写物で同じである。明らかに、４つの非構造タンパク質は、長い方の転写物に由来し、３つのビリオンタンパク質はすべて、最も小さな転写物から生じる。

【０１６９】

ＡＡＶは、ヒトにおけるあらゆる病的状態にも関連しない。興味深いことには、効率的な複製のために、ＡＡＶは、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、仮性狂犬病ウイルス、ならびにもちろんアデノウイルスなどのようなウイルスからの「支援」機能を必要とする。最も特徴付けられたヘルパーは、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複製を支援することが示されてきた。ＡＡＶ　ｒｅｐタンパク質の低レベルの発現は、ＡＡＶ構造発現を抑制すると考えられ、ヘルパーウイルス感染は、このブロックを除去すると考えられる。

【０１７０】

ＡＡＶベクター末端配列は、ＡＡＶまたは修飾ＡＡＶゲノムを含有する、ｐ２０１などのようなプラスミドの制限酵素消化によって（Ｓａｍｕｌｓｋｉら、Ｊ．　Ｖｉｒｏｌ．、６１巻：３０９６～３１０１頁（１９８７年））またはＡＡＶの公開配列に基づく末端配列の化学的もしくは酵素的合成を含むが、これらに限定されない当業者に公知の他の方法によって得ることができる。当業者は、機能、つまり安定した部位特異的な統合を可能にするために必要とされるＡＡＶ　ＩＴＲの最小の配列または部分を、欠失分析などのよ

うな周知の方法によって決定することができる。当業者はまた、安定した部位特異的な統合を指示するための末端配列の能力を維持しながら配列のどの小さな修飾を許容することができるかを決定することができる。

【０１７１】

ＡＡＶベースのベクターは、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおける遺伝子送達のための安全で有効な媒介物であることが証明されており、これらのベクターは、開発されており、ｅｘ ｖｉｖｏおよびｉｎ ｖｉｖｏの両方における潜在的な遺伝子療法における広範囲の適用のために前臨床および臨床的ステージにおいて試験されている（ＣａｒｔｅｒおよびＦｌｏｔｔｅ、（１９９５年）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、７７０巻；７９～９０頁；Ｃｈａｔｔｅｉｊｅｅら、（１９９５年）Ａｎｎ．Ｎ．Ｙ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．、７７０巻、７９～９０頁；Ｆｅｒｒａｒｉら、（１９９６年）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７０巻、３２２７～３２３４頁；Ｆｉｓｈｅｒら、（１９９６年）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７０巻、５２０～５３２頁；Ｆｌｏｔｔｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０巻，１０６１３～１０６１７頁、（１９９３年）；Ｇｏｏｄｍａｎら（１９９４年）、Ｂｌｏｏｄ、８４巻、１４９２～１５００頁；Ｋａｐｌｉｔｔら、（１９９４年）Ｎａｔ’ｌ Ｇｅｎｅｔ．、８巻、１４８～１５３頁；Ｋａｐｌｉｔｔ，Ｍ．Ｇ．ら、Ａｎｎ Ｔｈｏｒａｃ Ｓｕｒｇ．１９９６年１２月；６２巻（６号）：１６６９～７６頁；Ｋｅｓｓｌｅｒら、（１９９６年）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９３巻、１４０８２～１４０８７頁；Ｋｏｅｂｅｒｌら、（１９９７年）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９４巻、１４２６～１４３１頁；Ｍｉｚｕｋａｍｉら、（１９９６年）Ｖｉｒｏｌｏｇｙ、２１７巻、１２４～１３０頁）。

【０１７２】

肺中のＡＡＶ媒介性の効率的な遺伝子移入および発現は、嚢胞性線維症の治療のための臨床試験に至った（ＣａｒｔｅｒおよびＦｌｏｔｔｅ、１９９５年；Ｆｌｏｔｔｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０巻、１０６１３～１０６１７頁、（１９９３年））。同様に、骨格筋へのジストロフィン遺伝子のＡＡＶ媒介性の遺伝子送達による筋ジストロフィー症の、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、肝臓への第ＩＸ因子遺伝子送達による血友病Ｂの、および潜在的に、心臓への血管内皮増殖因子遺伝子による心筋梗塞の治療の見込みは、これらの器官におけるＡＡＶ媒介性の導入遺伝子発現が高度に効率的なことが最近示されたので、有望に見える（Ｆｉｓｈｅｒら、（１９９６年）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７０巻、５２０～５３２頁；Ｆｌｏｔｔｅら、１９９３年；Ｋａｐｌｉｔｔｅら、１９９４年；１９９６年；Ｋｏｅｂｅｒｌら、１９９７年；ＭｃＣｏｗｎら、（１９９６年）Ｂｒａｉｎ Ｒｅｓ．、７１３巻、９９～１０７頁；Ｐｉｎｇら、（１９９６年）Ｍｉｃｒｏｃｉｒｃｕｌａｔｉｏｎ、３巻、２２５～２２８頁；Ｘｉａｏら、（１９９６年）Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、７０巻、８０９８～８１０８頁）。

【０１７３】

４．他のウイルスベクター

他のウイルスベクターは、本発明の方法および組成物において発現構築物として用いられる。ワクシニアウイルス（Ｒｉｄｇｅｗａｙ、（１９８８年）Ｉｎ：Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ ｓｕｒｖｅｙ ｏｆ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｌｏｎｉｎｇ ｖｅｃｔｏｒｓ ａｎｄ ｔｈｅｉｒ ｕｓｅｓ、４６７～４９２頁；ＢａｉｃｈｗａｌおよびＳｕｇｄｅｎ、（１９８６年）Ｉｎ，Ｇｅｎｅ Ｔｒａｎｓｆｅｒ、１１７～１４８頁；Ｃｏｕｐａｒら、Ｇｅｎｅ、６８巻：１～１０頁、１９８８年）、カナリアポックスウイルス、およびヘルペスウイルスなどのようなウイルスに由来するベクターが用いられる。これらのウイルスは、様々な哺乳動物細胞の中への遺伝子移入において使用するためのいくつかの特徴を提供する。

【０１７４】

一度、構築物が細胞の中に送達されたら、導入遺伝子をコードする核酸は、異なる部位

に位置づけられ、発現する。ある実施形態では、導入遺伝子をコードする核酸は、細胞のゲノムの中に安定して統合される。この統合は、相同組換えを介して関連する位置および方向づけにある（遺伝子置換）またはそれは、ランダムで非特異的な位置に統合される（遺伝子増大）。さらなる実施形態では、核酸は、ＤＮＡの別個のエピソームセグメントとして細胞において安定して維持される。そのような核酸セグメントまたは「エピソーム」は、宿主細胞サイクルと無関係のまたはそれと同期した維持および複製を可能に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細胞に送達され、細胞において核酸がどこにとどまるかは、用いられる発現構築物のタイプに依存する

免疫応答の増強

ある実施形態では、ＮＦ－カッパＢ経路、Ａｋｔ経路、および／またはｐ３８経路を活性化するシグナル伝達副刺激ポリペプチドの操作を組み込む新規なＤＣ活性化戦略が、企図される。このＤＣ活性化系は、それがＡＰＣ活性化の間のＣＤ４＋Ｔ細胞支援のための必要を補充するので、免疫応答を増強するために標準のワクチンと共にまたはそれを伴わないで使用することができる（Ｂｅｎｎｅｔｔ，　Ｓ．　Ｒ．ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９８年６月４日　３９３巻：４７８～８０頁；Ｒｉｄｇｅ，　Ｊ．　Ｐ．、Ｄ．　Ｒ．　Ｆ、およびＰ．　Ｎａｔｕｒｅ、１９９８年６月４日　３９３巻：４７４～８頁；Ｓｃｈｏｅｎｂｅｒｇｅｒ，　Ｓ．　Ｐ．ら、Ｎａｔｕｒｅ、１９９８年６月４日　３９３巻：４８０～３頁）。したがって、本明細書において提示されるＤＣ活性化系は、ＭＨＣクラスＩＩ特異的ペプチドの生成の必要性を回避することによって免疫応答を増強する。

【０１７５】

特定の実施形態では、ＤＣの活性化は、ＣＤ４０活性化を介してのものである。したがって、内因的なＣＤ４０／ＣＤ４０Ｌ相互作用によるＤＣの活性化は、負のフィードバックによるダウンレギュレーションになりやすく、「ＩＬ－１２切れの結果」に急速に至り得る。ＣＤ４０活性化後の７～１０時間以内に、ＣＤ４０（ＩＩ型）の代替スプライスアイソフォームが、分泌可能因子として産生される（Ｔｏｎｅ，　Ｍ．ら、Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ、２００１年　９８巻（４号）：１７５１～１７５６頁）。ＩＩ型ＣＤ４０は、優性の負の受容体として作用し、ＣＤ４０Ｌを通してのシグナル伝達をダウンレギュレートし、生成される免疫応答の効力を潜在的に制限し得る。そのため、本発明の方法は、化学的に誘発される二量体化（ＣＩＤ）と称される技術を通して、細胞外ドメインを欠き、その代わりに合成二量体化リガンド（Ｓｐｅｎｃｅｒ，　Ｄ．　Ｍ．ら、Ｓｃｉｅｎｃｅ、１９９３年　２６２巻：１０１９～１０２４頁）によって活性化されるＣＤ４０の誘発性形態（ｉＣＤ４０）を作ることによって、ＣＤ４０の自然調節を選ぶ。

【０１７６】

本発明の方法は、被験体において免疫応答を増強するための方法であって、発現ベクター、発現構築物、または形質導入抗原提示細胞を被験体に投与するステップを含む方法を含む。発現ベクターは、ｉＣＤ４０などのような副刺激ポリペプチドをコードする。

【０１７７】

ある実施形態では、抗原提示細胞は、ヒト、非ヒト霊長動物、雌ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、またはげっ歯動物などのような動物中に含まれる。被験体は、例えばヒト、例えば感染症に罹患している患者および／または免疫無防備状態であり、もしくは過剰増殖疾患に罹患している被験体であってもよい。

【０１７８】

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は、抗原提示細胞を活性化する組成物または物質として利用することができる。「抗原提示細胞を活性化する」または「活性抗原提示細胞を増強する」ような組成物は、抗原提示細胞と関連する、１つまたは複数の活性を刺激するための能力を指す。そのような活性は、当業者らによって周知である。例えば、本発明の方法の発現構築物またはベクターなどのような組成物は、抗原提示細胞上の副刺激分子のアップレギュレーションを刺激する、抗原提示細胞におけるＮＦ－カッパＢの核転座を誘発する、抗原提示細胞におけるｔｏｌｌ様受容体またはサイ

トカインもしくはケモカインを伴う他の活性を活性化することができる。

【０１７９】

発現構築物、発現ベクター、ならびに／または形質導入抗原提示細胞は、例えば、高度に精製された、もしくは組換え抗原などのような、より弱い抗原の免疫原性を増強することによって、免疫応答に必要とされる抗原の量を低下させることによって、防御免疫をもたらすのに必要とされる免疫化の頻度を低下させることによって、新生児、高齢者、および免疫無防備状態の個人などのような、低下もしくは衰弱した免疫応答を有する被験体においてワクチンの有効性を改善することによって、ならびに粘膜の免疫などのような標的組織の免疫を増強することによってワクチンの有効性を増強し、もしくはそれに寄与することができ、または特定のサイトカインプロファイルを誘導することによって細胞性もしくは体液性免疫を促進することができる。

【０１８０】

さらに、免疫無防備状態の個人または被験体は、低下または衰弱した免疫応答を有する被験体である。そのような個人はまた、衰弱した免疫系をもたらす、化学療法もしくは任意の他の療法を受けたことのある被験体、移植レシピエント、免疫抑制薬を現在、服用している被験体、高齢の個人、または低下したおよび／もしくは障害性のＣＤ４ヘルパーＴ細胞を有する任意の個人を含んでいてもよい。本発明の方法は、免疫無防備状態の被験体においてＣＤ４ヘルパーＴ細胞の量および／または活性を増強するために利用することができることが企図される。

【０１８１】

特定の実施形態では、形質導入抗原提示細胞を投与する前に、細胞は、抗原（本明細書において「標的抗原」とも称される）を用いて抗原投与される。抗原投与の後に、形質導入され、負荷をかけられた抗原提示細胞は、非経口的に、皮内に、結節内に、またはリンパ内に被験体に投与される。さらなる非経口ルートは、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、動脈内、心筋内、経心内膜、経心外膜（ｔｒａｎｓｅｐｉｃａｒｄｉａｌ）、髄腔内、および注入技術を含むが、これらに限定されない。

【０１８２】

本明細書において使用される標的抗原は、抗原または抗原上の免疫学的エピトープであり、これは、哺乳動物における、免疫認識および疾患を引き起こす作用物質または疾患状態の最終の排除または制御において重大である。免疫認識は、細胞性および／または体液性であってもよい。細胞内病原体および癌の場合には、免疫認識は、例えばＴリンパ球応答であってもよい。

【０１８３】

標的抗原は、例えば、ＨＩＶ（Ｋｏｒｂｅｒら編　ＨＩＶ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｄａｔａｂａｓｅ、Ｌｏｓ　Ａｌａｍｏｓ　Ｎａｔｉｏｎａｌ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｌｏｓ　Ａｌａｍｏｓ、Ｎ．Ｍｅｘ．　１９７７年）、インフルエンザ、単純ヘルペス、ヒトパピローマウイルス（米国特許第５，７１９，０５４号）、Ｂ型肝炎（米国特許第５，７８０，０３６号）、Ｃ型肝炎（米国特許第５，７０９，９９５号）、ＥＢＶ、サイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、およびその他同種のものを含むウイルスなどのような病原微生物に由来してもよいまたはそれから単離されてもよい。標的抗原は、例えばクラミジア（米国特許第５，８６９，６０８号）、ミコバクテリア、レジオネラ、髄膜炎菌、Ａ群レンサ球菌、サルモネラ、リステリア、Ｈｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａｅ（米国特許第５，９５５，５９６号）、およびその他同種のものなどのような病原細菌に由来してもよいまたはそれから単離されてもよい。

【０１８４】

標的抗原は、例えばアスペルギルス、侵襲性のカンジダ（米国特許第５，６４５，９９２号）、ノカルジア、ヒストプラスモーシス、クリプトスポリジウム、およびその他同種のものを含む病原性酵母に由来してもよいまたはそれから単離されてもよい。

【０１８５】

標的抗原は、例えば、Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ　ｃａｒｉｎｉｉ、トリパノソーマ、

リーシュマニア（米国特許第５，９６５，２４２号）、プラスモジウム（米国特許第５，５８９，３４３号）、およびＴｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉを含むが、これらに限定されない病原性原生動物および病原性寄生体に由来してもよいまたはそれから単離されてもよい。

【０１８６】

標的抗原は、新生物発生前または過形成の状態と関連する抗原を含む。標的抗原はまた、癌と関連してもよいまたはその原因となってもよい。そ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）、組織特異的抗原、そのエピトープ、およびそのエピトープアゴニストであってもよい。そのような標的抗原は、ＣＡＰ－１、ＣＡＰ－１－６Ｄ、およびその他同種のもの（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｍ２９５４０）などのような癌胎児性抗原（ＣＥＡ）およびそのエピトープ、ＭＡＲＴ－１（Ｋａｗａｋａｒｎｉら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１８０巻：３４７～３５２頁、１９９４年）、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ら Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９１巻：６４５８～６４６２頁、１９９２年）、ＭＵＣ－１、ＭＵＣ－２、点突然変異ｒａｓ癌遺伝子、正常および点突然変異ｐ５３癌遺伝子（Ｈｏｌｌｓｔｅｉｎら Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２２巻：３５５１～３５５５頁、１９９４年）、ＰＳＭＡ（Ｉｓｒａｅｌｉら Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３巻：２２７～２３０頁、１９９３年）、チロシナーゼ（Ｋｗｏｎら ＰＮＡＳ ８４巻：７４７３～７４７７頁、１９８７年）、ＴＲＰ－１（ｇｐ７５）（Ｃｏｈｅｎら Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．１８巻：２８０７～２８０８頁、１９９０年；米国特許第５，８４０，８３９号）、ＮＹ－ＥＳＯ－１（Ｃｈｅｎら ＰＮＡＳ ９４巻：１９１４～１９１８頁、１９９７年）、ＴＲＰ－２（Ｊａｃｋｓｏｎら ＥＭＢＯＪ、１１巻：５２７～５３５頁、１９９２年）、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－ｆｌｉ－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、ならびにその他同種のものを含むが、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るものなどのような、当技術分野において公知の方法によって同定され、単離され、クローニングされてもよい。標的抗原はまた、１つまたは複数の増殖因子およびそれぞれのスプライス変異体を含んでいてもよい。

【０１８７】

抗原は、非癌細胞よりも癌細胞においてより頻繁に発現されてもよい。抗原は、修飾樹状細胞を、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）またはその断片と接触させることに起因してもよい。ある実施形態では、修飾樹状細胞は、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ってコードされる）を有するＰＳＭＡ断片と接触させる。

【０１８８】

ＤＮＡゲノムを含有する生物については、対象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は、ゲノムＤＮＡから単離される。ＲＮＡゲノムを有する生物については、所望の遺伝子は、ゲノムのｃＤＮＡコピーから単離されてもよい。ゲノムの制限地図が入手可能な場合、対象の遺伝子を含有するＤＮＡ断片は、当技術分野においてルーチン的な方法によって制限エンドヌクレアーゼ消化によって切断される。所望の遺伝子が以前にクローニングされた実例では、遺伝子は、入手可能なクローンから容易に得られてもよい。その代わりに、遺伝子のＤＮＡ配列が公知の場合、遺伝子は、デオキシリボ核酸の合成のための従来の技術のいずれかによって合成することができる。

【０１８９】

対象の抗原をコードする遺伝子は、例えば、細菌宿主の中に遺伝子をクローニングすることによって増幅することができる。この目的のために、様々な原核生物のクローニングベクターを使用することができる。例としてプラスミドｐＢＲ３２２、ｐＵＣ、およびｐＥＭＢＬがある。

【０１９０】
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は、標準の技術によるウイルスを用いる組換えのために設計されるプラスミドベクターの中への挿入のために調製することができる。一般に、クローニングされた遺伝子は、制限酵素消化によって原核生物のクローニングベクターから切り取ることができる。ほとんどの場合では、切り取られた断片は、遺伝子の全コード領域を含有するであろう。クローニングされた遺伝子を運搬するＤＮＡ断片は、例えば、ウイルスを用いる組換えのために使用されるＤＮＡベクターの挿入部位と適合性の断片の末端を作製するために必要に応じて修飾することができ、次いで、制限エンドヌクレアーゼ切断部位（クローニング部位）でのベクターの中への挿入前に精製することができる。

【０１９１】
抗原を用いる樹状細胞の抗原負荷は、例えば、ポリペプチド、ＤＮＡ（裸もしくはプラスミドベクター内）、またはＲＮＡとまたは抗原発現組換え細菌またはウイルス（例えばワクシニア、鶏痘、アデノウイルス、もしくはレンチウイルスベクター）と樹状細胞または前駆細胞をインキュベートすることによって達成されてもよい。負荷前に、ポリペプチドは、Ｔ細胞支援を提供する免疫学的パートナー（例えばキャリア分子）に共有結合で結合体化されてもよい。その代わりに、樹状細胞は、別々にまたはポリペプチドの存在下において、非結合体化免疫学的パートナーを適用されてもよい。細胞由来の抗原またはＭＨＣ分子は、当技術分野において公知の酸溶出または他の方法によって得られてもよい（Ｚｉｔｖｏｇｅｌ　Ｌら、Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　１９９６年　１８３巻：８７～９７頁を参照されたい）。

【０１９２】
さらなる実施形態では、形質導入抗原提示細胞は、腫瘍細胞ｍＲＮＡがトランスフェクトされる。形質導入されたトランスフェクト抗原提示細胞は、細胞傷害性Ｔリンパ球およびナチュラルキラー細胞の抗腫瘍抗原免疫応答を達成するために動物に投与され、二量体ＦＫ５０６および二量体ＦＫ５０６アナログを使用して調節される。腫瘍細胞ｍＲＮＡは、例えば、前立腺腫瘍細胞由来のｍＲＮＡであってもよい。

【０１９３】
さらに、形質導入抗原提示細胞は、腫瘍細胞溶解物を適用される。適用された形質導入抗原提示細胞は、細胞傷害性Ｔリンパ球およびナチュラルキラー細胞の抗腫瘍抗原免疫応答を達成するために動物に投与され、二量体ＦＫ５０６および二量体ＦＫ５０６アナログを使用して調節される。腫瘍細胞溶解物は、例えば、前立腺腫瘍細胞溶解物であってもよい。

【０１９４】
当業者は、本発明の副刺激分子の活性化が、その活性を誘発するために、リガンド結合ドメインのオリゴマー化、例えばＣＩＤに依存することを十分に知っている。特定の実施形態では、リガンドは、非タンパク質である。例えば、リガンドは、二量体ＦＫ５０６または二量体ＦＫ５０６アナログであってもよく、これは、免疫応答の増強または正の調節をもたらす。単量体ＦＫ５０６または単量体ＦＫ５０６アナログの使用は、免疫応答における阻害または低下を負にもたらす。

【０１９５】
Ｔリンパ球は、本明細書において議論される発現ベクターを含む抗原提示細胞との接触によって活性化されてもよく、抗原提示細胞は、抗原を抗原投与、トランスフェクト、適用または電気融合されている。

【０１９６】
電気融合は、ハイブリッド細胞を生成するための方法である。電気融合によって細胞のハイブリッドを産生するのにいくつかの利点がある。例えば、融合パラメーターは、融合されることとなる細胞に依存する条件に容易におよび正確に電子的に制御することができる。さらに、細胞の電気融合は、化学的手段による、または生物学的融合剤（ｆｕｓｏｇｅｎ）を介しての融合に対して融合効率を増加させる能力を示した。電気融合は、浮遊液

中の細胞に電気パルスをかけることによって実行される。交流電場に細胞を曝露することによって、細胞は、誘電泳動整列と称されるプロセスにおいてパールチェーンを形成する際に互いに接近するようになる。続くより高い電圧パルスにより、細胞はより近くに接触するようになり、細胞膜を可逆的に透過性にし、機械的に破壊する際に可逆的なエレクトロポア（ｅｌｅｃｔｒｏｐｏｒｅ）が形成され、融合をもたらす。

【０１９７】

Ｔ細胞は、それらの膜上に特有の抗原結合受容体（Ｔ細胞受容体）を発現し、これは、他の細胞の表面上の主要組織適合複合体（ＭＨＣ）分子と結合した抗原のみを認識することができる。ヘルパーＴ細胞およびＴ細胞傷害性細胞などのようなＴ細胞のいくつかの集団がある。ヘルパーＴ細胞およびＴ細胞傷害性細胞は、それぞれ、膜結合糖タンパク質ＣＤ４およびＣＤ８のそれらの表示によって主として区別される。ヘルパーＴ細胞は、Ｂ細胞、Ｔ細胞傷害性細胞、マクロファージ、および免疫系の他の細胞の活性化のために重大である、様々なリンホカインを分泌する。対照的に、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）と呼ばれるエフェクター細胞に分化する。ＣＴＬは、細胞溶解をもたらす物質を産生することによって、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞などのような、抗原を示す、体の細胞を排除する。

【０１９８】

ＣＴＬ活性は、本明細書において記載され、または当業者に公知であろう方法によって評価することができる。例えば、ＣＴＬは、標準の４時間の^{51}Ｃｒ放出マイクロ毒性（ｍｉｃｒｏｔｏｘｉｃｉｔｙ）アッセイを使用して、ＰＢＭＣから確立されたフィトヘマグルチニン（ｐｈｙｔｏｈａｅｍａｇｌｕｔｉｎｉｎ）刺激ＩＬ－２増殖細胞株において新たに単離された末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）において（Ｂｅｒｎａｒｄら、ＡＩＤＳ、１２巻（１６号）：２１２５～２１３９頁、１９９８年）または以前に免疫した被験体から単離され、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を用いて６日間、新たに再刺激されたＴ細胞によって評価されてもよい。あるタイプのアッセイは、クローニングＴ細胞を使用する。クローニングＴ細胞は、リダイレクト細胞毒性アッセイ（ｒｅｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ　ａｓｓａｙ）においてパーフォリンおよびＦａｓリガンド依存的死滅の両方を媒介するそれらの能力について試験されてきた（Ｓｉｍｐｓｏｎら、Ｇａｓｔｒｏｅｎｔｅｒｏｌｏｇｙ、１１５巻（４号）：８４９～８５５頁、１９９８年）。クローニング細胞傷害性Ｔリンパ球は、Ｆａｓおよびパーフォリンｰ依存的死滅の両方を示した。最近、新しい蛍光増幅系を利用するｉｎ　ｖｉｔｒｏデヒドロゲナーゼ放出アッセイが、開発されている（Ｐａｇｅ，　Ｂ．ら、Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１９９８年７月～８月；１８巻（４Ａ号）：２３１３～６頁）。このアプローチは、感度がよく、急速で、再生可能であり、混合リンパ球反応（ＭＬＲ）に有利に使用されてもよい。それは、容易に、細胞膜完全性を使用して大規模細胞毒性試験のためにさらに自動化されてもよく、したがって、よく考えられている。細胞媒介性細胞傷害の検出のために開発された他の蛍光定量的アッセイでは、使用される蛍光体は、無毒性分子ＡｌａｍａｒＢｌｕｅである（Ｎｏｃｉａｒｉら、Ｊ．　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　Ｍｅｔｈｏｄｓ、２１３巻（２号）：１５７～１６７頁、１９９８年）。ＡｌａｍａｒＢｌｕｅは、ミトコンドリアの還元が生じるまで、蛍光が消光されており（つまり低い量子収量）、これは、次いで、ＡｌａｍａｒＢｌｕｅ蛍光強度の劇的な増加をもたらす（つまり、量子収量の増加）。このアッセイは、非常に感度がよく、特異的であることが報告されており、標準の^{51}Ｃｒ放出アッセイよりも著しく少ない数のエフェクター細胞を必要とする。

【０１９９】

本発明の方法によって誘発される他の免疫細胞は、ナチュラルキラー細胞（ＮＫ）を含む。ＮＫは、抗原特異的受容体を欠き、自然免疫系の一部であるリンパ球様細胞である。典型的に、感染細胞は、細胞表面ＭＨＣに結合した外来粒子によって警告されたＴ細胞によって通常、破壊される。しかしながら、ウイルス感染細胞は、抗体によって認識されるウイルスタンパク質を発現することによって感染をシグナル伝達する。これらの細胞は、ＮＫによって死滅させることができる。腫瘍細胞において、腫瘍細胞がＭＨＣ　Ｉ分子の

発現を失う場合、それはＮＫに対して感受性であるかもしれない。

【０２００】

患者への投与のための製剤およびルート

臨床適用が企図される場合、意図した適用に適切な形態をした医薬組成物、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、形質導入し、負荷をかけたＤＣを調製することが必要となるであろう。一般に、これは、発熱物質およびヒトまたは動物に対して有害となり得る他の不純物が本質的にない組成物を調製することを要するであろう。

【０２０１】

送達ベクターを安定させ、かつ標的細胞による取り込みを可能にするために適切な塩および緩衝液を用いることを一般に望んでもよい。組換え細胞が患者の中に導入される場合、緩衝液もまた、用いられてもよい。水性組成物は、薬学的に許容されるキャリアまたは水性媒体中に溶解されたまたは分散した、細胞に対する有効量のベクターを含む。そのような組成物はまた、接種物とも称される。「薬学的に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された場合に、有害な、アレルギー性の、または他の不都合な反応をもたらさない分子の実体および組成物を指す。薬学的に許容されるキャリアは、任意のおよびすべての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、ならびにその他同種のものを含む。薬学的に活性な物質に対するそのような媒体および作用物質の使用は、当技術分野において周知である。いかなる従来の媒体または作用物質も、ベクターまたは細胞と不適合性である場合以外は、治療用組成物におけるその使用は、企図される。補充性の活性成分もまた、組成物の中に組み込むことができる。

【０２０２】

活性組成物は、典型的な医薬調製物を含んでいてもよい。標的組織がそのルートを介して利用可能である限り、これらの組成物の投与は、任意の一般的なルートを介してのものとなるであろう。これは、例えば経口、経鼻、頬側、直腸、膣内、または局部を含む。その代わりに、投与は、同所性、皮内、皮下、筋肉内、腹腔内、または静脈内注射によるものであってもよい。そのような組成物は、本明細書において議論される、薬学的に許容される組成物として通常、投与されるであろう。

【０２０３】

注射用の使用に適した医薬形態は、滅菌注射液または分散剤の即時調製のための滅菌水溶液または分散剤および滅菌粉末剤を含む。すべての場合において、その形態は、滅菌でなければならず、容易な注射可能性（ｓｙｒｉｎｇａｂｉｌｉｔｙ）が存在する程度まで液体でなければならない。それは、製造および保管の条件下で安定していなければならず、細菌および菌類などのような微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。キャリアは、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、および液体ポリエチレングリコール、ならびにその他同種のもの）、その適した混合物、ならびに植物油を含有する溶媒または分散媒とすることができる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのようなコーティング剤の使用によって、分散剤の場合に必要とされる粒径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。微生物の作用の予防は、様々な抗菌、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、チメロサール、およびその他同種のものによってもたらされ得る。ある実施例では、等張剤、例えば糖または塩化ナトリウムが、含まれていてもよい。注射用組成物の吸収の延長は、吸収を遅らせる作用物質、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンの組成物における使用によってもたらすことができる。

【０２０４】

経口投与のために、組成物は、添加剤が組み込まれてもよく、非摂取可能なうがい薬および歯みがき剤の形態で使用されてもよい。うがい薬は、ホウ酸ナトリウム溶液などのような適切な溶媒において必要とされる量の活性成分を組み込んで、調製されてもよい（ドーベル液）。その代わりに、活性成分は、ホウ酸ナトリウム、グリセリン、および炭酸水

素カリウムを含有する防腐洗浄液の中に組み込まれてもよい。活性成分はまた、例えばゲル、ペースト剤、粉末剤、およびスラリーを含む歯みがき剤中に分散されてもよい。活性成分は、例えば水、結合剤、研磨剤、香味料、起泡剤、および湿潤剤を含んでいてもよいペースト歯みがき剤に治療有効量で追加されてもよい。

【０２０５】

組成物は、中性または塩の形態で製剤されてもよい。薬学的に許容される塩は、例えば酸付加塩（タンパク質の遊離アミノ基を用いて形成される）を含み、これは、例えば塩酸もしくはリン酸などのような無機酸または酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸、およびその他同種のもののような有機酸を用いて形成される。遊離カルボキシル基を用いて形成される塩もまた、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ような無機塩基ならびに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、およびその他同種のもののような有機塩基に由来し得る。

【０２０６】

製剤に際して、溶液は、投薬製剤と適合性となるようにおよび治療上有効となる量で加えられるであろう。製剤は、注射液、薬剤放出カプセル剤、およびその他同種のものなどのような様々な剤形で容易に投与される。水溶液中の非経口投与について、例えば、溶液は、必要ならば、適切に緩衝剤で処理をされるべきであり、液体希釈液は、最初に、十分な生理食塩水またはグルコースを用いて等張にしなければならない。これらの特定の水溶液は、静脈内、筋肉内、皮下、および腹腔内投与に特に適している。この関係では、用いることができる滅菌水性媒体は、本発明の開示を考慮して当業者らに公知になるであろう。例えば、１回分の投薬量は、１ｍｌの等張ＮａＣｌ溶液中に溶解することができ、１０００ｍｌの皮下注入の液体に追加し、または注入の提唱部位に注射することができる（例えば「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ」第１５版、１０３５～１０３８頁および１５７０～１５８０頁を参照されたい）。投薬におけるいくつかの変更は、治療されている被験体の状態に依存して必然的に生じるであろう。投与の担当者は、どんな場合も、個々の被験体に適切な用量を決定するであろう。さらに、ヒト投与について、調製物は、ＦＤＡ　Ｏｆｆｉｃｅ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃｓ　ｓｔａｎｄａｒｄｓによって必要とされる無菌性、発熱性、ならびに一般的な安全性および純度の基準を満たすべきである。

【０２０７】

疾患を治療するための方法

本発明の方法はまた、病原微生物によって引き起こされる疾患および／または過剰増殖疾患の治療または予防の方法をも包含する。

【０２０８】

治療されてもよいまたは予防されてもよい疾患は、ウイルス、細菌、酵母、寄生生物、原生動物、癌細胞、およびその他同種のものによって引き起こされる疾患を含む。医薬組成物（形質導入ＤＣ、発現ベクター、発現構築物など）は、全身性免疫エンハンサー（ＤＣ活性化組成物または系）として使用されてもよく、そのため、疾患を治療する際に有用性を有する。治療および／または予防することができる例示的な疾患は、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、ポリオ、ウイルス性脳炎、麻疹、水痘、パピローマウイルスなどのようなウイルス病因の感染症；または肺炎、結核、梅毒などのような細菌病因の感染症；またはマラリア、トリパノソーマ症、リーシュマニア症、トリコモナス症、アメーバ症などのような寄生生物病因の感染症を含むが、これらに限定されない。

【０２０９】

医薬組成物（形質導入ＤＣ、発現ベクター、発現構築物など）を使用して治療されてもよいまたは予防されてもよい新生物発生前か過形成の状態は、結腸ポリープ、クローン病、潰瘍性大腸炎、乳房病変、およびその他同種のものなどのような新生物発生前または過形成の状態を含むが、これらに限定されない。

【０２１０】

医薬組成物を使用して治療されてもよい癌は、原発性または転移性黒色腫、腺癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮細胞癌（ａｄｅｎｏｓｑｕａｍｏｕｓ ｃｅｌｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ）、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、膵癌、結腸癌、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、ＮＰＣ、膀胱癌、子宮頸癌、およびその他同種のものを含むが、これらに限定されない。

【０２１１】

本明細書において提示されるＤＣ活性化系を使用して治療されてもよい他の過剰増殖疾患は、関節リウマチ、炎症性腸疾患、変形性関節症、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症、新生物発生前病変（腺腫様増殖および前立腺上皮内腫瘍など）、上皮内癌、口腔毛様白斑症、または乾癬を含むが、これらに限定されない。

【０２１２】

治療の方法では、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、形質導入し、負荷をかけたＤＣ）の投与は、「予防」または「治療」目的のためのものであってもよい。予防的に提供される場合、医薬組成物は、あらゆる症状より前に提供される。医薬組成物の予防の投与は、あらゆる続く感染症または疾患を予防し、または回復させるように果たす。治療上、提供される場合、医薬組成物は、感染症または疾患の症状の発症時にまたはその後に提供される。したがって、本明細書において提示される組成物は、疾患を引き起こす作用物質への予期される曝露もしくは疾患状態の前にまたは感染症もしくは疾患の開始の後に提供されてもよい。

【０２１３】

用語「単位用量」は、それが接種物に関するように、哺乳動物のための単一体の投薬として適した物理的に別々の単位を指し、それぞれの単位は、必要とされる希釈液と関連して、所望の免疫原性効果をもたらすように計算された、医薬組成物の所定の量を含有する。接種物の新規な単位用量についての規格は、規定され、医薬組成物の特有の特徴および達成されることとなる特定の免疫効果に依存的である。

【０２１４】

医薬組成物の有効量は、免疫応答を増強するこの選択される結果を達成する量となり、そのような量は、当業者によってルーチンとして決定することができる。例えば、免疫系欠失を治療するための有効量は、免疫系の活性化を引き起こし、抗原への曝露に際して抗原特異的免疫応答の増強をもたらすのに必要な量とすることができる。用語はまた、「十分な量」とも同義である。

【０２１５】

任意の特定の適用のための有効量は、治療されている疾患もしくは状態、投与されている特定の組成物、被験体のサイズ、および／または疾患もしくは状態の重症度などのような因子に依存して変わり得る。当業者は、不必要な実験を必要とせずに、本明細書において提示される特定の組成物の有効量を経験的に決定することができる。

【０２１６】

Ａ．遺伝子ベースの療法

ある実施形態では、細胞は、抗原提示細胞などのような細胞にＣＤ４０などのような副刺激ポリペプチドを提供し、ＣＤ４０を活性化することができる発現構築物を提供される。発現ベクターおよびそこに用いられる遺伝エレメントの長い議論は、参照によってこの節の中に組み込まれる。ある実施例では、発現ベクターは、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、およびレトロウイルスなどのようなウイルスベクターであってもよい。他の実施例では、ベクターは、リソソーム被包性発現ベクターであってもよい。

【０２１７】

当業者らは、ｉｎ ｖｉｖｏおよびｅｘ ｖｉｖｏの状況への遺伝子送達を適用する方法を十分に知っている。ウイルスベクターについて、一般に、ウイルスベクター株を調製

するであろう。ｅｘ ｖｉｖｏにおけるウイルスベクター媒介遺伝子送達の例は、本出願において提示されている。ウイルスの種類および達成可能な力価に依存するｉｎ ｖｉｖｏ送達について、例えば、１×１０^{4}、１×１０^{5}、１×１０^{6}、１×１０^{7}、１×１０^{8}、１×１０^{9}、１×１０^{10}、１×１０^{11}、または１×１０^{12}感染性粒子を患者に送達するだろう。同様の量は、相対的な取り込み効率を比較することによってリポソームまたは他の非ウイルス製剤について推定されてもよい。薬学的に許容される組成物としての製剤は、下記に議論される。

【０２１８】

Ｂ．細胞ベースの療法

企図される他の療法は、形質導入抗原提示細胞の投与である。抗原提示細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて形質導入されてもよい。薬学的に許容される組成物としての製剤は、本明細書において議論される。

【０２１９】

細胞ベースの療法では、形質導入抗原提示細胞は、例えば、ｍＲＮＡもしくはＤＮＡなどのような標的抗原核酸またはタンパク質がトランスフェクトされてもよい、細胞溶解物、タンパク質、もしくは核酸を適用されてもよい、または細胞と電気融合されてもよい。細胞、タンパク質、細胞溶解物、または核酸は、腫瘍細胞などのような細胞または他の病原微生物、例えばウイルス、細菌、原生動物に由来してもよい。

【０２２０】

Ｃ．併用療法

本明細書において提示される発現ベクターの有効性を増加させるために、疾患の治療において有効な作用物質とこれらの組成物および方法を組み合わせることは望ましいかもしれない。

【０２２１】

ある実施形態では、抗癌剤は、本発明の方法と組み合わせて使用されてもよい。「抗癌」剤は、例えば、１つもしくは複数の癌細胞を死滅させる、１つもしくは複数の癌細胞においてアポトーシスを誘発する、１つもしくは複数の癌細胞の増殖速度を低下させる、転移の発生率もしくは数を低下させる、腫瘍のサイズを低下させる、腫瘍の増殖を阻害する、腫瘍または１つもしくは複数の癌細胞への血液供給を低下させる、１つ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、癌の進行を予防もしくは阻害し、または癌を有する被験体の寿命を増加させることによって、被験体において癌に負に影響を与えることができる。抗癌剤は、例えば化学療法剤（化学療法）、放射線療法剤（放射線療法）、外科手技（外科手術）、免疫療法剤（免疫療法）、遺伝子療法剤（遺伝子療法）、ホルモン療法、他の生物学的作用物質（生物療法）、および／または代替療法を含む。

【０２２２】

さらなる実施形態では、抗生物質は、感染症を治療および／または予防するために医薬組成物と組み合わせて使用することができる。そのような抗生物質は、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、アムホテリシンＢ、アンピシリン、アンチモン薬、アトバコンナトリウムスチボグルコネート、アジスロマイシン、カプレオマイシン、セフォタキシム、セホキシチン、セフトリアキソン、クロラムフェニコール、クラリスロマイシン、クリンダマイシン、クロファジミン、サイクロセリン、ダプソン、ドキシサイクリン、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、ポリミキシンデフェンシン（ｄｅｆｉｎｓｉｎｓ）、プロチオナミド、ピラジンアミド、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、トリメトプリム（ｔｒｉｍｅｔｈａｐｒｉｍ）－スルファメトキサゾール合剤、バイオマイシン、またはその組合せを含むが、これらに限定されない。

【０２２３】

より一般に、そのような作用物質は、癌細胞および／または微生物を死滅させ、またはその増殖を阻害するのに有効な発現ベクターと組み合わせた量で提供されるであろう。このプロセスは、作用物質（複数可）および医薬組成物と細胞（複数可）を同時にまたはある期間内に接触させることを含んでいてもよく、細胞、組織、または生物への医薬組成物および作用物質の別個の投与は、所望の治療上の有益性をもたらす。これは、単一の組成物または医薬組成物および１つもしくは複数の作用物質の両方を含む薬理学的製剤と細胞、組織、もしくは生物を接触させることによってまたは２つ以上の別の組成物もしくは製剤と細胞を接触させることによって達成されてもよく、一方の組成物は、医薬組成物を含み、他方は１つまたは複数の作用物質を含む。

【０２２４】

用語「接触させる」および「曝露する」は、細胞、組織、または生物に適用される場合、医薬組成物および／または例えば化学療法もしくは放射能療法剤などのような他の作用物質が、標的細胞、組織、または生物に送達され、または標的細胞、組織、もしくは生物と直接、並べて置かれるプロセスを記載するために本明細書において使用される。細胞死滅または血行静止を達成するために、医薬組成物および／またはさらなる作用物質（複数可）は、細胞（複数可）を死滅させ、またはそれらが分裂するのを予防するのに有効な、組み合わせた量で、１つまたは複数の細胞に送達される。

【０２２５】

医薬組成物の投与は、数分間～数週間の範囲の間隔で、他の作用物質（複数可）に先行してもよい、それと並行（ｃｏ－ｃｕｒｒｅｎｔ）してもよい、および／またはそれに続いてもよい。医薬組成物および他の作用物質（複数可）が細胞、組織、または生物に別々に適用される実施形態では、一般に、医薬組成物および作用物質（複数可）が、細胞、組織、または生物に対する、有利に組み合わせられた効果をなお働かせることができるように、それぞれの送達の回の間に長期間が過ぎてしまわないことを確実にするであろう。例えば、そのような実例では、２、３、または４回以上の様式で、細胞、組織、または生物を医薬組成物と実質的に同時に（つまり約１分間未満以内）接触させてもよいことが企図される。他の態様では、１つまたは複数の作用物質は、発現ベクターを投与する前および／またはその後に、実質的に同時に、約１分間～約２４時間、約７日間、約１週間～約８数週間以上およびその中の推論可能な任意の範囲以内に投与されてもよい。さらに、本明細書において提示される医薬組成物および１つまたは複数の作用物質の様々な組合せのレジメンが用いられてもよい。

【実施例】

【０２２６】

以下に説明する実施例は例示であり、本発明を限定するものではない。

【０２２７】

（実施例１）

材料および方法

この後に続く実施例に記載の研究に利用する材料および方法を、この後に記載する。

【０２２８】

腫瘍細胞系およびペプチド

ＮＡ－６－Ｍｅｌ、Ｔ２、ＳＫ－Ｍｅｌ－３７およびＬＮＣａＰ細胞は、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ）（Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ）から購入した。ＨＬＡ－Ａ２拘束性ペプチドＭＡＧＥ－３ ｐ２７１－２７９（ＦＬＷＧＰＲＡＬＶ）、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、ＣＤ８＋Ｔ細胞応答を分析した。ヘルパーＴ細胞分極実験において、破傷風トキソイドペプチドＴＴｐ３０ ＦＮＮＦＴＶＳＦＷＬＲＶＰＫＶＳＡＳＨＬＥを使用した。すべてのペプチドは、Ｇｅｎｅｍｅｄ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｉｎｃ（Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ）により合成され、ＨＰＬＣ決定純度は９５％を超える。

【０２２９】

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、ＸｈｏＩ隣接５’プライマー（５ｈＣＤ４０Ｘ）、５’－ａｔａｔａｃｔｃｇａｇａａａａａｇｇｔｇｇｃｃａａｇａａｇｃｃａａｃｃ－３’およびＳａｌＩ隣接３’プライマー（３ｈＣＤ４０Ｓ）、５’－ａｔａｔａｇｔｃｇａｃｔｃａｃｔｇｔｃｔｃｔｃｃｔｇｃａｃｔｇａｇａｔｇ－３’を使用する、ヒト単球由来ＤＣ ｃＤＮＡから増幅されたＰｆｕＩポリメラーゼ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）であった。ＰＣＲ断片を、ＳａｌＩ消化ｐＳＨ１／Ｍ－ＦｖＦｖｌｓ－Ｅ１５にサブクローニングし、配列決定し、ｐＳＨ１／Ｍ－ＦｖＦｖｌｓ－ＣＤ４０－Ｅを作製した。誘導性ＣＤ４０を、次いで、サイトメガロウイルス初期／即時型プロモーターの下でトランス遺伝子を発現する、非複製Ｅ１、Ｅ３欠失Ａｄ５／ｆ３５に基づくベクターにサブクローニングした。ｉＣＤ４０コード配列を、制限消化および配列決定によって確認した。すべてのアデノウイルスの増幅、精製および力価決定は、Ｖｉｒａｌ Ｖｅｃｔｏｒ Ｃｏｒｅ Ｆａｃｉｌｉｔｙ ｏｆ Ｂａｙｌｏｒ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅにおいて実施した。

【０２３０】

ウェスタンブロット
全細胞抽出液を、プロテアーゼ阻害カクテル（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を含有するＲＩＰＡ緩衝液を用いて調製し、界面活性剤相溶性タンパク質濃度アッセイ（ｄｅｔｅｒｇｅｎｔ－ｃｏｍｐａｔｉｂｌｅ ｐｒｏｔｅｉｎ ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｉｏｎ ａｓｓａｙ）（Ｂｉｏ－Ｒａｄ、Ｈｅｒｃｕｌｅｓ、ＣＡ）を使用して定量した。１０～１５マイクログラムの全タンパク質を、常法に従って１２％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルにおいて分離し、タンパク質をニトロセルロース膜（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とハイブリダイズさせ、その後、それぞれロバ抗ヤギ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）を使用して発光させた。

【０２３１】

ヒトＤＣの作製および刺激
健康なドナー由来の末梢血単核球（ＰＢＭＣ）を、Ｌｙｍｐｈｏｐｒｅｐ（Ｎｙｃｏｍｅｄ、Ｏｓｌｏ、Ｎｏｒｗａｙ）におけるヘパリン添加血の密度遠心分離により単離した。ＰＢＭＣをＰＢＳで洗浄し、ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ ＤＣ培地（Ｆｒｅｉｂｕｒｇ、Ｇｅｒｍａｎｙ）に再懸濁し、培養プレート中で３７℃および５％CO_2において２時間接着させた。非接着性細胞を多数回の洗浄により取り除き、接着性単球を単球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。形態分析およびＦＡＣＳ分析により評価されたように、得られた未熟ＤＣ（ｉｍＤＣ）はＭＨＣ－クラスＩ、ＩＩｈｉおよび発現ＣＤ４０ｌｏ、ＣＤ８０ｌｏ、ＣＤ８３ｌｏ、ＣＤ８６ｌｏであった。ｉｍＤＣは、ＣＤ１４ｎｅｇであり、ＣＤ３＋Ｔ細胞、ＣＤ１９＋Ｂ細胞のおよびＣＤ１６＋ＮＫ細胞の汚染を３％未満含有した。

【０２３２】

およそ2×10^6細胞／ｍｌを２４ウェルディッシュにおいて培養し、アデノウイルスを１０，０００ウイルス粒子（ｖｐ）／細胞（約１６０ＭＯＩ）で、３７℃および５％CO_2において９０分間形質導入した。形質導入後すぐに、ＤＣを、ＭＰＬ、ＦＳＬ－１、Ｐａｍ３ＣＳＫ４（ＩｎｖｉｖｏＧｅｎ、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、ＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）、ＡＰ２０１８７（ＡＲＩＡＤ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡのご好意による贈呈）または１０ｎｇ／ｍｌのＴＮＦ－アルファ、１０ｎｇ／ｍｌのＩＬ－１β、１５０ｎｇ／ｍｌのＩ

Ｌ－６（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）および１マイクログラム／ｍｌのＰＧＥ２（Ｃａｙｍａｎ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ａｎｎ　Ａｒｂｏｒ、ＭＩ）を含有する成熟化カクテル（ＭＣ）を用いて刺激した。Ｔ細胞アッセイにおいて、ＤＣを、アデノウイルス形質導入の前後２４時間に５０マイクログラム／ｍｌのＰＳＭＡまたはＭＡＧＥ３ペプチドをパルスした。

【０２３３】

表面マーカーおよびサイトカインの産生

細胞表面染色を、蛍光色素結合体化モノクロナール抗体（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）を用いて実施した。細胞を、ＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒ血球計算器（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ　Ｊｏｓｅ、ＣＡ）において分析した。サイトカインを、ヒトＩＬ－６およびＩＬ－１２ｐ７０（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）用の酵素結合免疫吸着アッセイキットを使用して培養上清中で測定した。

【０２３４】

ヒトＳＯＣＳ１に関するリアルタイムＱ－ＰＣＲアッセイ

全ＲＮＡを精製し、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ　ＩＩ　ＲＴａｓｅ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を使用して、ランダムな六量体を用いて逆転写した。ｍＲＮＡのレベルを、ｃＤＮＡを、ＧｅｎｅＡｍｐ　５７００　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ　Ｃｉｔｙ、ＣＡ）を使用して、ＴａｑＭａｎ　ＰＣＲ分析に供することによって、ＤＣにおいて定量した。フォワードおよびリバースプライマーならびに蛍光発生性ＴａｑＭａｎ　ＦＡＭ標識ハイブリダイゼーションプローブを含む、ヒトＳＯＣＳ１および１８Ｓ　ｒＲＮＡに特異的なＰｒｅ－ｄｅｖｅｌｏｐｅｄ配列検出試薬（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を、混合物として供給し、１マイクロリットル／２０マイクロリットルＰＣＲで使用した。試料は、２連で処理した。個々の試料におけるＳＯＣＳ１の発現レベルを、同じ試料に由来する１８Ｓ　ｒＲＮＡのレベルに対して、比較２－デルタ・デルタＣＴ法（Ｌｉｖａｋ　ＫＪ、Ｓｃｈｍｉｔｔｇｅｎ　ＴＤ．　Ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｒｅｌａｔｉｖｅ　ｇｅｎｅ　ｅｘｐｒｅｓｓ　ｄａｔａ　ｕｓｉｎｇ　ｒｅａｌ－ｔｉｍｅ　ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ　ＰＣＲ　ａｎｄ　ｔｈｅ　２（－Ｄｅｌｔａ　Ｄｅｌｔａ　Ｃ（Ｔ））　Ｍｅｔｈｏｄ．　Ｍｅｔｈｏｄｓ．　２００１年；２５巻：４０２～４０８頁）を使用して正規化した。

【０２３５】

ＤＣ遊走アッセイ

ＤＣの走化性を、９６－Ｍｕｌｔｉｗｅｌｌ　ＨＴＳ　Ｆｌｕｏｒｏｂｌｏｋプレート（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）において、８マイクロメーターの細孔径を有するポリカーボネートフィルターを通過する遊走によって測定した。１００ｎｇ／ｍｌのＣＣＬ１９（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を含有するアッセイ培地（２５０マイクロリットル）またはアッセイ培地単独（自然発生的遊走に関する対照として）を、下方のチャンバーに投入した。ＤＣ（５０，０００）を、Ｇｒｅｅｎ－ＣＭＦＤＡ　ｃｅｌｌ　ｔｒａｃｋｅｒ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて標識し、刺激はしない、または表示の試薬を用いて４８時間刺激し、総容量５０マイクロリットルで３７℃および５％CO_2において１時間、上方チャンバーに加えた。微細孔膜を通過して遊走した細胞の蛍光を、ＦＬＵＯｓｔａｒ　ＯＰＴＩＭＡリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ　Ｉｎｃ．、Ｄｕｒｈａｍ、ＮＣ）を使用して測定した。自然発生的に遊走する細胞の平均蛍光を、各条件に関する総遊走細胞数から差し引いた。

【０２３６】

ＩＦＮガンマＥＬＩＳＰＯＴアッセイ

ＨＬＡ－Ａ２陽性の健康なボランティア由来のＤＣに、ＭＡＧＥ－３　Ａ２．１ペプチド（２７１～２７９残基；ＦＬＷＧＰＲＡＬＶ）を培養４日目にパルスし、その後Ａｄ－ｉＣＤ４０を形質導入し、５日目にさまざまな刺激剤を用いて刺激した。自己Ｔ細胞を、陰性選択（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡ）によりＰＢＭＣから

精製し、ＤＣ：Ｔ細胞が１：３で、ＤＣと混合した。細胞を、２０Ｕ／ｍｌのｈＩＬ－２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）および２５マイクログラム／ｍｌのＭＡＧＥ３　Ａ２．１ペプチドと共に完全ＲＰＭＩ中でインキュベートした。Ｔ細胞を、７日目に再刺激し、培養１４日目にアッセイした。

【０２３７】

ＥＬＩＳＰＯＴによる定量

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－ガンマｍＡｂ（２μｇ／ｍｌ、１－Ｄ１Ｋ；Ｍａｂｔｅｃｈ、Ｓｔｏｃｋｈｏｌｍ、Ｓｗｅｄｅｎ）を用いてコーティングし、４℃において一晩インキュベートした。０．０５％のＴＷＥＥＮ２０を含有するＰＢＳを用いて洗浄後、プレートを、完全ＲＰＭＩを用いて、３７℃において２時間ブロックした。総量１×１０^{5}の予備感作ＣＤ８＋Ｔエフェクター細胞を各ウェルに加え、２５マイクログラム／ｍｌのペプチドと一緒に２０時間インキュベートした。その後、プレートを、０．０５％のＴＷＥＥＮ２０を含有するＰＢＳを用いて完全に洗浄し、抗ＩＦＮ－ｍＡｂ（０．２μｇ／ｍｌ、７－Ｂ６－１－ビオチン；Ｍａｂｔｅｃｈ）を各ウェルに加えた。３７℃において２時間インキュベーション後、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（１μｇ／ｍｌ；Ｍａｂｔｅｃｈ）を用いて、室温において１時間発色させた。洗浄後、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。暗いピンク色のスポットを提示するプレート膜をスキャンし、ＺｅｌｌＮｅｔ　Ｃｏｎｓｕｌｔｉｎｇ　Ｉｎｃ．（Ｆｏｒｔ　Ｌｅｅ、ＮＪ）が分析した。

【０２３８】

クロム放出アッセイ

抗原認識を、クロム－５１（Ａｍｅｒｓｈａｍ）を用いて３７℃において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、標識標的細胞（５０マイクロリットル中５０００細胞）を、エフェクター：標的細胞の表示の割合で、Ｖ底のマイクロウェルプレートにおいて表示の濃度で、エフェクター細胞（１００マイクロリットル）に加えた。上清を３７℃において６時間インキュベーション後に収穫し、クロム放出を、ＭｉｃｒｏＢｅｔａ　Ｔｒｉｌｕｘカウンター（Ｐｅｒｋｉｎ－Ｅｌｍｅｒ　Ｉｎｃ、Ｔｏｒｒａｎｃｅ　ＣＡ）を使用して測定した。ＬＮＣａＰ細胞に関連するアッセイを１８時間実施した。比溶解のパーセントを、１００×［（実験の放出－自然発生的放出）／（最大放出－自然発生的放出）］として計算した。

【０２３９】

四量体染色

ＭＡＧＥ－３．Ａ２ペプチド（ＦＬＷＧＰＲＡＬＶ）と会合したＨＬＡ－Ａ２四量体を、Ｂａｙｌｏｒ　Ｃｏｌｌｅｇｅ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅ　Ｔｅｔｒａｍｅｒ　Ｃｏｒｅ　Ｆａｃｉｌｉｔｙ（Ｈｏｕｓｔｏｎ、ＴＸ）から入手した。０．５％のＦＣＳを含有する５０μｌのＰＢＳ中の予備感作ＣＤ８＋Ｔ細胞を、ＰＥ標識四量体を用いて氷上において１５分間、ＦＩＴＣ－ＣＤ８ｍＡｂ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）の添加前に染色した。、洗浄後、結果をフローサイトメトリによって分析した。

【０２４０】

ナイーブヘルパーＴ細胞の分極化

ＨＬＡ－ＤＲ１１．５陽性ドナー由来のナイーブ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を同定）を、ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞単離キット（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡ）を使用する陰性選択によって単離した。Ｔ細胞を、破傷風トキソイド（５ＦＵ／ｍｌ）をパルスした自己ＤＣを用いて刺激し、刺激物質とレスポンダーの比が１：１０でさまざまな刺激剤を用いて刺激した。７日後、Ｔ細胞を、ＨＬＡ－ＤＲ１１．５拘束性ヘルパーペプチドのＴＴｐ３０をパルスした自己ＤＣを用いて再刺激し、アデノベクターＡｄ－ｉＣＤ４０を形質導入した

。細胞を、ＰＥ－抗－ＣＤ４Ａｂ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて染色し、固定し、ＢＤ　Ｃｙｔｏｆｉｘ／Ｃｙｔｏｐｅｒｍキット（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して透過処理し、次いで、ｈＩＦＮ－ガンマｍＡｂ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）を用いて染色し、フローサイトメトリによって分析した。上清を、ヒトＴＨ１／ＴＨ２　ＢＤ　Ｃｙｔｏｍｅｔｒｉｃ　Ｂｅａｄ　Ａｒｒａｙ　Ｆｌｅｘ　Ｓｅｔ　ｏｎ　ＢＤ　ＦＡＣＳＡｒｒａｙ　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を使用して分析した。

【０２４１】

ＰＳＭＡタンパク質の精製

ＰＳＭＡ（４４～７５０残基）の細胞外部分のｃＤＮＡを含有する、バキュロウイルストランスファーベクター、ｐＡｃＧＰ６７Ａ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）は、Ｄｒ　Ｐａｍｅｌａ　Ｊ．Ｂｊｏｒｋｍａｎ（Ｈｏｗａｒｄ　Ｈｕｇｈｅｓ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｐａｓａｄｅｎａ、ＣＡ）のご厚意により提供された。ＰＳＭＡは、疎水性分泌シグナル、Ｘａ因子切断部位およびＮ末端６×Ｈｉｓ親和性タグと融合させた。高力価バキュロウイルスは、Ｂａｙｌｏｒ　Ｃｏｌｌｅｇｅ　ｏｆ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅのバキュロウイルス／モノクロナール抗体中核施設によって作製された。ＰＳＭＡタンパク質は、組換えウイルスに感染したＨｉｇｈ５細胞中に産生され、以前に記載されたように（Ｃｉｓｃｏ　ＲＭ、Ａｂｄｅｌ－Ｗａｈａｂ　Ｚ、Ｄａｎｎｕｌｌ　Ｊら、Ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｈｕｍａｎ　ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌ　ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ　ｕｓｉｎｇ　ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ＲＮＡ　ｅｎｃｏｄｉｎｇ　ａ　ｄｏｍｉｎａｎｔ　ｐｏｓｉｔｉｖｅ　ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　４．Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　２００４年；１７２巻：７１６２～７１６８頁）、細胞の上清から、Ｎｉ－ＮＴＡアフィニティカラム（Ｑｉａｇｅｎ、Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、ＣＡ）を使用して精製した。精製後、ＰＳＭＡタンパク質の約１００ｋＤａの単一バンドを、アクリルアミドゲルの銀染色によって検出した。

【０２４２】

マウス宿主におけるヒトＤＣの遊走　ｉｎ　ｖｉｖｏのヒトＤＣの遊走を評価するために、Ｐｙｒｏｐｈｏｒｕｓ　ｐｌａｇｉｏｐｈａｌａｍｕｓクリックビートル由来の赤方偏移（発光ピーク＝６１３ｎＭ）ルシフェラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を発現するアデノベクターＡｄ５－ＣＢＲを発育させた。ヒトＤＣに、約５０ＭＯＩのＡｄ５－ＣＢＲおよび１６０ＭＯＩのＡｄ５ｆ３５－ｉＣＤ４０を形質導入した。その後、ＤＣを、ＭＣまたは１マイクログラム／ｍｌのＬＰＳ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を用いて成熟させた。ＤＣ由来のマウス骨髄を１３以前に記載のように得、１マイクログラム／ｍｌのＬＰＳを用いて成熟させた。およそ2×10^{6}のＤＣを、被照射（２５０Ｒａｄ）Ｂａｌｂ／ｃマウス（３匹のマウスの両方の後ろ肢／群、ｎ＝６）の左右の後肢足蹠に注射した。マウスに、Ｄ－ルシフェリン（約１ｍｇ／２５ｇ動物）をｉ．ｐ．注射し、ＩＶＩＳ（商標）１００イメージングシステム（Ｘｅｎｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．、Ａｌａｍｅｄａ、ＣＡ）を使用して数日にわたって画像化した。発光シグナルを３マウス／群において測定し、膝窩および鼠径のリンパ節（ＬＮ）を、ＤＣ接種の２日後に取り出した。ＬＮのシグナルを測定し、各群に関してバックグラウンドを差し引いた（ｎ＝６）。

【０２４３】

データ分析

結果を、平均±標準誤差で表した。試料サイズを、パワーが０．８、片側アルファレベルが０．０５で決定した。実験群間の差は、スチューデントｔ検定によって決定した。

【０２４４】

（実施例２）

ｉＣＤ４０の発現およびＤＣ成熟の誘導

ｉＣＤ４０のシグナル伝達が、ヒトＤＣの免疫原性機能を増強できるかどうかを調査す

るために、誘導性ヒトＣＤ４０受容体を発現するアデノウイルス、Ａｄ５／ｆ３５－ｉｈＣＤ４０（Ａｄ－ｉＣＤ４０に対して単純化）を、前記マウスｉＣＤ４０ベクター１３（図１）に基づき作製した。普通の当業者は、これが、キメラｉＣＤ４０タンパク質、例えば、ｉＣＤ４０－ＭｙＤ８８または本明細書における他のキメラの例などの形質導入後の、ＤＣ成熟を試験するために使用できるアッセイの例であることを認識するであろう。ヒトＣＤ４０細胞質の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２つのタンデムドメイン（ヒトＦＫＢＰ１２（Ｖ３６）由来、「Ｆｖ’」と指定）の下流にクローニングし、これは、二量化剤のＡＰ２０１８７（Ｃｌａｃｋｓｏｎ Ｔ、Ｙａｎｇ Ｗ、Ｒｏｚａｍｕｓ ＬＷら Ｒｅｄｅｓｉｇｎｉｎｇ ａｎ ＦＫＢＰ－ｌｉｇａｎｄ ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ｔｏ ｇｅｎｅｒａｔｅ ｃｈｅｍｉｃａｌ ｄｉｍｅｒｉｚｅｒｓ ｗｉｔｈ ｎｏｖｅｌ ｓｐｅｃｉｆｉｃｉｔｙ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．１９９８年；９５巻：１０４３７～１０４４２頁）と結合する。未熟ＤＣは、ＬＰＳおよびＣＤ４０Ｌにより誘導される内因性ＣＤ４０を発現した。Ａｄ－ｉＣＤ４０の形質導入は、区別可能なサイズのｉＣＤ４０の発現をもたらし、このことは内因性ＣＤ４０の発現に干渉しなかった。興味深いことに、ｉＣＤ４０の発現は、ＬＰＳの刺激によって有意に増強され、「構成的」ＣＭＶプロモーターと結合する普遍的転写因子の誘導性のためと思われる。

【０２４５】

成熟状態は、活性化、免疫原性状態に対する寛容原性からの推移と関連しているので、ＤＣに基づくワクチンの設計に関する問題の１つは、完全に成熟し、活性化したＤＣを得ることである（Ｓｔｅｉｎｍａｎ ＲＭら、Ａｎｎｕ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００３年；２１巻：６８５～７１１頁；Ｈａｎｋｓ ＢＡ，ら、Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００５年；１１巻：１３０～１３７頁；Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ Ｊ，Ｓｔｅｉｎｍａｎ ＲＭ．Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ａｎｄ ｔｈｅ ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ｎａｔｕｒｅ．１９９８年；３９２巻：２４５～２５２頁）。マウス変異体Ａｄ－ｉＣＤ４０の発現が、ネズミ骨髄由来ＤＣの成熟を誘導できることが示されている（Ｈａｎｋｓ ＢＡら、Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００５年；１１巻：１３０～１３７頁）。ヒト化ｉＣＤ４０が、ＤＣ中の成熟マーカーの発現に影響を与えるかどうかを決定するために、ＤＣにＡｄ－ｉＣＤ４０を形質導入し、成熟マーカーであるＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８３およびＣＤ８６の発現を評価した。ＬＰＳまたはその誘導体のＭＰＬにより仲介されるＴＬＲ－４のシグナル伝達は、ＤＣ成熟の強力なインデューサーである（Ｉｓｍａｉｌｉ Ｊら、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００２年；１６８巻：９２６～９３２頁；Ｃｉｓｃｏ ＲＭら、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４年；１７２巻：７１６２～７１６８頁；Ｄｅ Ｂｅｃｋｅｒ Ｇ、Ｍｏｕｌｉｎ Ｖ、Ｐａｊａｋ Ｂら、Ｔｈｅ ａｄｊｕｖａｎｔ ｍｏｎｏｐｈｏｓｐｈｏｒｙｌ ｌｉｐｉｄ Ａ ｉｎｃｒｅａｓｅｓ ｔｈｅ ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｏｆ ａｎｔｉｇｅｎ－ｐｒｅｓｅｎｔｉｎｇ ｃｅｌｌｓ．Ｉｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０００年；１２巻：８０７～８１５頁；Ｇｒａｎｕｃｃｉ Ｆ、Ｆｅｒｒｅｒｏ Ｅ、Ｆｏｔｉ Ｍ、Ａｇｇｕｊａｒｏ Ｄ、Ｖｅｔｔｏｒｅｔｔｏ Ｋ、Ｒｉｃｃｉａｒｄｉ－Ｃａｓｔａｇｎｏｌｉ Ｐ．Ｅａｒｌｙ ｅｖｅｎｔｓ ｉｎ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ ｉｎｄｕｃｅｄ ｂｙ ＬＰＳ．Ｍｉｃｒｏｂｅｓ Ｉｎｆｅｃｔ．１９９９年；１巻：１０７９～１０８４頁）。内因性ＣＤ４０のシグナル伝達が、ヒトＤＣにおいてＣＤ８３の発現を特異的に上方制御することも、以前に報告されていた（Ｍｅｇｉｏｖａｎｎｉ ＡＭ、Ｓａｎｃｈｅｚ Ｆ、Ｇｌｕｃｋｍａｎ ＪＣ、Ｒｏｓｅｎｚｗａｊｇ Ｍ．Ｄｏｕｂｌｅ－ｓｔｒａｎｄｅｄ ＲＮＡ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｏｒ ＣＤ４０ ｌｉｇａｔｉｏｎ ｏｆ ｍｏｎｏｃｙｔｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ａｓ ｍｏｄｅｌｓ ｔｏ ｓｔｕｄｙ ｔｈｅｉｒ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ａｎｄ ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ ｐｒｏｃｅｓｓ．Ｅｕｒ Ｃｙｔｏｋｉｎｅ Ｎｅｔｗ．２００４年；１５巻：１２６～１３４頁）。これらの先の報告と一致して、ＣＤ８３の発現レベルは、Ａｄ－ｉＣＤ４０の形質導入において上方制御され、ＣＤ８３の発現は、ＬＰＳま

たはＭＰＬの追加後にさらに上方制御された。

【０２４６】

（実施例３）

ｉＣＤ４０のシグナル伝達と、誘導性ＰＲＲアダプタータンパク質のライゲーションとの間の相乗効果に関するアッセイ

普通の当業者は、この実施例において提示されるアッセイを改良し、ｉＣＤ４０のシグナル伝達と、誘導性ＰＲＲアダプタータンパク質のライゲーションとの間の相乗効果を観察できる。

【０２４７】

インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）は、Ｔ細胞およびＮＫ細胞の応答を活性化し、ＩＦＮ－ガンマの産生を誘導する。インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）は、ＴＨ１細胞の分化を助け、先天性面系および獲得免疫の間の生体リンクである（Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ Ｊら、Ａｎｎ Ｎ Ｙ Ａｃａｄ Ｓｃｉ．２００３年；９８７巻：１８０～１８７頁；Ｐｕｃｃｅｔｔｉ Ｐ、Ｂｅｌｌａｄｏｎｎａ ＭＬ、Ｇｒｏｈｍａｎｎ Ｕ．Ｅｆｆｅｃｔｓ ｏｆ ＩＬ－１２ ａｎｄ ＩＬ－２３ ｏｎ ａｎｔｉｇｅｎ－ｐｒｅｓｅｎｔｉｎｇ ｃｅｌｌｓ ａｔ ｔｈｅ ｉｎｔｅｒｆａｃｅ ｂｅｔｗｅｅｎ ｉｎｎａｔｅ ａｎｄ ａｄａｐｔｉｖｅ ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ｃｒｉｔ Ｒｅｖ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００２年；２２巻：３７３～３９０頁）。したがって、生物学的に活性なＩＬ－１２ｐ７０ヘテロ二量体の誘導は、最適なＤＣに基づくワクチンにとって重要であると思われる。それにもかかわらず、ＰＧＥ２を含む現在のＤＣワクチン接種プロトコールは、限られたＩＬ－１２だけを産生する（Ｌｅｅ ＡＷ、Ｔｒｕｏｎｇ Ｔ、Ｂｉｃｋｈａｍ Ｋら、Ａ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｇｒａｄｅ ｃｏｃｋｔａｉｌ ｏｆ ｃｙｔｏｋｉｎｅｓ ａｎｄ ＰＧＥ２ ｒｅｓｕｌｔｓ ｉｎ ｕｎｉｆｏｒｍ ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｍｏｎｏｃｙｔｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ：ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ．Ｖａｃｃｉｎｅ．２００２年；２０巻Ｓｕｐｐｌ４：Ａ８～Ａ２２）。ＩＬ－１２は、ｐ４０およびｐ３５鎖からなるヘテロ二量体サイトカインである。すでに、誘導性ＣＤ４０のシグナル伝達が、マウス骨髄由来ＤＣにおいてＩＬ－１２ｐ７０のｐ３５サブユニットの発現を促進することが報告されていた（Ｈａｎｋｓ ＢＡら、Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００５年；１１巻：１３０～１３７頁）。ＴＬＲ－４のライゲーションが、ｐ４０の発現を促進できることもまた報告されていた（Ｌｉｕ Ｊ、Ｃａｏ Ｓ、Ｈｅｒｍａｎ ＬＭ、Ｍａ Ｘ．Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｌ ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ（ＩＬ）－１２ ｐ３５ ａｎｄ ｐ４０ ｇｅｎｅ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎｄ ｉｎｔｅｒｆｅｒｏｎ（ＩＦＮ）－ｇａｍｍａ－ｐｒｉｍｅｄ ＩＬ－１２ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｂｙ ＩＦＮ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ ｆａｃｔｏｒ １．Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．２００３年；１９８巻：１２６５～１２７６頁）。したがって、ｉＣＤ４０－ＤＣを、ＬＰＳまたはＭＰＬの存在下で培養し、上清をＥＬＩＳＡにより、ＩＬ－１２ｐ７０の産生に関してアッセイした。

【０２４８】

予想通りに、標準的ＭＣを用いて処理したＤＣと同様に、ｉＣＤ４０－ＤＣは検出可能なＩＬ－１２ｐ７０ヘテロ二量体を産生しなかった。ＰＧＥ２がＭＣに抑制される場合、ＤＣは、検出可能であるが低レベルのＩＬ－１２ｐ７０を産生し、ＰＧＥ２に関する潜在的に有害な役割と一致する。さらに、ＬＰＳまたはＭＰＬ単独の存在下で１２時間培養されたＤＣもまたＩＬ－１２を産生できない（＜３０ｐｇ／ｍｌ）。しかし、Ａｄ－ｉＣＤ４０－形質導入ＤＣを、ＭＰＬまたはＬＰＳのどちらかの存在下で培養した場合、それらは、非常に高レベルのＩＬ－１２ｐ７０を産生した（ＭＰＬに関して１６．４±７．８ｎｇ／ｍｌ）。ＩＬ－１２のこのレベルは、ＰＧＥ２を欠く標準ＭＣにより誘導されたレベルより約２５倍高かった。興味深いことに、ｉＣＤ４０とＴＬＲ４とのこの相乗効果は、ＡＰ２０１８７の添加から部分的に独立しており、基本的なｉＣＤ４０シグナル伝達が、ＴＬＲ４のライゲーションと相乗効果を与え得ることを暗示する。ＩＬ－１２のレベルは

ウイルス粒子の用量と相関したので、ｉＣＤ４０－ＤＣにおけるＩＬ－１２ｐ７０の産生は、用量依存性である。

【０２４９】

ＣＤ４０のシグナル伝達は、通常は比較的短時間に厳しく制限されているので、（Ｃｏｎｔｉｎ Ｃ、Ｐｉｔａｒｄ Ｖ、Ｉｔａｉ Ｔ、Ｎａｇａｔａ Ｓ、Ｍｏｒｅａｕ ＪＦ、Ｄｅｃｈａｎｅｔ－Ｍｅｒｖｉｌｌｅ Ｊ．Ｍｅｍｂｒａｎｅ－ａｎｃｈｏｒｅｄ ＣＤ４０ ｉｓ ｐｒｏｃｅｓｓｅｄ ｂｙ ｔｈｅ ｔｕｍｏｒ ｎｅｃｒｏｓｉｓ ｆａｃｔｏｒ－ａｌｐｈａ－ｃｏｎｖｅｒｔｉｎｇ ｅｎｚｙｍｅ．Ｉｍｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｆｏｒ ＣＤ４０ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ．Ｊ Ｂｉｏｌ Ｃｈｅｍ．２００３年；２７８巻：３２８０１～３２８０９頁；Ｔｏｎｅ Ｍ、Ｔｏｎｅ Ｙ、Ｆａｉｒｃｈｉｌｄ ＰＪ、Ｗｙｋｅｓ Ｍ、Ｗａｌｄｍａｎｎ Ｈ．Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ＣＤ４０ ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｂｙ ｉｔｓ ｉｓｏｆｏｒｍｓ ｇｅｎｅｒａｔｅｄ ｔｈｒｏｕｇｈ ａｌｔｅｒｎａｔｉｖｅ ｓｐｌｉｃｉｎｇ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００１年；９８巻：１７５１～１７５６頁）、潜在的には獲得免疫にかぎって、ｉＣＤ４０が、ＴＬＲ－４－刺激ＤＣにおけるＩＬ－１２ｐ７０の発現の増強だけでなく、延長も誘導できるかどうかを決定した。ＩＬ－１２発現の動態を評価するために、ＬＰＳ処理ｉＣＤ４０－ＤＣと、ＬＰＳおよびＣＤ４０Ｌにより刺激したＤＣとを比較した。ＬＰＳ刺激を除去した場合、ＩＬ－１２ｐ７０の発現が停止される、ＣＤ４０Ｌまたは対照ベクター形質導入ＤＣと比較して、ｉＣＤ４０－ＤＣが、刺激後７２時間にわたってＩＬ－１２ｐ７０を産生できることが観察された。これらの結果は、誘導性ＣＤ４０シグナル伝達により、ＤＣがＴＬＲ－４刺激に応答して、増加レベルのＩＬ－１２ｐ７０を連続的に産生可能になることを示す。

【０２５０】

最終的に、サイトカインシグナル伝達のサプレッサー（ＳＯＣＳ１）の誘導を評価した。ＳＯＣＳ１は、ＤＣ活性化のネガティブフィードバック阻害剤であり、弱毒化できる（Ｗｅｓｅｍａｎｎ ＤＲ、Ｄｏｎｇ Ｙ、Ｏ’Ｋｅｅｆｅ ＧＭ、Ｎｇｕｙｅｎ ＶＴ、Ｂｅｎｖｅｎｉｓｔｅ ＥＮ．Ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｏｆ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ １ ｉｎｈｉｂｉｔｓ ｃｙｔｏｋｉｎｅ ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ＣＤ４０ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅｓ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００２年；１６９巻：２３５４～２３６０頁）ＬＰＳおよびサイトカイン刺激に対して応答性である（Ｅｖｅｌ－Ｋａｂｌｅｒ Ｋ、Ｓｏｎｇ ＸＴ、Ａｌｄｒｉｃｈ Ｍ、Ｈｕａｎｇ ＸＦ、Ｃｈｅｎ ＳＹ．ＳＯＣＳ１ ｒｅｓｔｒｉｃｔｓ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ’ ａｂｉｌｉｔｙ ｔｏ ｂｒｅａｋ ｓｅｌｆ ｔｏｌｅｒａｎｃｅ ａｎｄ ｉｎｄｕｃｅ ａｎｔｉｔｕｍｏｒ ｉｍｍｕｎｉｔｙ ｂｙ ｒｅｇｕｌａｔｉｎｇ ＩＬ－１２ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ａｎｄ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２００６年；１１６巻：９０～１００頁）。以前に報告されたように、ＬＰＳの刺激は、ＤＣにおいてＳＯＣＳ１の発現を上方制御した（Ｗｅｓｅｍａｎｎ ＤＲら、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００２年；１６９巻：２３５４～２３６０頁）。しかし、ＬＰＳの存在下では著しく、ｉＣＤ４０－ＤＣはＣＤ４０Ｌ刺激ＤＣよりＳＯＣＳ１の発現レベルが３倍低かった。さらに、ｉＣＤ４０はＣＤ４０Ｌとは異なり、それ自体ではＳＯＣＳ１を誘導しなかった。これらのデータは、ヒトＤＣにおいてｉＣＤ４０がＳＯＣＳ１誘導を部分的にバイパスでき、ＩＬ－１２レベルおよびＤＣ成熟マーカーの持続的上昇の観察を部分的に説明できることを示す。

【０２５１】

ＩＬ－１２に加えて、ＩＬ－６は、細胞生存および制御性Ｔ細胞に対する耐性において重要な役割を果たす（Ｒｅｓｃｉｇｎｏ Ｍら、Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１９９８年；１８８巻：２１７５～２１８０頁；Ｐａｓａｒｅ Ｃ、Ｍｅｄｚｈｉｔｏｖ Ｒ．Ｔｏｌｌ ｐａｔｈｗａｙ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｂｌｏｃｋａｄｅ ｏｆ ＣＤ４＋ＣＤ２５＋ Ｔ ｃｅｌｌ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｓｕｐｐｒｅｓｓｉｏｎ ｂｙ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００３年；２９９巻：１０３３～１０３６頁）

。Ａｄ－ｉＣＤ４０のトランスフェクションにおいて、ｉＣＤ４０－ＤＣを二量化剤およびＴＬＲ－４リガンドを用いて刺激した場合、ＩＬ－６の発現は有意に増強され、さらに上方制御されたことが観察された。したがって、ｉＣＤ４０のシグナル伝達は、一部の炎症性サイトカインの産生には十分であるが、鍵となるＴＨ１サイトカインのＩＬ－１２の産生のためにはさらなるＴＬＲのシグナル伝達が必要である。

【０２５２】

（実施例４）

抗原特異的ＴＨ１の分極化

抗原特異的ＴＨ１の分極化アッセイを、本明細書において提示する。普通の当業者は、誘導性ＰＲＲおよびＰＲＲアダプタータンパク質の関連において分極化をアッセイするために提示された実施例を改良できる。

【０２５３】

ＴＬＲ－４リガンドにより成熟されたｉＣＤ４０－ＤＣが、ＣＤ４＋ヘルパーＴ（ＴＨ）細胞を有効に予備刺激するかどうかをさらに調査するために、それらが、ＣＤ４＋エピトープ特異的Ｔ細胞応答をｉｎ　ｖｉｔｒｏで増大できるかどうかを決定した。ナイーブＣＤ４＋ＣＤ４５ＲＡ＋Ｔ細胞を、モデル抗原の破傷風トキソイドをパルスした自己Ａｄ－ｉＣＤ４０ＤＣの存在下で、７日間刺激した。７日目に、Ｔ細胞を、ＭＨＣクラスＩＩ拘束性破傷風トキソイドのエピトープ、ＴＴｐ３０を用いて刺激した。ＩＦＮ－ガンマの産生は、ｉＣＤ４０－ＤＣと同時培養したＣＤ４＋Ｔ細胞およびＭＰＬまたはＭＣのどちらかを用いて刺激したｉＣＤ４０－ＤＣにおいて有意に増加した。ＩＦＮ－ガンマの産生は、対照ウイルスＡｄ－ＧＦＰ形質導入ＤＣによって、またはＭＰＬもしくはＭＣ刺激単独によって誘導されなかったので、ＩＦＮ－ガンマの産生はｉＣＤ４０特異的であった。さらに、Ｔ細胞の分極化を、Ｔ細胞の上清中のＴＨ１／ＴＨ２サイトカインレベルを、サイトメトリービーズアレイ（ｃｙｔｏｍｅｔｒｉｃ　ｂｅａｄ　ａｒｒａｙ）を使用して評価することによって分析した。ＩＦＮ－ガンマ、ＴＮＦ－アルファ、ＩＬ－４およびＩＬ－５分泌サイトカインのレベルは、ｉＣＤ４０－ＤＣによって刺激されたヘルパーＴ細胞において増加し、ＴＨ１およびＴＨ２両方の分極化Ｔ細胞の拡大を示す。しかし、ＴＨ１サイトカインのレベルは、ＴＨ２関連サイトカインより有意に高く、ＴＨ１細胞の拡大の優勢を示す。対照的に、ナイーブＣＤ４＋ＣＤ４５ＲＡ＋細胞由来のＴＴ特異的ＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞の、ＭＣ－成熟ＤＣを使用する誘導は、ＴＴエピトープ特異的なＴＨ１の分化において中程度の偏向のみをもたらした。これらの結果はＤＣにおけるｉＣＤ４０のシグナル伝達が、おそらくＩＬ－１２のより多くの産生のために、ＤＣを、抗原特異的なＴＨ１の分化を有効に誘導可能にすることを示唆する。

【０２５４】

（実施例５）

腫瘍抗原特異的ＣＴＬ応答アッセイ

本明細書において、抗原特異的ＴＨ１分極化アッセイを提示する。普通の当業者は、誘導性ＰＲＲおよびＰＲＲアダプタータンパク質の関連において分極化をアッセイするために提示された実施例を改良できる。

【０２５５】

ｉＣＤ４０およびＭＰＬが、免疫原性の不十分なメラノーマ自己抗原のＭＡＧＥ－３に対する細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答を増強できるかどうかを決定した。ＨＬＡ－Ａ２陽性ドナー由来のｉＣＤ４０－ＤＣに、クラス－Ｉ　ＨＬＡ－Ａ２．１拘束性ＭＡＧＥ３由来免疫優勢ペプチドのＦＬＷＧＰＲＡＬＶをパルスし、自己Ｔ細胞と同時培養した。一連の刺激後、抗原特異的Ｔ細胞の頻度を、ＩＦＮ－ガンマ特異的ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって評価した。ＭＰＬを用いて刺激したｉＣＤ４０－ＤＣは、ＭＣを用いて刺激したｉＣＤ４０－ＤＣと比較して、ＭＡＧＥ－３特異的Ｔ細胞において５０％の増加をもたらし、対照の非形質導入（ＷＴ）ＤＣと比較して、抗原特異的Ｔ細胞において約５倍の増加をもたらした。

【０２５６】

ｉＣＤ４０－ＤＣが、抗原特異的様式で腫瘍細胞のＣＴＬ仲介死を増強できるかどうかをさらに決定した。ＨＬＡ－Ａ２陽性の健康なボランティア由来の未熟ＤＣに、Ａｄ－ｉＣＤ４０をトランスフェクトし、ＭＡＧＥ－３タンパク質をパルスし、刺激物質として使用し、ｉｎ ｖｉｔｒｏでＣＴＬを作製した。ＳＫ－ＭＥＬ－３７細胞（ＨＬＡ－Ａ２＋、ＭＡＧＥ－３＋）およびＭＡＧＥ－３ Ａ２．１ペプチド（ＨＬＡ－Ａ２＋、ＭＡＧＥ－３＋）をパルスしたＴ２細胞を標的として利用した。ＮＡ－６－ＭＥＬ細胞（ＨＬＡ Ａ２－、ＭＡＧＥ－３＋）および無関係なＡ２．１拘束性インフルエンザマトリックスペプチドをパルスしたＴ２細胞（ＨＬＡ－Ａ２＋）は陰性対照として機能した。ｉＣＤ４０－ＤＣにより誘導されたＣＴＬは、それらの同種の標的（ＳＫ－ＭＥＬ－３７）およびさらにＭＡＧＥ－３ Ａ２．１ペプチドをパルスしたＴ２細胞をも有効に認識し、溶解でき、ＭＡＧＥ－３特異的ＣＴＬの存在を示す。対照的に、対照標的は、有意に低いレベルで溶解された。ＭＰＬまたはＭＣを用いて処理したｉＣＤ４０－ＤＣを刺激物質として使用した場合、ＭＰＬまたはＭＣ単独で処理した非形質導入ＤＣと比較した溶解活性の改善は連続的に観察された。加えて、ＭＰＬを用いて処理したｉＣＤ４０－ＤＣによる、ＭＡＧＥ－３／ＨＬＡ－Ａ２特異的四量体陽性ＣＤ８＋ＣＴＬの有意な拡大が観察された。

【０２５７】

同様に、ＬＰＳおよびｉＣＤ４０刺激ＤＣがＣＴＬ溶解活性を増強できるかどうかを試験するために、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）に対する耐性を壊すそれらの能力を検査した。健康なＨＬＡ－Ａ２＋ボランティアから作製したＤＣに、ＰＳＭＡタンパク質（Ｄａｖｉｓ ＭＩ、Ｂｅｎｎｅｔｔ ＭＪ、Ｔｈｏｍａｓ ＬＭ、Ｂｊｏｒｋｍａｎ ＰＪ．Ｃｒｙｓｔａｌ ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ｏｆ ｐｒｏｓｔａｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｍｅｍｂｒａｎｅ ａｎｔｉｇｅｎ，ａ ｔｕｍｏｒ ｍａｒｋｅｒ ａｎｄ ｐｅｐｔｉｄａｓｅ．Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００５年；１０２巻：５９８１～５９８６頁）またはＭＡＧＥ－３をパルスし、ＡＤ－ｉＣＤ４０またはＡｄ－Ｌｕｃを形質導入し、自己Ｔ細胞と同時培養した。３ラウンドの刺激後、抗原特異的ＣＴＬ活性を、クロム放出アッセイにより、ＬＮＣａＰ細胞（ＨＬＡ－Ａ２＋ＰＳＭＡ＋）を標的として、およびＳＫ－Ｍｅｌ－３７（ＨＬＡ－Ａ２＋ＰＳＭＡ－）をＰＳＭＡ－パルスＤＣに対する対照として使用して測定した。同じドナーのＤＣにＭＡＧＥ－３をパルスし、ＬＮＣａＰ細胞（ＭＡＧＥ－３－）を陰性対照として使用した場合、ＳＫ－Ｍｅｌ－３７細胞（ＭＡＧＥ－３＋）を標的として使用した。まとめると、これらのデータはｉＣＤ４０－形質導入ＤＣは、ＭＣ処理ＤＣより強力な抗原特異的ＣＴＬ応答をｉｎ ｖｉｔｒｏで有意に誘導できることを示す。普通の当業者は、このアッセイを改良して、キメラｉＣＤ４０誘導性ＰＲＲアダプタータンパク質を使用して、腫瘍抗原特異的ＣＴＬ応答を試験できる。

【０２５８】

（実施例６）

誘導性ＣＤ４０は、ＣＣＲ７の発現およびＰＧＥ２有さないＤＣの遊走能力を増強する。

【０２５９】

抗原特異的ＴＨ１の分極化アッセイを本明細書において提示する。普通の当業者は、誘導性ＰＲＲおよびＰＲＲアダプタータンパク質の関連において分極化をアッセイするために提示された実施例を改良できる。

【０２６０】

他の成熟マーカーに加えて、ＣＣＲ７は、成熟に関してＤＣにおいて上方制御され、それらの流入領域リンパ節へ向かう遊走に関与する（Ｃｙｓｔｅｒ ＪＧ．Ｃｈｅｍｏｋｉｎｅｓ ａｎｄ ｃｅｌｌ ｍｉｇｒａｔｉｏｎ ｉｎ ｓｅｃｏｎｄａｒｙ ｌｙｍｐｈｏｉｄ ｏｒｇａｎｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．１９９９年；２８６巻：２０９８～２１０２頁）。近年、いくつかの報告により、走化性とは別に、ＣＣＲ７もまたＤＣの「細胞構築」、エンドサイトーシスの速度、生存、遊走速度および成熟に影響を与えることが示された（Ｓａｎｃｈｅｚ－Ｓａｎｃｈｅｚ Ｎ、Ｒｉｏｌ－Ｂｌａｎｃｏ Ｌ、Ｒｏｄ

ｒｉｇｕｅｚ－Ｆｅｒｎａｎｄｅｚ ＪＬ. Ｔｈｅ Ｍｕｌｔｉｐｌｅ Ｐｅｒｓｏｎａｌｉｔｉｅｓ ｏｆ ｔｈｅ Ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ＣＣＲ７ ｉｎ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ. Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ. ２００６年；１７６巻：５１５３～５１５９頁）。共刺激分子およびＴＨ１サイトカインに加えて、ｉＣＤ４０は、ヒトＤＣにおいてＣＣＲ７の発現を特異的に上方制御する。さらに、ＣＣＲ７の発現は、Ａｄ－ｉＣＤ４０ウイルス用量の増大と相関した。

【０２６１】

ＣＣＲ７の発現レベルは、ＭＩＰ－３ベータＣＣＬ１９に向かう遊走の増強と相関するので、ヒトｉＣＤ４０－ＤＣが、ＭＩＰ－３ベータに向かってｉｎ ｖｉｔｒｏで遊走できるかどうかを、トランスウェルアッセイにおいて決定した。ＡＰ２０１８７二量体化薬物を用いて処理したｉＣＤ４０－ＤＣは、ＭＣにより誘導された遊走レベルに相当する遊走レベルを有する。さらに、ｉＣＤ４０－ＤＣの遊走は、ＰＧＥ２が例え存在しない場合も、ＭＰＬまたはＭＣの刺激によりさらに増加した。これらのデータは高度に再現可能であり、ＰＧＥ２がヒトＤＣのリンパ節ホーミングにとって必須であるという、広く支持されている意見とは対照的に、ｉＣＤ４０がｉｎ ｖｉｔｒｏのＣＣＲ７の発現およびＤＣの遊走を誘導するのに十分であることを示す。

【０２６２】

ケモカインおよびケモカイン受容体は、１つの種の中および種の間で、配列同一性を高い割合で共有している（Ｄｅ Ｖｒｉｅｓ ＩＪ、Ｋｒｏｏｓｈｏｏｐ ＤＪ、Ｓｃｈａｒｅｎｂｏｒｇ ＮＭら、Ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ ｍｉｇｒａｔｉｏｎ ｏｆ ａｎｔｉｇｅｎ－ｐｕｌｓｅｄ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ｔｏ ｌｙｍｐｈ ｎｏｄｅｓ ｉｎ ｍｅｌａｎｏｍａ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｉｓ ｄｅｔｅｒｍｉｎｅｄ ｂｙ ｔｈｅｉｒ ｍａｔｕｒａｔｉｏｎ ｓｔａｔｅ. Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ. ２００３年；６３巻：１２～１７頁）。この知見に基づいて、ｉｎ ｖｉｖｏでヒトＤＣにおいて遊走をモニタリングするための新規な異種移植片モデルを開発した。ヒトＤＣにｉＣＤ４０を形質導入し、ＬＰＳまたはＭＣを用いて成熟させ、マウスＤＣを、ＬＰＳを用いて成熟させた。ＤＣにＡｄ５－ＣＢＲを同時形質導入したので、生物発光は即時に可視化された。期待通りに、未熟ＤＣは膝窩の流入リンパ節に遊走しなかった。しかし、ＬＰＳまたはＭＣを用いて成熟させたｉＣＤ４０－ＤＣは、異種の膝窩リンパ節において、接種２日後以内に検出可能であった。ＬＰＳを用いて刺激したｉＣＤ４０－ＤＣの遊走は、非刺激ＤＣより有意に高く（ｐ＝０．０３６）、マウスＤＣの遊走に相当した。さらに、２日目に、ｉＣＤ４０－ＤＣが鼠径ＬＮにおいて検出され、一方ＭＣ刺激ＤＣは検出されず、ｉＣＤ４０－ＤＣの遊走能力はＭＣを用いて刺激されたＤＣよりも高いことを示唆した。まとめると、これらの結果は、ＤＣにおけるｉＣＤ４０のシグナル伝達が、ＣＣＲ７の発現の調節におい重要な役割を果たし、リンパ節へのＤＣの遊走にとって十分であることを示している。ｉＣＤ４０－ＤＣの遊走は、細胞をＬＰＳを用いて刺激した場合さらに増強され、ＣＣＲ７の発現の増強と相関する。普通の当業者は、キメラｉＣＤ４０誘導性ＰＲＲアダプタータンパク質のアッセイのために、このアッセイを改良できる。

【０２６３】

（実施例７）

ｉＣＤ４０およびＰＲＲを用いた、実施例２から実施例６において提示したアッセイによる観察の要約

樹状細胞の有効性は、多くの変異、特に成熟状態およびリンパ節への効率的な遊走に依存する。癌患者におけるいくつかの臨床試験は、腫瘍特異的抗原に対する獲得免疫を誘導するＤＣの効力を示した（Ｎｅｓｔｌｅ ＦＯ、Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ Ｊ、Ｈａｒｔ Ｄ. Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ：Ｏｎ ｔｈｅ ｍｏｖｅ ｆｒｏｍ ｂｅｎｃｈ ｔｏ ｂｅｄｓｉｄｅ. Ｎａｔ Ｍｅｄ. ２００１年；７巻：７６１～７６５頁；Ｓｃｈｕｌｅｒ Ｇ、Ｓｃｈｕｌｅｒ－Ｔｈｕｒｎｅｒ Ｂ、Ｓｔｅｉｎｍａｎ ＲＭ. Ｔｈｅ ｕｓｅ ｏｆ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ｉｎ ｃａｎｃｅｒ ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ. Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ. ２００３年；

１５巻：１３８～１４７頁；Ｃｒａｎｍｅｒ ＬＤ、Ｔｒｅｖｏｒ ＫＴ、Ｈｅｒｓｈ ＥＭ．Ｃｌｉｎｉｃａｌ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ ｉｎ ｔｈｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｃａｎｃｅｒ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．２００４年；５３巻：２７５～３０６頁）。しかし、臨床応答は一時的であり、ＤＣワクチン設計のさらなる改善を保証する（Ｒｉｄｇｗａｙ Ｄ．Ｔｈｅ ｆｉｒｓｔ １０００ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｖａｃｃｉｎｅｓ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｖｅｓｔ．２００３年；２１巻：８７３～８８６頁；Ｄａｌｌａｌ ＲＭ、Ｌｏｔｚｅ ＭＴ．Ｔｈｅ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ａｎｄ ｈｕｍａｎ ｃａｎｃｅｒ ｖａｃｃｉｎｅｓ．Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０００年；１２巻：５８３～５８８頁）。現在のＤＣに基づくワクチンの制限は、リンパ組織内の一時的活性化状態、ＣＤ４＋Ｔ細胞免疫の誘導の低さおよび流入領域リンパ節への遊走能力の損傷である（Ａｄｅｍａ ＧＪ、ｄｅ Ｖｒｉｅｓ ＩＪ、Ｐｕｎｔ ＣＪ、Ｆｉｇｄｏｒ ＣＧ．Ｍｉｇｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｂａｓｅｄ ｃａｎｃｅｒ ｖａｃｃｉｎｅｓ：ｉｎ ｖｉｖｏ ｖｅｒｉｔａｓ？Ｃｕｒｒ Ｏｐｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００５年；１７巻：１７０～１７４頁）。ＬＰＳへの曝露後２４時間未満で、ＤＣは、ＴＨ１－分極化サイトカインのＩＬ－１２の合成を終了し、さらなる刺激剤に対して不応性になり（Ｌａｎｇｅｎｋａｍｐ Ａ、Ｍｅｓｓｉ Ｍ、Ｌａｎｚａｖｅｃｃｈｉａ Ａ、Ｓａｌｌｕｓｔｏ Ｆ．Ｋｉｎｅｔｉｃｓ ｏｆ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ：ｉｍｐａｃｔ ｏｎ ｐｒｉｍｉｎｇ ｏｆ ＴＨ１，ＴＨ２ ａｎｄ ｎｏｎｐｏｌａｒｉｚｅｄ Ｔ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０００年；１巻：３１１～３１６頁）、ヘルパーＴ細胞およびＣＴＬを活性化するそれらの能力を制限する。他の研究は、皮内投与された成熟ＤＣの５％未満がリンパ節に到達し、非効率的なホーミング[39]を示すことを示している。これらの発見は、活性化状態の延長およびＤＣの遊走能力および／またはリンパ節内の同系のＴ細胞が関与するＤＣ活性化「ウインドウ」の時間的調整のいずれかの必要性を強調している。

【０２６４】

ｉｎ ｖｉｖｏでマウスＤＣ機能を促進する方法を、キメラ誘導性ＣＤ４０受容体の操作によって開発した（Ｈａｎｋｓ ＢＡら、Ｎａｔ Ｍｅｄ．２００５年；１１巻：１３０～１３７頁）。誘導性ＣＤ４０の取り組みは、ヒトＤＣの免疫刺激性機能の増強においても有効であることが観察されている。ＩＬ－１２ｐ７０分泌に関するＴＬＲおよびＣＤ４０シグナル伝達の組み合わせの相乗的活性の以前の報告に一致して、ｉＣＤ４０＋ＴＬＲ４シグナル伝達は、高レベルのＩＬ－１２分泌、ＤＣの成熟、Ｔ細胞刺激機能および遊走能力の拡大を誘導した（Ｌａｐｏｉｎｔｅ Ｒら、Ｅｕｒ Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０００年；３０巻：３２９１～３２９８頁；Ｎａｐｏｌｉｔａｎｉ Ｇ、Ｒｉｎａｌｄｉ Ａ、Ｂｅｒｔｏｎｉ Ｆ、Ｓａｌｌｕｓｔｏ Ｆ、Ｌａｎｚａｖｅｃｃｈｉａ Ａ．Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｔｏｌｌ－ｌｉｋｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ａｇｏｎｉｓｔ ｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎｓ ｓｙｎｅｒｇｉｓｔｉｃａｌｌｙ ｔｒｉｇｇｅｒ ａ Ｔ ｈｅｌｐｅｒ ｔｙｐｅ １－ｐｏｌａｒｉｚｉｎｇ ｐｒｏｇｒａｍ ｉｎ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００５年；６巻：７６９～７７６頁）。

【０２６５】

ｉＤＣにおけるＩＬ－１２ｐ７０の分泌の増加および延長は、ＩＬ－１２シグナル伝達を阻害するＳＯＣＳ１の産生を最優先に一部起因すると思われる自己免疫寛容を壊すことができることを実証した（Ｅｖｅｌ－Ｋａｂｌｅｒ Ｋら、Ｊ Ｃｌｉｎ Ｉｎｖｅｓｔ．２００６年；１１６巻：９０～１００頁）。可溶性ＣＤ４０Ｌにより刺激された内因性ＣＤ４０のシグナル伝達は、ＳＯＣＳ１の上方制御をもたらすが、ｉＣＤ４０は、有意なＳＯＣＳ１導入が無くてもＤＣを活性化することが決定されている。加えて、ｉＣＤ４０のシグナル伝達は、ＤＣにおいて、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＣＴＬの刺激における効力の増強を示すＩＬ－１２ｐ７０の高度かつ延長された発現を招く。

【０２６６】
ＩＬ－６は、ｐ３８ＭＡＰＫ、ＥＲＫ１，２　４７およびＰＩ３－キナーゼなどの抗アポトーシス経路の活性化による、多くの異なる細胞型の生存に関わっている（Ｂｉｓｐｉｎｇ　Ｇ、Ｋｒｏｐｆｆ　Ｍ、Ｗｅｎｎｉｎｇ　Ｄら、Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｒｅｃｅｐｔｏｒ　ｋｉｎａｓｅｓ　ｂｙ　ａ　ｎｏｖｅｌ　ｉｎｄｏｌｉｎｏｎｅ　ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅ　ｉｎ　ｍｕｌｔｉｐｌｅ　ｍｙｅｌｏｍａ：　ａｂｒｏｇａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｓｔｒｏｍａ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｉｎｎｔｅｒｌｅｕｋｉｎ－６　ｓｅｃｒｅｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ａｐｏｐｔｏｓｉｓ　ｉｎ　ｃｙｔｏｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ　ｄｅｆｉｎｅｄ　ｓｕｂｇｒｏｕｐｓ．　Ｂｌｏｏｄ．　２００６年；１０７巻：２０７９～２０８９頁）。ＤＣにおけるｉＣＤ４０およびＴＬＲ－４のシグナル伝達によるＩＬ－６の発現の誘導を、さらに特定した。この発見は、前記のＤＣの生存延長を部分的に説明できる（Ｈａｎｋｓ　ＢＡら、Ｎａｔ　Ｍｅｄ．　２００５年；１１巻：１３０～１３７頁）。さらに、ＩＬ－６の発現は、ＣＤ４＋ＣＤ２５＋制御性Ｔ細胞の作製を阻害するＤＣの能力において重要である（Ｐａｓａｒｅ　ＣおよびＭｅｄｚｈｉｔｏｖ　Ｒ．、Ｓｃｉｅｎｃｅ．　２００３年；２９９巻：１０３３～１０３６頁）。この関連において、ｉＣＤ４０－ＤＣ－に基づくワクチンは、ターゲッティング抗原に対する末梢寛容を阻害する、負の制御因子を、ｉｎ　ｖｉｖｏで潜在的に抑制できる。

【０２６７】
癌免疫療法の１つの主要な焦点は癌患者において強力な腫瘍抗原特異的ＣＴＬ応答を促進するワクチンの設計であった（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ　ＳＡ．、Ｉｍｍｕｎｉｔｙ．　１９９９年；１０巻：２８１～２８７頁）。しかし、累積証拠は、ＣＤ４＋Ｔ細胞は、ＣＤ８＋Ｔ細胞の誘導、持続および拡大に寄与するので、ＣＤ４＋Ｔ細胞が、抗腫瘍免疫において重要な役割を果たすこと示唆している（Ｋａｌａｍｓ　ＳＡ、Ｗａｌｋｅｒ　ＢＤ．　Ｔｈｅ　ｃｒｉｔｉｃａｌ　ｎｅｅｄ　ｆｏｒ　ＣＤ４　ｈｅｌｐ　ｉｎ　ｍａｉｎｔａｉｎｉｎｇ　ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ　ｃｙｔｏｔｏｘｉｃ　Ｔ　ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ．　Ｊ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ．　１９９８年；１８８巻：２１９９～２２０４頁）。本発明者らの研究は、ｉＣＤ４０－ＤＣがナイーブＴ細胞を有効に刺激し、免疫応答の両方の腕（すなわち、ＭＡＧＥ－３およびＰＳＭＡ特異的ＣＴＬならびにＴＴ特異的ＣＤ４＋Ｔ細胞）を表す抗原特異的細胞を有効に拡大することを示した。ＴＨ１（ＩＦＮ－ガンマおよびＴＮＦ－アルファ）サイトカインが、ｉＣＤ４０－ＤＣ刺激ＣＤ４＋Ｔ細胞の環境下で優勢に産生されたことを実証し、ＴＨ１細胞の拡大を示す。ＰＧＥ２（ＭＣの鍵となる成分）は、ＴＨ１応答の強力なサプレッサーであるので、Ｔ細胞を、ＭＣ処理ＤＣを用いて刺激した場合、期待通りに、これらのサイトカインは検出されなかった（Ｋａｌｉｎｓｋｉ　Ｐ、Ｈｉｌｋｅｎｓ　ＣＭ、Ｓｎｉｊｄｅｒｓ　Ａ、Ｓｎｉｊｄｅｗｉｎｔ　ＦＧ、Ｋａｐｓｅｎｂｅｒｇ　ＭＬ．　Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌｓ，　ｏｂｔａｉｎｅｄ　ｆｒｏｍ　ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　ｂｌｏｏｄ　ｐｒｅｃｕｒｓｏｒｓ　ｉｎ　ｔｈｅ　ｐｒｅｓｅｎｃｅ　ｏｆ　ＰＧＥ２，　ｐｒｏｍｏｔｅ　Ｔｈ２　ｒｅｓｐｏｎｓｅｓ．　Ａｄｖ　Ｅｘｐ　Ｍｅｄ　Ｂｉｏｌ．　１９９７年；４１７巻：３６３～３６７頁；Ｍｃｌｌｒｏｙ　Ａ、Ｃａｒｏｎ　Ｇ、Ｂｌａｎｃｈａｒｄ　Ｓら、Ｈｉｓｔａｍｉｎｅ　ａｎｄ　ｐｒｏｓｔａｇｌａｎｄｉｎ　Ｅ　ｕｐ－ｒｅｇｕｌａｔｅ　ｔｈｅ　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｔｈ２－ａｔｔｒａｃｔｉｎｇ　ｃｈｅｍｏｋｉｎｅｓ　（ＣＣＬ１７　ａｎｄ　ＣＣＬ２２）　ａｎｄ　ｄｏｗｎ－ｒｅｇｕｌａｔｅ　ＩＦＮ－ｇａｍｍａ－ｉｎｄｕｃｅｄ　ＣＸＣＬ１０　ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｂｙ　ｉｍｍａｔｕｒｅ　ｈｕｍａｎ　ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ　ｃｅｌｌｓ．　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ．　２００６年；１１７巻：５０７～５１６頁；Ｍｅｙｅｒ　Ｆ、Ｒａｍａｎｕｊａｍ　ＫＳ、Ｇｏｂｅｒｔ　ＡＰ、Ｊａｍｅｓ　ＳＰ、Ｗｉｌｓｏｎ　ＫＴ．　Ｃｕｔｔｉｎｇ　ｅｄｇｅ：　ｃｙｃｌｏｏｘｙｇｅｎａｓｅ－２　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ　Ｔｈ１　ｐｏｌａｒｉｚａｔｉｏｎ　ｉｎ　ｒｅｓｐｏｎｓｅ　ｔｏ　Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ．　Ｊ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．　２００３年；１７１巻：３９１３～３９１７頁）。

【０２６８】
近年のマウス研究により、ＤＣの遊走がＴ細胞の増殖と直接相関することが示された（Ｍａｒｔｌｎ－Ｆｏｎｔｅｃｈａ Ａ、Ｓｅｂａｓｔｉａｎｉ Ｓ、Ｈｏｐｋｅｎ ＵＥら、Ｒｅｇｕｌａｔｉｏｎ ｏｆ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｍｉｇｒａｔｉｏｎ ｔｏ ｔｈｅ ｄｒａｉｎｉｎｇ ｌｙｍｐｈ ｎｏｄｅ：ｉｍｐａｃｔ ｏｎ Ｔ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ｔｒａｆｆｉｃ ａｎｄ ｐｒｉｍｉｎｇ．Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．２００３年；１９８巻：６１５～６２１頁）。したがって、遊走の増加は、ＤＣに基づくワクチン[４５]の有効性を増強するはずである。最新のＤＣワクチンのプロトコールは、炎症性サイトカインを用いたワクチン注射部位のプレコンディショニングまたはＴＬＲリガンドおよび主にＭＣ成分からなる炎症促進性サイトカインを用いたＤＣのｅｘ ｖｉｖｏ刺激を含む（Ｍａｒｔｌｎ－Ｆｏｎｔｅｃｈａ Ａら、Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．２００３年；１９８巻：６１５～６２１頁；Ｐｒｉｎｓ ＲＭ、Ｃｒａｆｔ Ｎ、Ｂｒｕｈｎ ＫＷら、Ｔｈｅ ＴＬＲ－７ ａｇｏｎｉｓｔ，ｉｍｉｑｕｉｍｏｄ，ｅｎｈａｎｃｅｓ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌ ｓｕｒｖｉｖａｌ ａｎｄ ｐｒｏｍｏｔｅｓ ｔｕｍｏｒ ａｎｔｉｇｅｎ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ Ｔ ｃｅｌｌ ｐｒｉｍｉｎｇ：ｒｅｌａｔｉｏｎ ｔｏ ｃｅｎｔｒａｌ ｎｅｒｖｏｕｓ ｓｙｓｔｅｍ ａｎｔｉｔｕｍｏｒ ｉｍｍｕｎｉｔｙ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００６年；１７６巻：１５７～１６４頁）。ＣＣＲ７およびそのリガンドに対する感作の両方を上方制御することによって、ＤＣの遊走能力を刺激するので、その多数の免疫抑制機能[８～１２]にもかかわらず、ＰＧＥ２は過去数年の間、ＤＣ成熟カクテルの不可欠な成分として使用されてきた。ＰＧＥ２を用いないＤＣの遊走能力を増強する別の取り組みは、ＤＣに基づくワクチンの改善によって有益であるはずである。

【０２６９】
これらの研究の結果は、ＤＣにおいてｉＣＤ４０のシグナル伝達がＣＣＲ７の発現を上方制御するだけでなく、ｉｎ ｖｉｔｒｏでＣＣＬ１９に対するそれらの走化性を刺激することを示す。加えて、ｉＣＤ４０を形質導入した未熟ＤＣは、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏの両方で、ＭＣ刺激ＤＣと同様に効率的に遊走できた。さらに、ｉＣＤ４０－ＤＣの遊走は、細胞を、ＴＬＲ－４リガンドを用いて刺激した場合さらに誘導された。ＣＣＲ７の刺激は、ＤＣの遊走速度を上昇させ、この受容体がＤＣの移動および運動性を制御できることを示すことが最近示された（Ｒｉｏｌ－Ｂｌａｎｃｏ Ｌ、Ｓａｎｃｈｅｚ－Ｓａｎｃｈｅｚ Ｎ、Ｔｏｒｒｅｓ Ａら、Ｔｈｅ ｃｈｅｍｏｋｉｎｅ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ＣＣＲ７ ａｃｔｉｖａｔｅｓ ｉｎ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ｔｗｏ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ｍｏｄｕｌｅｓ ｔｈａｔ ｉｎｄｅｐｅｎｄｅｎｔｌｙ ｒｅｇｕｌａｔｅ ｃｈｅｍｏｔａｘｉｓ ａｎｄ ｍｉｇｒａｔｏｒｙ ｓｐｅｅｄ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００５年；１７４巻：４０７０～４０８０頁；Ｐａｌｅｃｅｋ ＳＰ、Ｌｏｆｔｕｓ ＪＣ、Ｇｉｎｓｂｅｒｇ ＭＨ、Ｌａｕｆｆｅｎｂｕｒｇｅｒ ＤＡ、Ｈｏｒｗｉｔｚ ＡＦ．Ｉｎｔｅｇｒｉｎ－ｌｉｇａｎｄ－ｂｉｎｄｉｎｇ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｇｏｖｅｒｎ ｃｅｌｌ ｍｉｇｒａｔｉｏｎ ｓｐｅｅｄ ｔｈｒｏｕｇｈ ｃｅｌｌ－ｓｕｂｓｔｒａｔｕｍ ａｄｈｅｓｉｖｅｎｅｓｓ．Ｎａｔｕｒｅ．１９９７年；３８５巻：５３７～５４０頁；Ｙａｎａｇａｗａ Ｙ、Ｏｎｏｅ Ｋ．ＣＣＬ１９ ｉｎｄｕｃｅｓ ｒａｐｉｄ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ｏｆ ｍｕｒｉｎｅ ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ ｃｅｌｌｓ．Ｂｌｏｏｄ．２００２年；１００巻：１９４８～１９５６頁）。ＣＣＲ７の刺激は、ＤＣ５８の成熟表現型を増強することが示されている。したがって、ＤＣにｉＣＤ４０を形質導入することによって、ＣＣＲ７の発現、ＤＣの遊走および成熟状態は、増強され、ＰＧＥ２の必要性が取り除かれる。

【０２７０】
最終的に、ＤＣのｉＣＤ４０刺激は、標的ＬＮＣａＰ細胞の死を有意に増加できる前立腺特異的抗原、ＰＳＭＡに対する強力な細胞傷害性Ｔ細胞応答を誘導できる（Ｄｕｄｌｅｙ ＭＥ、Ｗｕｎｄｅｒｌｉｃｈ ＪＲ、Ｙａｎｇ ＪＣら、Ａｄｏｐｔｉｖｅ ｃｅｌ

ｌ ｔｒａｎｓｆｅｒ ｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｌｌｏｗｉｎｇ ｎｏｎ－ｍｙｅｌｏａｂｌａｔｉｖｅ ｂｕｔ ｌｙｍｐｈｏｄｅｐｌｅｔｉｎｇ ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｔｈｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｐａｔｉｅｎｔｓ ｗｉｔｈ ｒｅｆｒａｃｔｏｒｙ ｍｅｔａｓｔａｔｉｃ ｍｅｌａｎｏｍａ．Ｊ Ｃｌｉｎ Ｏｎｃｏｌ。２００５年；２３巻：２３４６～２３５７頁；Ｍｏｒｇａｎ ＲＡ、Ｄｕｄｌｅｙ ＭＥ、Ｗｕｎｄｅｒｌｉｃｈ ＪＲら、Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｇｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎ Ｐａｔｉｅｎｔｓ Ａｆｔｅｒ Ｔｒａｎｓｆｅｒ ｏｆ Ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００６年）。本明細書に引用した他の文献は、「Ｉｎｄｕｃｅｄ Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ Ｉｎ Ｄｅｎｄｒｉｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ」と題され、発明者としてＳｐｅｎｃｅｒらの名が挙げられ、現在米国特許第７，４０４，９５０号として発行された、２００４年２月１８日提出の米国特許出願第１０／７８１，３８４号に参照された。

【０２７１】

（実施例８）

誘導性ＣＤ４０

先天性免疫系は、パターン認識受容体、ＰＲＲのいくつかのファミリーを使用して病原体感染または損傷を感知する。ＰＲＲの１つのファミリーは、現在哺乳動物中に約１１のメンバーを含むＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）である。これらは通常、ロイシンリッチモチーフ（ＬＲＭ）を介して多価リガンドと結合する。リガンドは、細菌、ウイルス、真菌または宿主細胞に由来でき、細胞表面または細胞内小胞（特にＴＬＲ３、７、８および９）内のどちらかにおいてＴＬＲと結合できる。それらの細胞質シグナル伝達ドメイン内で、それらは、下流のＴＩＲ含有アダプター分子、例えば、ＭｙＤ８８およびＴＲＩＦ／ＴＩＣＡＭ－１ならびにアダプターＴＩＲＡＭ／ＴＩＣＡＭ－２およびＭＡＬ／ＴＩＲＡＰと結合する、保存ＴＩＲ（Ｔｏｌｌ／ＩＬ－１Ｒ）ドメインを共有する。さらなるＰＲＲは、ＮＯＤ様受容体（例えば、ＮＯＤ１およびＮＯＤ２）およびＲＩＧ様ヘリカーゼ、ＲＩＧ－ＩおよびＭｄａ－５を含む。多くのＰＲＲは、フレキシブルＬＲＭを介してリガンドと結合し、タンパク質－タンパク質結合モチーフ、例えば、ＴＩＲまたはＣＡＲＤ（カスパーゼ動員ドメイン）ドメインを介して下流のシグナル伝達分子とカップリングする。

【０２７２】

ＴＬＲ－４を介した刺激と、共刺激性分子ＣＤ４０を介したシグナル伝達とを併せると、ヒト単球由来樹状細胞（ＭｏＤＣ）において高レベルの成熟および遊走特性を促進できる。公開および非公開データ[2～7]の両方に基づき、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよび／またはｉｎ ｖｉｖｏのヒトＭｏＤＣの活性化状態のこの延長および増強は、獲得免疫療法のための自己腫瘍特異的Ｔ細胞の活性化および拡大の両方を促進でき、ワクチン接種のための自己限定ｅｘ ｖｉｖｏ成熟ＤＣの問題を克服できる。

【０２７３】

さまざまな取り組みは、さまざまなＰＲＲと、誘導性ＣＤ４０との組み合わせの使用を評価するために利用できる。これらの取り組みおよびこれらの評価を実施するために使用した実験方法はまた、誘導性ＣＤ４０と、誘導性ＰＲＲアダプタータンパク質、例えば、ＭｙＤ８８およびＴＲＩＦとの組み合わせを研究するためにも使用できる。

【０２７４】

複合体を交換するために、不明なところが多いＭｏＤＣ成熟カクテル、またはアジュバントならびにＣＤ４０シグナル伝達、Ｔｏｌｌ様受容体４のＣＩＤ誘導性型（ｉＴＬＲ４と呼ばれる）および他のｉＴＬＲ（すなわち、ＴＬＲ３、７、８および９）との組み合わせを開発し、ｉＴＬＲを、同じポリペプチド鎖内でトランスまたはシスのどちらかでｉＣＤ４０との相乗効果に関してアッセイする。有効性は、転写因子ＮＦカッパＢおよびＩＲＦ３／７の誘導ならびにＤＣ系、Ｄ２ＳＣ／１におけるｐ３８およびＪＮＫのリン酸化に基づく。最も強力な誘導性受容体を、ＭｏＤＣの効率的な形質導入のために、アデノベクター内にサブクローニングする。

【０２７５】

樹状細胞（ＤＣ）は、獲得免疫の開始および制御において重要な役割を果たす[7、8]。「危険なシグナル」の検出において、ＤＣは、遺伝的成熟プログラムを受けることによって、それらの微小環境に生理学的に適応する[6]。抗原提示および共刺激性分子を使用して、ＤＣは、ナイーブ抗原特異的Ｔリンパ球を強力に活性化でき、それらのその後の表現型および機能を制御できる[9]。ほとんどの場合、ＤＣによる強固な細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫の開発は、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞由来の「ヘルパー」シグナルを必要とする[10]。このシグナルは、可溶性サイトカイン、例えばＩＬ－２およびＤＣの表面ＣＤ４０受容体のＣＤ４０Ｌ仲介刺激の両方からなる[11～13]。腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーのメンバー、ＣＤ４０は、いくつかの抗原提示、共刺激性サイトカインおよび生存促進性遺伝子の上方制御をもたらすＤＣ内でさまざまな経路を誘発し、ＣＤ４０は、集約的にＤＣがＣＴＬの活性化を誘導できるようにする[14、15]。

【０２７６】

抗原提示細胞（ＡＰＣ）としてのＤＣの抜群の役割を得、それらを、さまざまな悪性腫瘍の治療のためのワクチン接種プロトコールにおける天然のアジュバントとして活用できる[16、17]。通常、適用は、いくつかの方法のうちの１つ、例えば、未熟ＤＣへの非分画腫瘍溶解物のパルス、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））あるいはＤＣへの巨大腫瘍のｍＲＮＡまたはＴＡＡをコードするｍＲＮＡのトランスフェクト（１８、１９において再考される）による、白血球除去、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４中の培養における分化ならびに未熟単球（またはＣＤ３４$^{+}$前駆体細胞）－由来ＤＣ（ＭｏＤＣ）への腫瘍抗原の投入を介した末梢血単球の収穫を含む。次いで、抗原投入ＤＣを、炎症性サイトカイン（例えば、ＴＮＦアルファ、ＩＬ１ベータ、ＩＬ６およびＰＧＥ$_{2}$）または他のアジュバント（例えば、ＬＰＳ、ＣｐＧオリゴヌクレオチド）を用いて、通常通りｅｘ　ｖｉｖｏで成熟させ、患者に注射した。個々の場合において、ＤＣの免疫刺激特性は、多くの変異、特にリンパ節への遊走能力および完全な成熟状態に依存する。しかし、ＤＣ免疫療法を用いた最近の臨床試験における成功が限定されていることは、ＤＣに基づく免疫療法が、抗癌治療のより従来型のモダリティと平行して治療の宝庫に含まれる場合、現在のプロトコールを改良する必要を示唆している[20、21]。

【０２７７】

ＤＣに基づくワクチンの２つの鍵となる制限は、成熟ＤＣの寿命の短さおよびリンパ組織内でのそれらの一時的活性化状態である。リポ多糖類（ＬＰＳ）への曝露後２４時間未満で、ＤＣは、Ｔ$_{H}$１－分極化サイトカインのＩＬ－１２の合成を終了し、さらなる刺激剤に対して不応性になり[22]、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）を活性化するそれらの能力を制限する。他の研究は、流入領域リンパ節（ＬＮ）内の抗原パルスＤＣの生存は、それらの送達後４８時間だけに制限され、主として抗原特異的ＣＴＬによる排除によるものであることを示す[23]。これらの発見は、ＤＣの活性化状態および寿命の延長および／またはＬＮ内の同系のＴ細胞が関与するＤＣ活性化「ウインドウ」の時間的調整のいずれかの方法の改良の必要性を強調している。したがって、ＤＣの活性化および生存の増強は、腫瘍に対する免疫の促進に重要であると思われる。

【０２７８】

ＤＣの生存は、少なくとも部分的には、１種または複数種の保存Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）およびＴ細胞発現共刺激性分子（例えば、ＣＤ４０ＬおよびＴＲＡＮＣＥ）を介して作用する病原体由来分子により制御され、抗アポトーシス活性に関してＢｃｌ－２およびＢｃｌ－ｘ$_{L}$に部分的に依存する[3、24～27]。ＴＬＲ－、ＣＤ４０－またはＢｃｌ－２に仲介されるＤＣの長寿は十分立証されているが、恒常性フィードバック機構は、腫瘍ワクチンプロトコールにおけるＤＣの長寿を拡大するＴＬＲ－リガンドまたはＢｃｌ－２ファミリーのメンバーの有用性を制限すると思われる。これらは、受容体の脱感作または下方制御[4、28、29]、ＩＲＡＫ－Ｍ[30]およびＳＯＣＳ－１[5]のようなＴＬＲ／ＩＬ－１Ｒに対する負のレギュレーターの発現ならびにＢｉｍ[31]などのアポトーシス促進性分子の誘導を含み、ＴＬＲシグナルによる抗アポトーシス分子の中和をもたらす。

【０２７９】
操作のための魅力的な標的は、ＴＮＦファミリー受容体、ＣＤ４０である。ＤＣが末梢のいたるところで遭遇する炎症促進性サイトカインまたは病原体関連分子とは異なり、ＤＣ発現ＣＤ４０受容体は、その同質リガンド、ＣＤ４０Ｌを介して、ＬＮ副皮質内でＣＤ４$^{+}$ヘルパーＴ細胞により関与される[12、13、37]。最近の研究は、ＣＤ４０の刺激が、ＤＣを「交差提示」抗原可能にし[38]、末梢Ｔ細胞寛容性を克服し[39]、ＣＤ４０の刺激に基づく治療研究を促進することをさらに示した。戦略は、ＣＤ４０特異的モノクローナル抗体（ｍＡｂ）または三量体ＣＤ４０Ｌ[40]の全身送達を含み、ＣＤ４０刺激の利用、抗原投入ＤＣに基づくワクチン[41]および遺伝子改変ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）発現ＤＣの投与[42]を含んだ。大きな潜在力にもかかわらず、Ｂ細胞、マクロファージおよび内皮細胞を含むさまざまな他の細胞型によるＣＤ４０のユビキタスな発現を含む、ＣＤ４０のいくつかの特性はその治療的開発を制限し[14]、ＣＤ４０刺激剤の全身投与による副作用の可能性を増加する。さらに、いくつかの機序は、マトリックスメタロプロテアーゼ酵素によるＣＤ４０Ｌ誘導性切断[29]、選択的にスプライシングされたＣＤ４０アイソフォームによるネガティブフィードバックの分解[28]およびＣＤ４０のＣＤ４０Ｌ仲介エンドサイトーシスを含む、その細胞外ドメインをターゲティングすることによってＣＤ４０の表面発現を制御する。

【０２８０】
したがって、ＤＣターゲット化の機能性を提供することによりリンパ組織内のＤＣの刺激促進状態を拡大するための、ＣＤ４０シグナル伝達経路に基づくＤＣの活性化系、時間的制御およびＣＤ４０制御機構に対する耐性が開発されている。この操作された組換え受容体は、リガンド結合ドメインと融合されたＣＤ４０の細胞質ドメインおよび膜ターゲティング配列を含む（図２）。脂質透過性二量体化薬物の腹腔内投与は、ＣＤ４０依存性シグナル伝達カスケードの強力な誘導をもたらし、他の活性化モダリティと比較して、ｉｎｖｉｖｏの規定された抗原および腫瘍の両方に対して免疫原性が非常に改善された[4]。それ故、キメラＣＤ４０を、誘導性ＣＤ４０（ｉＣＤ４０）と名付けた。マウス中のｉＣＤ４０活性化ＤＣの高度な有用性は、内因性ＣＤ４０シグナル伝達を安定化させる方法が、ＤＣワクチンの効力を増強させるであろうことを示唆した。

【０２８１】
ＴＬＲはさまざまなウイルスおよび細菌由来分子と結合し、これらは標的細胞、例えばＴ細胞、マクロファージおよび樹状細胞の活性化を誘発する。１０種ほどの哺乳動物のＴＬＲの大部分が、誘導性ＰＲＲアダプタータンパク質である、ＮＦカッパＢの活性化をもたらすＭｙＤ８８により開始されるシグナル伝達を利用するが、ＴＬＲ３は、その代わりに、ＩＲＦ３およびＩ型インターフェロンの誘導をもたらす誘導性ＰＲＲアダプターＴＲＩＦに頼る。一緒になって、これらのシグナル伝達経路は相乗効果を与えて、高レベルのＴｈ１サイトカイン、ＩＬ－１２を産生できる[43]。興味深いことに、ＴＬＲ－４は、強力なマイトジェン、ＬＰＳまたは誘導体の結合後に両方の経路を利用できる。共刺激分子ＣＤ４０を介したシグナル伝達と併せたＴＬＲ－４を介した刺激は、ヒトＭｏＤＣにおいて高レベルの成熟および遊走特性を促進できる。

【０２８２】
細胞膜を通過するシグナルを生み出す多くの細胞表面受容体のように、ＴＬＲはホモもしくはヘテロ二量体化またはオリゴマー化によってすべて活性化されると思われる。ＴＬＲ－４のホモ二量体化およびＴＬＲ２およびＴＬＲ１ならびにＴＬＲ６のヘテロ二量体化仲介活性化の報告がすでにある[44～48]。さらに、最近の記事で、Ｉａｎ Ｗｉｌｓｏｎおよび同僚は、ＴＬＲ－３を結晶化し、細胞外ドメイン内の二量体化領域を特定し、ｄｓＲＮＡの結合後のホモ二量体として、二量体化領域がシグナル伝達することを示唆した[49]。したがって、ＴＬＲ、特にＴＬＲ－４の化学的に誘導された二量体化は、それらの誘導をもたらすと思われる。

【０２８３】
ｅｘ ｖｉｖｏで成熟した、単球由来「増強」ヒトＤＣの開発に関する考察。公開[4]お

よび非公開の研究は、ｉｎ ｖｉｖｏでＤＣ機能を増強する２つの強力な方法、最適化された構成的Ａｋｔ（Myr_F－ΔＡｋｔ）の異所性発現およびｉｎ ｖｉｖｏのキメラ誘導性ＣＤ４０の操作を示唆している。この作業を完全にするために、Ｓｉ－Ｙｉ Ｃｈｅｎ（Ｂａｙｌｏｒ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ、Ｈｏｕｓｔｏｎ、Ｔｅｘａｓ）は、ＤＣにおいてＳＯＣＳ－１レベルを低下させることが、有効性をさらに増強可能にすることを示している[5]。ｉＣＤ４０、Myr_F－ΔＡｋｔおよびｓｏｃｓ－１の取り組みに関する、マウスにおける有意に支持するデータは蓄積されているが、ヒトＭｏＤＣは、ネズミ骨髄由来ＤＣと同一ではない。特に、最も一般的に使用されるヒトＤＣワクチンのプロトコールは、ＴＮＦ－アルファ、ＩＬ－１－ベータ、ＩＬ－６およびPGE_2を含有する「ゴールドスタンダード」炎症促進性成熟カクテルを用いた治療に先立って、単球由来ＭｏＤＣの分化に関与する。PGE_2は、ＣＣＲ７の上方制御およびリンパ節由来ケモカイン、ＣＣＬ１９およびＣＣＬ２１に対する走化性反応の増加に必要であると思われるが[50、51]、PGE_2は、生理活性ＩＬ１２ｐ７０の産生の抑制によって、ＤＣシグナル伝達を損なうこともあり得る[52]。ＩＬ１２の抑制はｉｎ ｖｉｖｏで永続性であるとは考えにくいが、ＤＣワクチンのゆっくりと積み上げられている成功率を得[7]、上に要約したどの方法が、遊走能力に干渉せずに、ヒトＭｏＤＣにおけるPGE_2仲介ＩＬ１２抑制を最もよく克服できるかを、臨床応用前に決定することが重要であると思われる。

【０２８４】

ＤＣに基づくワクチンにおける臨床成功は中程度であるが[7、20]、非常に低い副作用および申し分の無い特異性および感受性がこのモダリティを魅力的にしている。抗原特異的Ｔ細胞との相互作用が延長されるように思われるので、これらの増強されたＤＣは、ＤＣワクチンの臨床転帰を改善すると思われる。増強された抗原発現ＤＣの開発は、悪性腫瘍の治療に対する潜在的適用性を有するだけでなく、多くの病原体などの治療にも適用可能なはずである。さらに、この高度に影響を与える取り組みは、腫瘍抗原を特定した、多数の研究室による先行する試みを補完するはずである。

【０２８５】

一次ＤＣにおけるｉＣＤ４０の機能性の特徴付けおよびｉＣＤ４０発現ＤＣに基づく前立腺癌ワクチンの開発。新鮮に単離されたＤＣの多くの特徴を保有する、ネズミＤ２ＳＣ／１細胞におけるｉＣＤ４０の機能性の実証後（[4]および非掲載）、一次骨髄由来ＤＣ（ＢＭＤＣ）におけるｉＣＤ４０の機能性を、ｉＣＤ４０発現アデノウイルスを利用することにより試験した。Ａｄ－ｉＣＤ４０－ＧＦＰと名付けた、ヘルパー依存性、ΔＥ１、ΔＥ３－の５型アデノウイルスベクターを、ＣＭＶ初期／即時型プロモーター／エンハンサーの調節下で、ｉＣＤ４０およびＥＧＦＰの両方を発現するように操作した。Ａｄ－ｉＣＤ４０－ＧＦＰの形質導入に成功し、精製ＢＭＤＣにおいてＡｄ－ｉＣＤ４０－ＧＦＰはｉＣＤ４０トランス遺伝子およびＥＧＦＰマーカーを発現した。Ｂ７．２（ＣＤ８６）のｉＣＤ４０誘導性上方制御を測定しながら、Ａｄ－ｉＣＤ４０－ＧＦＰを力価決定することにより、最大の薬剤仲介ｉＣＤ４０活性化はおよそ１００ｍｏｉで起こり、より高いウイルス力価で漸近的に停滞状態が始まることが示された（データ非掲載）。効果は中程度であったが、ＡＰ２０１８７は、ｉＣＤ４０発現ＢＭＤＣにおいて１００ｍｏｉでＭＨＣクラスＩK^b、Ｂ７．２ならびに内因性ＣＤ４０の表面発現を誘導したが、非形質導入ＤＣにおいては誘導しなかった。その後、ＢＭＤＣについてのＡｄ－ｉＣＤ４０－ＧＦＰの効果を、T_H１分極化サイトカイン、ＩＬ－１２のＤＣにおける発現を評価するための細胞内サイトカイン染色を使用して、調査した。これらの発見は、空のアデノウイルスベクターが、このサイトカインの低レベルの産生を刺激することによって、バックグラウンドの蛍光読み取りに寄与できるという多数の先の報告を確認した[53]。これらの実験は、ｉＣＤ４０トランス遺伝子が、ＣＩＤが存在しなくてもこれらの力価で有意なレベルの基底シグナル伝達を発生できることを、さらに明らかにした。しかし、これらのｉＣＤ４０発現ＤＣのＡＰ２０１８７への曝露は、何とか再生可能な方法でこれらの累積効果を克服し、$IL-12^+$ＤＣのパーセントをさらに増加させた。興味深いことに、ＬＰＳおよびＣ

ＤＡＯＬを用いたＩＬ－１２ｐ７０／ｐ４０合成の刺激は、８時間でピークに達し、その後減少したが、ＩＬ－１２$^{+}$ＤＣのパーセントは、少なくともＡｄ－ｉＣＤ４０－ＧＦＰ形質導入後２４時間まで増加し続けた。Ｌａｎｇｅｎｋａｍｐらによる以前の研究は、ＤＣのＬＰＳ処理の延長は、サイトカイン産生に関するそれらの能力を使い果たすことを実証している[54]。これらの結果は、ＬＰＳの危険なシグナルに対抗するＡｄ－ｉＣＤ４０－ＧＦＰベクターが、ＢＭＤＣによるより耐久性のあるＩＬ－１２応答の促進および維持を可能にすることを暗示する。

【０２８６】

ＤＣ活性化状態に加えて、ＤＣの長寿が、Ｔ細胞依存性免疫の発生に影響を与える別の重要な変異である。事実、ＤＣのＣＴＬ仲介死は、宿主を自己免疫疾患から保護しながら、免疫応答を調節する有意な機序と考えられる[55、56]。他の研究は、ＤＣのＣＤ４０刺激は、抗アポトーシスタンパク質のｂｃｌ－X_LおよびグランザイムＢ阻害剤のＳｐｉ－６の上方制御を含むさまざまな機序により、それらの生存を延長する[57、58]。ＤＣの生存に関する、ＣＤ４０Ｌと比較したｉＣＤ４０の効果を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏの血清飢餓培養アッセイにおいて比べた。生体染色色素（ヨウ化プロピジウム（ＰＩ））陽性細胞集団を、フローサイトメトリによって分析することによって、ＢＭＤＣを発現するｉＣＤ４０が、ＣＤ４０Ｌを用いて処理した非形質導入ＤＣと比較して、これらの条件下でより長い長寿を示すことが発見された。Ａｄ－ＧＦＰ－形質導入ＤＣは、これらの条件下で生存の改善に反映できなかったのでこの効果はｉＣＤ４０依存性であった。この研究は、未処理ＢＭＤＣと比較して、ｉＣＤ４０ＢＭＤＣのＡＰ２０１８７二量体化薬物への曝露が、この生存効果をさらに増強することをさらに示した。さらに、Ａｄ－ｉＣＤ４０形質導入ＤＣをＣＦＳＥ染色し、足蹠に注射した場合、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで刺激されたｉＣＤ４０ＤＣまたはＬＰＳ／ＣＤ４０Ｌ処理ＤＣに対して、ＡＰ２０１８７のｉ．ｐ．注射後にＤＣ数の有意な増加が膝窩リンパ節において発見された。

【０２８７】

一次ＢＭＤＣにおけるｉＣＤ４０の周知のＡｄ依存性成熟シグナルおよび基底シグナル伝達効果にもかかわらず、ＡＰ２０１８７の存在下でＤＣ活性化の増強が検出された。全体として、このデータは、薬剤に対する応答のために設計された誘導性ＣＤ４０受容体が、ＣＤ４０Ｌ刺激のより一時的な効果および抗ＣＤ４０抗体の潜在的により複合的な効果と比較して、活性化の持続状態で一次ＤＣを維持できることを示唆する。このデータは、内因性ＣＤ４０を標的とする刺激剤に対する短期ＤＣ調節のみを記載する初期発見と一致する。

【０２８８】

抗腫瘍ＤＮＡワクチンのための強力なアジュバントとしてのｉＣＤ４０活性化スイッチ機能。

【０２８９】

以前の研究は、ＤＣが、Ｔ細胞に応答するＤＮＡワクチンの加工および提示において重要な役割を果たすことを実証している[59]。ｉＣＤ４０ＤＣに基づくワクチンのｉｎ　ｖｉｖｏの抗腫瘍有効性および腫瘍の免疫学的監視におけるｉＣＤ４０発現ＤＣのｉｎ　ｓｉｔｕの役割を研究した。治療的腫瘍モデルを確立するために、Ｃ５７ＢＬ／６マウスにＥＧ．７－ＯＶＡ胸腺腫瘍系を皮下に接種し、腫瘍体積がおよそ０．５ｃｍ^{3}に達するまで進行させた。これらの腫瘍支持マウスに、ＳＩＩＮＦＥＫＬパルスｗｔまたはｉＣＤ４０ＢＭＤＣのどちらかをワクチン接種した。ｗｔＢＭＤＣのワクチン接種、未処理もしくはＬＰＳおよびＣＤ４０Ｌを含む培養においての刺激またはｉｎ　ｖｉｖｏでの抗ＣＤ４０ｍＡｂの使用のいずれもが、全体の腫瘍成長速度を遅くできなかった。しかし、ＢＭＤＣワクチンのｉｎ　ｖｉｖｏの薬剤仲介ｉＣＤ４０活性化は、腫瘍サイズの持続的縮小をもたらした。さらに、ｉｎ　ｖｉｖｏの活性化ｉＣＤ４０発現ＢＭＤＣワクチンに対する応答速度は、すべての他のワクチン接種条件（７０％対３０％）の下で、野生型ＢＭＤＣに対する応答速度より有意に速かった。腫瘍支持マウスにおける腫瘍抗原特異的Ｔ細胞応答の誘発を確認するために、本発明者らは、Ｈ－２Ｋ^{b}ＯＶＡ$_{257-264}$四量対分析

を、末梢血ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞について実施した。この分析は、ｉｎ　ｖｉｖｏの活性化ｉＣＤ４０ＢＭＤＣをワクチン接種したマウスにおいて排他的な、Ｋ^{b}ＯＶＡ$_{257-264}$特異的ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の拡大した集団の存在を検証した。

【０２９０】

皮下腫瘍モデルは、腫瘍サイズの概算のために便利なツールを提供するが、それらの有用性は、通常、ある程度左右対称な非同所性腫瘍に限られる。さらに転移の定量は安楽死を必要とし、単一の測定に限られる。この主力の取り組みについての改善として、Ｃａｒｉｂｂｅａｎ　ｃｌｉｃｋ　ｂｅｅｔｌｅｓ（Ｐｙｒｏｐｈｏｒｕｓ　ｐｌａｇｉｏｐｈｔｈａｌａｍｕｓ）由来の赤方偏移ルシフェラーゼを安定して発現するように腫瘍細胞を発達させた。基質のＤ－ルシフェリンの投与後の、マウスにおける画像化が、冷却ＣＣＤカメラ（ＩＶＩＳ（商標）Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ、Ｘｅｎｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ．）または標準的キャリパーのどちらかによって容易に検出されることを確認する。さらに、赤方偏移（約６１３ｎＭ発光）ルシフェラーゼレポーターは、表面遠隔転移のより線形の定量を可能にするはずである。

【０２９１】

ＣＩＤ誘導性ＴＬＲ（ｉＴＬＲ）の発達：亜局在性および利用したシグナル伝達経路に基づくＴＬＲのいくつかのサブグループがある。リガンド結合細胞外ドメインの通常の細胞内局在に関わらず、シグナル伝達ドメインは細胞質であり、ホモ二量体化が通常のシグナル伝達機序である場合、すべての場合において適切にシグナル伝達するはずである。ｉＣＤ４０に類似して、ＴＬＲ細胞質シグナル伝達ドメインを、２つの二量体化の化学インデューサー（ＣＩＤ）結合ドメイン（ＣＢＤ）、ＦＫＢＰ１２$_{V36}$の５’側または３’側のサブクローニングのための隣接するＸｈｏＩおよびＳａｌＩ制限部位にＰＣＲ増幅した[1]。キメラＣＢＤ－ＴＬＲを、細胞膜に、ミリストイル化ターゲティングモチーフを使用して局在化した（図３）。

【０２９２】

ＴＬＲの初期試験は、発現ベクターとＮＦカッパＢ応答性ＳＥＡＰ（分泌型アルカリホスファターゼ）レポータープラスミドとを併せたＪｕｒｋａｔ－ＴＡｇまたは２９３細胞への同時トランスフェクションを含んだ[66]。興味深いことに、予備データは、ｉＴＬＲ７およびｉＴＬＲ８だけがＪｕｒｋａｔ－ＴＡｇ細胞において機能し、ＣＢＤおよびＴＬＲの相対的な位置に関わらずｉＴＬＲ３、４および９は機能しなかったことを示唆した。細胞のパネルにおけるさらなるトランスフェクションは、このことが、これらのキメラの構築物の生理学的組織特異的シグナル伝達の差または他の特異体質を反映するかどうかを決定する必要があるだろう。

【０２９３】

普通の当業者は、以下の方法において、ＴＬＲではなくアダプタータンパク質の使用のために実施可能な改良を認識するであろう。

【０２９４】

誘導性ＴＬＲの開発：誘導性キメラＴＬＲは、ＤＣの活性化において、病原体由来（または合成）アジュバントの必要性を回避するために開発できる。初めに、キメラｉＴＬＲ３，４，７，８および９を、ＣＩＤ－結合ドメインのＴＬＲ５’（上流）または３’（下流）の細胞質シグナル伝達ドメインをクローニングすることによって開発した（図３）。Ｊｕｒｋａｔ－ＴＡＧ細胞における最初のスクリーニングは、ｉＴＬＲ８（およびより少ない程度にｉＴＬＲ７）が、ＮＦカッパＢの最も大きな誘導を誘発することを明らかにした。しかし、さまざまなＴＬＲの相対的強度は、組織特異的パラメーターであってよい。このことに対処するために、これらの構築物を、多重発現プラスミドの標的細胞への一過性トランスフェクションに基づくＮＦカッパＢ　ＳＥＡＰレポーター系を使用して、ＮＦカッパＢの活性化に関して、ＤＣ細胞系のＤ２ＳＣ／１において試験できる。２ＤＳＣ／１細胞は、未熟ＤＣ表現型および活性化シグナルに従った成熟能力の両方を保有する不死化ＤＣ系の稀なサブセットを表す[67]。ＮＦカッパＢの誘導はＴＬＲの唯一の機能ではないので、ＩＲＦ３／７の導入はＩＲＦと結合するインターフェロン（ＩＦＮ）刺激性応答

要素（ＩＳＲＥ）－ＳＥＡＰレポータープラスミドを使用してスクリーニングでき、レポーター活性を誘導する。ＩＳＲＥ－ＳＥＡＰを開発するために、ＩＳＲＥ－ｌｕｃ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）由来のＩＳＲＥ含有プロモーターは、構成的レポータープラスミドｐＳＨ１／ｋＳＥＡＰ中のＳＲアルファプロモーターを交換できる。ＴＬＲシグナル伝達の二次誘導として、ＪＮＫおよびｐ３８のリン酸化を、リン酸化特異的抗体を使用してウェスタンブロットによりモニターする。

【０２９５】

さまざまな異なるＴＬＲが、ＩＲＦおよびＮＦカッパＢを差次的に誘導でき、ＤＣの活性化およびＩＬ－１２の産生において相乗効果を与えることができ[43]、誘導性ＴＬＲの初期試験は、ｉＴＬＲの同時トランスフェクションにより２つ同時にコンビナトリアル試験を続けることができる。通常のホモ二量体かおよびより予測不可能なヘテロ二量体化の両方が起こりうるが、この取り組みは、ＴＬＲの異なるクラスの間の相乗効果を明らかにするはずである。ＴＬＲ対の相乗的活性化は、ＤＣに免疫刺激能力の増強をもたらすはずである。相乗効果が検出できる場合、誘導性複合ＴＬＲ（ｉｃＴＬＲ）と呼ばれる２つのタンデムな異なる（または同一の）ＴＬＲからなる新規な一連の構築物を試験する（図４）。この場合、上記の細胞質ＸｈｏＩ－ＳａｌＩ－隣接ＴＬＲシグナル伝達ドメインを、ＣＢＤの上流および下流でさまざまな配置で組み合わせる。最終的に２つの最も強力な構築物を、ＣＤ４０の細胞質ドメインを含有するように改良し、ＣＩＤにより活性化されることがすでに実証されている（図５）。

【０２９６】

ＤＣのトランスフェクションは問題があり得るが、エレクトロポレーションの改善された方法が、Ｖｉｅｗｅｇおよび同僚によって最近記載された[68]。彼らの取り組みでは、エレクトロポレーション後の生存が、（３００Ｖ、１５０ｍＦ（Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ　ＩＩ：Ｂｉｏ－Ｒａｄ））高カリウムイオンのＶｉａＳｐａｎ緩衝液（Ｂａｒｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）中にＤＣ（４×１０[7]／ｍｌ）を再懸濁することによって増強される。加えて、トランスフェクションの有効性が未だ低い場合、本発明者らのｐＳＨ１シリーズの発現ベクターを増幅するためにＳＶ４０ラージＴ抗原を含有する、すべてがＳＶ４０複製起点を含有する発現ベクターｐＲＳＶ－ＴＡｇを同時トランスフェクトする。

【０２９７】

一体化された活性化遺伝子ｉｃＴＬＲ／ＣＤ４０を発現するアデノベクターの開発：Ｄ２ＳＣ／１は、前臨床試験のための有用な細胞モデルであるが、臨床適用の前に、一次マウスおよびヒトＤＣにおいて免疫制御遺伝子を次にアッセイするつもりである。一次細胞への有効な遺伝子輸送を容易にするために、最も強力な構築物（複数可）に、アデノウイルスシャトルベクター、ｐＳｈｕｔｔｌｅ－ＸまたはｐＤＮＲ－ＣＭＶをサブクローニングし、それぞれ、Ａｄ５ベクター、ｐＡｄｅｎｏ－Ｘ（ＢＤ）またはＡｄＸＬＰ（ＢＤ）に転写した。高力価ウイルスの調製を実施する。すでに開発されたＡｄ５／ｆ３５－ｉＣＤ４０を用いて達成されているように、このベクターを、ヒトおよびマウスの両方のＤＣにおいて試験する。Ａｄ５／ｆ３５偽型アデノベクターは、形質導入の有効性をヒトＤＣにおいて少し改善するが、「純粋な」Ａｄ５に包まれるアデノベクターは、ネズミＤＣのさらなる形質導入を可能にするために使用できる。

【０２９８】

ヒトの研究のために、ＭｏＤＣを、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４において接着性末梢血ＤＣ前駆体の標準的インキュベーションにより、調製する。未熟ＤＣに、開発されたｉｃＴＬＲ／ＣＤ４０ベクターおよび対照ベクター（例えば、Ａｄ５／ｆ３５－ｉＣＤ４０およびＡｄ５／ｆ３５－ＥＧＦＰ）を形質導入する。成熟および活性のための標準的ＭｏＤＣアッセイを本明細書に記載し、成熟および活性のための標準的ＭｏＤＣアッセイは、例えば、成熟マーカー（例えば、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＨＬＡクラスＩおよびＩＩ、ＣＣＲ７）、ＩＬ－１２の産生、抗原特異的Ｔ細胞の遊走および活性化のフローサイトメトリ分析をさらに含む。

【０２９９】

ＣＤ４０およびＴＬＲシグナル伝達ドメインをタンデムに配置することが、単離ドメインにより活性化されるシグナル伝達経路に干渉し得る事象において、構築物は、別の戦略、例えば、バイシストロニック発現カセットの使用またはデルタＥ１デルタＥ３アデノベクターのＥ３領域へのクローニングなどを使用して、ウイルスベクターにおいて同時発現できる。さらに、キメラ受容体は、内因性タンパク質と同一にシグナル伝達できない。特定のＰＲＲまたはＰＲＲアダプターは骨髄ＤＣの活性化にとって最も強力なＴＬＲであると考えられるが、ＣＩＤ活性化受容体に転換した場合、代替物はよりよく機能できる。さらに、さまざまな誘導性ＰＲＲおよびＰＲＲアダプターと、構成的Ａｋｔ、M_F－デルタＡｋｔまたはｓｉＲＮＡ　ＳＯＣＳ－１との間の相乗効果は、より強力であることが発見され得る。これらの場合、免疫制御遺伝子のさまざまな組み合わせは、マルチシストロニックなアデノベクターにおいて組み合わせることができる。

【０３００】

ＣＩＤ誘導性アダプターをアッセイするさらなる方法

当業者は、以下の方法において、ＴＬＲではなくアダプタータンパク質の使用のために実施可能な改良を認識するであろう。

【０３０１】

獲得免疫の制御においてＤＣが果たす極めて重要な役割のために、ＤＣ活性を下方制御する多くの恒常性機序がある。それにもかかわらず、増大した活性化が、腫瘍由来またはウイルス由来の寛容原性機序を克服するために必要であり得る。これらの恒常性機序を回避するいくつかの方法を、本明細書おいて考察する。誘導性ＣＤ４０は、免疫学的シナプスとの関連でｉｎ　ｖｉｖｏで活性化でき、その細胞外ドメインを欠いており、このドメインを標的とするいくつかのネガティブフィードバック機序を回避する。「最適化された」構成的に活性なＡｋｔ、M_F－デルタＡｋｔは、切断型Ａｋｔ１対立遺伝子の脂質ラフトターゲティングに基づく。ｓｉＲＮＡ技術を用いた阻害剤ＳＯＣＳ－１の減少は、ｔｏｌｌ－受容体シグナル伝達およびＩ型インターフェロン産生を増加させる。したがって、３つすべての方法は、ＭｏＤＣを増強する能力を有する。

【０３０２】

ＭｏＤＣの調製：増強ＤＣ（ｅＤＣ）の最適化に基づく実験の大部分に関して、単球由来ＤＣは分化し、Ｂｌｏｏｄ　Ｂａｎｋまたは健康なボランティアから得た末梢血単核細胞から濃縮された。簡潔に言うと、ＤＣ前駆体を、浮遊密度技術（Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ：Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ）によって単離し、その後接着（および半接着）細胞を無血清Ｘ－ＶＩＶＯ１５ＤＣ培地（Ｃａｍｂｒｅｘ　Ｂｉｏ　Ｓｃｉｅｎｃｅ）において、サイトカインＧＭ－ＣＳＦ（８００Ｕ／ｍｌ）およびＩＬ－４（５００Ｕ／ｍｌ）（Ｒ＆ＤＳｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ）の存在下で５日間培養した。培養５日後、未熟ＤＣを、ｉＣＤ４０を発現するアデノベクター（すなわち、Ａｄ５／ｆ３５－ｉＣＤ４０）、構成的Ａｋｔ（Ａｄ５／ｆ３５－ＭＦ－ｄｅｌｔａＡｋｔ）、ｓｈＲＮＡ　ＳＯＣＳ１（Ａｄ５－ｓｈＳＯＣＳ１）またはＡｄ５－ｉＴＬＲ／ＣＤ４０を１０，０００ウイルス粒子（ｖｐ）／細胞（注：Ａｄ５ベクターは、２０，０００ｖｐで加え、形質導入の効率の若干の減少を部分的に補うことができる）の存在下でさらに２４時間インキュベートする。試料のサブセットにおいて、さらなるＴＬＲ４リガンドモノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ；１ｍｇ／ｍｌ）または二量体化薬物ＡＰ２０８１７（１００ｎＭ；ｉＣＤ４０－ＤＣのみ）を、完全な成熟のために加えるものとする。

【０３０３】

ＭｏＤＣの成熟状態の決定：ＣＤ２５、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ８６、ＨＬＡクラスＩおよびクラスＩＩ、ＣＣＲ７などを含む多くの表面タンパク質（「マーカー」）を、ＭｏＤＣ活性化の間に誘導する。予備試験により、ｉＣＤ４０シグナル伝達単独で、ＭｏＤＣに関してＣＤ８３およびＣＣＲ７の上方制御に十分であることが実証された（非掲載）。さらなるＴＬＲ４シグナル伝達（ＭＰＬ経由）は、全成熟マーカーの相加的（または相乗的）活性化をもたらす。したがって、固定ｖｐ数で、４種のウイルスベクターすべてによる、単独またはＭＰＬと組み合わせた成熟マーカーの誘導（フローサイトメ

トリにより決定）を評価した。これらの実験および以下の実験において、ＩＬ－１ａ、ＩＬ－６、ＴＮＦアルファおよびＰＧＥ$_2$を含む先の「ゴールドスタンダード」成熟カクテル（ＭＣ）による成熟は、陽性対照として作用し、未処理（ｍｏｃｋ）の未熟ＤＣは、陰性対照として機能する。細胞表面マーカーの表現型分析に加えて、ＩＬ－１２および他のＴ$_H$１分極化サイトカイン（例えば、ＩＬ－２３、ＴＮＦアルファ）の産生もまた、最適な抗腫瘍免疫にとって重要である。ｉＣＤ４０は、ＩＬ－１２の産生にとって十分ではないが、ＭＰＬとｉＣＤ４０との組み合わせは、ＩＬ－１２の強力な相乗的産生をもたらす。したがって、上記のように刺激したＤＣの培養上清を、形質導入および成熟の２４時間および４８時間後に収穫する。ＩＬ－１２　ｐ７０のレベル、ＩＬ－１２／ＩＬ－２３ｐ４０二量体およびＴＮＦアルファの濃度を、比色サンドイッチＥＬＩＳＡアッセイ（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）によって決定した。あるいは、多数のさらなるサイトカイン（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－６、ＩＦＮアルファなど）を同時にアッセイするために、ＢＤにより開発されたマルチプレックスビーズを使用できる。

【０３０４】

遊走能力の決定：ＬＮの遊走にとって有能な、ネズミ骨髄由来ＤＣ（ＢＭＤＣ）とは異なり、この極めて重要な機能において、未熟ＭｏＤＣが欠けている。通常、ＰＧＥ$_2$がＣＣＲ７および遊走能力の上方制御に使用されるが、ＰＧＥ$_2$の有用性は、ＣＤ４０シグナル伝達およびＩＬ－１２の産生の下方制御およびＩＬ－１０の上方制御を含む、潜在的悪影響によって抑えられている[５０、５２、６９]。さらに、ＰＧＥ$_2$の存在下でさえ、ＬＮに対する遊走は中程度であり、注射した細胞のおよそ１～２％である[７０]。ＣＣＲ７の発現は、リンパ節への遊走にとって必須条件であると思われるが、ＬＮ由来ＣＣＲ７ケモカイン、ＣＣＬ１９およびＣＣＬ２１に対する走化性反応は、リンパ節への遊走のより直接的尺度であると思われる。したがって、ＣＣＬ１９／ＭＩＰ３ｂへの遊走は、改良された２チャンバーアッセイにおいて比較できる。

【０３０５】

予備実験は、ｉＣＤ４０のシグナル伝達は、ＰＧＥ$_2$が不在であっても遊走能力にとって十分であるという驚くべき結果を実証している。このアッセイにおいて、ＭｏＤＣにＡｄ５／ｆ３５－ｉｈＣＤ４０を形質導入し、蛍光染料Ｇｒｅｅｎ－ＣＭＦＤＡ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ）を用いて標識した。細胞を、２チャンバー８ｍｍアッセイプレートの上方チャンバーに配置し、下方チャンバーにおける全蛍光を定量し、ＰＧＥ$_2$仲介刺激と比較した。同様に、ｉＣＤ４０－ＴＬＲ－、ｉＣＤ４０－およびＡｋｔ－のＭｏＤＣならびにＳＯＣＳ１－欠損ＭｏＤＣのｉｎ　ｖｉｔｒｏの遊走能力を、個別に、およびＴＬＲ４リガンドと組み合わせて、または組み合わせないで比較できる。

【０３０６】

遊走能力のための第２の直接アッセイとして、ｉｎ　ｖｉｖｏの遊走を、ｅＤＣを、非骨髄機能廃絶的に放射線照射した免疫不全ＳＣＩＤマウスの下肢に注射することによって比較できる。最小の放射（約２５０Ｒａｄ）は、異種細胞に対するナチュラルキラー（ＮＫ）細胞の活性を抑制するために必要である。種の違いに関わらず、ヒトＭｏＤＣは、ネズミケモカインに応答し、流入領域ＬＮに遊走する[７１]。遊走に成功したＭｏＤＣを可視化するために、細胞を蛍光染料のＧｒｅｅｎ－ＣＭＦＤＡセルトラッカーを用いて標識し、フローサイトメトリにより定量する。第２に、アデノベクター仲介「増強」に加えて、ＭｏＤＣに、アデノベクター、Ａｄ５／ｆ３５－ＣＢＲを形質導入し赤方偏移（励起ピーク５１０ｎｍ）ｃｌｉｃｋ　ｂｅｅｔｌｅｓ（Ｐｙｒｏｐｈｏｒｕｓ　ｐｌａｇｉｏｐｈｔｈａｌａｍｕｓ）ルシフェラーゼ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を発現する。ＣＢＲルシフェラーゼ対立遺伝子の使用は、流入領域膝窩ＬＮ内、およびより離れた膜遠位部位の両方において、生物発光ＤＣをより容易に検出させるはずである（本発明者らのＩＶＩＳ（登録商標）Ｉｍａｇｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｘｅｎｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐ、Ａｌａｍｅｄａ、ＣＡ）を使用）。

【０３０７】

自己Ｔ細胞の活性化および分極化：成熟および遊走に加えて、Ｔ$_H$１－偏向抗原特異的

免疫応答のｉｎ　ｖｉｖｏの活性化能力は、固形腫瘍に対するＤＣワクチン接種の必須条件である。したがって、ヘルパーＴおよび細胞傷害性機能の両方を刺激するｅＤＣの能力が評価可能である。初めに、同種異系ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の増殖の刺激をアッセイできる。増強されたＤＣは、上記の条件を使用して成熟し、活性化され、放射線照射（３０００ｒａｄ）され、同種異系の磁気ビーズにより精製された（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ、Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡ）ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞と１：１０で培養さる。［^{3}Ｈ］－チミジンと共に１６時間インキュベーション後、４日後に増殖を評価した。これらの研究を補完するために、さまざまな標準またはｅＤＣによるT_H1の分極化（ＩＬ－４およびＩＦＮガンマに対するＥＬＩＳｐｏｔアッセイにより決定）能力を決定できる。ＤＣの成熟状態をより具体的にアッセイするために、ナイーブＣＴＬ機能を刺激する能力を、ＨＬＡ－Ａ２拘束性四量体分析およびＣＴＬアッセイを使用して決定する（注：いくつかのＨＬＡ－Ａ２担体は、近年遺伝子型が同定されている）。ＨＬＡ－Ａ２拘束性抗原の、一方は強く、一方は弱い２種の異なるカクテルを提示するさまざまなｅＤＣによる、健康なドナーの自己Ｔ細胞の活性化を比較する。ＣＴＬアッセイは、標準またはｅＤＣを用いて上記のように刺激されたＴ細胞の抗原比溶解活性に基づくものである。これらの４種のＴ細胞アッセイは、釣り合った増強されたＤＣの前臨床分析と共にさまざまな取り組みの機能分析を提供するはずである。

【０３０８】

本実施例において参照した、および／またはさらなる技術支援を提供する引用文献

【０３０９】

【数１】

1. Clackson, T. et al. Redesigning an FKBP-ligand interface to generate chemical dimerizers with novel specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10437-10442 (1998).
2. Labeur, M.S. et al. Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol* **162**, 168-75 (1999).
3. Nopora, A. & Brocker, T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J Immunol* **169**, 3006-14 (2002).
4. Hanks, B.A. et al. Re-engineered CD40 receptor enables potent pharmacological activation of dendritic-cell cancer vaccines in vivo. *Nat Med* **11**, 130-7 (2005).
5. Shen, L., Evel-Kabler, K., Strube, R. & Chen, S.Y. Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat Biotechnol* **22**, 1546-53 (2004).
6. Reis e Sousa, C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity* **14**, 495-8 (2001).

【０３１０】

【数２】

7. Banchereau, J. & Palucka, A.K. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat Rev Immunol* **5**, 296-306 (2005).
8. Banchereau, J. et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811 (2000).
9. Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* **106**, 263-6 (2001).
10. Smith, C.M. et al. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat Immunol* **5**, 1143-8 (2004).
11. Schoenberger, S.P., Toes, R.E., El, v.d.V., Offringa, R. & Melief, C.J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions [see comments]. *Nature* **393**, 480-3 (1998).
12. Bennett, S.R. et al. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signaling. *Nature* **393**, 478-80 (1998).
13. Ridge, J.P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* **393**, 474-8 (1998).
14. Grewal, I.S. & Flavell, R.A. CD40 and CD154 in cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* **16**, 111-35 (1998).
15. O'Sullivan, B. & Thomas, R. CD40 and dendritic cell function. *Crit Rev Immunol* **23**, 83-107 (2003).
16. Nestle, F.O., Banchereau, J. & Hart, D. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat Med* **7**, 761-5 (2001).
17. Schuler, G., Schuler-Thurner, B. & Steinman, R.M. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **15**, 138-47 (2003).
18. Gilboa, E. & Vieweg, J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* **199**, 251-63 (2004).
19. Gilboa, E. The promise of cancer vaccines. *Nat Rev Cancer* **4**, 401-11 (2004).
20. Ridgway, D. The first 1000 dendritic cell vaccinees. *Cancer Invest* **21**, 873-86 (2003).
21. Dallal, R.M. & Lotze, M.T. The dendritic cell and human cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* **12**, 583-8 (2000).
22. Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* **1**, 311-6 (2000).
23. Hermans, I.F., Ritchie, D.S., Yang, J., Roberts, J.M. & Ronchese, F. CD8+ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J Immunol* **164**, 3095-101 (2000).

【０３１１】

【数３】

24. Park, Y., Lee, S.W. & Sung, Y.C. Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway. *J Immunol* **168**, 5-8 (2002).
25. Josien, R. et al. TRANCE, a tumor necrosis factor family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J Exp Med* **191**, 495-502 (2000).
26. Miga, A.J. et al. Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions. *Eur J Immunol* **31**, 959-65 (2001).
27. Cremer, I. et al. Long-lived immature dendritic cells mediated by TRANCE-RANK interaction. *Blood* **100**, 3646-55 (2002).
28. Tone, M., Tone, Y., Fairchild, P.J., Wykes, M. & Waldmann, H. Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 1751-1756. (2001).
29. Contin, C. et al. Membrane-anchored CD40 is processed by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. Implications for CD40 signaling. *J Biol Chem* **278**, 32801-9 (2003).
30. Kobayashi, K. et al. IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell* **110**, 191-202 (2002).
31. Hou, W.S. & Van Parijs, L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* **5**, 583-9 (2004).
32. Kandel, E.S. & Hay, N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* **253**, 210-29 (1999).
33. Vassiliou, E., Sharma, V., Jing, H., Sheibanie, F. & Ganea, D. Prostaglandin E2 promotes the survival of bone marrow-derived dendritic cells. *J Immunol* **173**, 6955-64 (2004).
34. Ardeshna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S. & Khwaja, A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **96**, 1039-46 (2000).
35. Kanto, T., Kalinski, P., Hunter, O.C., Lotze, M.T. & Amoscato, A.A. Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis. *J Immunol* **167**, 3773-84 (2001).
36. Mochizuki, T. et al. Akt protein kinase inhibits non-apoptotic programmed cell death induced by ceramide. *J Biol Chem* **277**, 2790-7 (2002).
37. Bennett, M.R., Evan, G.I. & Schwartz, S.M. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways. *Circ.Res.* **77**, 266-273 (1995).

【０３１２】

【数４】

38. Albert, M.L., Jegathesan, M. & Darnell, R.B. Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nat Immunol* **2**, 1010-7 (2001).
39. Diehl, L. et al. CD40 activation in vivo overcomes peptide-induced peripheral cytotoxic T-lymphocyte tolerance and augments anti-tumor vaccine efficacy. *Nat Med* **5**, 774-9 (1999).
40. Vonderheide, R.H. et al. CD40 activation of carcinoma cells increases expression of adhesion and major histocompatibility molecules but fails to induce either CD80/CD86 expression or T cell alloreactivity. *Int J Oncol* **19**, 791-8 (2001).
41. Mazouz, N. et al. CD40 triggering increases the efficiency of dendritic cells for antitumoral immunization. *Cancer Immun* **2**, 2 (2002).
42. Kikuchi, T., Worgall, S., Singh, R., Moore, M.A. & Crystal, R.G. Dendritic cells genetically modified to express CD40 ligand and pulsed with antigen can initiate antigen-specific humoral immunity independent of CD4+ T cells. *Nat Med* **6**, 1154-9 (2000).
43. Napolitani, G., Rinaldi, A., Bertoni, F., Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* **6**, 769-76 (2005).
44. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-7 (1997).
45. Hoshino, K. et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* **162**, 3749-52 (1999).
46. Ozinsky, A. et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13766-71 (2000).
47. Zhang, H., Tay, P.N., Cao, W., Li, W. & Lu, J. Integrin-nucleated Toll-like receptor (TLR) dimerization reveals subcellular targeting of TLRs and distinct mechanisms of TLR4 activation and signaling. *FEBS Lett* **532**, 171-6 (2002).
48. Lee, H.K., Dunzendorfer, S. & Tobias, P.S. Cytoplasmic domain-mediated dimerizations of toll-like receptor 4 observed by beta-lactamase enzyme fragment complementation. *J Biol Chem* **279**, 10564-74 (2004).
49. Choe, J., Kelker, M.S. & Wilson, I.A. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science* **309**, 581-5 (2005).
50. Luft, T. et al. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* **100**, 1362-72 (2002).

【０３１３】

【数５】

51. Scandella, E. et al. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* **103**, 1595-601 (2004).

52. Kalinski, P., Vieira, P.L., Schuitemaker, J.H., de Jong, E.C. & Kapsenberg, M.L. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* **97**, 3466-9 (2001).

53. Korst, R., Mahtabifard, A., Yamada, R., and Crystal, R. Effect of Adenovirus Gene Transfer Vectors on the Immunologic Functions of Mouse Dendritic Cells. *Molecular Therapy* **5**, 307-315 (2002).

54. Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2, and nonpolarized T cells. *Nature Immunology* **1**, 311-316 (2000).

55. Hermans, I., Ritchie, D., Yang, J., Roberts, J., and Ronchese, F. CD8 T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *Journal of Immunology* **164**, 3095-3101 (2000).

56. Wong, P.a.P., E. Feedback Regulation of Pathogen-Specific T Cell Priming. *Immunity* **188**, 499-511 (2003).

57. Miga, A., Masters, S., Durell, B., Gonzalez, M., Jenkins, M., Maliszewski, C., Kikutani, H., Wade, W., and Noelle, R. Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154-CD40 interactions. *European Journal of Immunology* **31**, 959-965 (2001).

58. Medema, J., Schuurhuis, D., Rea, D., van Tongeren, J., de Jong, J., Bres, S., Laban, S., Toes, R., Toebes, M., Schumacher, T., Bladergroen, B., Ossendorp, F., Kummer, J., Melief, C., and Offringa, R. Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *Journal of Experimental Medicine* **194**, 657-667 (2001).

59. Steinman, R.a.P., M. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *Journal of Clinical Investigation* **109**, 1519-1526 (2002).

60. Woltman, A.M. et al. Rapamycin specifically interferes with GM-CSF signaling in human dendritic cells, leading to apoptosis via increased p27KIP1 expression. *Blood* **101**, 1439-45 (2003).

61. Granucci, F. et al. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol* **2**, 882-8 (2001).

62. Fujio, Y. & Walsh, K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J Biol Chem* **274**, 16349-54 (1999).

【０３１４】

【数６】

63. Mukherjee, A., Arnaud, L. & Cooper, J.A. Lipid-dependent recruitment of neuronal Src to lipid rafts in the brain. *J Biol Chem* **278**, 40806-14 (2003).

64. Li, B., Desai, S.A., MacCorkle-Chosnek, R.A., Fan, L. & Spencer, D.M. A novel conditional Akt 'survival switch' reversibly protects cells from apoptosis. *Gene Ther* **9**, 233-44. (2002).

65. Sporri, R. & Reis e Sousa, C. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol* **6**, 163-70 (2005).

66. Spencer, D.M., Wandless, T.J., Schreiber, S.L. & Crabtree, G.R. Controlling signal transduction with synthetic ligands. *Science* **262**, 1019-1024 (1993).

67. Granucci, F. et al. Modulation of cytokine expression in mouse dendritic cell clones. *Eur J Immunol* **24**, 2522-6 (1994).

68. Su, Z. et al. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8+ and CD4+ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* **174**, 3798-807 (2005).

69. Scandella, E., Men, Y., Gillessen, S., Forster, R. & Groettrup, M. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **100**, 1354-61 (2002).

70. Morse, M.A. et al. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res* **59**, 56-8 (1999).

71. Hammad, H. et al. Monocyte-derived dendritic cells induce a house dust mite-specific Th2 allergic inflammation in the lung of humanized SCID mice: involvement of CCR7. *J Immunol* **169**, 1524-34 (2002).

（実施例９）

発現構築物および試験

ＴＬＲ３、４、７、８および９は、単球由来ＤＣにおいてＴｈ１サイトカイン、ＩＬ－１２を誘発することが知られている異なるサブファミリー由来のＴＬＲを提示するので、まず、ＴＬＲ３、４、７、８および９を、誘導性キメラタンパク質を構築するために選択した。さらに、ＴＬＲ４は、異種細胞外ドメインを介したキメラＴＬＲ４対立遺伝子の架橋後、シグナル伝達を誘発することが示されている。個々の（ＴＩＲを含む）細胞質ドメインをＰＣＲ増幅し、２つの（２）ＦＫＢＰ１２（Ｖ３６）（F_Vおよび$F_{V'}$（ゆらぎ（ｗｏｂｂｌｅｄ））遺伝子に隣接して（５’および３’）配置し、これらはｃ－Ｓｒｃ由来のミリストイル化－ターゲティング配列を使用して細胞膜に結合した。第３のＦＫＢＰ遺伝子を有するキメラタンパク質は、オリゴマー化の改善のために開発されている。

【０３１５】

加えて、誘導性ＰＲＲアダプターＭｙＤ８８およびＴＲＩＦのキメラ型は、これらの細胞質タンパク質と、２つの（２）ＦＫＢＰとの融合によって作製されている。最終的に、細胞質のＰＲＲ、ＮＯＤ２およびＲＩＧ－Ｉ由来のタンデムＣＡＲＤドメインは、タンデムＦＫＢＰに融合される。これらの構築物およびレポーターアッセイを以下に記載する。

【０３１６】

構築物：

（ｉ）誘導性ｉＴＬＲ：ＴＬＲ３、４、７、８および９をＭｏＤＣに由来するｃＤＮＡ

からＰＣＲ増幅した。ＰＣＲプライマーを、ＸｈｏＩおよびＳａｌＩ制限部位に隣接させ、それぞれ、ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＥのＸｈｏＩおよびＳａｌＩ部位にタンデムＦＫＢＰの５’および３’にクローニング可能にした[1]、[2]。使用したプライマーは、（ａ）５ＴＬＲ３ｃＸ（５’－ｃｇａｔｃａｃｔｃｇａｇｇｇｃｔｇｇａｇｇａｔａｔｃｔｔｔｔｔａｔｔｇｇ－３’）および３ＴＬＲ３ｃＳ（５’－ｔｇａｔｃｇｇｔｃｇａｃａｔｇｔａｃａｇａｇｔｔｔｔｔｇｇａｔｃｃａａｇｔｇ－３’）であり、ｐＳＨ１／Ｍ－ＴＬＲ３－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＴＬＲ３－Ｅを得た；（ｂ）５ＴＬＲ４ｃＸ（５’－ｃｇａｔｃａｃｔｃｇａｇｔａｔａａｇｔｔｃｔａｔｔｔｔｃａｃｃｔｇａｔｇｃｔｔｃ－３’）および３ＴＬＲ４ｃＳ（５’－ｔｇａｔｃｇｇｔｃｇａｃｇａｔａｇａｔｇｔｔｇｃｔｔｃｃｔｇｃｃａａｔｔｇ－３’）でありｐＳＨ１／Ｍ－ＴＬＲ４－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＴＬＲ４－Ｅを得た；（ｃ）５ＴＬＲ７ｃＳ（５’－ｃｇａｔｃａｇｔｃｇａｃｇａｔｇｔｇｔｇｇｔａｔａｔｔｔａｃｃａｔｔｔｃｔｇ－３’）および３ＴＬＲ７ｃＳ（５’－ｔｇａｔｃｇｇｔｃｇａｃｇａｃｃｇｔｔｔｃｃｔｔｇａａｃａｃｃｔｇａｃ－３’）であり、ｐＳＨ１／Ｍ－ＴＬＲ７－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＴＬＲ７－Ｅを得た；（ｄ）５ＴＬＲ８ｃＸ（５’－ｃｇａｔｃａｃｔｃｇａｇｇａｔｇｔｔｔｇｇｔｔｔａｔａｔａｔａａｔｇｔｇｔｇ－３’）および３ＴＬＲ８ｃＳ（５’－ｔｃｇｇｔｃｇａｃｇｔａｔｔｇｃｔｔａａｔｇｇａａｔｃｇａｃａｔａｃ－３’）であり、ｐＳＨ１／Ｍ－ＴＬＲ８－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＴＬＲ８－Ｅを得た；（ｅ）５ＴＬＲ９ｃＸ（５’－ｃｇａｔｃａｃｔｃｇａｇｇａｃｃｔｃｔｇｇｔａｃｔｇｃｔｔｃｃａｃｃ－３’）および３ＴＬＲ９ｃＳ（５’－ｔｇａｔｃｔｇｔｃｇａｃｔｔｃｇｇｃｃｇｔｇｇｇｔｃｃｃｔｇｇｃ－３’）であり、ｐＳＨ１／Ｍ－ＴＬＲ９－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＴＬＲ９－Ｅを得た。すべてのインサートはシークエンシングにより確認し、３’ヘマグルチニン（ｈｅｍａｇｌｕｔｔｉｎｉｎ）（ＨＡ）エピトープ（Ｅ）に対する適切なサイズに関してはウェスタンブロットにより確認した。Ｍ、ｃ－Ｓｒｃ由来のミリストイル化－ターゲティング配列（１～１４残基）。ｐＳＨ１、発現ベクター。加えて、第３のＸｈｏＩ／ＳａｌＩ－連結Ｆｖ，ドメインを、ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＴＬＲ４－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＴＬＲ８－ＥのＸｈｏＩ部位に加え、それぞれ、ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，２－Ｆｖｌｓ－ＴＬＲ４－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，２－Ｆｖｌｓ－ＴＬＲ８－Ｅを得、オリゴマー化を改善した。

【０３１７】

生理学的ＴＬＲ４シグナル伝達を忠実に反映するために、完全長２．５－ｋｂ　ＴＬＲ４を、ＴＬＲ４　ｃＤＮＡ（Ｍｅｄｚｈｉｔｏｖ　ｌａｂから）から、それぞれ、ＳａｃＩＩおよびＸｈｏＩ結合プライマーの５ｈＴＬＲ４（５’－ａａｔｃｔａｃｃｇｃｇｇｃｃａｃｃａｔｇａｔｇｔｃｔｇｃｃｔｃｇｃｇｃｃｔｇ－３’）および３ｈＴＬＲ４（５’－ｔｃａｇｔｔｃｔｃｇａｇｇａｔａｇａｔｇｔｔｇｃｔｔｃｃｔｇｃｃａａｔｔｇ－３’）を使用してＰＣＲ増幅した。２５４６－ｂｐのＰＣＲ産物を、ｐＣＲ－Ｂｌｕｎｔ－ＴＯＰＯにサブクローニングし、シークエンシングした。配列検証済インサートを、ＳａｃＩＩ／ＸｈｏＩ消化し、ＳａｃＩＩ／ＸｈｏＩ消化（および「ＣＩＰｐｅｄ」）ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－Ｅにサブクローニングし、ｐＳＨ１／ｈＴＬＲ４－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－Ｅを得た。さらなるＦｖ，を、ＸｈｏＩ部位に付加しｐＳＨ１／ｈＴＬＲ４－Ｆｖ，２－Ｆｖｌｓ－Ｅを得た。

【０３１８】

（ｉｉ）誘導性複合体ｉＴＬＲ４－ＣＤ４０：１９１－ｂｐのＸｈｏＩ－ＳａｌＩ－連結ヒトＣＤ４０細胞質ドメインを、プライマーｈＣＤ４０５Ｘ（５’－ａｔａｃｔｃｇａｇａａａａａｇｇｔｇｇｃｃａａｇａａｇｃｃａａｃｃ－３’）およびｈＣＤ４０３Ｓｎｓ（５’－ａｃａｔａｇｔｃｇａｃｃｔｇｔｃｔｃｔｃｃｔｇｃａｃｔｇａｇａｔｇ－３’）を用いてＰＣＲ増幅し、ｐＳＨ１／ｈＴＬＲ４－Ｆｖ，－Ｆｖｌｓ－ＥおよびｐＳＨ１／ｈＴＬＲ４－Ｆｖ，２－Ｆｖｌｓ－ＥのＳａｌＩ部位にサブクローニングし、ｐ

ＳＨ１／ｈＴＬＲ４－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＣＤ４０－ＥおよびｐＳＨ１／ｈＴＬＲ４－Ｆ$_{v}$，２－Ｆ$_{vls}$－ＣＤ４０－Ｅを得た。

【０３１９】

（ｉｉｉ）誘導性ｉＮＯＤ２：約８００－ｂｐのＰＲＲ　ＮＯＤ２（タンデムＣＡＲＤドメイン含有）のアミノ末端を、ＸｈｏＩ／ＳａｌＩ－連結プライマー５ＮＯＤ２Ｘ（５’－ａｔａｇｃａｃｔｃｇａｇａｔｇｇｇｇｇａａｇａｇｇｇｔｇｇｔｔｃａｇ－３’）および３ＮＯＤ２Ｓｂ（５’－ｃｔｔｃａｔｇｔｃｇａｃｇａｃｃｔｃｃａｇｇａｃａｔｔｃｔｃｔｇｔｇ－３’）を用いてＰＣＲ増幅し、ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＥのＸｈｏＩおよびＳａｌＩ部位にサブクローニングし、ｐＳＨ１／Ｍ－ＮＯＤ２－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＮＯＤ２－Ｅ＝Ｆ$_{v}$，ＮＯＤ２を得た。

【０３２０】

（ｉｖ）誘導性ｉＲＩＧ－Ｉ：約６５０ｂｐのＲＮＡヘリカーゼＲＩＧ－Ｉ（タンデムＣＡＲＤドメイン含有）のアミノ末端を、ＸｈｏＩ／ＳａｌＩ－連結プライマー５ＲＩＧＸ（５’－ａｔａｇｃａｃｔｃｇａｇａｃｃａｃｃｇａｇｃａｇｃｇａｃｇｃａｇ－３’）および３ＲＩＧＳ（５’－ｃｔｔｃａｔｇｔｃｇａｃａａｔｃｔｇｔａｔｇｔｃａｇａａｇｔｔｔｃｃａｔｃ－３’）を用いてＰＣＲ増幅し、ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＥのＸｈｏＩおよびＳａｌＩ部位にサブクローニングし、ｐＳＨ１／Ｍ－ＲＩＧＩ－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＲＩＧＩ－Ｅ＝Ｆ$_{v}$，ＲＩＧ－Ｉを得た。

【０３２１】

（ｖ）誘導性ｉＭｙＤ８８：ヒトＴＩＲ含有誘導性ＰＲＲアダプターＭｙＤ８８（約９００－ｂｐ）を、２９３ｃＤＮＡからＸｈｏＩ／ＳａｌＩ－連結プライマー５ＭｙＤ８８Ｓ（５’－ａｃａｔｃａａｃｔｃｇａｇａｔｇｇｃｔｇｃａｇｇａｇｇｔｃｃｃｇｇ－３’）および３ＭｙＤ８８Ｓ（５’－ａｃｔｃａｔａｇｔｃｇａｃｃａｇｇｇａｃａａｇｇｃｃｔｔｇｇｃａａｇ－３’）を使用してＰＣＲ増幅し、ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＥのＸｈｏＩおよびＳａｌＩ部位にサブクローニングし、それぞれ、ｐＳＨ１／Ｍ－ＭｙＤ８８－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＥおよびｐＳＨ１／Ｍ－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＭｙＤ８８－Ｅを得た。

【０３２２】

（ｖｉ）誘導性ｉＴＲＩＦ：ヒトＴＩＲ含有誘導性ＰＲＲアダプターＴＲＩＦ２（約２１５０－ｂｐ）を、２９３のｃＤＮＡからＸｈｏＩ／ＳａｌＩ－連結プライマー５ＴＲＩＦＸ（５’－ａｃａｔｃａａｃｔｃｇａｇａｔｇｇｃｃｔｇｃａｃａｇｇｃｃｃａｔｃａｃ－３’）および３ＴＲＩＦＳ（５’－ａｃｔｃａｔａｇｔｃｇａｃｔｔｃｔｇｃｃｔｃｃｔｇｃｇｔｃｔｔｇｔｃｃ－３’）を使用してＰＣＲ増幅し、ＳａｌＩ消化ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－Ｅにサブクローニングし、ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆ$_{v}$，－Ｆ$_{vls}$－ＴＲＩＦ－Ｅを得た。

【０３２３】

（ｖｉｉ）ＩＦＮｂ－ＳＥＡＰ：最小ＩＦＮｂ$_{l}$プロモーターを、ヒトゲノムＤＮＡからプライマー５ＩＦＮｂＭｌ（５’－ａａｃｔａｇａｃｇｃｇｔａｃｔａｃｔａａａａｔｇｔａａａｔｇａｃａｔａｇｇａａａａａｃ－３’）および３ＩＦＮｂＨ（５’－ｇａｃｔｔｇａａｇｃｔｔａａｃａｃｇａａｃａｇｔｇｔｃｇｃｃｔａｃｔａｃ－３’）を使用してＰＣＲ増幅した。ＭｌｕＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ消化断片を、プロモーターレスＳＥＡＰレポータープラスミドにサブクローニングした。

【０３２４】

特定の構築物は、Ｆｙｎ由来ミリストイル化配列およびＴＩＲＡＰのＰＩＰ２膜ターゲティングドメインを使用して、細胞膜脂質ラフトを特異的に標的化した。（５）

分泌型アルカリホスファターゼ（ＳＥＡＰ）アッセイ：レポーターアッセイを、ヒトＪｕｒｋａｔ－ＴＡｇ（Ｔ細胞）または２９３（腎臓胚上皮）細胞またはネズミＲＡＷ２６４．７（マクロファージ）細胞において実施した。対数増殖期のＪｕｒｋａｔ－ＴＡｇ細

胞（１０^{7}）を、２ｍｇの発現プラスミドおよび２ｍｇのレポータープラスミドＮＦ－ｋＢ－ＳＥＡＰ^{3}またはＩＦＮｂ－ＴＡ－ＳＥＡＰを用いて、エレクトロポレートした（９５０ｍＦ、２５０Ｖ）（上を参照されたい）。対数期の２９３またはＲＡＷ２６４．７細胞（約２×１０^{5}細胞／３５－ｍｍディッシュ）に、６ｍｌのＦｕＧＥＮＥ－６を成長培地においてトランスフェクトした。２４時間後、形質転換細胞を、ＣＩＤを用いて刺激した。さらに２０時間後、上清を、前記のようにＳＥＡＰ活性に関してアッセイした^{3}。

【０３２５】

組織培養：Ｊｕｒｋａｔ－ＴＡｇおよびＲＡＷ２６４．７細胞を、ＲＰＭＩ１６４０培地、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、１０ｍＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．ｌ４）、ペニシリン（１００Ｕ／ｍｌ）およびストレプトマイシン（１００ｍｇ／ｍｌ）において成長させた。２９３細胞は、ダルベッコ変法イーグル培地、１０％ＦＢＳおよびｐｅｎ－ｓｔｒｅｐにおいて成長させた。

【０３２６】

ウェスタンブロット分析：タンパク質の発現を、一般的なヘマグルチニン（ＨＡ）エピトープ（Ｅ）タグに対する抗体を使用して、ウェスタンブロットにより決定した。

【０３２７】

結果

キメラｉＴＬＲ４は、ＰＩＰ２膜ターゲティングモチーフにより、２倍活性される。構築物は、２つのリガンド結合ドメインをコードする。しかし、残りのｉＴＬＲは、レポーターアッセイにおいて観察されるように、２９３、ＲＡＷまたはＤ２ＳＣ１細胞においてＣＩＤにより強いレベルで誘導されない。このことが、ｉＴＬＲの多様な膜ターゲティングの必要条件の原因であると思われる。したがって、本発明者らは、細胞膜に対するターゲティングを必要としない細胞質ＰＲＲである、誘導性Ｎｏｄ２およびＲＩＧ－１を開発した。ｉＮｏｄ２は２９３細胞において二量体化薬物により２倍に活性化されたが、ＲＡＷ２６４．７細胞においてはこのような効果は観察されない。ＣＩＤの漸増濃度の添加により、ＲＡＷ細胞においてｉＮｏｄ２活性は減少する。さらに、ｉＮｏｄ２およびｉＣＤ４０一緒の効果は、ＮＦカッパＢ活性化について２９３細胞において相加的である（図７）。ｉＲＩＧ－１は、２．５倍に活性化される（図８）。ＴＬＲのシグナル伝達下流の一次メディエーターである、完全長誘導性ＰＲＲアダプター分子のＭｙＤ８８およびＴＲＩＦの誘導型は、スクリーニング過程に存在する。

【０３２８】

本実施例において参照した、およびさらなる技術支援を提供する引用文献

【０３２９】

【数７】

1. Xie, X. et al. Adenovirus-mediated tissue-targeted expression of a caspase-9-based artificial death switch for the treatment of prostate cancer. Cancer Res 61, 6795-804. (2001).

2. Fan, L., Freeman, K. W., Khan, T., Pham, E. & Spencer, D. M. in Human Gene Therapy 2273-2285 (1999).

3. Spencer, D. M., Wandless, T. J., Schreiber, S. L. & Crabtree, G. R. Controlling signal transduction with synthetic ligands. Science 262, 1019-1024 (1993).

4. Thompson, B. S., P. M. Chilton, J. R. Ward, J. T. Evans, And T. C. Mitchell. 2005. The Low-Toxicity Versions Of Lps, Mpl Adjuvant And Rc529, Are Efficient Adjuvants For Cd4+ T Cells. J Leukoc Biol 78:1273-1280.

5. Salkowski, C. A., G. R. Detore, And S. N. Vogel. 1997. Lipopolysaccharide And Monophosphoryl Lipid A Differentially Regulate Interleukin-12, Gamma Interferon, And Interleukin-10 Mrna Production In Murine Macrophages. Infect Immun 65:3239-3247.

6. Beutler, B. 2004. Inferences, Questions And Possibilities In Toll-Like Receptor Signalling. Nature 430:257-263.

7. Werts, C., S. E. Girardin, And D. J. Philpott. 2006. Tir, Card And Pyrin: Three Domains For An Antimicrobial Triad. Cell Death Differ 13:798-815.

8. Kagan, J. C., And R. Medzhitov. 2006. Phosphoinositide-Mediated Adapter Recruitment Controls Toll-Like Receptor Signaling. Cell 125:943-955.

（実施例１０）

ｉＲＩＧ－Ｉ、ｉＣＤ４０およびｉＮＯＤ２をトランスフェクトされた細胞におけるＮＦカッパＢ活性の薬物依存性誘導

２９３細胞に、１マイクログラムのＮＦカッパＢ－ＳＥＡＰレポーター構築物＋１マイクログラムの誘導性ＰＲＲ構築物を、Ｆｕｇｅｎｅ６トランスフェクション試薬を使用してトランスフェクトした。トランスフェクションは６ウェルプレートにおいて、１×１０^{6}細胞／ウェルまたはトランスフェクションで実施した。

【０３３０】

Ｊｕｒｋａｔ　ＴＡｇ細胞に、２マイクログラムのＮＦカッパＢ－ＳＥＡＰレポーター構築物および３マイクログラムの誘導性ＰＲＲ構築物を、９５０マイクロＦおよび０．２５ｋＶでエレクトロポレーションを使用してトランスフェクトした。この細胞に、１０×１０^{6}細胞／トランスフェクションでトランスフェクトした。

【０３３１】

２４時間後、細胞を、９６ウェルプレートに、２種の異なる濃度のＡＰ２０１８７（１００ｎＭおよび１０００ｎＭ）で播種した。３７℃、５％CO_2において、さらにインキュベーション２４時間後、上清を回収し、ＳＥＡＰ基質、リン酸４－メチルウンベリフェリル（ＭＵＰ）と一緒のインキュベーションによりＳＥＡＰ活性に関して分析した。蛍光を、励起３５５ｎｍおよび発光４６０ｎｍにおいて、ＦＬＵＯｓｔａｒ　Ｏｐｔｉｍａプレートリーダー（ＢＭＧ　Ｌａｂｔｅｃｈ）を使用して決定した。

【０３３２】

ｉＮＯＤ２および組み合わせ実験に関して、トランスフェクションを、全ＤＮＡに対して「空」発現ベクター、ｐＳＨ１／Ｓ－Ｆｖ’－Ｆｖｌｓ－Ｅを使用して正規化した。

【０３３３】

図１１～１４は、ＮＦカッパＢ活性およびＳＥＡＰレポーターカウントの薬物依存性誘導を示すグラフである。各グラフは、別々の個別の実験の代表である。

【０３３４】

グラフにおける明確さのために、いくつかのベクターを図のために新たに命名した。
Ｆｖ’ＲＩＧ－Ｉ＝ｐＳＨ１－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＲＩＧ－Ｉ＝ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ’－Ｆｖｌｓ－ＲＩＧ－Ｉ
Ｆｖ’ＮＯＤ２＝ｐＳＨ１－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＮＯＤ２＝ｐＳＨ１／Ｍ－Ｆｖ’－Ｆｖｌｓ－ＮＯＤ２－Ｅ
Ｆｖ’２ＮＯＤ２＝ｐＳＨ１－Ｆｖ’２Ｆｖｌｓ－ＮＯＤ２
Ｆｖ’ＮＯＤ２＋＝ｐＳＨ１－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＮＯＤ２（Ｎｕｎｅｚ　ＮＯＤ２配列と同じ）
Ｆｖ’ＣＤ４０＝ｐＳＨ１－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＣＤ４０
（実施例１１）
誘導性ＭｙＤ８８および複合体ＭｙＤ８８－ＣＤ４０は、２９３細胞においてＮＦカッパＢを活性化する。
【０３３５】
構築物のセットを、ＴＩＲドメインを欠いたＭｙＤ８８の切断型を含む、誘導性受容体を発現するように設計した。２９３細胞に、ＮＦカッパ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．、Ｗａｎｄｌｅｓｓ，　Ｔ．Ｊ．、Ｓｃｈｒｅｉｂｅｒ，　Ｓ．Ｌ．およびＣｒａｂｔｒｅｅ，　Ｇ．Ｒ．　Ｃｏｎｔｒｏｌｌｉｎｇ　ｓｉｇｎａｌ　ｔｒａｎｓｄｕｃｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｌｉｇａｎｄｓ．　Ｓｃｉｅｎｃｅ２６２巻、１０１９～１０２４頁（１９９３年）に記載のように実施した。独自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製した。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、ＡＰ２０１８７を加え、さらに２０時間後、細胞上清をＳＥＡＰ活性に関して試験した。これらのキメラ構築物および活性化に関するグラフを、図１６および１７に提供する。結果を図１８に示す。
【０３３６】
構築物：
対照：ＮＦカッパＢレポーターだけをトランスフェクトした
ＴＬＲ４ｏｎ：ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ＣＤ４／ＴＬＲ４－Ｌ３－Ｅ：ＣＤ４／ＴＬＲ４Ｌ３－Ｅは、マウスＣＤ４の細胞外ドメインとタンデムでヒトＴＬＲ４の膜貫通ドメインおよび細胞質ドメイン（Ｍｅｄｚｈｉｔｏｖ　Ｒ、　Ｐｒｅｓｔｏｎ－Ｈｕｒｌｂｕｒｔ　Ｐ、Ｊａｎｅｗａｙ　ＣＡ　Ｊｒ、Ａ　ｈｕｍａｎ　ｈｏｍｏｌｏｇｕｅ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ　Ｔｏｌｌ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ｓｉｇｎａｌｓ　ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｏｆ　ａｄａｐｔｉｖｅ　ｉｍｍｕｎｉｔｙ．　Ｎａｔｕｒｅ．　１９９７年７月２４日；３８８巻（６６４０号）：３９４～７頁に記載のように）続いて３つの６アミノ酸リンカーおよびＨＡエピトープを含有するＴＬＲ４の構成型である。
【０３３７】
ｉＭｙＤ８８：Ｍ－ＭｙＤ８８Ｌ－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－Ｅ含有
ｉＣＤ４０：Ｍ－Ｆｖ’－Ｆｖｌｓ－ＣＤ４０－Ｅ含有
ｉＣＤ４０Ｔ：Ｍ－Ｆｖ’－Ｆｖ’－Ｆｖｌｓ－ＣＤ４０－Ｅ含有－ｉＣＤ４０Ｔは追加のＦｖ’を含有する（バリンにゆらぎを有するＦＫＢＰ）
ｉＭｙＤ８８：ＣＤ４０：Ｍ－ＭｙＤ８８Ｌ－ＣＤ４０－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－Ｅ含有
ｉＭｙＤ８８：ＣＤ４０Ｔ：Ｍ－ＭｙＤ８８ＬＣＤ４０－Ｆｖ’Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－Ｅ含有－ｉＭｙＤ８８：ＣＤ４０と比較して追加のＦｖ’を含有する。
【０３３８】
（実施例１２）
誘導性ＣＤ４０－ＭｙＤ８８、ＣＤ４０－ＲＩＧ－１およびＣＤ４０：ＮＯＤ２
以下の構築物を設計し、ＮＦカッパＢレポーター系においてアッセイした。２９３細胞に、ＮＦカッパＢレポーターおよび構築物の１つを同時トランスフェクトした。２４時間後、ＡＰ２０１８７を加え、さらに３時間（図１９）または２２時間（図２０）後、細胞

上清を、ＳＥＡＰ活性に関して試験した。トランスフェクション約２０～２４時間後、細胞を、二量体化薬物のＡＰ２０１８７を用いて処理した。二量体化薬物を用いた処理後約２０～２４時間、細胞を、ＳＥＡＰ基質のリン酸４－メチルウンベリフェリル（ＭＵＰ）を用いて処理した。一晩のインキュベーション後（１６～２２時間の範囲）、ＳＥＡＰカウントを、ＦＬＵＯＳｔａｒ　ＯＰＴＩＭＡ機において記録した。

【０３３９】

ＭｙＤ８８ＬＦｖ’ＦｖｌｓＣＤ４０：ｐＢＪ５骨格およびＭｙＤ８８Ｌから上流のミリストイル化配列で作製された。

【０３４０】

Ｆｖ’ＦｖｌｓＣＤ４０ＭｙＤ８８Ｌ：ｐＢＪ５骨格およびＦｖ’から上流のミリストイル化配列で作製された。

【０３４１】

ＭｙＤ８８ＬＣＤ４０Ｆｖ’Ｆｖｌｓ：２つのベクター骨格（ｐＢＪ５）およびＭｙＤ８８Ｌから上流のミリストイル化配列で作製された。

【０３４２】

ＣＤ４０Ｆｖ’ＦｖｌｓＭｙＤ８８Ｌ：ｐＢＪ５骨格およびＣＤ４０から上流のミリストイル化配列で作製された。

【０３４３】

Ｆｖ’２ＦｖｌｓＣＤ４０ｓｔＭｙＤ８８Ｌ：ＣＤ４０の後ろの終止配列が、ＭｙＤ８８Ｌを翻訳から保護する構築物。ｉＣＤ４０Ｔとも呼ばれる。

【０３４４】

Ｆｖ’２Ｆｖｌｓは、ｇｔｃｇａｇ配列で隔てられたＦｖ’の２コピーを含む。

【０３４５】

ＭｙＤ８８ＬＦｖ’Ｆｖｌｓ

Ｆｖ’ＦｖｌｓＭｙＤ８８Ｌ：ｐＢＪ５骨格およびＦｖ’から上流のミリストイル化配列で作製された。

【０３４６】

Ｆｖ’ＦｖｌｓＣＤ４０：ｐＢＪ５およびｐＳｈｕｔｔｌｅＸにおいて利用可能

ＣＤ４０Ｆｖ’Ｆｖｌｓ：ｐＢＪ５骨格およびＣＤ４０から上流のミリストイル化配列で利用可能

ＭＦｖ’Ｆｖｌｓ：ｐＢＪ５骨格およびＭで示されるミリストイル化配列で利用可能

Ｆｖ’’ＦｖｌｓＮＯＤ２：ｐＢＪ５－Ｓｎ－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＮＯＤ２－Ｅミリストイル化配列を有さないｐＢＪ５骨格および、２つのＦＫＢＰ続けてＮＯＤ２の２つのＣＡＲＤドメインおよびＨＡエピトープを含有。

【０３４７】

Ｆｖ’ＦｖｌｓＲＩＧ－１：ｐＢＪ５－Ｓｎ－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＲＩＧ－Ｉ－Ｅミリストイル化配列を有さないｐＢＪ５骨格および、２つのＦＫＢＰ続けてＲＩＧ－Ｉの２つのＣＡＲＤドメインおよびＨＡエピトープを含有。

【０３４８】

アデノウイルス産生のために使用したｐＳｈｕｔｔｌｅＸ型に関する構築マップの例を、図３０、３１および３２に提示する。普通の当業者は、これらの構築物の改良方法に気が付き、本明細書に記載した方法および組成物に使用した他の構築物を作製する。

【０３４９】

（実施例１３）

２９３Ｔ細胞のＭｙＤ８８Ｌアデノウイルストランスフェクションはタンパク質発現をもたらす。

【０３５０】

以下のｐＳｈｕｔｔｌｅＸ構築物は、アデノウイルス産生のために構築された。

【０３５１】

ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ＭｙＤ８８Ｌ－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－Ｅ

ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ＭｙＤ８８ＬＣＤ４０－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－Ｅ
ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ＣＤ４／ＴＬＲ４－Ｌ３－Ｅ
Ｌ３は、ＤＮＡ配列：ＧＧＡＧＧＣＧＧＡＧＧＣＡＧＣＧＧＡＧＧＴＧＧＣＧＧＴＴＣＣＧＧＡＧＧＣＧＧＡＧＧＴＴＣＴ
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。

【０３５２】

組換えアデノウイルスを、普通の当業者に公知の方法を使用して、および基本的にＨｅ，Ｔ．Ｃ．，Ｓ．Ｚｈｏｕら、（１９９８年）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９５巻（５号）：２５０９～１４頁に記載のように得た。

【０３５３】

個々のアデノウイルス アッセイのために、いくつかのウイルスプラーク由来の粗生成物を、ウェスタンブロッティングにより、タンパク質の発現に関してアッセイした。ウイルス粒子を、Ｖｅｃｔｏｒ Ｃｏｒｅ ａｔ Ｂａｙｌｏｒ Ｃｏｌｌｅｇｅ ｏｆ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（ｗｏｒｌｄ ｗｉｄｅ ｗｅｂ ａｄｄｒｅｓｓ ｏｆ ｈｔｔｐ：／／ｖｅｃｔｏｒ．ｂｃｍ．ｔｍｃ．ｅｄｕ／）により供給された細胞ペレットから、凍結解凍ペレットにより３回放出した。２９３Ｔ細胞を、1×10^{6}細胞／ウェルで６ウェルプレートに播種した。培養２４時間後、細胞を、抗生物質を含む無血清ＤＭＥＭ培地を用いて２回洗浄し、続いて２５マイクロリットルまたは１００マイクロリットルのウイルス溶解物を、５００マイクロリットルの無血清培地中の細胞単層に加えた。２時間後、２．５ｍｌの血清補給ＤＭＥＭを、６ウェルプレートの各ウェルに加えた。

【０３５４】

２４～４８時間後、細胞を収穫し、１×ＰＢＳを用いて２回洗浄し、ＲＩＰＡ溶解緩衝液に再懸濁した（１００マイクロモルのＰＭＳＦ含有）（例えば、ＭｉｌｌｉｐｏｒｅまたはＴｈｅｒｍｏ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃから入手可能）。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、続いて、１０，０００ｇで４℃において１５分間回転させた。上清を、ＳＤＳ Ｌａｅｍｍｌｉ緩衝液＋ベーターメルカプトエタノールと１：２の割合で混合し、１００℃において１０分間インキュベートし、ＳＤＳゲルに投入し、ＨＡエピトープに対する抗体を使用してニトロセルロース膜においてプローブした。結果を、図２１および２２に示す。残存細胞溶解物は、今後の使用のために－８０℃において保存した。細胞に、個別に各ウイルス、ｖｉｚ．、Ａｄ５－ｉＭｙＤ８８およびＡｄ５－ＴＬＲｏｎを別々に形質導入した。

【０３５５】

（実施例１４）

ＭｙＤ８８Ｌ－アデノウイルス形質導入細胞におけるＩＬ－１２ｐ７０の発現

骨髄由来樹状細胞（ＢＭＤＣｓ）を、抗生物質を含む無血清ＲＰＭＩ培地を用いて２回洗浄後、0.25×10^{6}細胞／ウェルで、４８ウェルプレートに播種した。細胞に、１２５マイクロリットルの無血清培地中６マイクロリットルの粗ウイルス溶解物を、形質導入した。２時間後、３７５マイクロリットルの血清補給ＲＰＭＩを、４８ウェルプレートの各ウェルに加えた。４８時間後、上清を収穫し、マウスＩＬ－１２ｐ７０ ＥＬＩＳＡキット（ＢＤ ＯｐｔＥＩＡ（ＢＤ ＢｉｏＳｃｉｅｎｃｅｓ、Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ）を使用して分析した。２連のアッセイを、１００ｎＭのＡＰ２１０８７を添加して、または添加しないでのいずれかで、各試料関して実施した。ＣＤ４０－Ｌは、ＣＤ４０のリガンド、ＣＤ４０受容体に結合するＴＮＦファミリーメンバーである。ＬＰＳリポ多糖類である。結果を図２３に示す。アッセイの反復の結果を図２４に示す。粗アデノウイルス溶解物を、６．２マイクロリットル／２５万細胞で加えた。図２５は、より多くのウイルス溶解物、１２．５マイクロリットル／２５万細胞を使用し、ＢＭＤＣを感染させた、追加のアッセイの結果を示す。

【０３５６】
（実施例１５）
誘導性ｉＲＩＧ－１、ｉＮＯＤ２およびｉＴＲＩＦの活性
ｐＢＪ５－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＲＩＧ－１およびｐＢＪ５－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＣＤ４０のそれぞれ１マイクログラムを、１マイクログラムのＮＦカッパＢ－ＳＥＡＰレポーターと共に、２９３細胞にトランスフェクトし、細胞を、漸増用量の二量体化薬物ＡＰ２０１８７による処理についてのレポーター活性に関して分析した。ｐＢＪ５－ＲＩＧ－１－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ構築物もまた試験した。結果を、図２６に示す。結果は、ｉＲＩＧ－ＩおよびｉＣＤ４０両方の構築物を２９３細胞にトランスフェクトした場合、ＮＦカッパＢレポーターアッセイにおいて見られる相加効果により実証されるように、ｉＲＩＧ－ＩはｉＣＤ４０と共に潜在的に十分作用できることを示す。
【０３５７】
１マイクログラムのｐＢＪ５－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＲＩＧ－１を、１マイクログラムのＩＦＮベーター－ＳＥＡＰレポーターと共に２９３細胞にトランスフェクトし、細胞を、二量体化薬物ＡＰ２０１８７の半対数希釈液（ｈａｌｆ－ｌｏｇ　ｄｉｌｕｔｉｏｎ）を用いた処理についてのレポーター活性に関して分析した。同時に、ｉＴＲＩＦ（ｐＢＪ５－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＴＲＩＦ）構築物もまた、漸増量で、２９３細胞へトランスフェクトすることによって試験した。ｐＢＪ５－Ｍ－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＴＲＩＦ－Ｅは、ｐＢＪ５骨格およびミリストイル化配列、２つのＦＫＢＰ、完全長ＴＲＩＦおよびＨＡエピトープで作製された。結果を図２７および２８に示す。結果は、ｉＴＲＩＦは、２９３細胞において、ＮＦカッパＢを構成的に活性化し、より高い程度で、ＩＦＮベータレポーターを活性化することを実証している。
【０３５８】
同様のアッセイを、図２９に示すように、ｉＮＯＤ２を使用して実施した。結果は、ｉＮＯＤ２がＮＦカッパＢを、薬物依存性の様式で活性化することを示す。ＮＦカッパＢのこの活性化は、第３のＦＫＢＰドメインのｉＮＯＤ２（ｉＮＯＤ２Ｔｕｒｂｏ）への付加において増加する。ｐＢＪ５－Ｓｎ－Ｆｖ’Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－ＮＯＤ２－Ｅは、ｐＢＪ５骨格で作製され、ミリストイル化配列、３つのＦＫＢＰ、ＮＯＤ２の２つのＣＡＲＤドメインおよびＨＡエピトープを含有する。
【０３５９】
（実施例１６）
ＭｙＤ８８Ｌ－アデノウイルス形質導入ヒト単球由来樹状細胞におけるＩＬ－１２ｐ７０の発現
未熟ヒト単球由来樹状細胞（ｍｏＤＣ）を、抗生物質を含む無血清ＲＰＭＩ培地を用いて２回洗浄後、０．２５×１０^{6}細胞／ウェルで、４８ウェルプレートに播種した。細胞に、さまざまな感染の多重度（ＭＯＩ）のアデノウイルスＡＤ５－ｉＭｙＤ８８．ＣＤ４０を形質導入し、１００ｎＭの二量体化薬物ＡＰ２０１８７を用いて刺激した。使用したウイルスは、実施例１３および１４に使用したウイルス溶解物の最適化型であった。４８時間後、上清を収穫し、ＩＬ１２ｐ７０ＥＬＩＳＡアッセイにおいてアッセイした。図３３は、この力価決定の結果を表す。
【０３６０】
未熟ヒトｍｏＤＣを、抗生物質を含む無血清ＲＰＭＩ培地を用いて２回洗浄後、０．２５×１０^{6}細胞／ウェルで、４８ウェルプレートに播種した。次いで、細胞に、Ａｄ５ｆ３５－ｉＣＤ４０（１０，０００ＶＰ／細胞）、Ａｄ５－ｉＭｙＤ８８．ＣＤ４０（１００ＭＯＩ）、Ａｄ５．ｉＭｙＤ８８（１００ＭＯＩ）またはＡｄ５－ＴＬＲ４ｏｎ（１００ＭＯＩ）のいずれかを形質導入し、示した１マイクログラム／ミリリットルＬＰＳおよび図３４に示した１００ｎＭの二量体化薬物ＡＰ２０１８７を用いて刺激した。４８時間後、上清を収穫し、ＩＬ１２ｐ７０　ＥＬＩＳＡアッセイにおいてアッセイした。
【０３６１】
Ａｄ５ｆ３５－ｉＣＤ４０を、ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ｉｈＣＤ４０（Ｍ－Ｆｖ’－Ｆｖ

ｌｓ－ｈＣＤ４０；ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－Ｍ－Ｆｖ’－Ｆｖｌｓ－ｈＣＤ４０としても公知）を使用して作製した。図３３および３４に示したように、ＭｙＤ８８は、本明細書においてＭｙＤ８８Ｌとして示した型と同じＭｙＤ８８の切断型である。Ａｄ５．ｉＭｙＤ８８として示したアデノウイルスを、ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ＭｙＤ８８Ｌ－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－Ｅを使用して作製した。Ａｄ５－ｉＭｙＤ８８．Ｃｄ４０として示したアデノウイルスを、ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ＭｙＤ８８ＬＣＤ４０－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－Ｅを使用して作製した。Ａｄ５－ＴＬＲ４Ｏｎとして示したアデノウイルスは、ｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ＣＤ４／ＴＬＲ４－Ｌ３－Ｅを使用して作製した。

【０３６２】

（実施例１７）

樹状細胞の非ウイルス性形質転換

Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列に作動可能に連結したｉＭｙＤ８８－ＣＤ４０配列、例えばｐＳｈｕｔｔｌｅＸ－ＭｙＤ８８ＬＣＤ４０－Ｆｖ’Ｆｖｌｓ－Ｅインサートを含むプラスミドベクターを構築する。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制御要素：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をさらに含む。ベクターは、エンハンサー配列をさらに含むことができる。ＭｙＤ８８Ｌ、ＣＤ４０およびＦｖＦｖｌｓ配列を、最適化コドンを含む、当分野において公知の合成技術を使用して改良できる。

【０３６３】

未熟ヒト単球由来樹状細胞（ＭｏＤＣ）を、抗生物質を含む無血清ＲＰＭＩ培地を用いて２回洗浄後、０．２５×10^6細胞／ウェルで４８ウェルプレートに播種した。細胞に、普通の当業者に公知の任意の適切な方法、例えば、ＡＭＡＸＡキットを使用したヌクレオフェクション（ｎｕｃｌｅｏｆｅｃｔｉｏｎ）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム、ＤＥＡＥ－デキストラン、超音波処理、リポソーム仲介トランスフェクション、受容体仲介トランスフェクションまたは微粒子銃照射（ｍｉｃｒｏｐｒｏｊｅｃｔｉｌｅ ｂｏｍｂａｒｄｍｅｎｔ）を使用して形質導入した

ＤＮＡワクチンは、例えば、２００８年１１月６日公開の米国特許公開第２００８０２７４１４０号において論じられている。Ｆｖ’Ｆｖｌｓ配列に作動可能に連結したｉＭｙＤ８８－ＣＤ４０配列をＤＮＡワクチンベクターに挿入し、これらは、例えば、宿主組織においてｉＭｙＤ８８－Ｃｄ４０Ｆｖ’Ｆｖｌｓキメラタンパク質の発現にとって必要な制御要素を含む。これらの制御要素は、限定するものではないが、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を含み、キメラタンパク質をコードするコドンは最適化できる。

【０３６４】

（実施例１８）

マウス腫瘍モデルを使用した、ｉｎ ｖｉｖｏのＭｙＤ８８ＣＤ４０形質転換樹状細胞の評価

骨髄樹状細胞を、本明細書の実施例において提示した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ＢＭＤＣを、ＥＧ．７－ＯＶＡモデルにおいて、それらの腫瘍成長の阻害能力に関して試験した。ＥＧ．７－ＯＶＡ細胞（５×10^5細胞／１００ｍｌ）を、Ｃ５７ＢＬ／６雌マウスの右わき腹に接種した。全群のＢＭＤＣに、５０マイクログラム／ｍｌのオボアルブミンタンパク質をパルスし、上記のように活性化した。腫瘍細胞摂取のおよそ７日後、ＢＭＤＣを解凍し、マウスの後肢足蹠に皮下注射した。

【０３６５】

腫瘍成長を、全群のマウスにおいて週に２回モニターした。全群のランダム選択のマウス由来の末梢血を四量体染色およびｉｎ ｖｉｖｏのＣＴＬアッセイによって分析した。表１は実験計画を表し、これは、非形質導入樹状細胞（第１群および第２群）、対照アデノウイルスベクターを形質導入した樹状細胞（第３群）、ベクターをコードするＣＤ４０細胞質を形質導入した樹状細胞（第４群）、切断型ＭｙＤ８８ベクターを形質導入した樹状細胞（第５群および第６群）およびキメラＣＤ４０－切断型ＭｙＤ８８ベクターを形質

導入した樹状細胞（第７群および第８群）を含む。細胞を、ＡＰ－１９０３、ＬＰＳまたはＣＤ４０リガンドを用いて、表示のように刺激した。

【０３６６】

【表１】

表1

群	処理	用量レベル	ADV vp/細胞	[LPS]	[AP1903] (*in vitro*)	他の試薬 (*in vitro*)	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	1.5e6 細胞		200 ng/ml	N/A	CD40L 2 μg/ml	SC	N/A	6
3	DCs + Ad-Luc + LPS + AP1903	1.5e6 細胞 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ	200 ng/ml	100 nM		SC	IP	6
4	DCs + Ad-iCD40 + LPS + AP1903	1.5e6 細胞 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ	200 ng/ml	100 nM		SC	IP	6
5	DCs + Ad-iMyD88 + AP1903	1.5e6 細胞 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ		100 nM		SC	IP	6
6	DCs + Ad-iMyD88	1.5e6 細胞	20K wGJ		N/A		SC	N/A	6
7	DCs + Ad-iMyD88.CD40 + AP1903	1.5e6 細胞 5 mg/kg (AP1903)	20K wGJ		100 nM		SC	IP	6
8	DCs + Ad-iMyD88.CD40	1.5e6 細胞	20K wGJ		N/A		SC	N/A	6

腫瘍接種マウスのワクチン接種前に、形質導入樹状細胞のＩＬ－１２ｐ７０レベルをｉｎ　ｖｉｔｒｏで測定した。ＩＬ－１２ｐ７０レベルは、図３５に提示する。図３６は、形質導入マウスにおいて観察された腫瘍成長阻害のチャートを示す。ＭｙＤ８８を形質導入し、ＡＰ１９０３で処理した樹状細胞の接種は、１／６の治癒率をもたらし、一方、ＡＰ１９０３を用いない、ＭｙＤ８８－ＣＤ４０形質導入樹状細胞の接種は、４／６の治癒率をもたらし、二量体独立性の効果の可能性を示した。アスタリスクは、Ｌｕｃ＋ＬＰＳ＋ＡＰと、ｉＣＤ４０ＭｙＤ８８＋ＬＰＳ＋／－ＡＰ１９０３との比較を示す。図３６は、代表的なワクチン接種マウスの写真をさらに提供する。

【０３６７】

図３７は、ｉＭｙＤ８８－ＣＤ４０形質導入樹状細胞を用いて処理したマウスにおける、Ａｇ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の誘導頻度増強の分析を提示する。７日目にワクチン接種した１０日後に、処理マウス由来の末梢骨髄細胞を収穫した。ＰＢＭＣを、抗ｍＣＤ８－ＦＩＴＣおよびＨ２－Ｋ^{b}－ＳＩＩＮＦＥＫＬ－四量体－ＰＥを用いて染色し、フローサイトメトリにより分析した。

【０３６８】

図３８は、ｉＭｙＤ８８－ＣＤ４０－形質導入樹状細胞処理後のマウスにおいて誘導された、Ａｇ特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＣＤ４＋Ｔ$_{H}$１細胞の頻度増強を提示する。全実験群の３匹のマウスをワクチン接種１８日後に犠牲にした。３匹のマウス／群の脾細胞を一緒に「プール」し、ＩＦＮ－ガンマＥＬＩＳＰＯＴアッセイにより分析した。Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ　ＭｕｌｔｉＳｃｒｅｅｎ－ＨＡプレートを、１０マイクログラム／ｍｌの抗マウスＩＦＮ－ガンマＡＮ１８抗体（Ｍａｂｔｅｃｈ　ＡＢ、Ｉｎｃ．、Ｎａｃｋａ、Ｓｗｅｄｅｎ）を用いてコーティングした。脾細胞を加え、完全ＥＬＩＳｐｏｔ培地（ＲＰＭＩ、１０％ＦＢＳ、ペニシリン、ストレプトマイシン）中で、５％ＣＯ$_{2}$中３７℃において２０時間培養した。脾細胞を、２マイクログラム／ｍｌのＯＴ－１（ＳＩＩＮＦＥＫＬ）、ＯＴ－２（ＩＳＱＡＶＨＡＡＨＡＥＩＮＥＡＧＲ）またはＴＲＰ－２ペプチド（対照の非標的化ペプチド）と共にインキュベートした。洗浄後、マウスＩＦＮ－ガンマ（Ｒ４－６Ａ２、Ｍａｂｔｅｃｈ　ＡＢ）に対するビオチン化モノクローナル二次抗体を、１マイクログラム／ｍｌの濃度でウェルに適用し、続いて，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）と共にインキュベートした。その後、プレートをアルカリホスファ

ターゼ基質、３－アミノ－９エチルカルバゾール（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｉｎｃ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を用いて発色させた。ウェル中のスポットの数を、ＺｅｌＮｅｔ Ｃｏｎｓｕｌｔｉｎｇ，Ｉｎｃ．および自動ＥＬＩＳＰＯＴリーダーシステム（Ｃａｒｌ Ｚｅｉｓｓ，Ｉｎｃ、Ｔｈｏｒｎｗｏｏｄ ＮＹ）により点数化した。

【０３６９】

図３９は、ｉｎ ｖｉｖｏの細胞傷害性リンパ球アッセイの概略図および結果を提示する。ＤＣワクチン接種の１８日後、ｉｎ ｖｉｖｏのＣＴＬアッセイを実施した。同系ナイーブ脾細胞を、ｉｎ ｖｉｖｏの標的細胞として使用した。同系ナイーブ脾細胞を、ＣＴＬ培地中６マイクロモルのＣＦＳＥ（ＣＦＳＥ^{hi}細胞）または０．６マイクロモルのＣＦＳＥ（ＣＦＳＥ^{lo}細胞）のどちらかと共に、３７℃において１０分間のインキュベーションによって標識した。ＣＦＳＥ^{hi}細胞に、ＯＴ－１ ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをパルスし、ＣＦＳＥ^{lo}細胞を、対照ＴＲＰ２ペプチドと共にインキュベートした。４×１０^{6}のＣＦＳＥ^{hi}＋４×１０^{6}のＣＦＳＥ^{lo}細胞の混合物を、尾静脈を介して静脈注射した。ｉｎ ｖｉｖｏのインキュベーション１６時間後、脾細胞を回収し、単一細胞懸濁液を、ＣＦＳＥ－標識細胞の検出および定量に関して分析した。図４０は、接種マウスにおいてｉＭｙＤ８８－ＣＤ４０－形質導入樹状細胞により誘導されたＣＴＬ活性の増強を提示するチャートである。図４１は、ｉＭｙＤ８８－ＣＤ４０形質導入樹状細胞により誘導されたｉｎ ｖｉｖｏのＣＴＬ活性の増強を示す、選択試料に関する未加工のＣＴＬヒストグラムを示す。

【０３７０】

図４２は、形質導入細胞をワクチン接種したマウスにおいて、T_H２細胞を産生するＩＬ－４に関する細胞内染色の結果を提示する。マウスの脾細胞（３匹のマウスからプールした細胞）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、１０マイクログラム／ｍｌのブレフェルジンＡと共に６時間インキュベートし、分泌を抑制した。その後、細胞を固定し、透過処理し、抗ｍＩＬ－４－ＡＰＣおよび抗ｍＣＤ４－ＦＩＴＣを用いた細胞内染色により分析した。

【０３７１】

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細胞を阻害するその能力に関して、再度評価した。第１の実験において、薬物依存性腫瘍成長阻害を、誘導性ＣＤ４０－切断型ＭｙＤ８８ベクターを用いて改良された樹状細胞（Ａｄ－ｉＣＤ４０．ＭｙＤ８８）の接種後測定した。Ｃ５７ＢＬ／６マウス由来の骨髄由来樹状細胞に、１０マイクログラム／ｍのオボアルブミンをパルスし、アデノウイルス構築物、Ａｄ５－ｉＣＤ４０．ＭｙＤ８８、Ａｄ５－ｉＭｙＤ８８またはＡｄ５－Ｌｕｃ（対照）の２０，０００ウイルス粒子／細胞（ＶＰ／ｃ）を形質導入した。細胞を２マイクログラム／ｍｌのＣＤ４０Ｌ、２００ｎｇ／ｍｌのＬＰＳまたは５０ｎＭのＡＰ１９０３二量化剤のいずれかを用いて活性化した。５×１０^{5}のＥ．Ｇ７－ＯＶＡ胸腺腫細胞を、Ｃ５７ＢＬ／６マウス（Ｎ＝６／群）の背中に接種した。腫瘍が直径約５ｍｍに達した時（接種後８日目）、マウスを、２×１０^{6}のＢＭＤＣの皮下注射により処理した。翌日、細胞ワクチン接種後、マウスを、５ｍｇ／ｋｇのＡＰ１９０３の腹腔内注射により処理した。腫瘍成長を、週に２回モニターした。結果を図４３Ａに示す。実験の別のセットにおいて、上記のようにＥ．Ｇ７－ＯＶＡ腫瘍を確立させた。マウス（Ｎ＝６／群）を、２×１０^{6}のＢＭＤＣ（オボアルブミン添加）を用いて処理し、２０，０００または１，２５０ＶＰ／ｃのどちらかのＡｄ５－ｉＣＤ４０．ＭｙＤ８８を形質導入した。ＡＰ１９０３群のＢＭＤＣを、５０ｎＭのＡＰ１９０３を用いてｉｎ ｖｉｔｒｏで処理した。翌日、細胞ワクチン接種後、ＡＰ１９０３群のマウスを、５ｍｇ／ｋｇのＡＰ１９０３の腹腔内注射により処理した。結果を図４３Ｂに示す。図４３Ｃは、冷凍保存前の、さまざまなワクチン細胞を一晩培養した後に産生された相対的ＩＬ－１２ｐ７０レベルを表す。ＩＬ－１２ｐ７０はＥＬＩＳＡアッセイによりアッセイした。

【０３７２】

改良された骨髄樹状細胞により免疫化されたマウス由来の血液を、四量体染色を使用し

て、腫瘍特異的Ｔ細胞の頻度および機能に関して分析した。図４４Ａは、マウス（Ｎ＝３～５）を、皮下にＢＭＤＣを用いて免疫化し、オボアルブミンをパルスし、図４３に記載のように活性化した実験の結果を示す。ワクチン接種の１週間後、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、抗ｍＣＤ８－ＦＩＴＣおよびＳＩＩＮＦＥＫＬ－Ｈ２－Ｋ^{b}－ＰＥを用いて染色し、フローサイトメトリにより分析した。図４４Ｂは、上記のようにＢＭＤＣをワクチン接種されたマウスにおいて実施したｉｎ　ｖｉｖｏのＣＴＬアッセイの結果を示す。ＢＭＤＣによる免疫化の２週間後、同系Ｃ５７ＢＬ／６マウス由来の脾細胞に、ＴＲＰ－２対照ペプチドのＳＶＹＤＦＦＶＷＬまたは標的ペプチドのＳＩＮＦＥＫＬ標的のどちらかをパルスし、ｉｎ　ｖｉｖｏ標的として使用した。脾細胞の半数を、６マイクロモルのＣＦＳＥ（ＣＦＳＥ^{hi}細胞）または０．６マイクロモルのＣＦＳＥ（ＣＦＳＥ^{lo}細胞）を用いて標識した。ＣＦＳＥ^{hi}細胞に、ＯＴ－１（ＳＩＩＮＦＥＫＬ）ペプチドをパルスし、ＣＦＳＥ^{lo}細胞を、対照ＴＲＰ－２（ＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）ペプチドと共にインキュベートした。４×１０^{6}のＣＦＳＥ^{hi}＋４×１０^{6}のＣＦＳＥ^{lo}細胞の混合物を、尾静脈を介して静脈注射した。翌日、脾細胞を回収し、単一細胞懸濁液を、ＣＦＳＥ－標識細胞の検出および定量に関して分析した。図４４Ｃおよび４４Ｄは、ＩＦＮ－ガンマアッセイの結果を示す。図４３に記載のように処理したＥ．Ｇ７－ＯＶＡ支持マウス由来の末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、１マイクログラム／ｍｌのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド（ＯＴ－１）、ＩＳＱＡＶＨＡＡＨＡＥＩＮＥＡＧＲ（ＯＴ－２）およびＴＲＰ－２（無関係なＨ２－Ｋ^{b}拘束性）ペプチドを用いてＩＦＮ－ガンマＥＬＩＳｐｏｔアッセイにおいて分析した。ＩＦＮ－ガンマ産生リンパ球の数を、３連のウェルにおいて評価した。３匹のマウス／群由来の細胞をプールし、３連のウェルにおいてＩＦＮ－ガンマＥＬＩＳｐｏｔにより分析した。アッセイは２回実施した。

【０３７３】

図４５は、この実施例に示されたように処理されたマウス由来の脾細胞を使用して実施したナチュラルキラー細胞アッセイの結果を提示する。マウス（３匹／群）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、^{51}Ｃｒを用いて標識し、標的（Ｔ）として使用した。ＥＬ－４細胞系を、無関係な対照として使用した。

【０３７４】

図４６は、抗原特異的細胞傷害性リンパ球の検出に関するアッセイの結果を提示する。マウス（３匹／群）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、^{51}Ｃｒを用いて標識し、標的（Ｔ）として使用した。ＥＬ－４細胞系を、無関係な対照として使用した。

【０３７５】

図４７は、誘導性ＣＤ４０－切断型ＭｙＤ８８（ｉＣＤ４０．ＭｙＤＤ）アデノウイルスベクターを形質導入した人細胞の活性化の結果を提示する。３つの異なるＨＬＡ－Ａ２＋ドナー由来の樹状細胞（培養５日目）を、プラスチック接着法により精製し、１０，０００ＶＰ／細胞のＡｄ５－ｉＣＤ４０．ＭｙＤ８８、Ａｄ５－ｉＭｙＤ８８またはＡｄ５－Ｌｕｃを形質導入した。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（PGE_2）を含有する標準成熟カクテル（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陰性選択により精製し、１０マイクログラム／ｍｌのＨＬＡ－Ａ２拘束性ＦＬＷＧＰＲＡＬＶ　ＭＡＧＥ－３ペプチドを１：５（ＤＣ：Ｔ）の割合でパルスしたＤＣと、７日間同時培養した。ＤＣによる刺激の第２ラウンドの５日後（７日目）、Ｔ細胞を、標準的ＩＦＮ－ガンマＥＬＩＳｐｏｔアッセイにおいてアッセイした。細胞に、１マイクログラム／ｍｌのＭＡＧＥ－３または無関係のＨＬＡ－Ａ２拘束性ＰＳＭＡペプチド（ＰＳＭＡ－Ｐ２）をパルスした。実験は３連に実施した。

【０３７６】

図４８および４９は、細胞遊走アッセイの結果である。

ｍＢＭＤＣに、１０，０００ＶＰ／細胞のＡｄ５．ルイシフェラーゼまたはＡｄ５．ｉＭ

ｙＤ８８．ＣＤ４０を、Ｇｅｎｅ　Ｊａｍｍｅｒ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）の存在下で形質導入し、１００ｎＭのＡＰ１９０３（ＡＰ）またはＬＰＳ（１マイクログラム／ｍｌ）により４８時間刺激した。ＣＣＲ７の発現を、ＣＤ１１ｃ＋樹状細胞の表面において、ＰｅｒＣＰ．Ｃｙ５．５結合体化抗体を使用する細胞内染色により分析した。図４８は、個別に提示された各アッセイの実験結果を示し、図４９は、同じグラフにおける結果を提供する。

【０３７７】

（実施例１９）

具体的な核酸配列およびアミノ酸配列の例。

【０３７８】

【化２】

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;
細胞質領域は太字で示した）

1 gccaaggctg gggcagggga gtcagcagag gcctcgctcg ggcgcccagt ggtcctgccg
61 cctggtctca cctcgctatg gttcgtctgc ctctgcagtg cgtcctctgg ggctgcttgc
121 tgaccgctgt ccatccagaa ccacccactg catgcagaga aaaacagtac ctaataaaca
181 gtcagtgctg ttctttgtgc cagccaggac agaaactggt gagtgactgc acagagttca
241 ctgaaacgga atgccttcct tgcggtgaaa gcgaattcct agacacctgg aacagagaga
301 cacactgcca ccagcacaaa tactgcgacc ccaacctagg gcttcgggtc cagcagaagg
361 gcacctcaga aacagacacc atctgcacct gtgaagaagg ctggcactgt acgagtgagg
421 cctgtgagag ctgtgtcctg caccgctcat gctcgcccgg ctttggggtc aagcagattg
481 ctacaggggt ttctgatacc atctgcgagc cctgcccagt cggcttcttc tccaatgtgt
541 catctgcttt cgaaaaatgt caccttgga caagctgtga gaccaaagac ctggttgtgc
601 aacaggcagg cacaaacaag actgatgttg tctgtggtcc ccaggatcgg ctgagagccc
661 tggtggtgat ccccatcatc ttcgggatcc tgtttgccat cctcttggtg ctggtcttta
721 tc**aaaaaggt ggccaagaag ccaaccaata aggcccccca ccccaagcag gaaccccagg**

【０３７９】

【化３】

781 agatcaattt tcccgacgat cttcctggct ccaacactgc tgctccagtg caggagactt
841 tacatggatg ccaaccggtc acccaggagg atggcaaaga gagtcgcatc tcagtgcagg
901 agagacagtg aggctgcacc cacccaggag tgtggccacg tgggcaaaca ggcagttggc
961 cagagagcct ggtgctgctg ctgctgtggc gtgagggtga ggggctggca ctgactgggc
1021 atagctcccc gcttctgcct gcacccctgc agtttgagac aggagacctg gcactggatg
1081 cagaaacagt tcaccttgaa gaacctctca cttcaccctg gagcccatcc agtctcccaa
1141 cttgtattaa agacagaggc agaagtttgg tggtggtggt gttggggtat ggtttagtaa
1201 tatccaccag accttccgat ccagcagttt ggtgcccaga gaggcatcat ggtggcttcc
1261 ctgcgcccag gaagccatat acacagatgc ccattgcagc attgtttgtg atagtgaaca
1321 actggaagct gcttaactgt ccatcagcag gagactggct aaataaaatt agaatatatt
1381 tatacaacag aatctcaaaa acactgttga gtaaggaaaa aaaggcatgc tgctgaatga
1441 tgggtatgga acttttaaa aaagtacatg cttttatgta tgtatattgc ctatggatat
1501 atgtataaat acaatatgca tcatatattg atataacaag ggttctggaa gggtacacag
1561 aaaacccaca gctcgaagag tggtgacgtc tggggtgggg aagaagggtc tggggg

配列番号2(ヒトCD40をコードするアミノ酸配列;細胞質領域は太字で示した)

MVRLPLQCVLWGCLLTAVHPEPPTACREKQYLINSQCCSLCQPGQKLVSDCTEFTETECLPC
GESEFLDTWNRETHCHQHKYCDPNLGLRVQQKGTSETDTICTCEEGWHCTSEACESCVLH
RSCSPGFGVKQIATGVSDTICEPCPVGFFSNVSSAFEKCHPWTSCETKDLVVQQAGTNKTD
VVCGPQDRLRALVVIPIIFGILFAILLVLVFI**KKVAKKPTNKAPHPKQEPQEINFPDDLPGSNTA**
APVQETLHGCQPVTQEDGKESRISVQERQ

配列番号3(PSMAをコードするヌクレオチド配列)

gcggatccgcatcatcatcatcacagctccggaatcgagggacgtggtaaatcctccaatgaagctactaacattactccaaa
gcataatatgaaagcatttttggatgaattgaaagctgagaacatcaagaagttcttatataatttacacagataccacatttagcag
gaacagaacaaaactttcagcttgcaaagcaaattcaatcccagtggaaagaatttggcctggattctgttgagctagcacattatg
atgtcctgttgtcctacccaaataagactcatcccaactacatctcaataattaatgaagatggaaatgagattttcaacacatcattatt
tgaaccacctcctccaggatatgaaaatgtttcggatattgtaccacctttcagtgctttctctcctcaaggaatgccagagggcgatct
agtgtatgttaactatgcacgaactgaagacttctttaaattggaacgggacatgaaaatcaattgctctgggaaaattgtaattgcca
gatatgggaaagttttcagaggaaataaggttaaaaatgcccagctggcaggggccaaaggagtcattctctactccgaccctgct
gactactttgctcctggggtgaagtcctatccagatggttggaatcttcctggaggtggtgtccagcgtggaaatatcctaaatctgaat
ggtgcaggagaccctctcacaccaggttacccagcaaatgaatatgcttataggcgtggaattgcagaggctgttggtcttccaagt
attcctgttcatccaattggatactatgatgcacagaagctcctagaaaaaatgggtggctcagcaccaccagatagcagctggag
aggaagtctcaaagtgccctacaatgttggacctggctttactggaaacttttctacacaaaaagtcaagatgcacatccactctacc
aatgaagtgacaagaatttacaatgtgataggtactctcagaggagcagtggaaccagacagatatgtcattctgggaggtcacc
gggactcatgggtgtttggtggtattgaccctcagagtggagcagctgttgttcatgaaattgtgaggagctttggaacactgaaaaa
ggaagggtggagacctagaagaacaattttgtttgcaagctgggatgcagaagaatttggtcttcttggttctactgagtgggcagag
gagaattcaagactccttcaagagcgtggcgtggcttatattaatgctgactcatctatagaaggaaactacactctgagagttgattg
tacaccgctgatgtacagcttggtacacaacctaacaaaagagctgaaaagccctgatgaaggctttgaaggcaaatctctttatg
aaagttggactaaaaaaagtccttccccagagttcagtggcatgcccaggataagcaaattgggatctggaaatgattttgaggtgt
tcttccaacgacttggaattgcttcaggcagagcacggtatactaaaaattgggaaacaaacaaattcagcggctatccactgtatc
acagtgtctatgaaacatatgagttggtggaaaagttttatgatccaatgtttaaatatcacctcactgtggcccaggttcgaggaggg
atggtgtttgagctagccaattccatagtgctccctttgattgtcgagattatgctgtagttttaagaaagtatgctgacaaaatctacagt
atttctatgaaacatccacaggaaatgaagacatacagtgtatcatttgattcacttttttctgcagtaaagaattttacagaaattgcttc
caagttcagtgagagactccaggactttgacaaaagcaagcatgtcatctatgctccaagcagccacaacaagtatgcagggga
gtcattcccaggaatttatgatgctctgtttgatattgaaagcaaagtggacccttccaaggcctggggagaagtgaagagacagat
ttatgttgcagccttcacagtgcaggcagctgcagagactttgagtgaagtagcctaagcggccgcatagca

【０３８０】

【化４】

配列番号４（配列番号：３によりコードされるＰＳＭＡのアミノ酸配列）

MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFL
DELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHP
NYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLE
RDMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGG
GVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSA
PPDSSWRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILG
GHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAE
ENSRLLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWT
KKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYE
LVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEM
KTYSVSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSKHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIES
KVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA

配列番号５（ＭｙＤ８８ＬおよびＳａｌＩリンカーのヌクレオチド配列）

gtcgacatggctgcaggaggtcccggcgcggggtctgcggccccggtctcctccacatcctcccttcccctggctgctctcaacat
gcgagtgcggcgccgcctgtctctgttcttgaacgtgcggacacaggtggcggccgactggaccgcgctggcggaggagatgg
actttgagtacttggagatccggcaactggagacacaagcggaccccactggcaggctgctggacgcctggcagggacgccct
ggcgcctctgtaggccgactgctcgagctgcttaccaagctgggccgcgacgacgtgctgctggagctgggacccagcattgag
gaggattgccaaaagtatatcttgaagcagcagcaggaggaggctgagaagcctttacaggtggccgctgtagacagcagtgt
cccacggacagcagagctggcgggcatcaccacacttgatgacccccctggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcatctgct
attgccccagcgacatc**gtcgac**

配列番号６（ＭＹＤ８８Ｌのアミノ酸配列）

MAAGGPGAGSAAPVSSTSSLPLAALNMRVRRRLSLFLNVRTQVAADWTALAEEMDFEYLEIR
QLETQADPTGRLLDAWQGRPGASVGRLLELLTKLGRDDVLLELGPSIEEDCQKYILK
QQQEEAEKPLQVAAVDSSVPRTAELAGITTLDDPLGHMPERFDAFICYCPSDI

配列番号７（Ｆｖ’ ＦｖｌｓおよびＸｈｏＩ／ＳａｌＩリンカーの配列
（Ｆｖ’ 中ゆらぎ(wobbled)コドンは小文字で書いてある））

ctcgagGGcGTcCAaGTcGAaACcATtagtCCcGGcGAtGGcaGaACaTTtCCtAAaaGgGGaCAaA
CaTGtGTcGTcCAtTAtACaGGcATGtTgGAgGAcGGcAAaAAgGTgGAcagtagtaGaGAtcGc
AAtAAaCCtTTcAAaTTcATGtTgGGaAAaCAaGAaGTcATtaGgGGaTGGGAgGAgGGcGT
gGCtCAaATGtccGTcGGcCAacGcGCtAAgCTcACcATcagcCCcGAcTAcGCaTAcGGcGCt
ACcGGaCAtCCcGGaATtATtCCcCCtCAcGCtACctTgGTgTTtGAcGTcGAaCTgtTgAAgCT
cGAa**gtcgag**ggagtgcaggtggaaaccatctccccaggagacgggcgcaccttccccaagcgcggccagacctgc
gtggtgcactacaccgggatgcttgaagatggaaagaaagttgattcctcccgggacagaaacaagccctttaagtttatgc
taggcaagcaggaggtgatccgaggctgggaagaaggggttgcccagatgagtgtgggtcagagagccaaactgacta
tatctccagattatgcctatggtgccactgggcacccaggcatcatcccaccacatgccactctcgtcttcgatgtggagcttct
aaaactggaatctggcggtggatccgga**gtcgag**

【０３８１】

【化５】

配列番号８（FV’FVLSのペプチド配列）

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThr
GlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGl
nGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrA
laTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGlu
(ValGlu)

GlyValGlnValGluThrIleSerProGlyAspGlyArgThrPheProLysArgGlyGlnThrCysValValHisTyrThr
GlyMetLeuGluAspGlyLysLysValAspSerSerArgAspArgAsnLysProPheLysPheMetLeuGlyLysGl
nGluValIleArgGlyTrpGluGluGlyValAlaGlnMetSerValGlyGlnArgAlaLysLeuThrIleSerProAspTyrA
laTyrGlyAlaThrGlyHisProGlyIleIleProProHisAlaThrLeuValPheAspValGluLeuLeuLysLeuGluSer
GlyGlyGlySerGly

配列番号９（TRIFのヌクレオチド配列およびXhoI/SalIリンカー）

ctcgagatggcctgcacaggcccatcacttcctagcgccttcgacattctaggtgcagcaggccaggacaagctcttgtatctgaa
gcacaaactgaagaccccacgcccaggctgccaggggcaggacctcctgcatgccatggttctcctgaagctgggccaggaaa
ctgaggccaggatctctctagaggcattgaaggccgatgcggtggcccggctggtggcccgccagtgggctggcgtggacagca
ccgaggacccagaggagcccccagatgtgtcctgggctgtggcccgcttgtaccacctgctggctgaggagaagctgtgccccg
cctcgctgcgggacgtggcctaccaggaagccgtccgcaccctcagctccagggacgaccaccggctgggggaacttcaggat
gaggcccgaaaccggtgtgggtgggacattgctggggatccagggagcatccggacgctccagtccaatctgggctgcctccca
ccatcctcggctttgccctctgggaccaggagcctcccacgccccattgacggtgtttcggactggagccaagggtgctccctgcga
tccactggcagccctgcctccctggccagcaacttggaaatcagccagtcccctaccatgcccttcctcagcctgcaccgcagccc
acatgggcccagcaagctctgtgacgacccccaggccagcttggtgcccgagcctgtccccggtggctgccaggagcctgagga
gatgagctggccgccatcgggggagattgccagcccaccagagctgccaagcagcccacctcctgggcttcccgaagtggccc
cagatgcaacctccactggcctccctgataccccccgcagctccagaaaccagcaccaactacccagtggagtgcaccgagggg
tctgcaggcccccagtctctcccccttgcctattctggagccggtcaaaaaacccctgctctgtcaaagaccagacgccactccaacttt
ctgtagaagataccacctctccaaataccaagccgtgcccacctactcccaccaccccagaaacatcccctcctcctcctcctcc
ctccttcatctactccttgttcagctcacctgacccccctcctccctgttcccttcctccctggaatcatcatcggaacagaaattctataact
ttgtgatcctccacgccagggcagacgaacacatcgccctgcgggttcgggagaagctggaggcccttggcgtgcccgacgggg
ccaccttctgcgaggatttccaggtgccggggcgcggggagctgagctgcctgcaggacgccatagaccactcagctttcatcatc
ctacttctcacctccaacttcgactgtcgcctgagcctgcaccaggtgaaccaagccatgatgagcaacctcacgcgacaggggtc
gccagactgtgtcatccccttcctgccctggagagctccccggcccagctcagctccgacacggccagcctgctctccgggctgg
tgcggctggacgaacactcccagatcttcgccaggaaggtggccaacaccttcaagccccacaggcttcaggcccgaaaggcc
atgtggaggaaggaacaggacacccgagccctgcgggaacagagccaacacctggacggtgagcggatgcaggcggcggc
actgaacgcagcctactcagcctacctccagagctacttgtcctaccaggcacagatggagcagctccaggtggcttttgggagcc
acatgtcatttgggactggggcgccctatggggctcgaatgccctttgggggccaggtgcccctgggagccccgccacccttttcca
cttggccggggtgcccgcagccgccacccctgcacgcatggcaggctggcacccccccaccgccctccccacagccagcagc
ctttccacagtcactgcccttcccgcagtccccagccttccctacggcctcacccgcacccccctcagagcccagggctgcaacccct
cattatccaccacgcacagatggtacagctggggctgaacaaccacatgtggaaccagagagggtcccaggcgcccgaggac
aagacgcaggaggcagaa**gtcgac**

【０３８２】

【化６】

配列番号１０（TRIFのペプチド配列）

MetAlaCysThrGlyProSerLeuProSerAlaPheAspIleLeuGlyAlaAlaGlyGlnAspLysLeuLeuTyrLeuLysHisLysLeuLysThrProArgProGlyCysGlnGlyGlnAspLeuLeuHisAlaMetValLeuLeuLysLeuGlyGlnGluThrGluAlaArgIleSerLeuGluAlaLeuLysAlaAspAlaValAlaArgLeuValAlaArgGlnTrpAlaGlyValAspSerThrGluAspProGluGluProProAspValSerTrpAlaValAlaArgLeuTyrHisLeuLeuAlaGluGluLysLeuCysProAlaSerLeuArgAspValAlaTyrGlnGluAlaValArgThrLeuSerSerArgAspAspHisArgLeuGlyGluLeuGlnAspGluAlaArgAsnArgCysGlyTrpAspIleAlaGlyAspProGlySerIleArgThrLeuGlnSerAsnLeuGlyC

配列番号１１（RIG-Iのヌクレオチド配列（CARDドメインに下線を引いた）およびXhoI-SalIリンカー

Ctcgagaccaccgagcagcgacgcagcctgcaagccttccaggattatatccggaagaccctggaccctacctacatcctgagctacatggccccctggtttagggaggaagaggtgcagtatattcaggctgagaaaaacaacaagggcccaatggaggctgccacacttttctcaagttcctgttggagctccaggaggaaggctggttccgtggctttttggatgccctagaccatgcaggttattctggactttatgaagccattgaaagttgggatttcaaaaaaattgaaaagttggaggagtatagattacttttaaaacgtttacaaccagaatttaaaaccagaattatcccaaccgatatcatttctgatctgtctgaatgtttaattaatcaggaatgtgaagaaattctacagatttgctctactaaggggatgatggcaggtgcagagaaattggtggaatgccttctcagatcagacaaggaaaactggcccaaaactttgaaacttgctttggagaaagaaaggaacaagttcagtgaactgtggattgtagagaaaggtataaaagatgttgaaacagaagatcttgaggataagatggaaacttctgacatacagatt**gtcgac**

配列番号１２（RIG-１のペプチド配列（CARDドメインに下線を引いた））

TTEQRRSLQAFQDYIRKTLDPTYILSYMAPWFREEEVQYIQAEKNNKGPMEAATLFLKFLLELQEEGWFRGFLDALDHAGYSGLYEAIESWDFKKIEKLEEYRLLLKRLQPEFKTRIIPTDIISDLSECLINQECEEILQICSTKGMMAGAEKLVECLLRSDKENWPKTLKLALEKERNKFSELWIVEKGIKDVETEDLEDKMETSDIQI

配列番号１３（NOD2のヌクレオチド配列（CARDドメインに下線を引いた）およびXhoI-SalIリンカー

Ctcgagatgggggaagagggtggttcagcctctcacgatgaggaggaaagagcaagtgtcctcctcggacattctccgggttgtgaaatgtgctcgcaggaggcttttcaggcacagaggagccagctggtcgagctgctggtctcagggtccctggaaggcttcgagagtgtcctggactggctgctgtcctgggaggtcctctcctgggaggactacgagggcttccacctcctgggccagcctctctcccacttggccaggcgccttctggacaccgtctggaataagggtacttgggcctgtcagaagctcatcgcggctgcccaagaagcccaggccgacagccagtcccccaagctgcatggctgctgggacccccactcgctccacccagcccgagacctgcagagtcaccggccagccattgtcaggaggctccacagccatgtggaagaacatgctggacctggcatgggagcgggtttcgtcagccagtatgaatgtgatgaaatcaggttgccgatcttcacaccgtcccagagggcaagaaggctgcttgatcttgccacggtgaaagcgaatggattggctgccttccttctacaacatgttcaggaattaccagtcccattggccctgcctttggaagctgccacatgcaagaagtatatggccaagctgaggaccacggtgtctgctcagtctcgcttcctcagtacctatgatggagcagagacgctctgcctggaggacatatacacagagaatgtcctggaggtc**gtcgac**

配列番号１４（NOD2のペプチド配列（CARDドメインに下線を引いた））

MetGlyGluGluGlyGlySerAlaSerHisAspGluGluGluArgAlaSerValLeuLeuGlyHisSerProGlyCysGluMetCysSerGlnGluAlaPheGlnAlaGlnArgSerGlnLeuValGluLeuLeuValSerGlySerLeuGluGlyPheGluSerValLeuAspTrpLeuLeuSerTrpGluValLeuSerTrpGluAspTyrGluGlyPheHisLeuLeuGlyGlnProLeuSerHisLeuAlaArgArgLeuLeuAspThrValTrpAsnLysGlyThrTrpAlaCysGlnLysLeuIleAlaAlaAlaGlnGluAlaGlnAlaAspSerGlnSerProLysLeuHisGlyCysTrpAspProHisSerLeuHisProAlaArgAsp

【０３８３】

【化７】

LeuGlnSerHisArgProAlaIleValArgArgLeuHisSerHisValGluAsnMetLeuAspLeuAlaTrpGluArgGly
PheValSerGlnTyrGluCysAspGluIleArgLeuProIlePheThrProSerGlnArgAlaArgArgLeuLeuAspLe
uAlaThrValLysAlaAsnGlyLeuAlaAlaPheLeuLeuGlnHisValGlnGluLeuProValProLeuAlaLeuProL
euGluAlaAlaThrCysLysLysTyrMetAlaLysLeuArgThrThrValSerAlaGlnSerArgPheLeuSerThrTyr
AspGlyAlaGluThrLeuCysLeuGluAspIleTyrThrGluAsnValLeuGluVal

配列番号15（MyD88のヌクレオチド配列）

atggctgcaggaggtcccggcgcggggtctgcggccccggtctcctccacatcctcccttccccctggctgctctcaacatgcgagtg
cggcgccgcctgtctctgttcttgaacgtgcggacacaggtggcggccgactggaccgcgctggcggaggagatggactttgagt
acttggagatccggcaactggagacacaagcggaccccactggcaggctgctggacgcctggcagggacgccctggcgcctct
gtaggccgactgctcgagctgcttaccaagctgggccgcgacgacgtgctgctggagctgggacccagcattgaggaggattgc
caaaagtatatcttgaagcagcagcaggaggaggctgagaagcctttacaggtggccgctgtagacagcagtgtcccacggac
agcagagctggcgggcatcaccacacttgatgacccctggggcatatgcctgagcgtttcgatgccttcatctgctattgccccag
cgacatccagtttgtgcaggagatgatccggcaactggaacagacaaactatcgactgaagttgtgtgtgtctgaccgcgatgtcct
gcctggcacctgtgtctggtctattgctagtgagctcatcgaaaagaggtgccgccggatggtggtggttgtctctgatgattacctgca
gagcaaggaatgtgacttccagaccaaatttgcactcagcctctctccaggtgcccatcagaagcgactgatccccatcaagtaca
aggcaatgaagaaagagttccccagcatcctgaggttcatcactgtctgcgactacaccaacccctgcaccaaatcttggttctgga
ctcgccttgccaaggccttgtccctgccc

配列番号16（MyD88のペプチド配列）

M A A G G P G A G S A A P V S S T S S L P L A A L N M R V R R R L
S L F L N V R T Q V A A D W T A L A E E M D F E Y L E I R Q L E T Q
A D P T G R L L D A W Q G R P G A S V G R L L E L L T K L G R D D
V L L E L G P S I E E D C Q K Y I L K Q Q Q E E A E K P L Q V A A V
D S S V P R T A E L A G I T T L D D P L G H M P E R F D A F I C Y C
P S D I Q F V Q E M I R Q L E Q T N Y R L K L C V S D R D V L P G T
C V W S I A S E L I E K R C R R M V V V V S D D Y L Q S K E C D F Q
T K F A L S L S P G A H Q K R L I P I K Y K A M K K E F P S I L R F I
T V C D Y T N P C T K S W F W T R L A K A L S L P

本明細書において参照した個々の特許、特許出願、刊行物および文献の全体は、参照によって組み込まれる。上記の特許、特許出願、刊行物および文献の引用は、前述のいずれもが関連のある先行技術であることの承認ではなく、これらの広報または文献の内容または日付に関していかなる承認をも構成するものではない。

【０３８４】

本発明の基本的態様から逸脱することなく、改良が可能である。本発明は、１つまたは複数の具体的実施形態の参照により、実質的に詳細に記載されているが、普通の当業者は、本出願において具体的に開示される実施形態に対する変更が実施可能であることを認識すると思われ、さらにこれらの改良および改善は、本発明の範囲および精神の範囲内である。

【０３８５】

本明細書に例示的に記載された発明は、本明細書に具体的に開示されない任意の要素（複数可）の不在下でも、適切に実践可能である。したがって、例えば、本明細書のいかなる場合においても、「含む」、「から本質的になる」および「からなる」という用語のいずれも、他の２つの用語のどれとも交換可能である。採用されている用語および表現は、説明の用語として使用し、限定するものではなく、このような用語および表現の使用は、示されたまたは記載された特徴の任意の均等物またはそれらの一部を排除するものではなく、特許請求した本発明の精神の範囲内でさまざまな改良が可能である。１つの要素か、または複数の要素のどちらかを記載していることが文脈上明らかでない限り、「１つの（

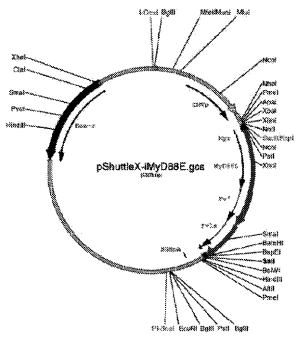
ａ）」または「１つの（ａｎ）」という用語は、それが修飾する１つまたは複数の要素を指す（例えば、「１つの試薬（ａ　ｒｅａｇｅｎｔ）」は１つまたは複数の試薬を意味することができる）。本明細書において使用する「約」という用語は、基本的なパラメーターの１０％以内の値を指し（すなわち、プラスマイナス１０％）、一連の値の先頭にある「約」という用語の使用は、個々の値を修飾する（すなわち、「約１、２および３」は約１、約２および約３）。例えば、「約１００グラム」の重量は、９０グラムから１１０グラムの間の重量を含むことができる。したがって、本発明は、代表的実施形態および任意選択の特徴により具体的に開示されているが、本明細書に開示の概念の、改良および変更は、当業者により再分類可能であると理解するべきであり、このような改良および変更は本発明の範囲内であると考えられる。

【０３８６】

本発明の実施形態は、以下に続く特許請求の範囲において説明する。

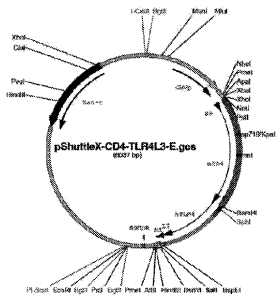
【図３０】

Figure 30



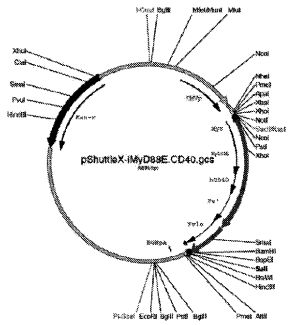
【図３１】

Figure 31

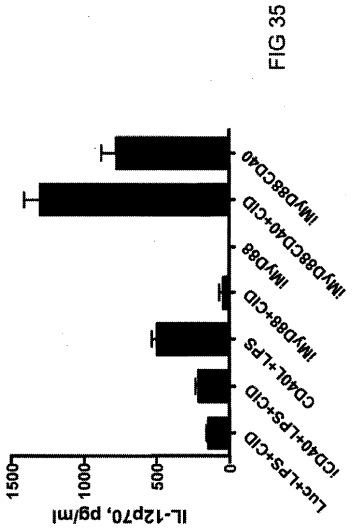


【図３２】

Figure 32



【図３５】



【図３６Ｂ】

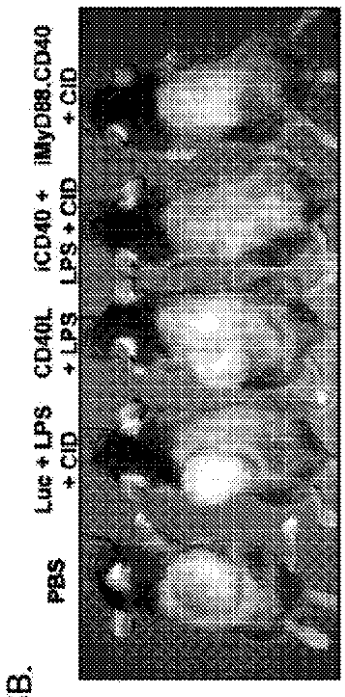


Fig. 36B.

【図４２】

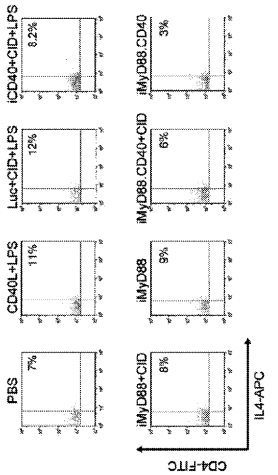


Figure 42

【図１】

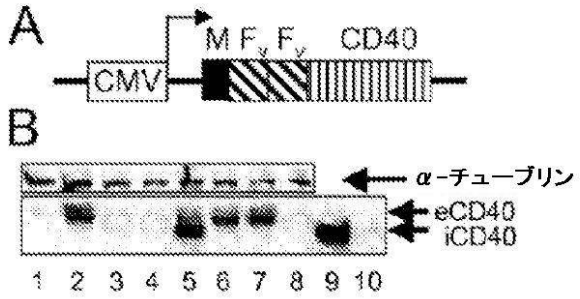


FIG. 1

【図２】

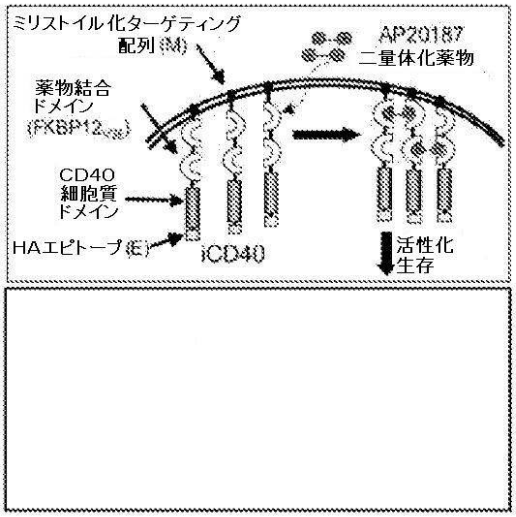


FIG. 2

【図３】

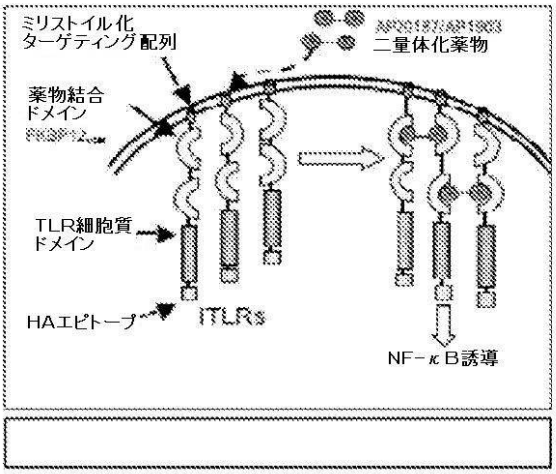


FIG. 3

【図４】

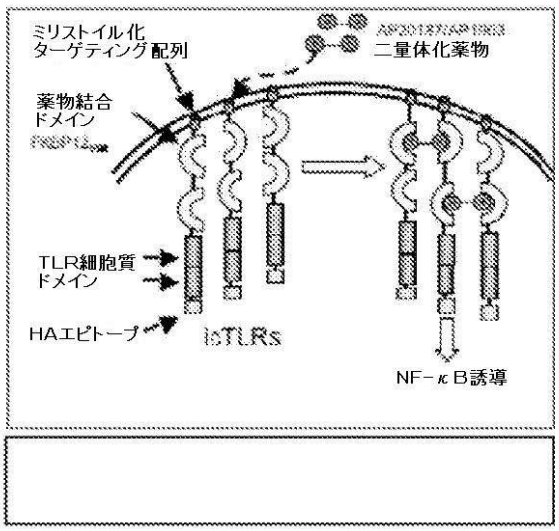


FIG. 4

【図５】

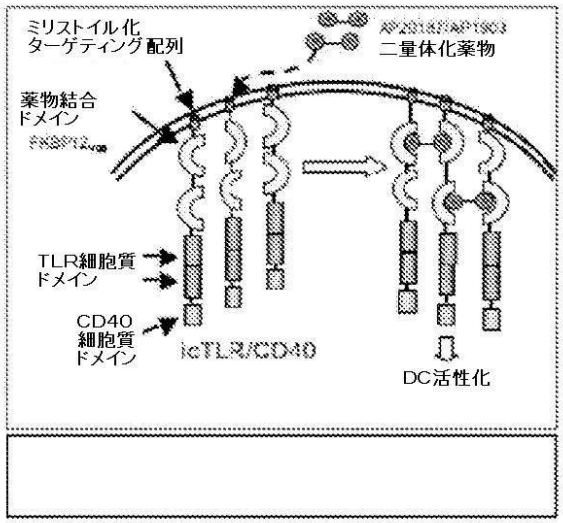


FIG. 5

【図６】

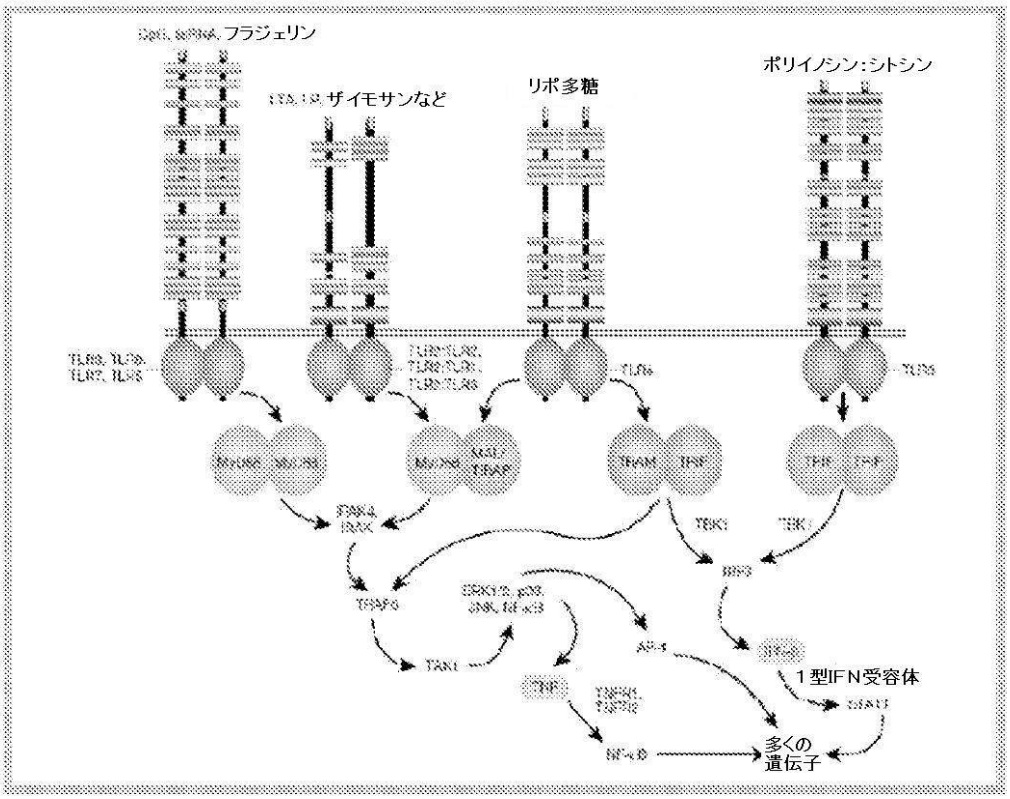


FIG. 6

【図７】

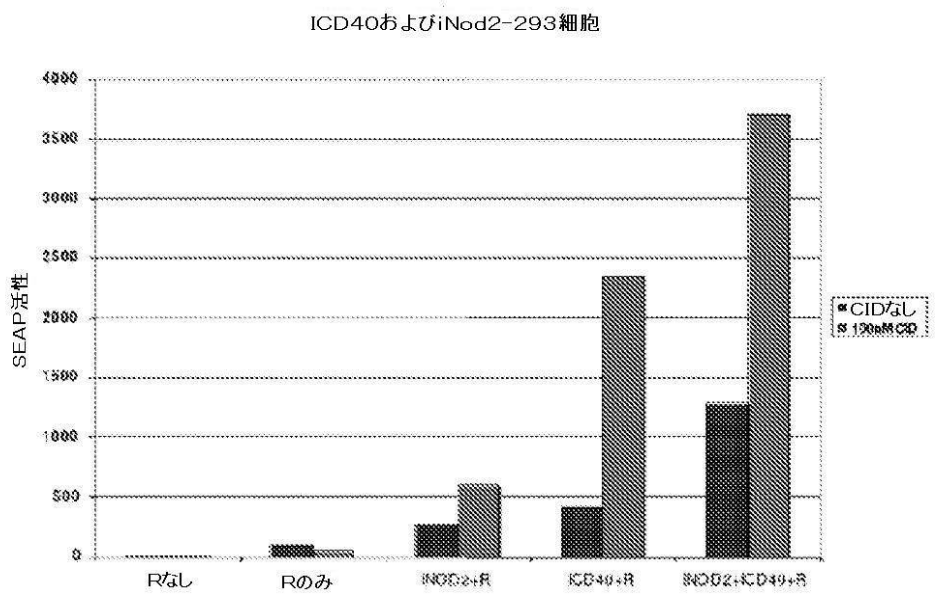


FIG. 7

【図８】

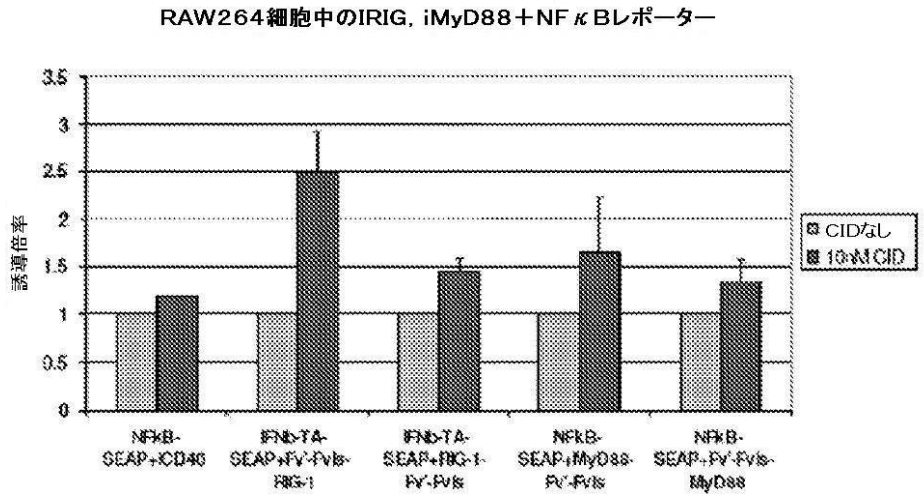


FIG. 8

【図９】

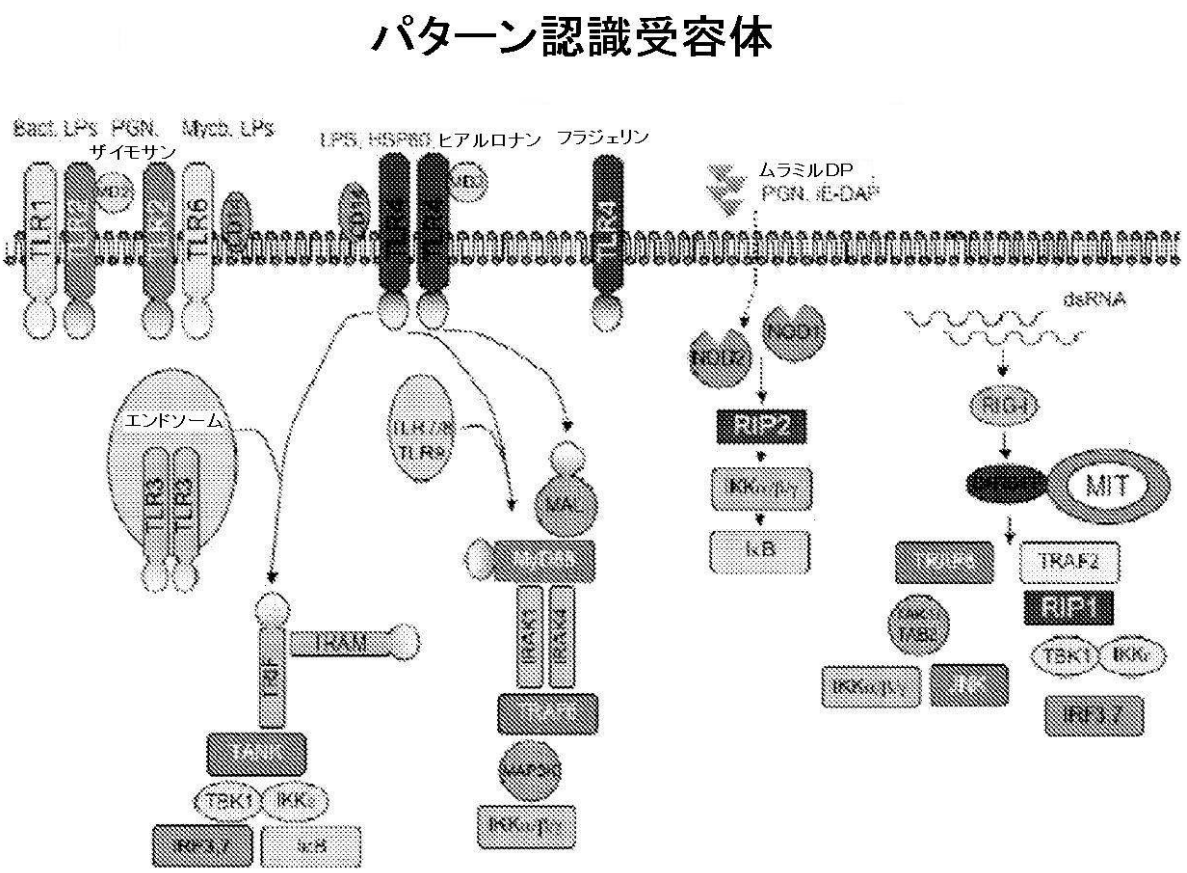

パターン認識受容体
Bact. LPs PGN, Myco. LPs
ザイモサン
LPS, HSP60 ヒアルロナン フラジェリン
ムラミルDP
PGN, iE-DAP
dsRNA
TLR1
TLR6
TLR4
TLR5
エンドソーム
TLR3
TLR9
NOD
RIP2
IκB
RIG-I
MIT
TRAF2
RIP1
TBK1
IKKε
IRF3,7
TRAM
TRIF
TAK1
TAB1/2/3
IKKα
IKKβ
NF-κB
IκB

FIG. 9

【図１０Ａ】

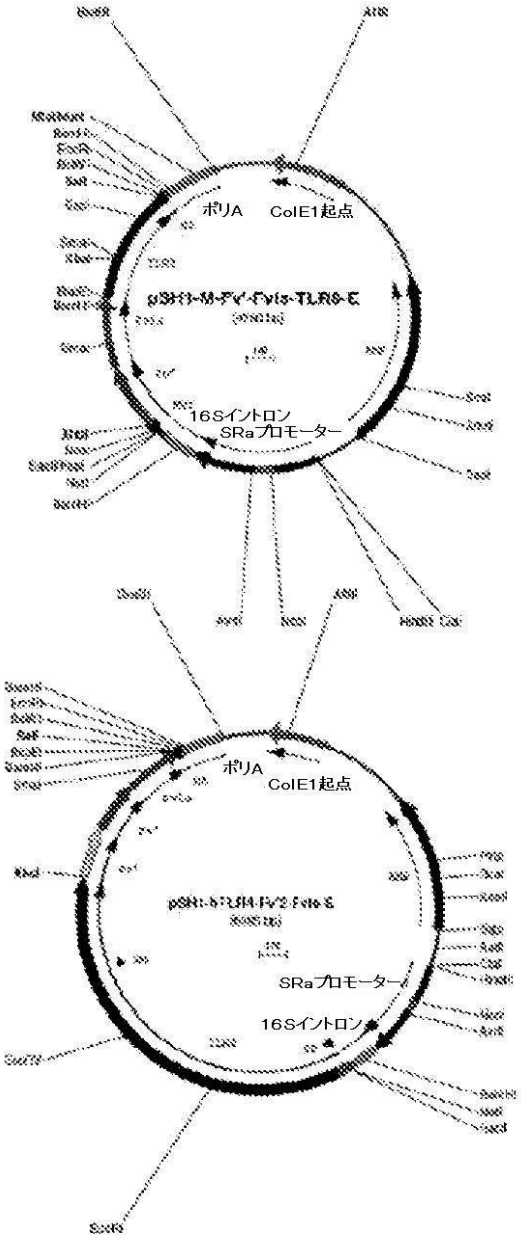

ポリA
ColE1起点
16Sイントロン
SRaプロモーター
ポリA
ColE1起点
SRaプロモーター
16Sイントロン

FIG. 10A

【図１０Ｂ】

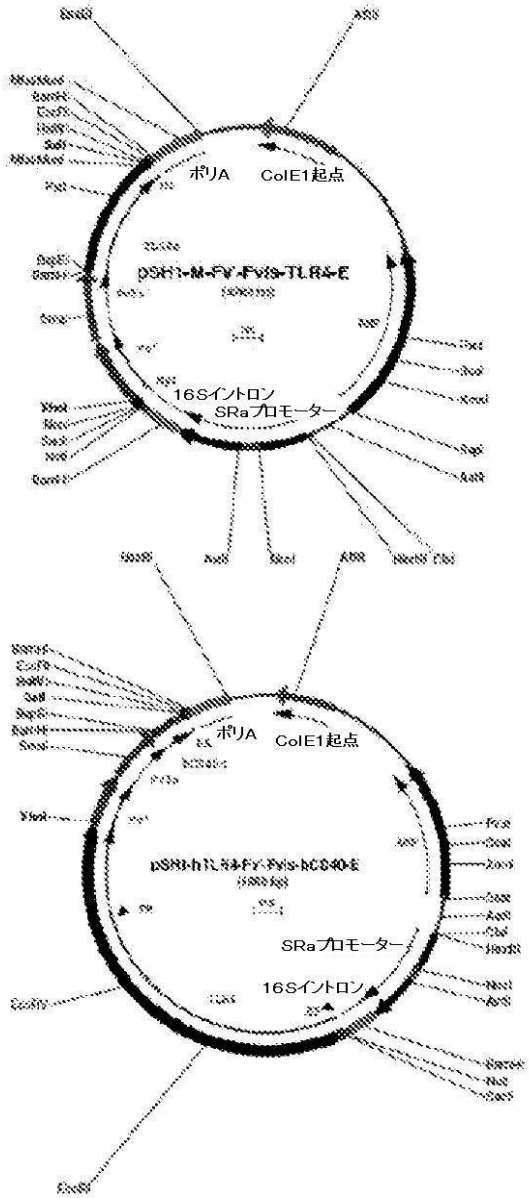

ポリA
ColE1起点
16Sイントロン
SRaプロモーター
ポリA
ColE1起点
SRaプロモーター
16Sイントロン

FIG. 10B

【図１０Ｃ】

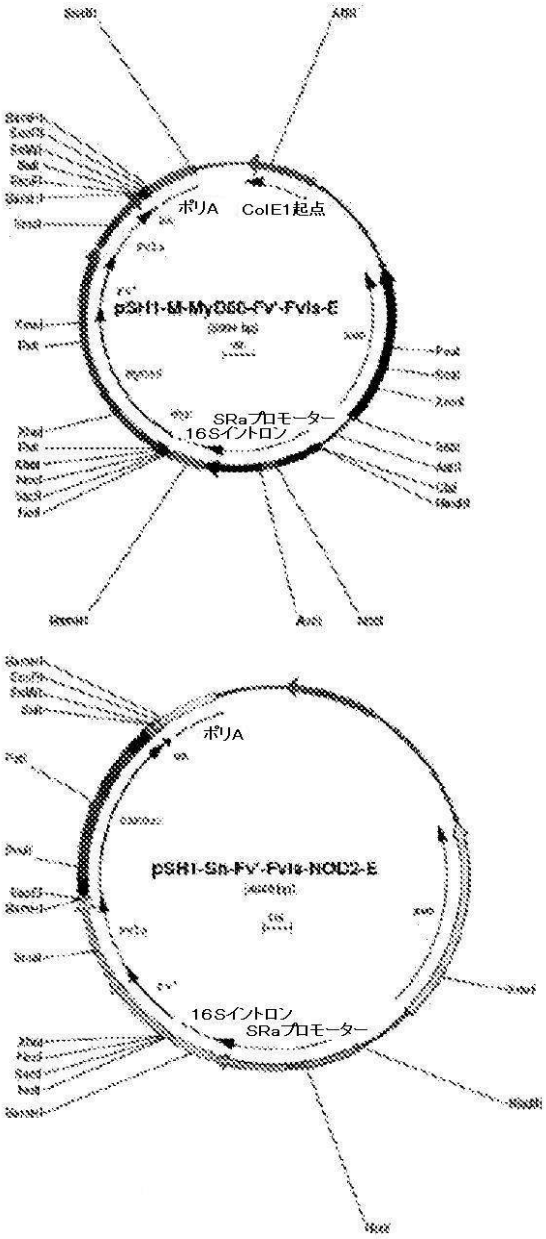

ポリA
ColE1起点
pSH1-M-MyD88-FV-Fvis-E
SRaプロモーター
16Sイントロン
ポリA
pSH1-Sh-FV-Fvis-NOD2-E
16Sイントロン
SRaプロモーター

FIG. 10C

【図１１】

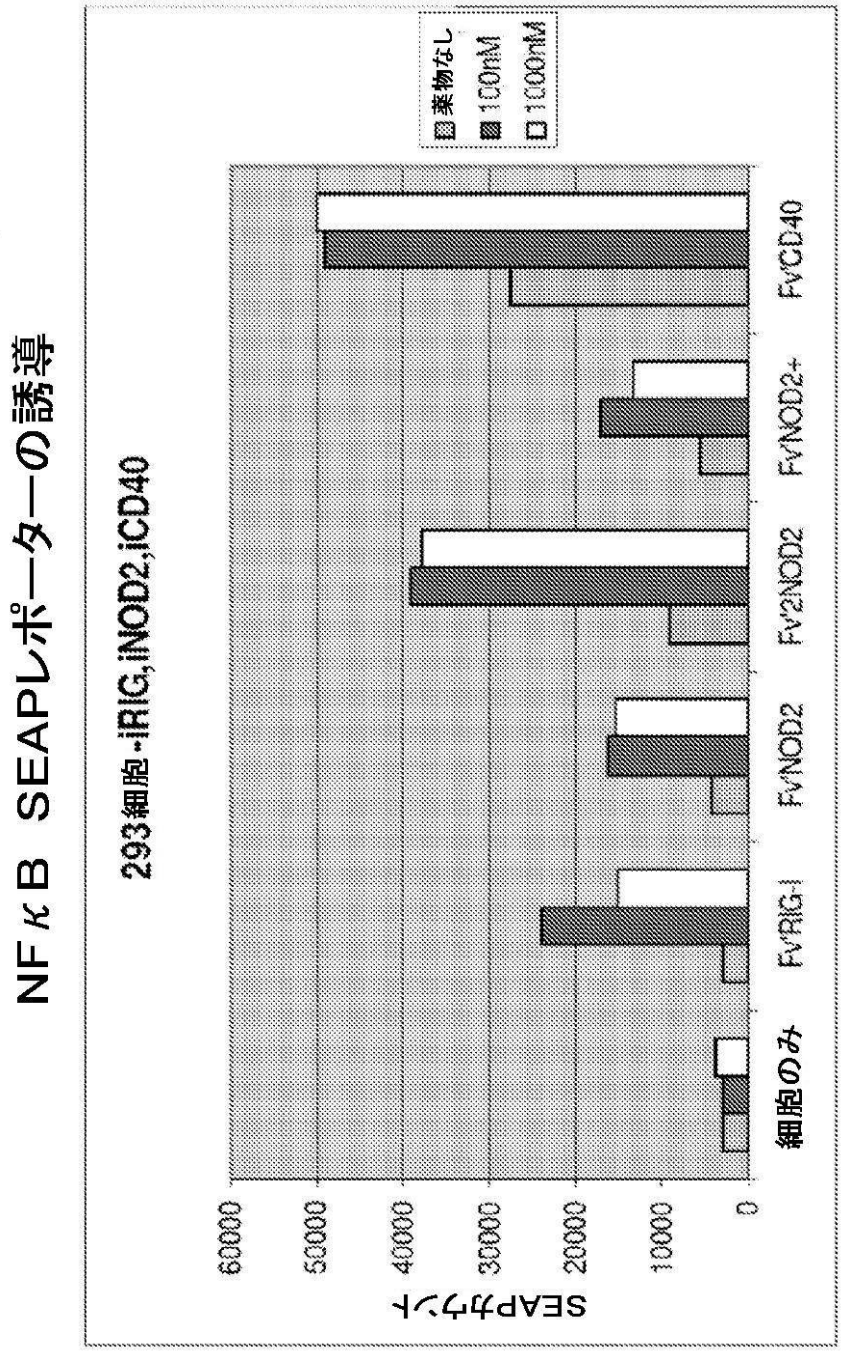

NFκB SEAPレポーターの誘導
293細胞-iRIG,iNOD2,iCD40
薬物なし
100nM
1000nM
SEAPカウント
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
細胞のみ
Fv'RIG-I
Fv'NOD2
Fv'2NOD2
Fv'NOD2+
Fv'CD40

FIG. 11

【図１２】

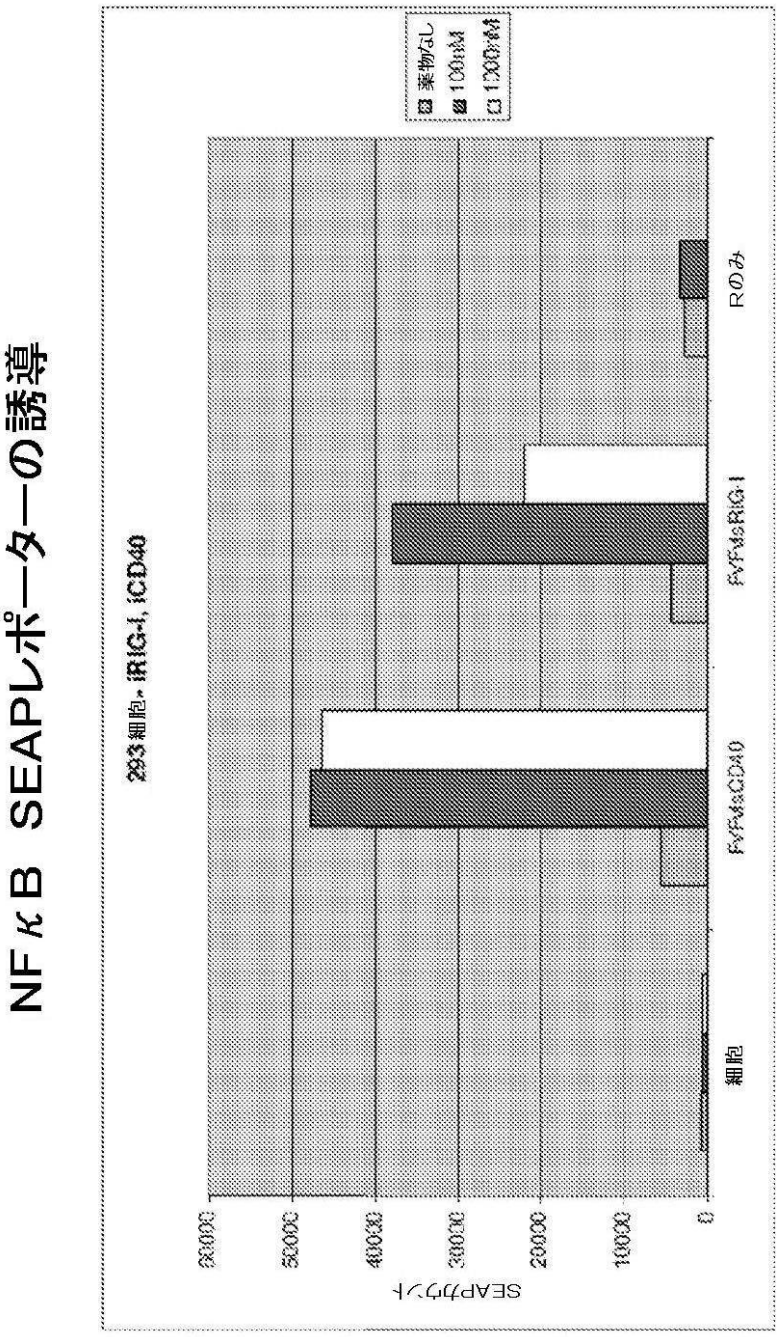

NFκB SEAPレポーターの誘導
293細胞- iRIG-I, iCD40
薬物なし
100nM
1000nM
SEAPアクティビティ
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
細胞
FvFv-iCD40
FvFv-iRIG-I
RIGのみ

FIG. 12

【図１３】

NFκB SEAPレポーターの誘導

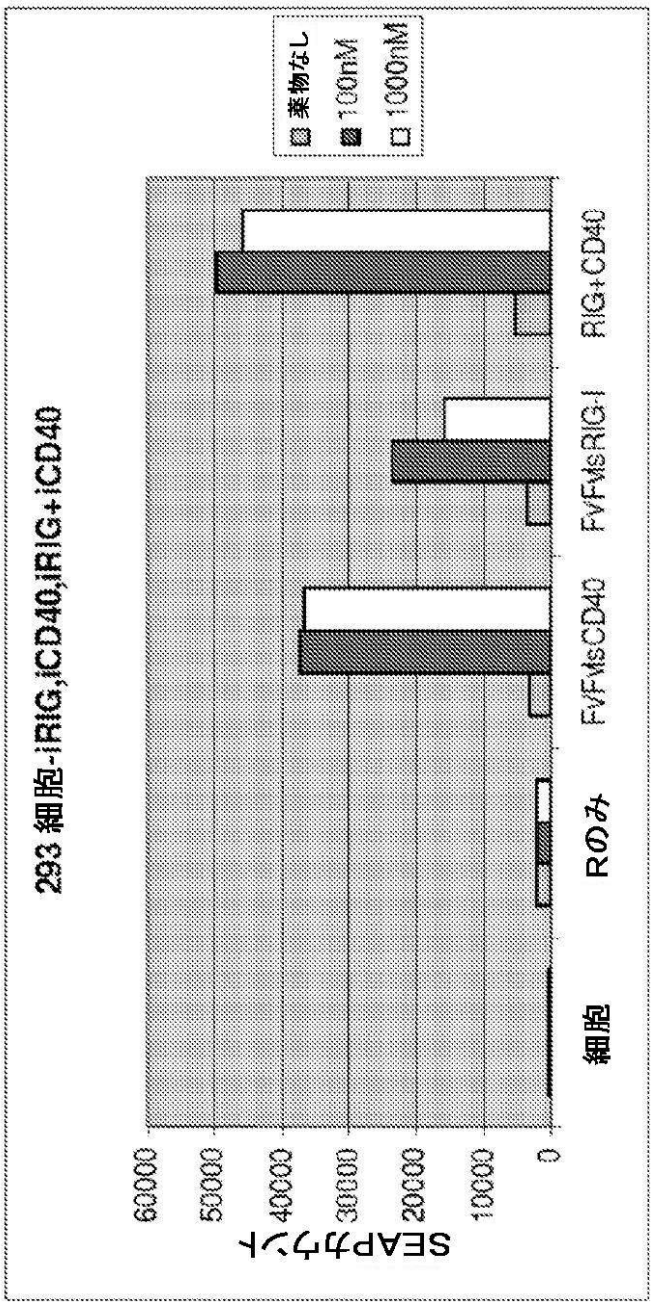


FIG. 13

【図１４】

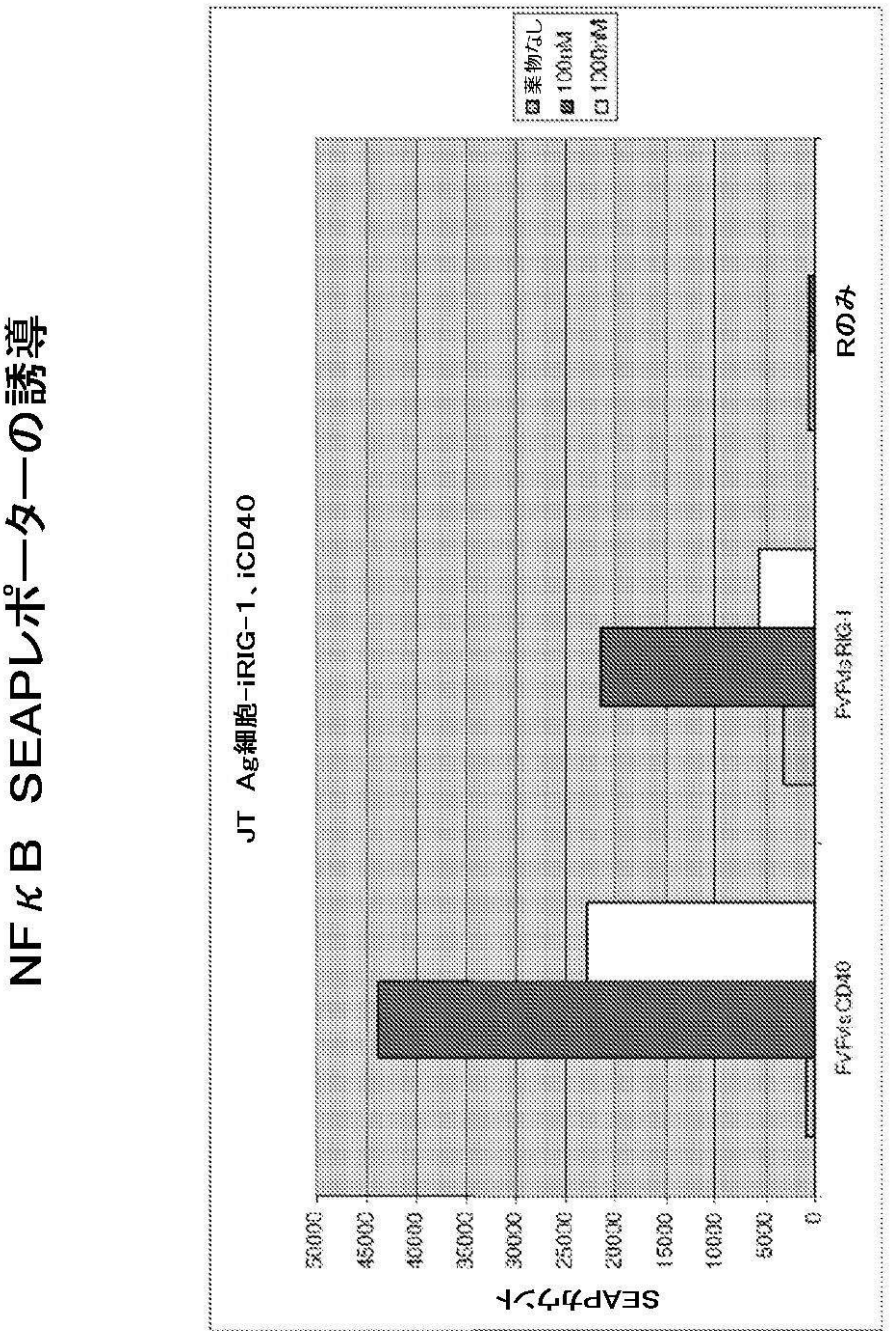

NFκB SEAPレポーターの誘導
JT Ag細胞-iRIG-1、iCD40
SEAPカウント
50000
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
薬物なし
100nM
1000nM
FvFAsCD40
FvFAsRIG-I
Rのみ

FIG. 14

【図１５】

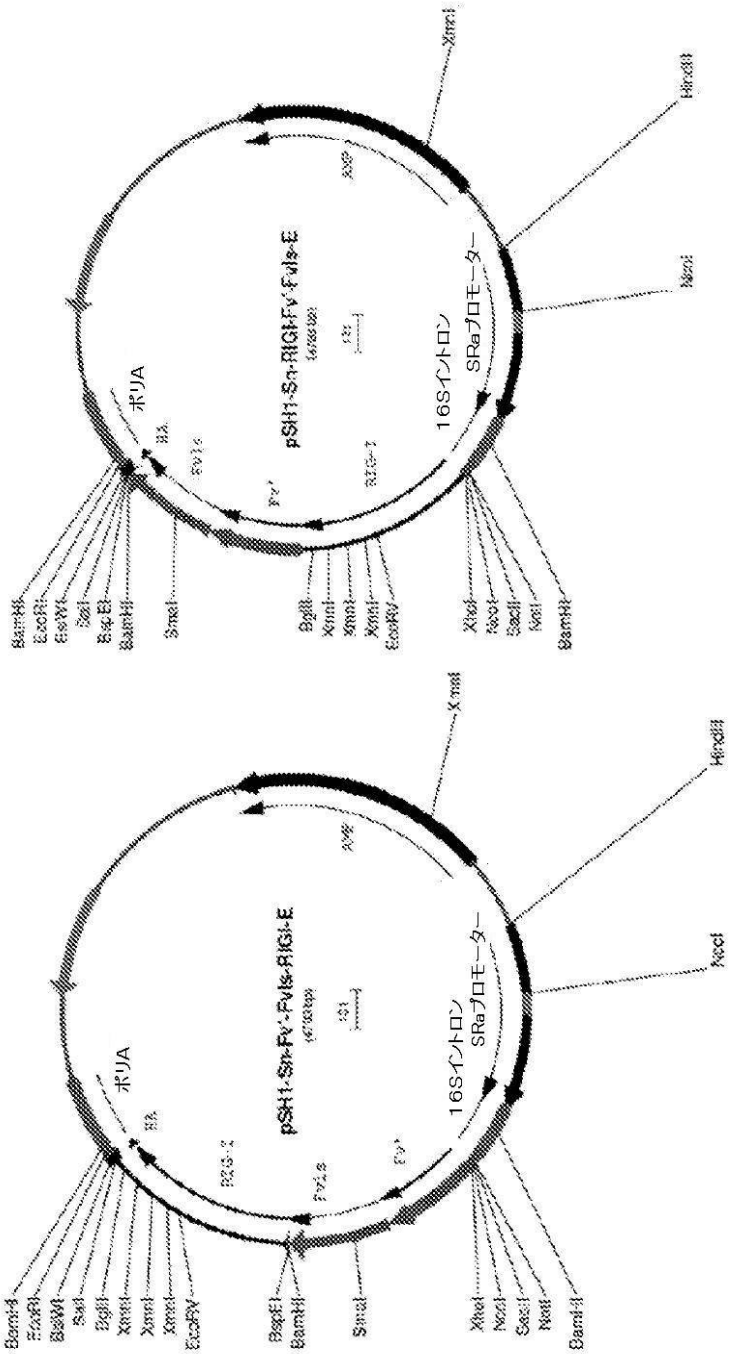

A
pSH1-Sn-RIGI-Fv'-Fvls-E
16Sイントロン
SRaプロモーター
ポリA
XmnI
HindIII
NcoI
B
pSH1-Sn-Fv'-Fvls-RIGI-E
16Sイントロン
SRaプロモーター
ポリA
XmnI
HindIII
NcoI

FIG. 15

【図１６】

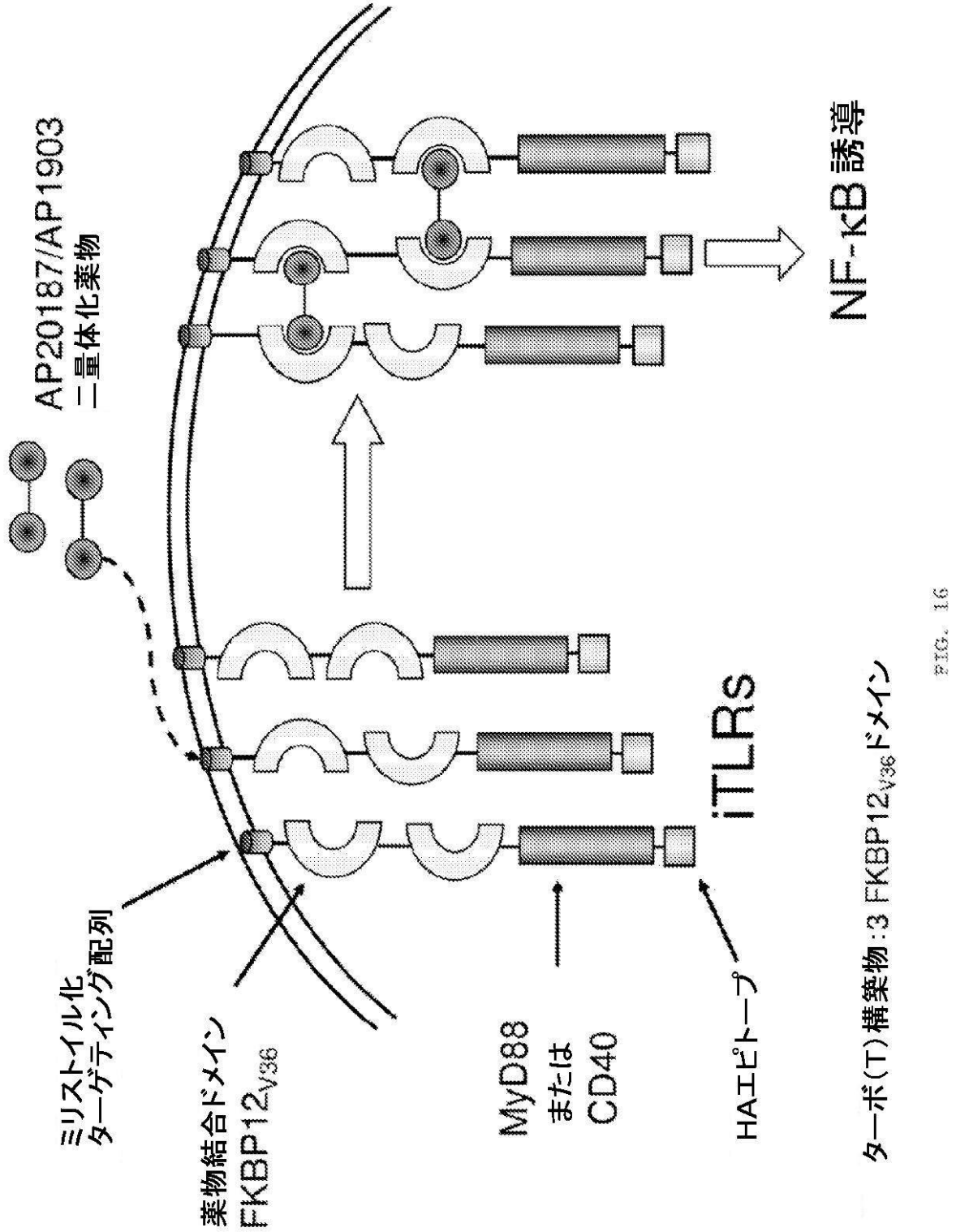

AP20187/AP1903
二量体化薬物
ミリストイル化
ターゲティング配列
薬物結合ドメイン
FKBP12V36
MyD88
または
CD40
HAエピトープ
iTLRs
NF-κB 誘導
ターボ(T)構築物:3 FKBP12V36ドメイン

FIG. 16

【図１７】

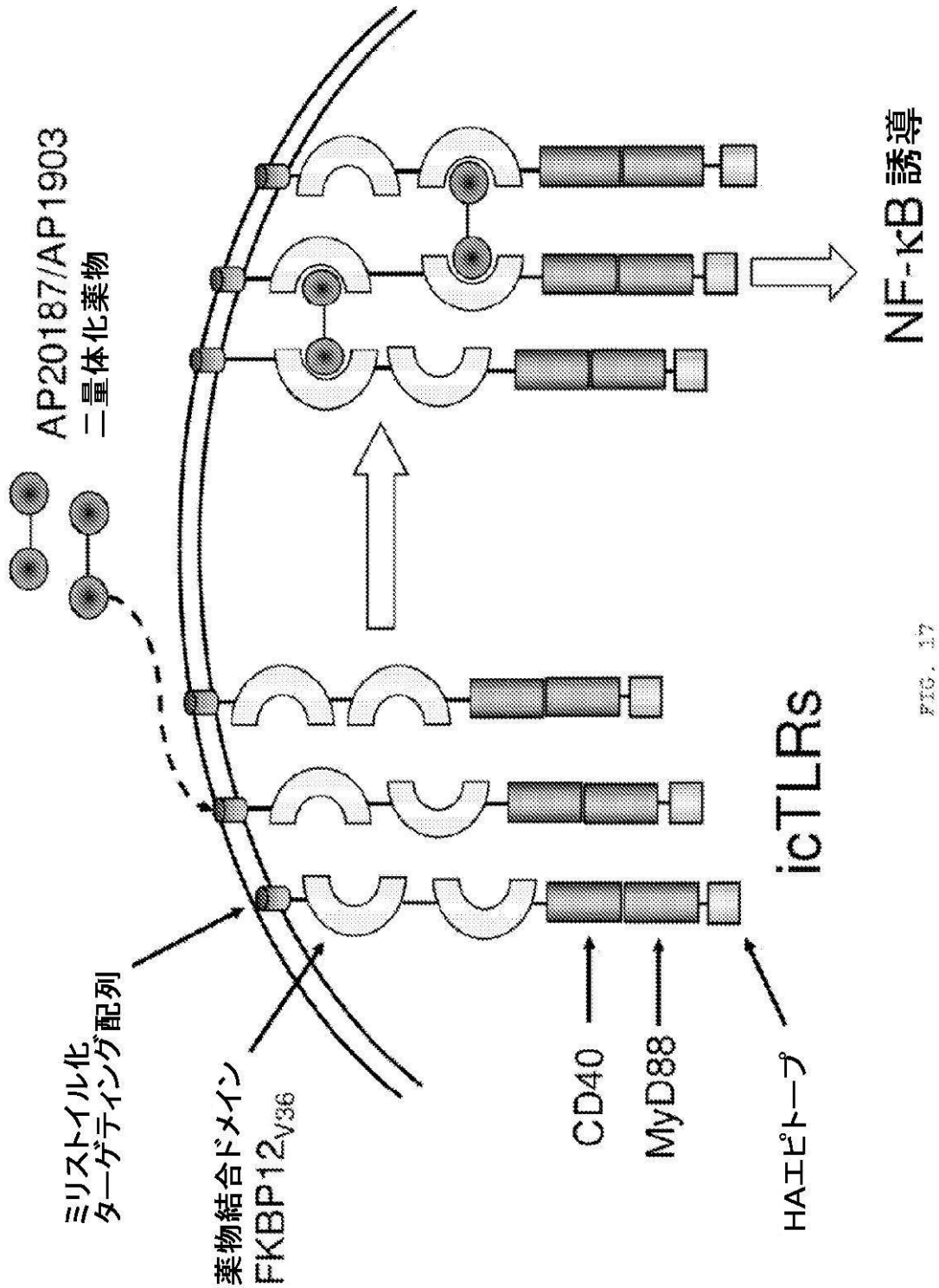
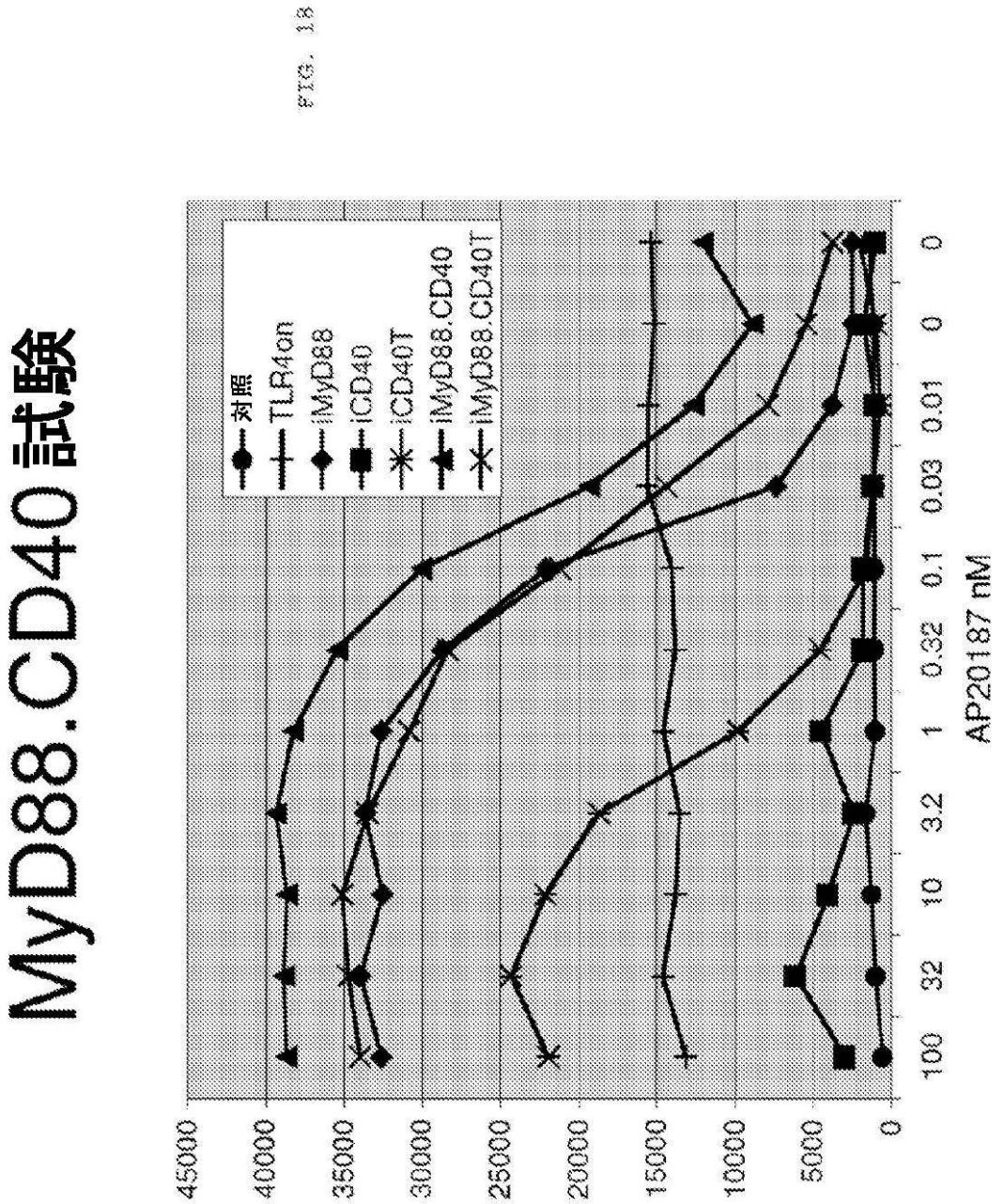
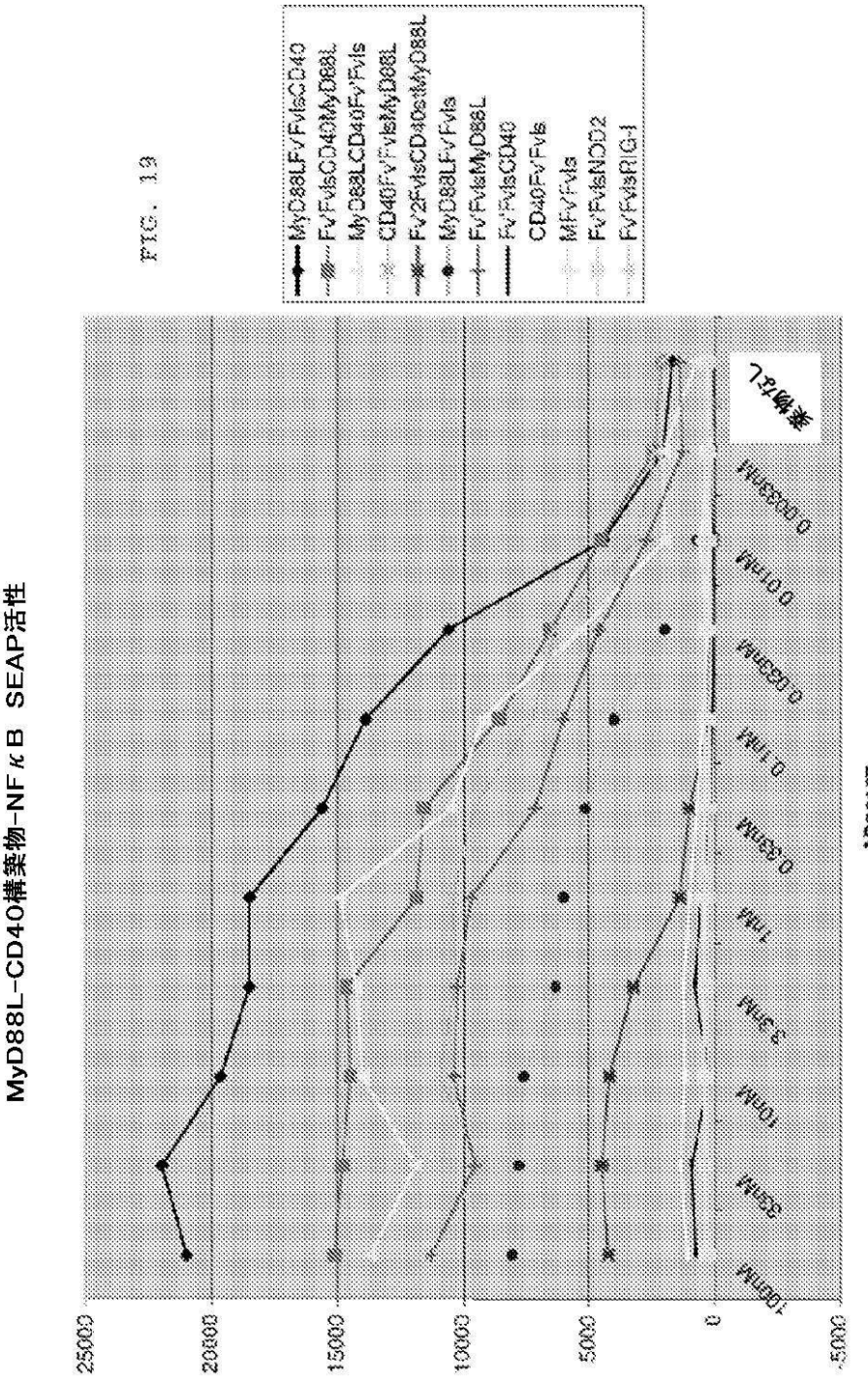

AP20187/AP1903
二量体化薬物
NF-κB 誘導
ミリストイル化
ターゲティング配列
薬物結合ドメイン
FKBP12v36
CD40
MyD88
HAエピトープ
icTLRs

FIG. 17

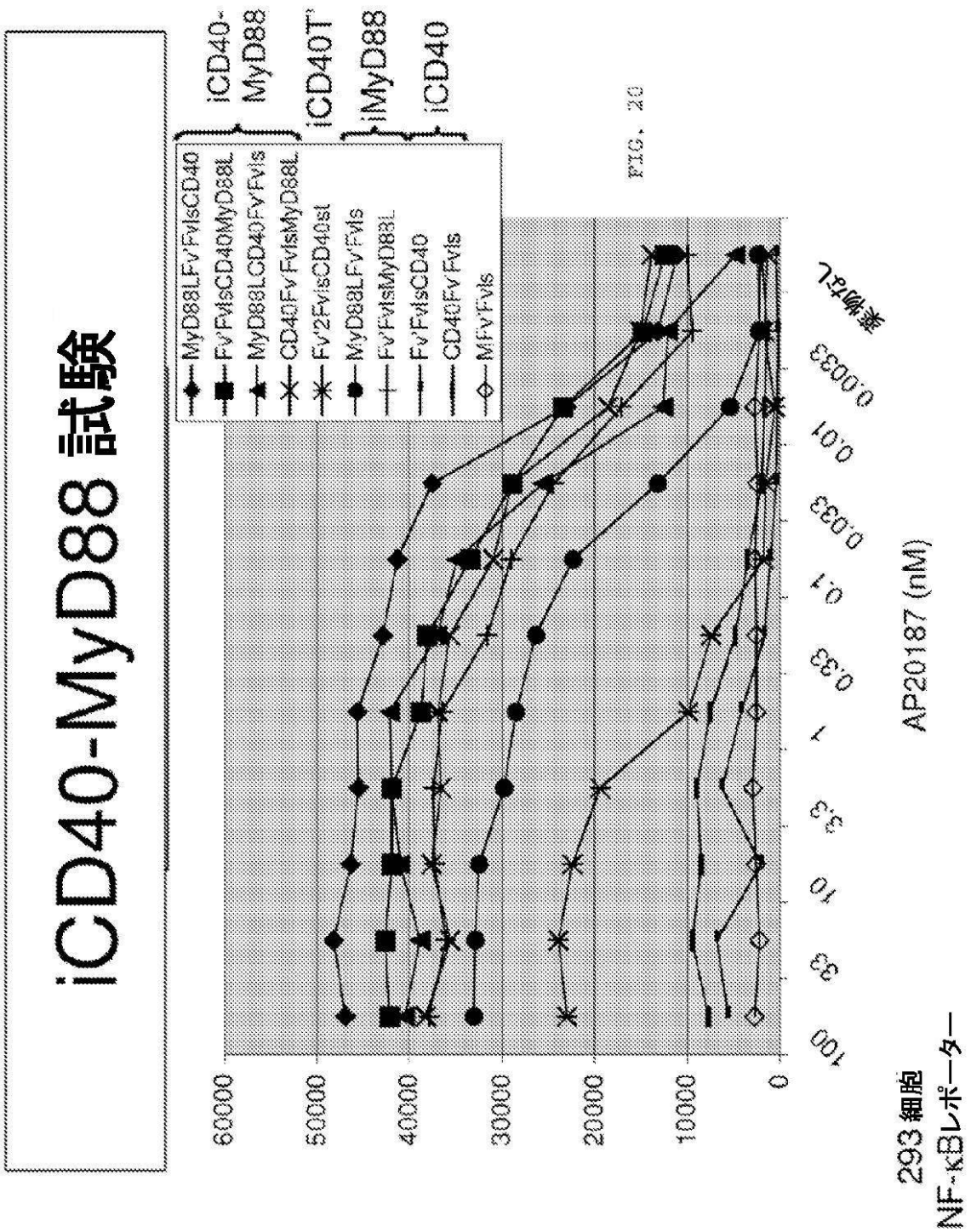
【図１８】


MyD88.CD40 試験
FIG. 18
対照
TLR4cn
iMyD88
iCD40
iCD40T
iMyD88.CD40
iMyD88.CD40T
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
100
32
10
3.2
1
0.32
0.1
0.03
0.01
0
0
AP20187 nM

【図１９】


FIG. 19
MyD88L-CD40構築物-NFκB SEAP活性
MyD88LFvFvlsCD40
FvFvlsCD40MyD88L
MyD88LCD40FvFvls
CD40FvFvlsMyD88L
Fv2FvlsCD40stMyD88L
MyD88LFvFvls
FvFvlsMyD88L
FvFvlsCD40
CD40FvFvls
MFvFvls
FvFvlsNOD2
FvFvlsRIG-I
25000
20000
15000
10000
5000
0
-5000
未刺激
1000nM
333nM
100nM
33nM
10nM
3.3nM
1nM
0.33nM
0.1nM
0.033nM
0.01nM
0.0033nM
AP20187
基質と共に3時間(アッセイの飽和なし)

【図２０】


iCD40-MyD88 試験
iCD40-MyD88
iCD40T
iMyD88
iCD40
MyD88LFvFvIsCD40
FvFvIsCD40MyD88L
MyD88LCD40FvFvIs
CD40FvFvIsMyD88L
Fv2FvIsCD40sl
MyD88LFvFvIs
FvFvIsMyD88L
FvFvIsCD40
CD40FvFvIs
MFvFvIs
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
100
33
10
3.3
1
0.33
0.1
0.033
0.01
0.0033
薬物なし
AP20187 (nM)
293細胞
NF-κBレポーター
FIG. 20

【図２１】

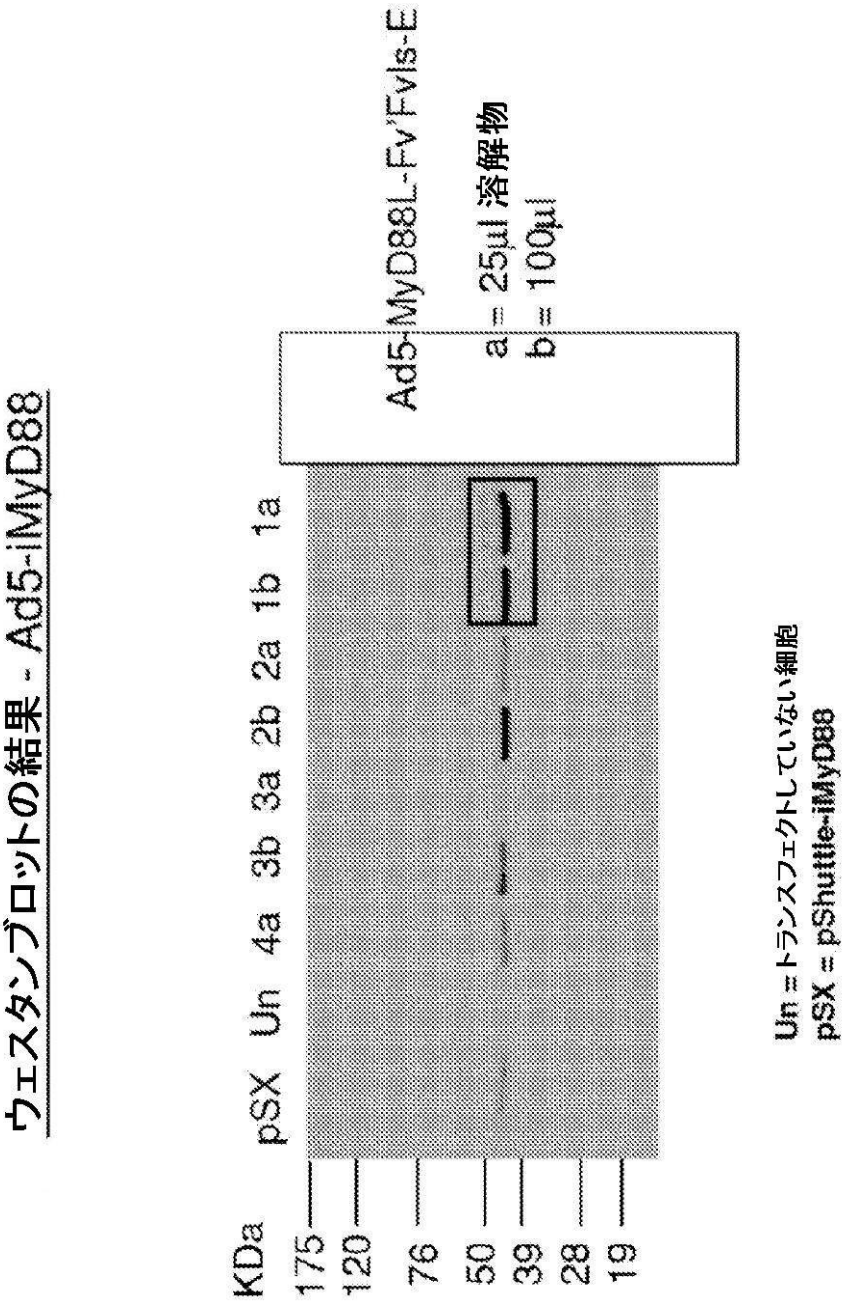

ウェスタンブロットの結果 - Ad5-iMyD88
KDa
175
120
76
50
39
28
19
pSX
Un
4a
3b
3a
2b
2a
1b
1a
Ad5-MyD88L-Fv'FvIs-E
a = 25µl 溶解物
b = 100µl
Un = トランスフェクトしていない細胞
pSX = pShuttle-iMyD88

FIG. 21

【図２２】

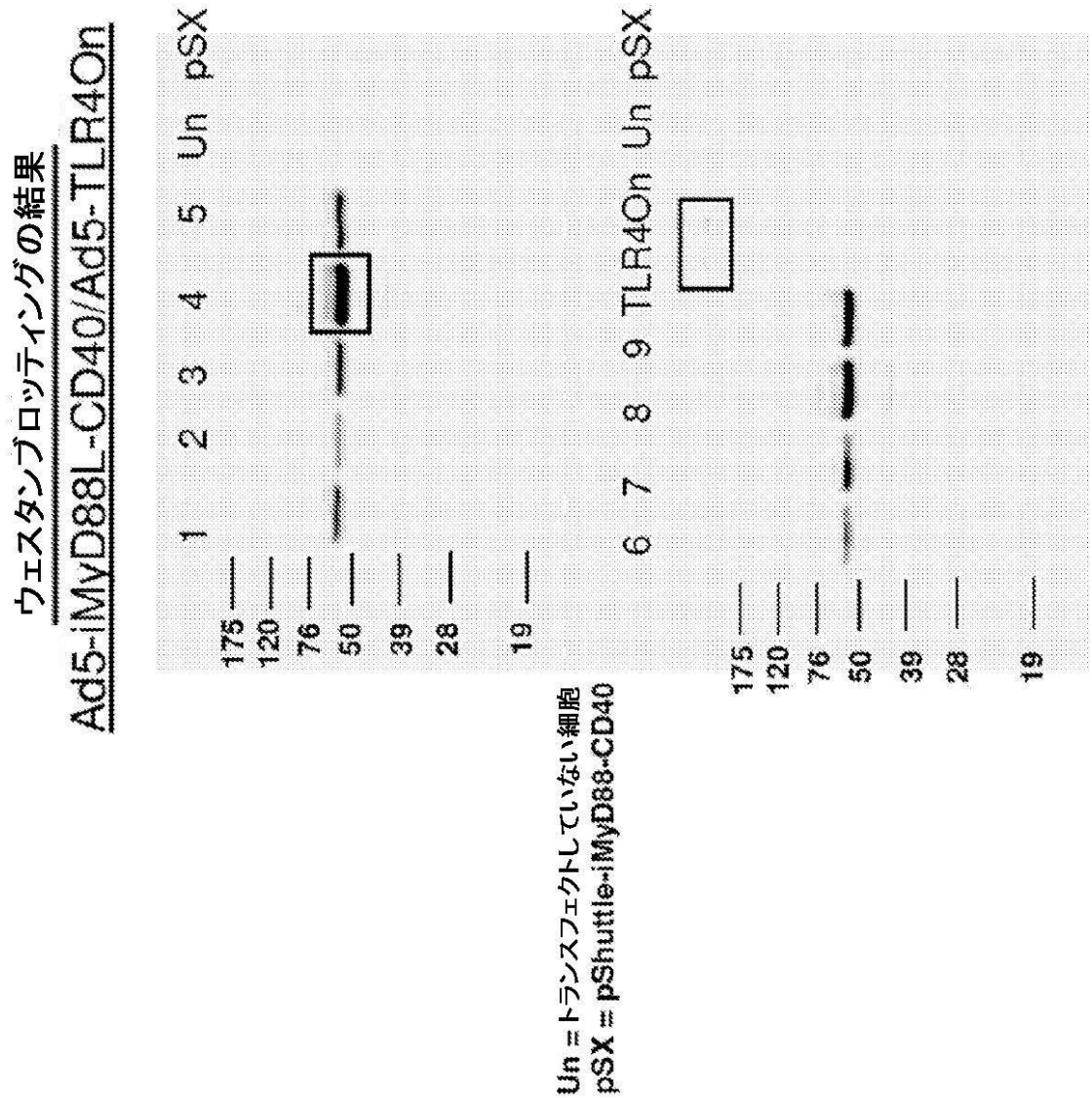

ウェスタンブロッティングの結果
Ad5-iMyD88L-CD40/Ad5-TLR4On
1 2 3 4 5 Un pSX
6 7 8 9 TLR4On Un pSX
175
120
76
50
39
28
19
Un＝トランスフェクトしていない細胞
pSX＝pShuttle-iMyD88-CD40

FIG. 22

【図２３】

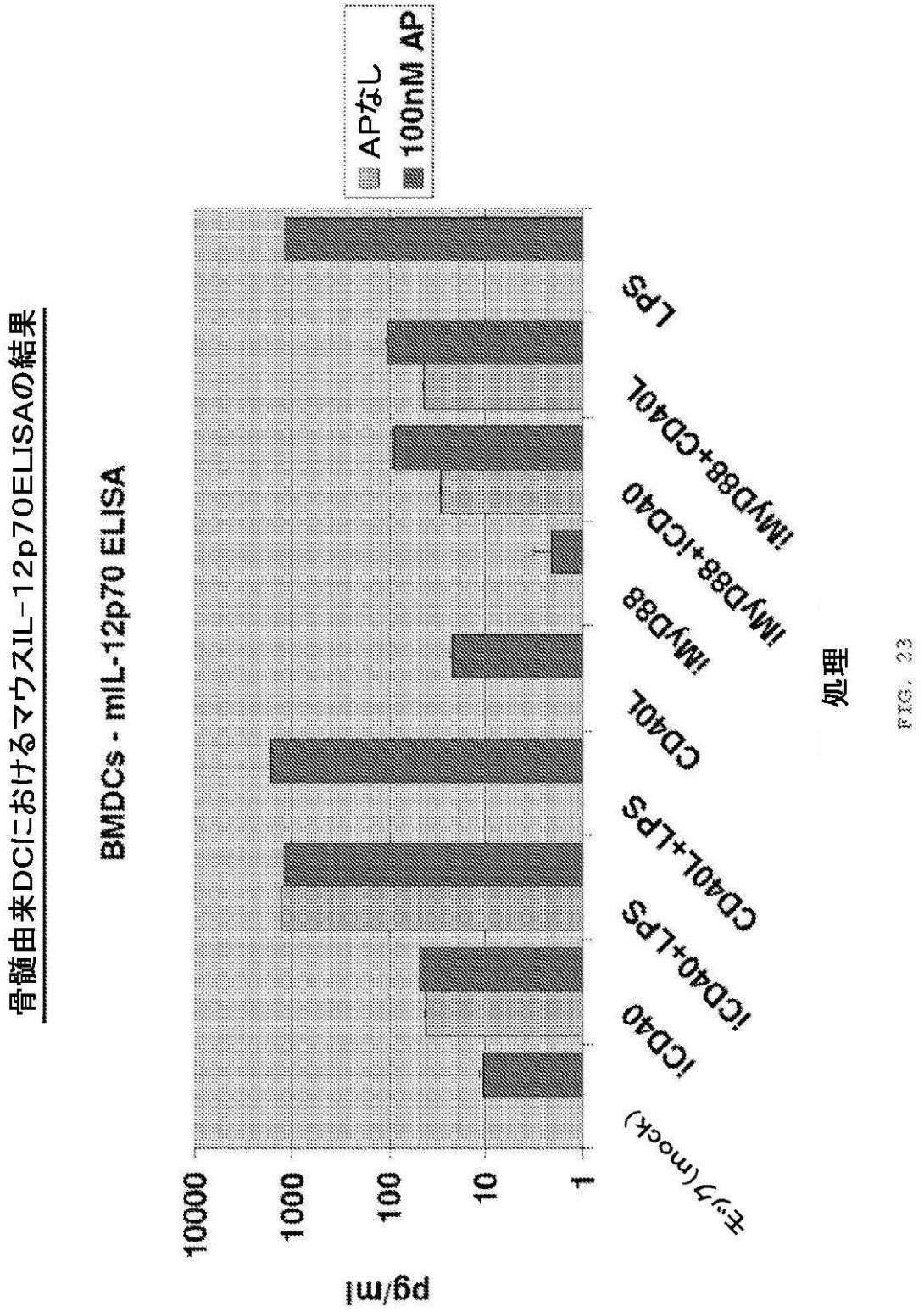

骨髄由来DCにおけるマウスIL-12p70ELISAの結果
BMDCs - mIL-12p70 ELISA
APなし
100nM AP
pg/ml
10000
1000
100
10
1
モック(mock)
iCD40
iCD40+LPS
CD40L+LPS
CD40L
iMyD88
iMyD88+iCD40
iMyD88+CD40L
LPS
処理

FIG. 23

【図２４】

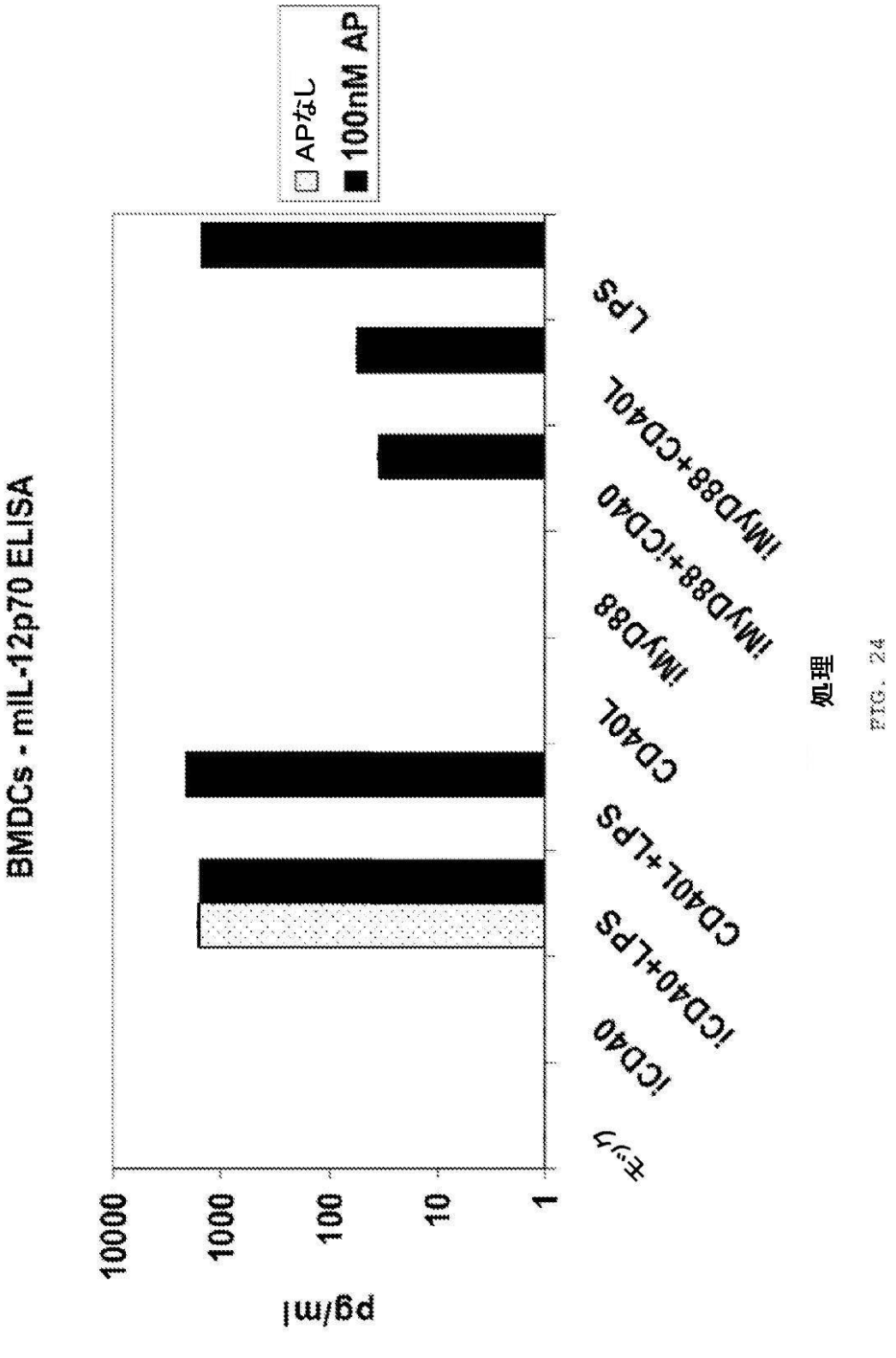

BMDCs - mIL-12p70 ELISA
pg/ml
10000
1000
100
10
1
APなし
100nM AP
モック
iCD40
iCD40+LPS
CD40L+LPS
CD40L
iMyD88
iMyD88+iCD40
iMyD88+CD40L
LPS
処理

FIG. 24

【図２５】

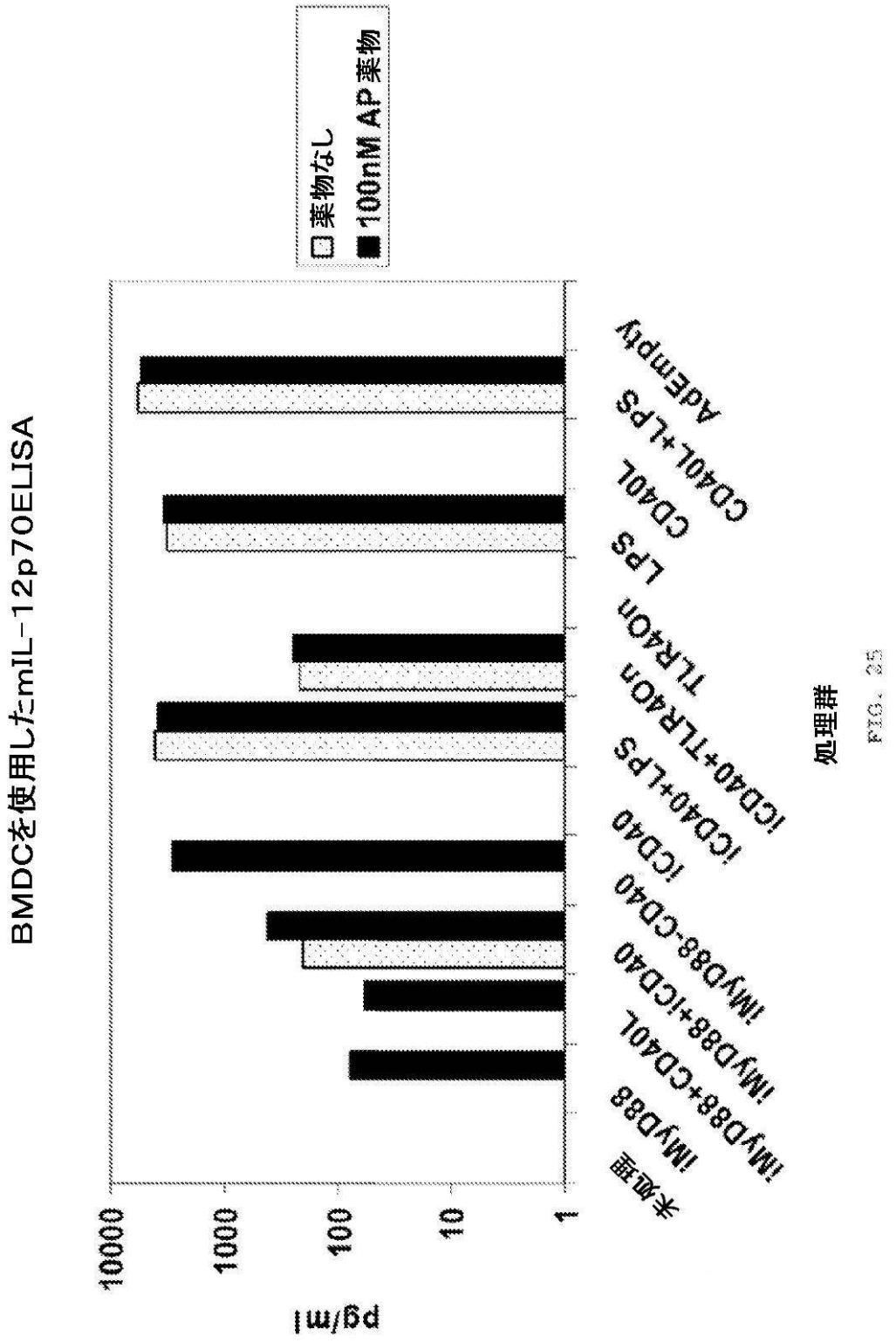

BMDCを使用したmIL-12p70ELISA
□薬物なし
■100nM AP薬物
pg/ml
10000
1000
100
10
1
未処理
iMyD88
iMyD88+CD40L
iMyD88+iCD40
iMyD88-CD40
iCD40
iCD40+LPS
iCD40+TLR4On
TLR4On
LPS
CD40L
CD40L+LPS
ADEmpty
処理群

FIG. 25

【図２６】

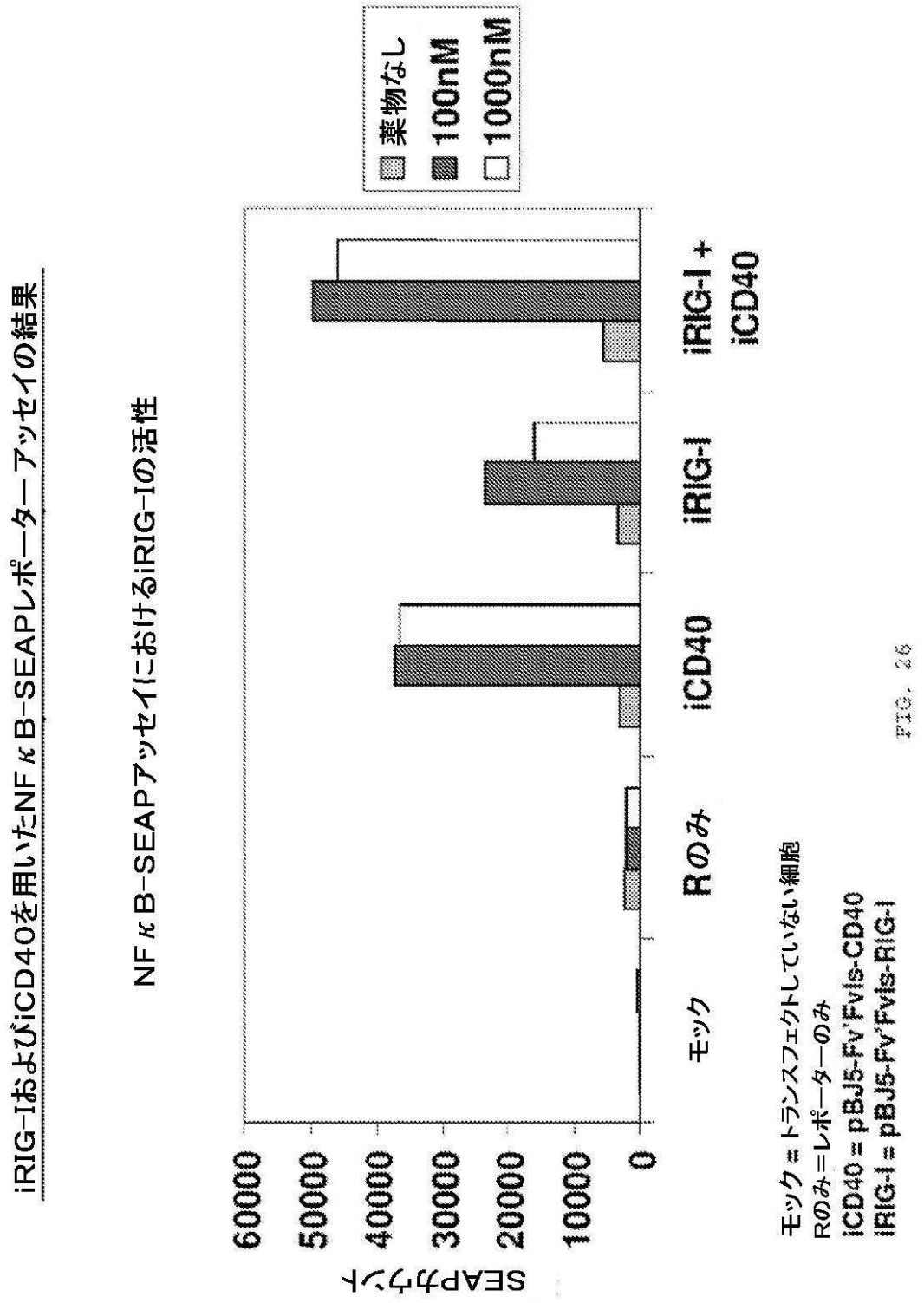
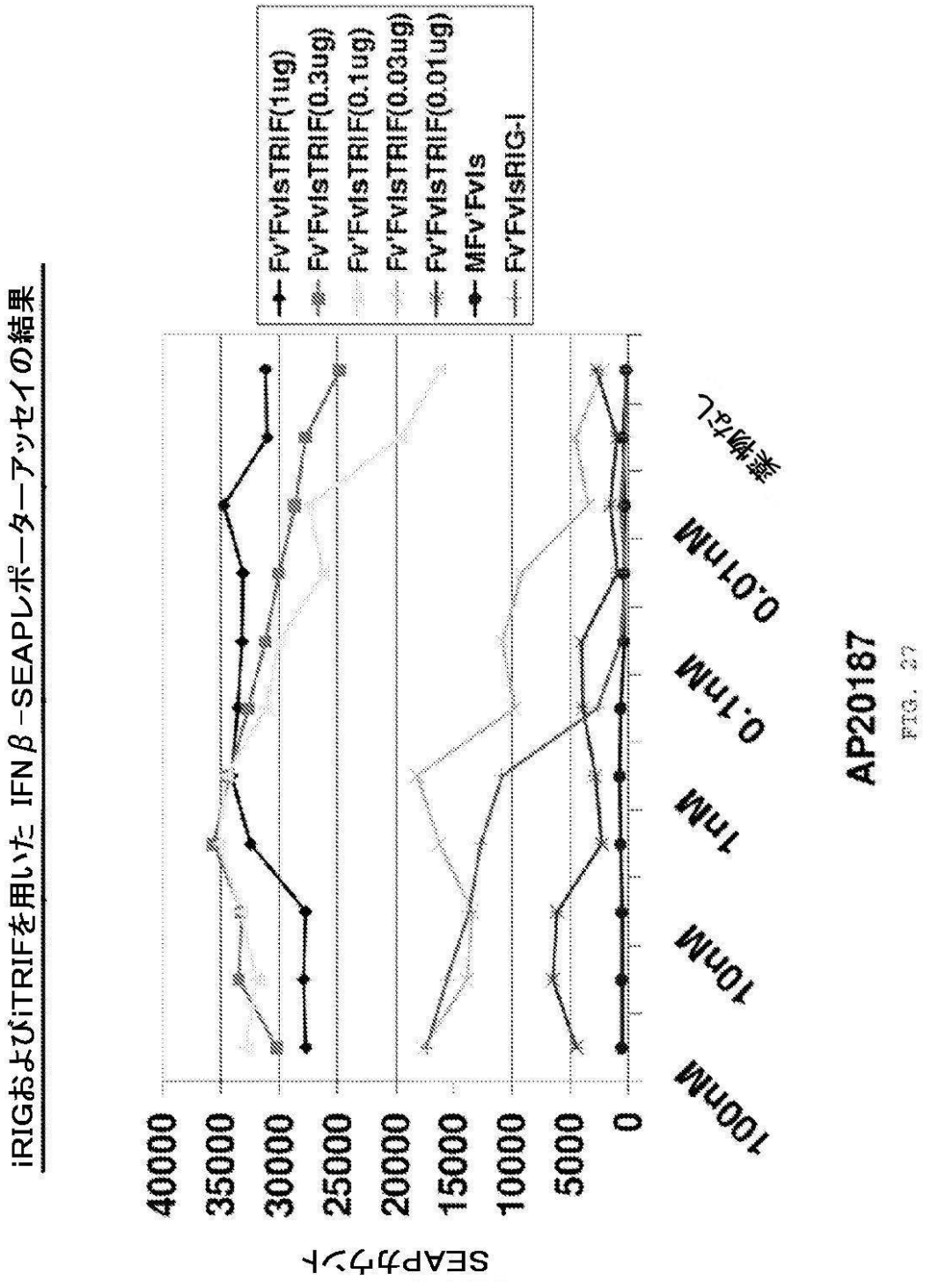

iRIG-IおよびiCD40を用いたNFκB-SEAPレポーター アッセイの結果
NFκB-SEAPアッセイにおけるiRIG-Iの活性
SEAPカウント
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
薬物なし
100nM
1000nM
モック
Rのみ
iCD40
iRIG-I
iRIG-I + iCD40
モック = トランスフェクトしていない細胞
Rのみ = レポーターのみ
iCD40 = pBJ5-Fv'Fvis-CD40
iRIG-I = pBJ5-Fv'Fvis-RIG-I

FIG. 26

【図２７】


iRIGおよびiTRIFを用いた IFNβ-SEAPレポーターアッセイの結果
Fv'FvIsTRIF(1ug)
Fv'FvIsTRIF(0.3ug)
Fv'FvIsTRIF(0.1ug)
Fv'FvIsTRIF(0.03ug)
Fv'FvIsTRIF(0.01ug)
MFv'FvIs
Fv'FvIsRIG-I
SEAPカウント
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
100nM
10nM
1nM
0.1nM
0.01nM
薬物なし
AP20187
FIG. 27

【図２８】

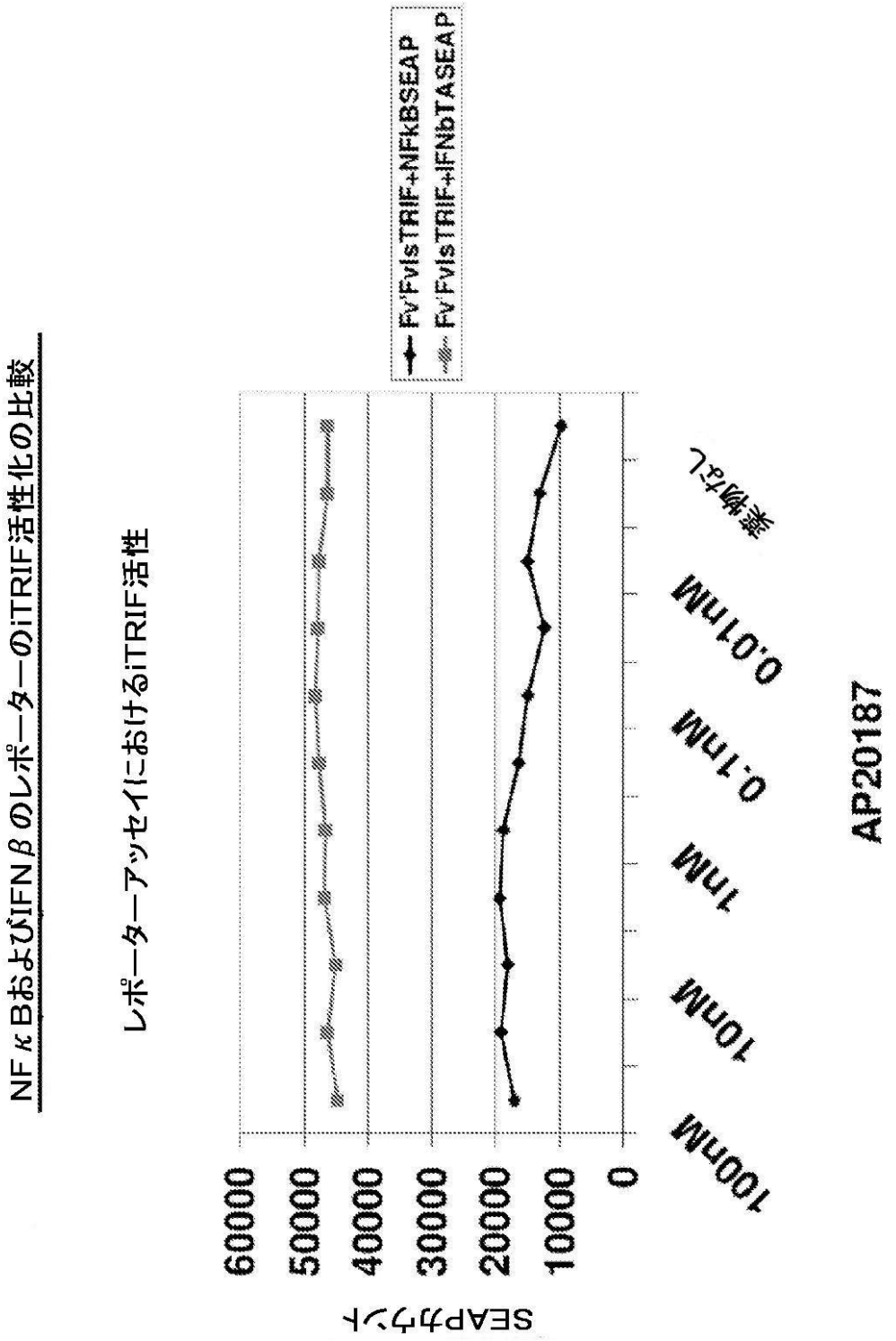

NFκBおよびIFNβのレポーターのiTRIF活性化の比較
レポーターアッセイにおけるiTRIF活性
Fv'FvIsTRIF+NFkBSEAP
Fv'FvIsTRIF+IFNbTASEAP
SEAPカウント
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
100nM
10nM
1nM
0.1nM
0.01nM
薬物なし
AP20187

FIG. 28

【図２９】

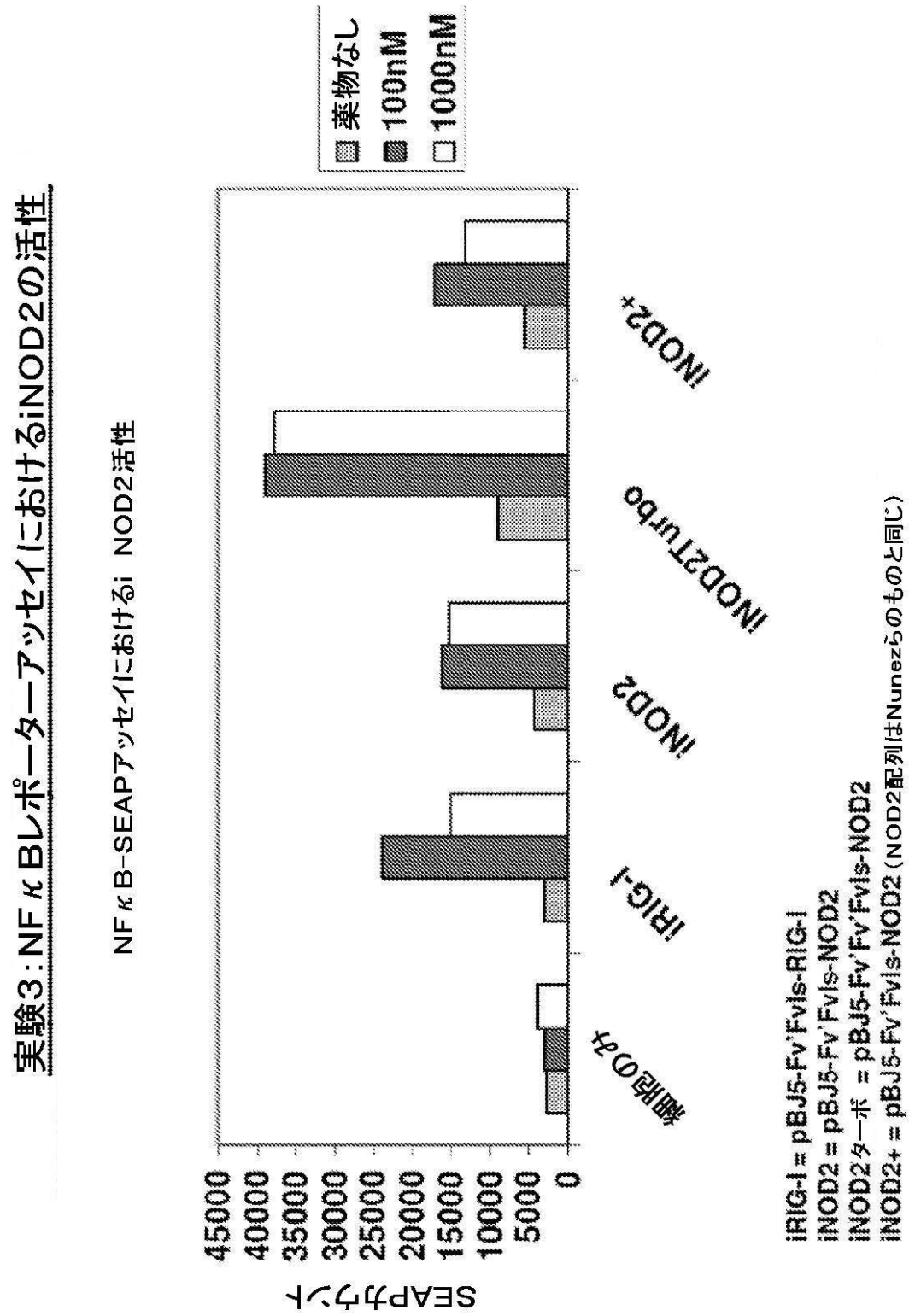

実験3:NFκBレポーターアッセイにおけるiNOD2の活性
NFκB-SEAPアッセイにおけるi NOD2活性
薬物なし
100nM
1000nM
SEAPカウント
45000
40000
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
細胞のみ
iRIG-I
iNOD2
iNOD2Turbo
iNOD2+
iRIG-I = pBJ5-Fv'Fvls-RIG-I
iNOD2 = pBJ5-Fv'Fvls-NOD2
iNOD2ターボ = pBJ5-Fv'Fv'Fvls-NOD2
iNOD2+ = pBJ5-Fv'Fvls-NOD2 (NOD2配列はNunezらのものと同じ)

FIG. 29

【図３３】

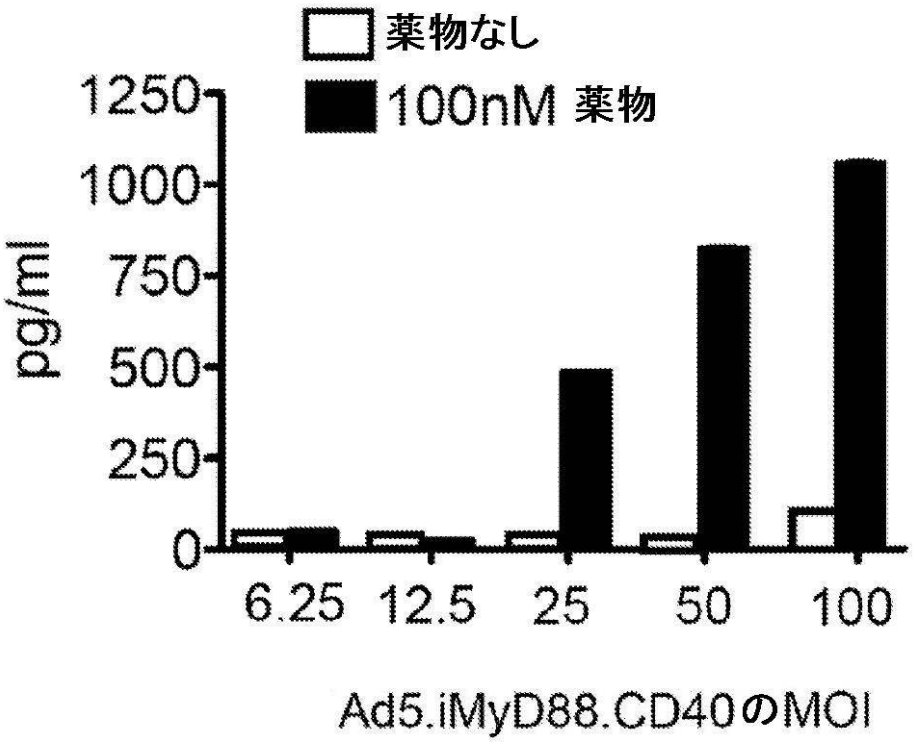


FIGURE 33

【図３４】

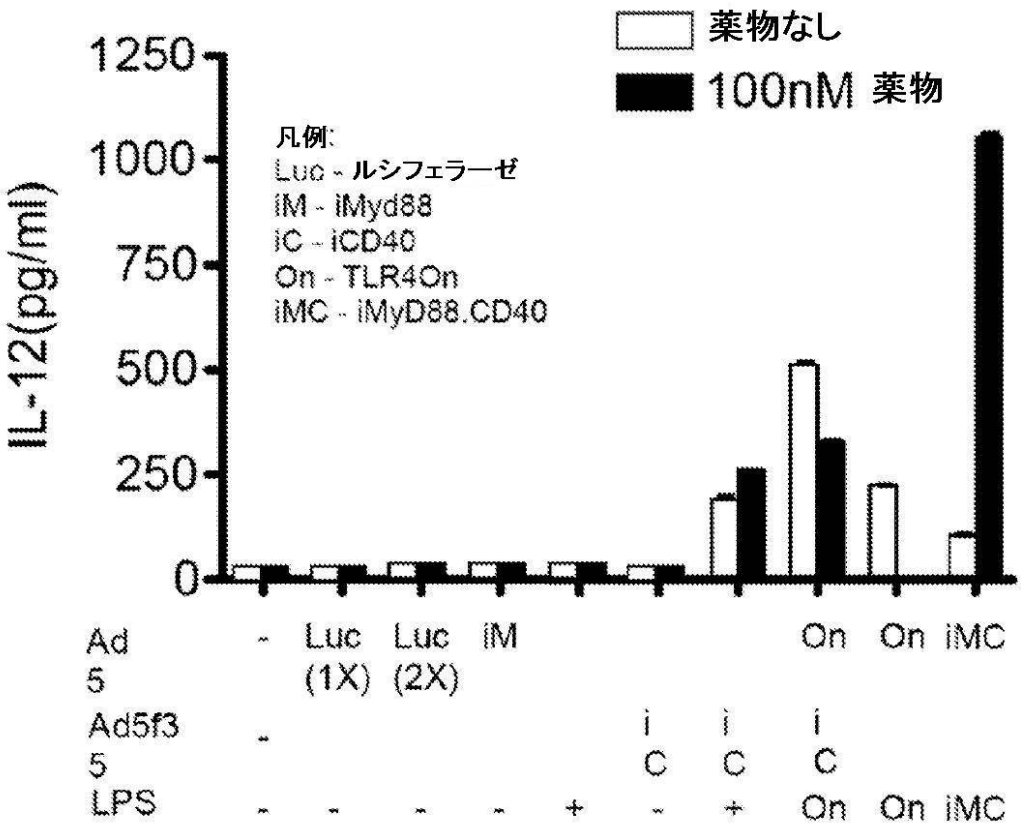


FIGURE 34

【図３６Ａ】

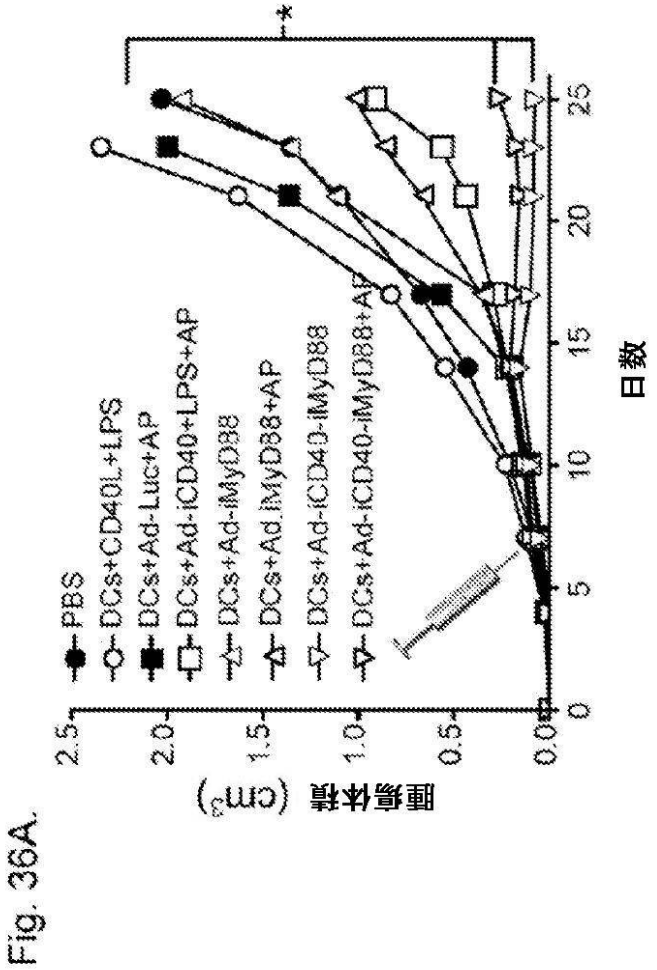

腫瘍体積 (cm³)
日数
PBS
DCs+CD40L+LPS
DCs+Ad-Luc+AP
DCs+Ad-iCD40+LPS+AP
DCs+Ad-iMyD88
DCs+Ad.iMyD88+AP
DCs+Ad-iCD40-iMyD88
DCs+Ad-iCD40-iMyD88+AP
*

Fig. 36A.

【図３６Ｃ】

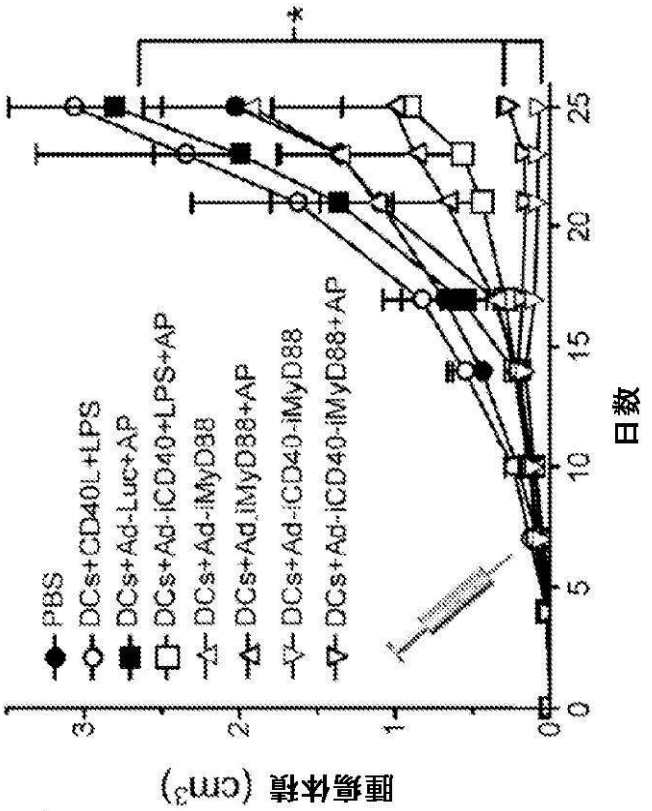

腫瘍体積 (cm³)
日数
PBS
DCs+CD40L+LPS
DCs+Ad-Luc+AP
DCs+Ad-iCD40+LPS+AP
DCs+Ad-iMyD88
DCs+Ad-iMyD88+AP
DCs+Ad-iCD40-iMyD88
DCs+Ad-iCD40-iMyD88+AP
*

Fig. 36C.

【図３７】

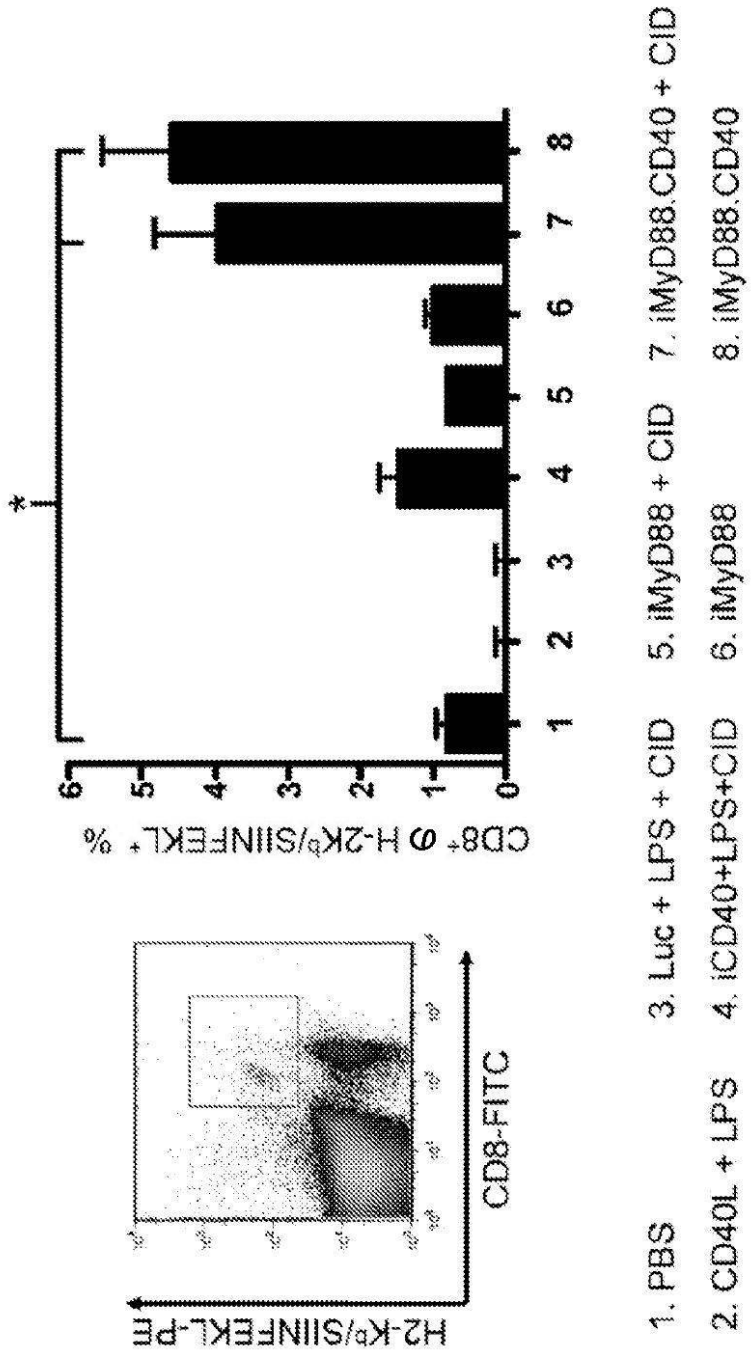
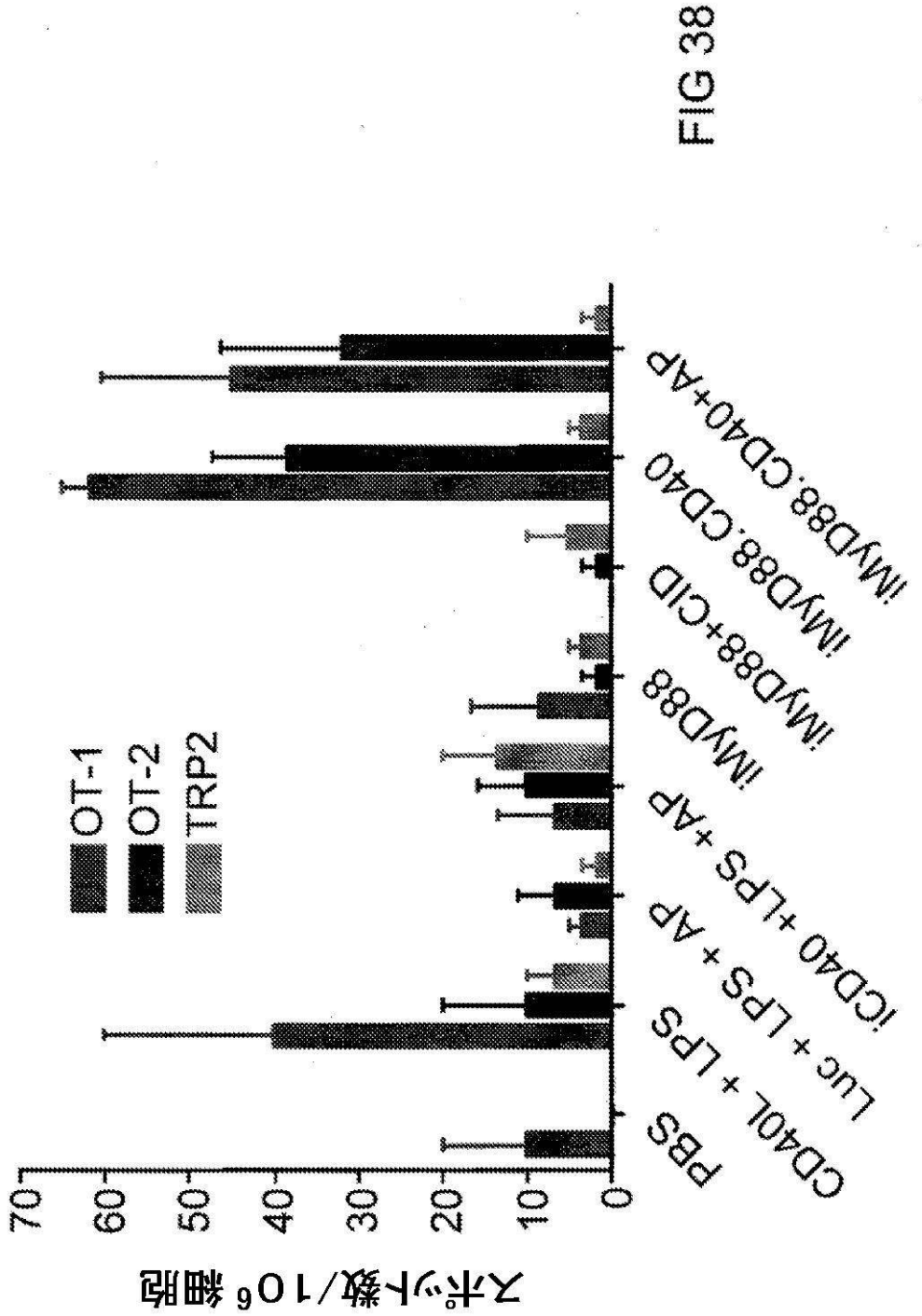


Figure 37

【図３８】


FIG 38
スポット数/10^6 細胞
70
60
50
40
30
20
10
0
OT-1
OT-2
TRP2
PBS
CD40L + LPS
Luc + LPS + AP
iCD40 +LPS +AP
iMyD88
iMyD88+CID
iMyD88.CD40
iMyD88.CD40+AP

【図３９】

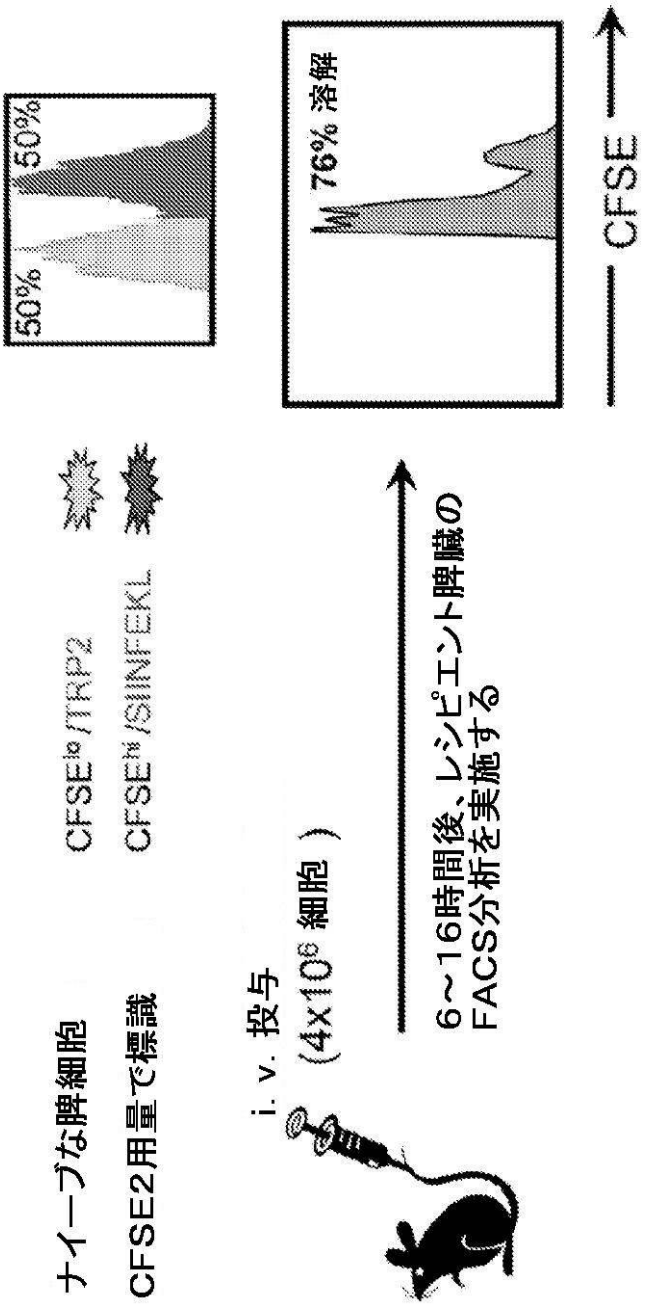


Figure 39

【図４０】

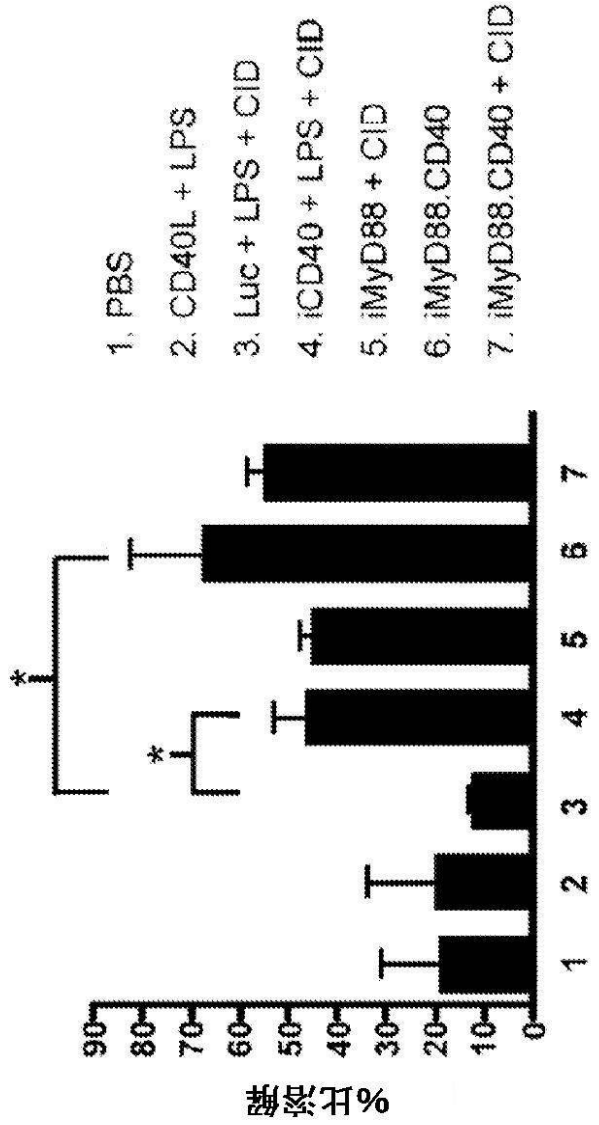


Figure 40

【図４１】

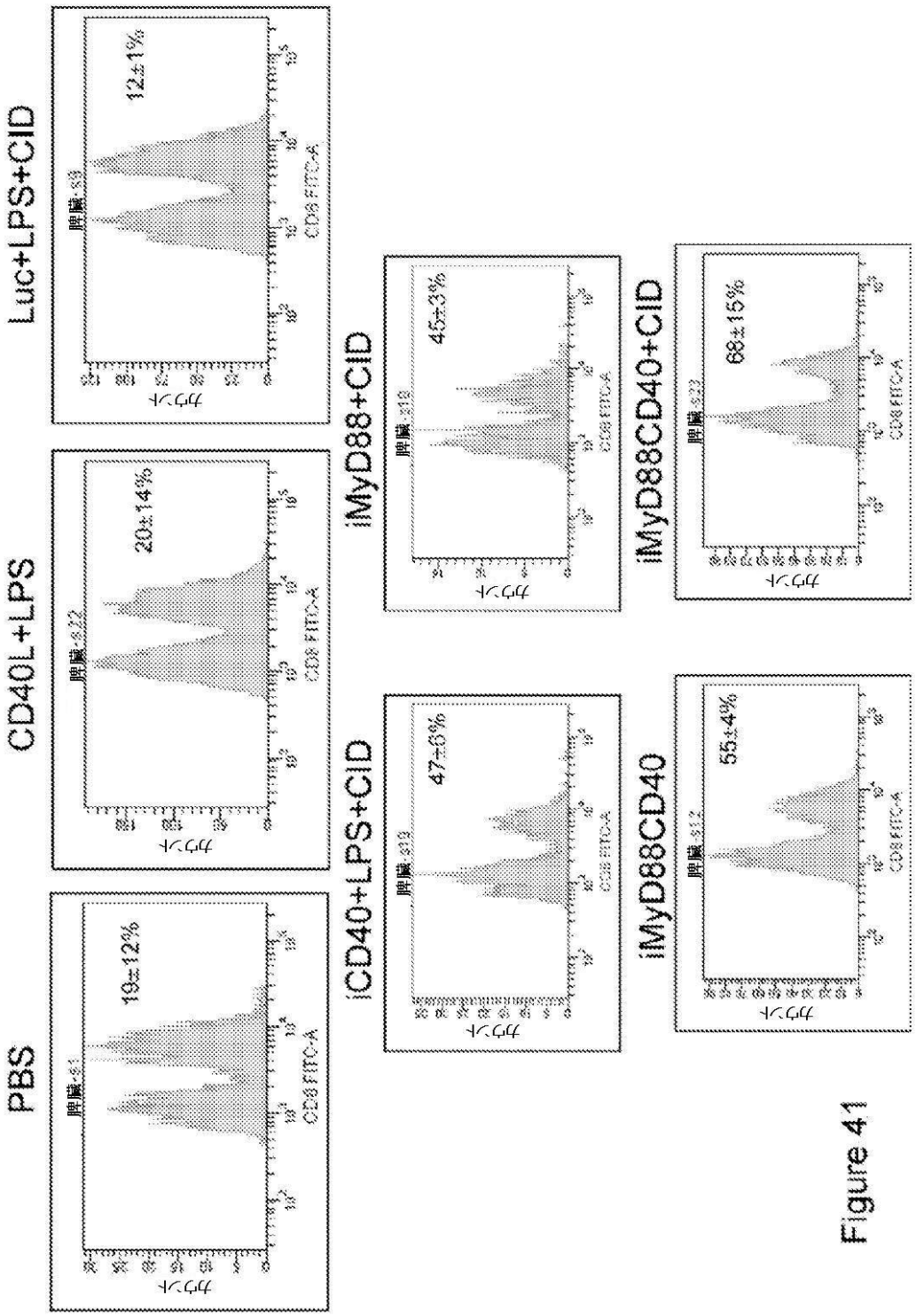


Figure 41

【図４３】

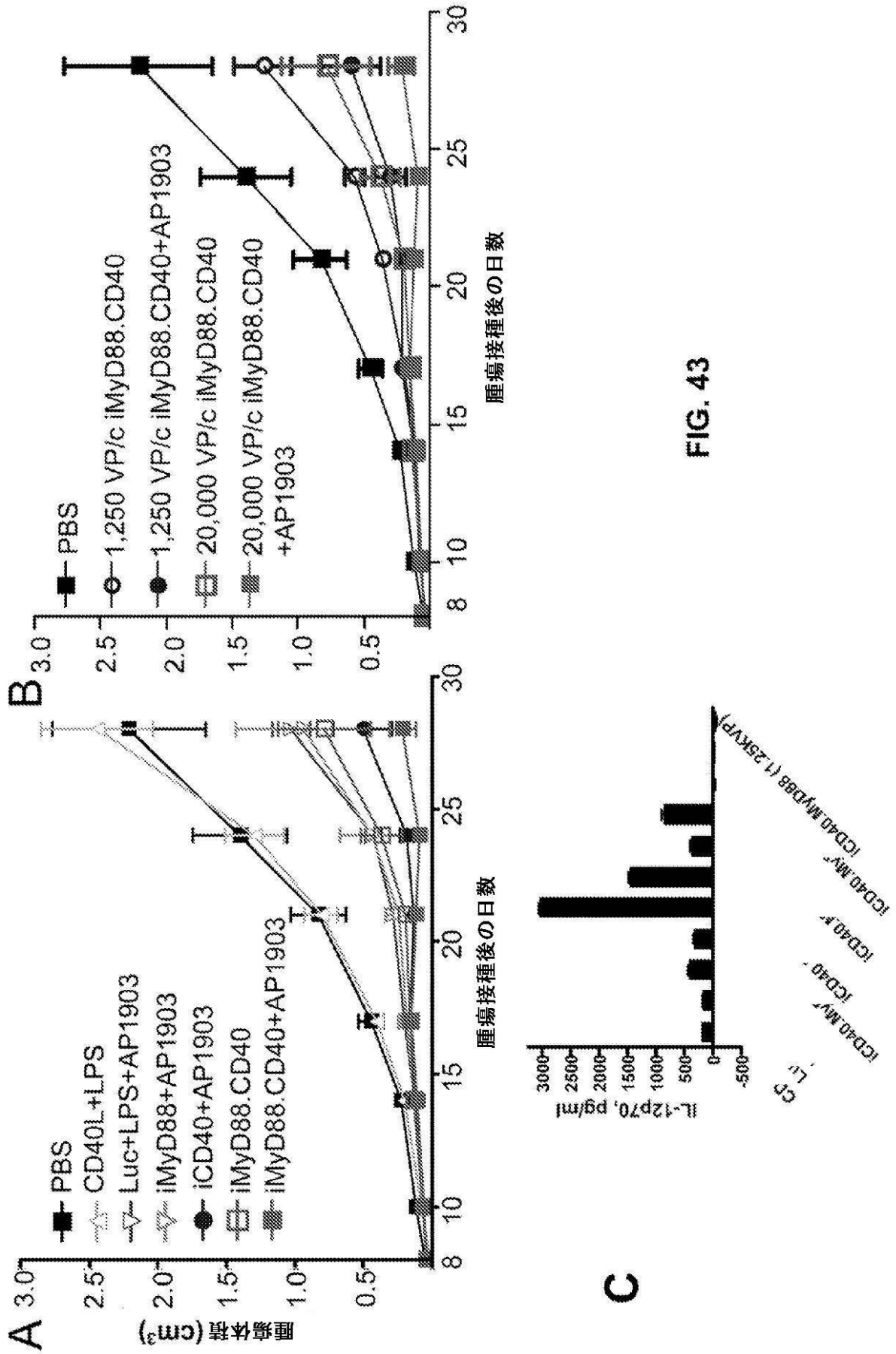

A
B
C
PBS
CD40L+LPS
Luc+LPS+AP1903
iMyD88+AP1903
iCD40+AP1903
iMyD88.CD40
iMyD88.CD40+AP1903
1,250 VP/c iMyD88.CD40
1,250 VP/c iMyD88.CD40+AP1903
20,000 VP/c iMyD88.CD40
20,000 VP/c iMyD88.CD40 +AP1903
腫瘍体積 (cm³)
腫瘍接種後の日数
IL-12p70, pg/ml
CC
iCD40.MyD88 (1.25KVP)

FIG. 43

【図４４】

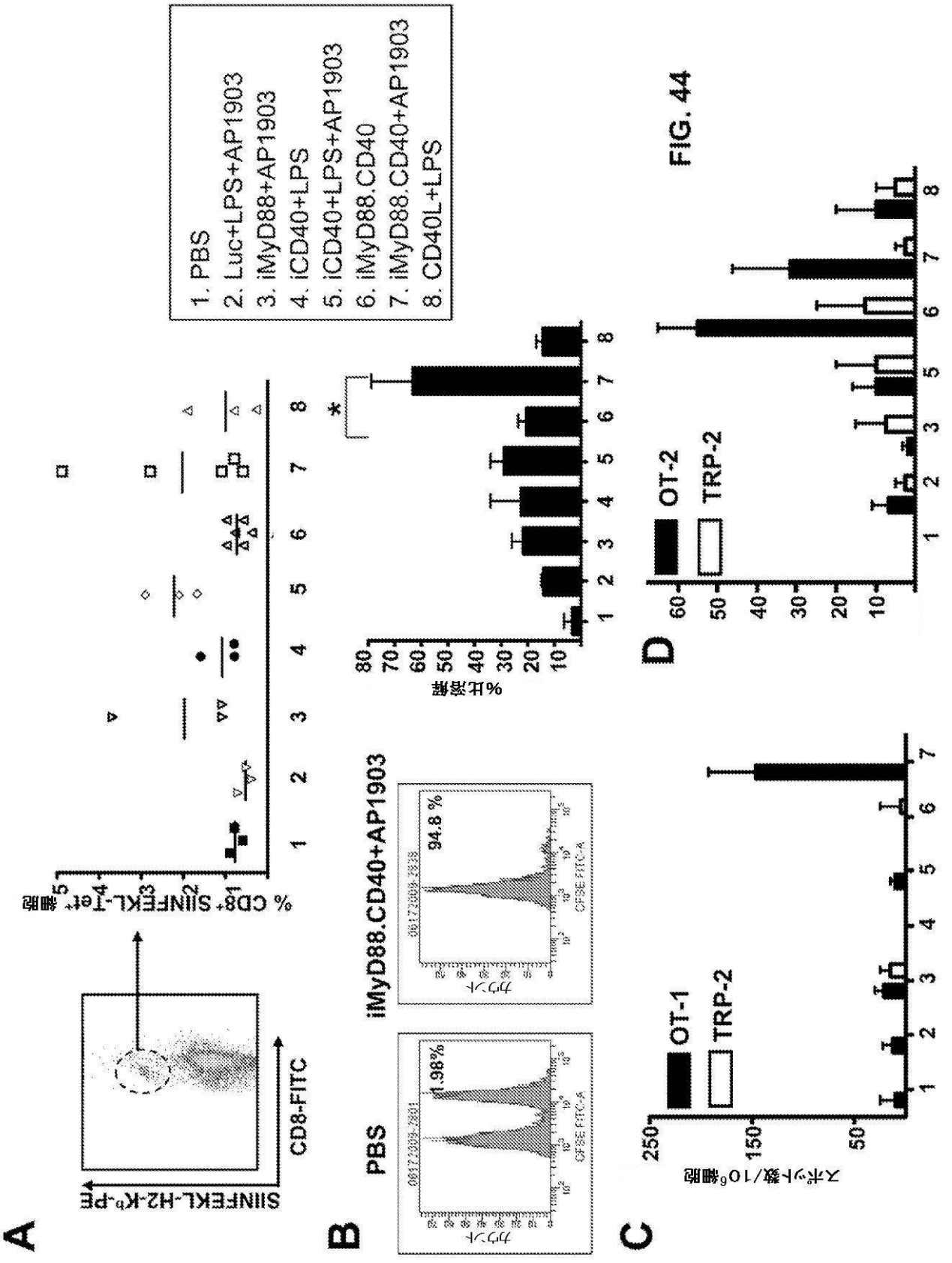

A
SIINFEKL-H2-Kb-PE
CD8-FITC
% CD8+ SIINFEKL-Tet+ 細胞
1. PBS
2. Luc+LPS+AP1903
3. iMyD88+AP1903
4. iCD40+LPS
5. iCD40+LPS+AP1903
6. iMyD88.CD40
7. iMyD88.CD40+AP1903
8. CD40L+LPS
B
PBS
iMyD88.CD40+AP1903
1.98%
94.8 %
CFSE FITC-A
%比溶解
C
OT-1
TRP-2
スポット数/10^6細胞
D
OT-2
TRP-2

FIG. 44

【図４５】

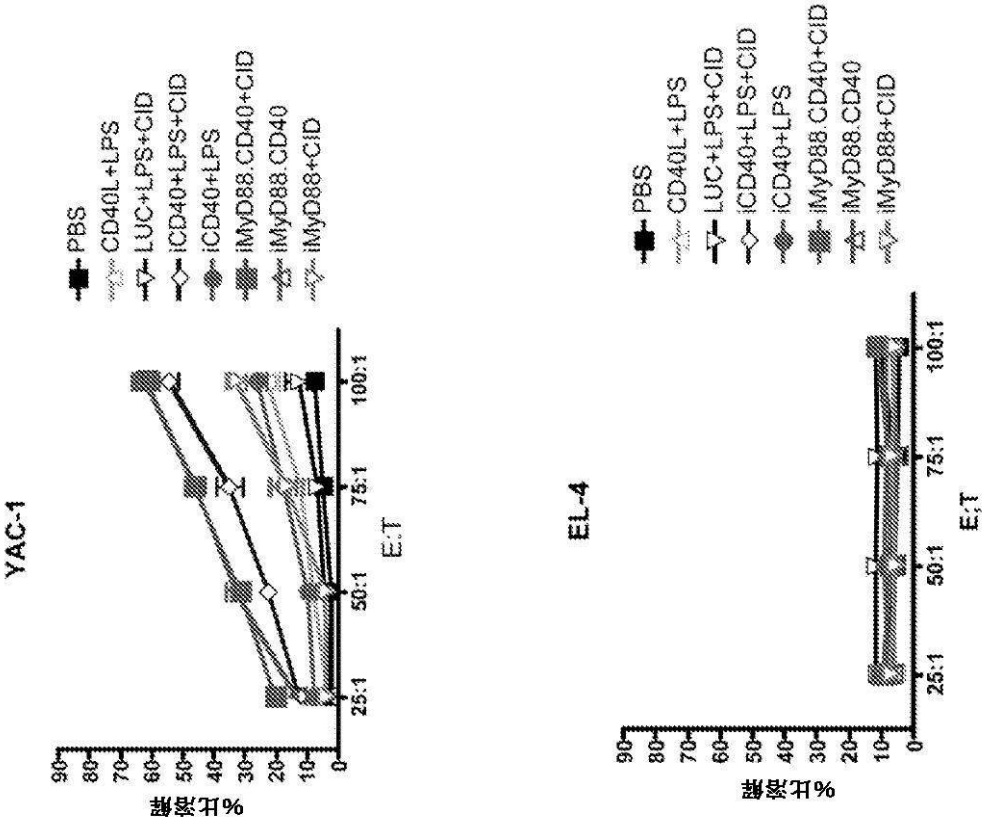

YAC-1
EL-4
PBS
CD40L+LPS
LUC+LPS+CID
iCD40+LPS+CID
iCD40+LPS
iMyD88.CD40+CID
iMyD88.CD40
iMyD88+CID
%比溶解
E:T
25:1
50:1
75:1
100:1
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90

FIG. 45

【図４６】

EG7実験　2つの免疫モニタリングデータの要約

CTLアッセイ

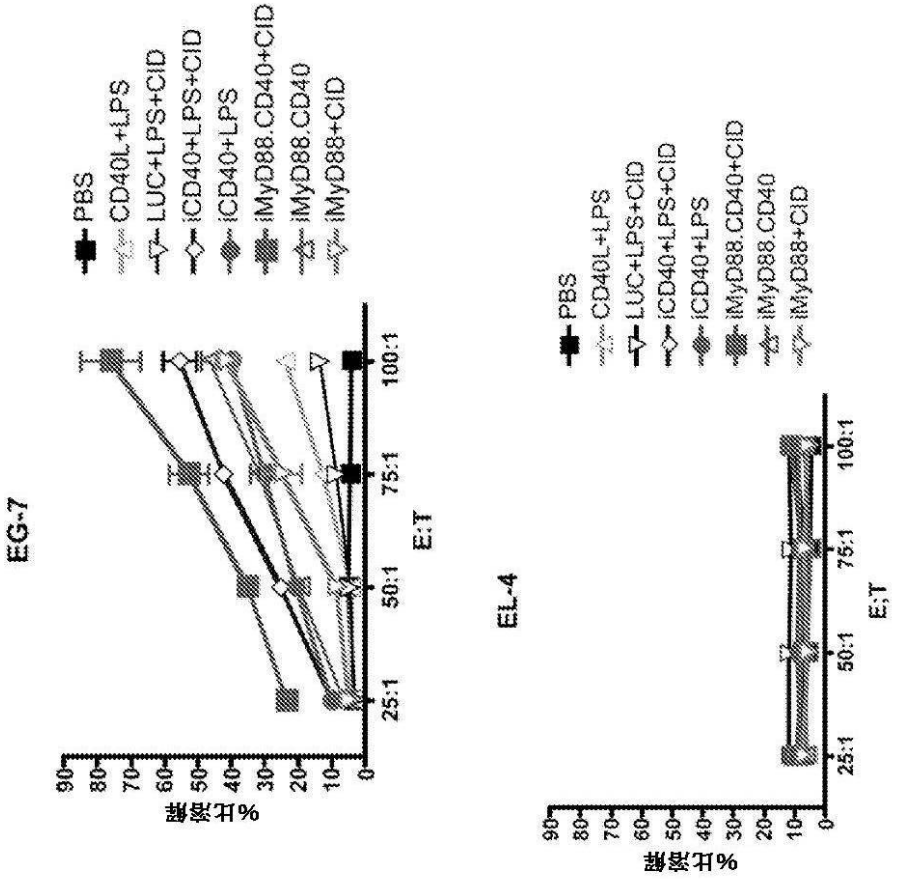


FIG. 46

【図４７】

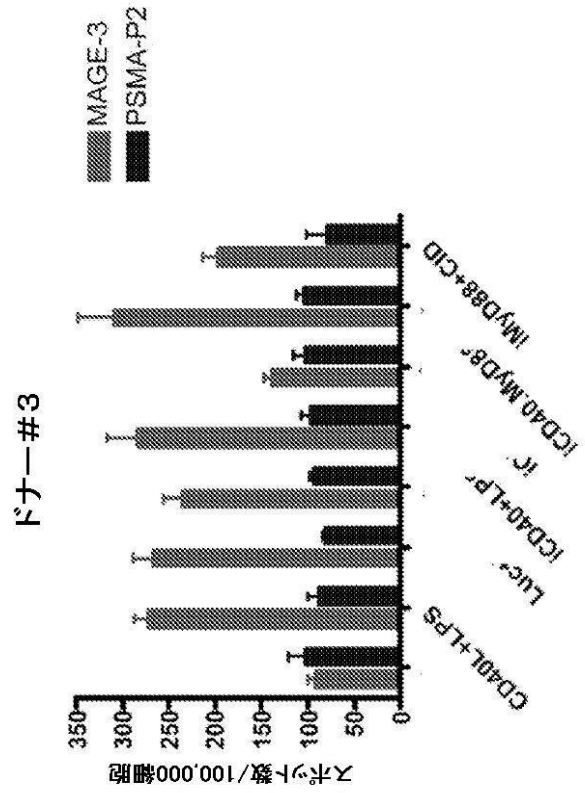

MAGE-3
PSMA-P2
ドナー#3
スポット数/100,000細胞
350
300
250
200
150
100
50
0
CD40L+LPS
Luc
ICD40+LPr
iC
ICD40.MyD8r
IMyD88+CID

FIG. 47

【図４８】

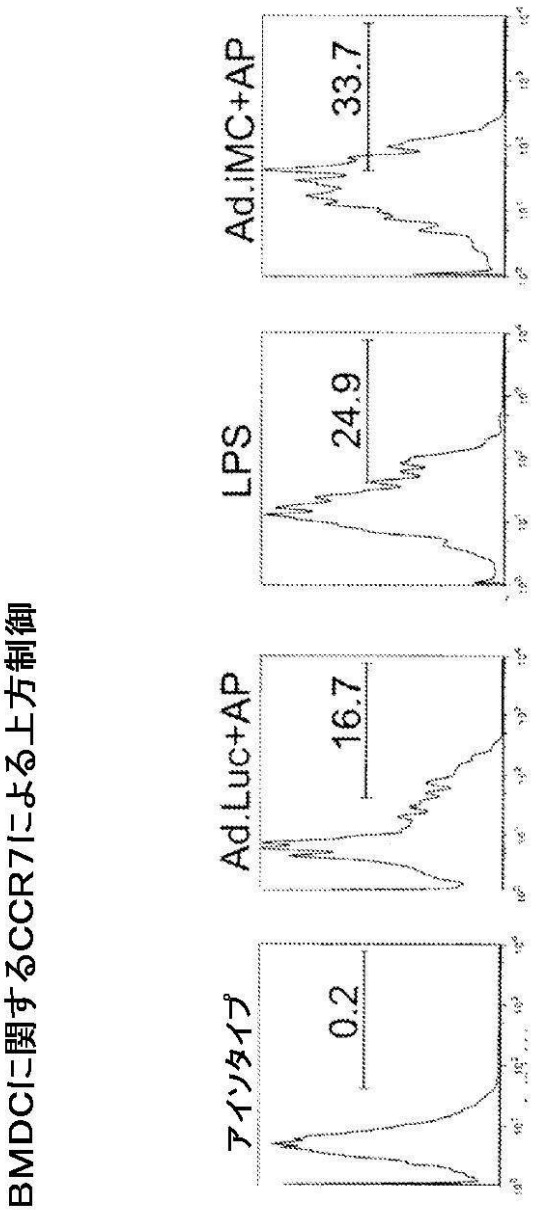

mBMDCに関するCCR7による上方制御
アイソタイプ
0.2
Ad.Luc+AP
16.7
LPS
24.9
Ad.iMC+AP
33.7

FIG. 48

【図４９】

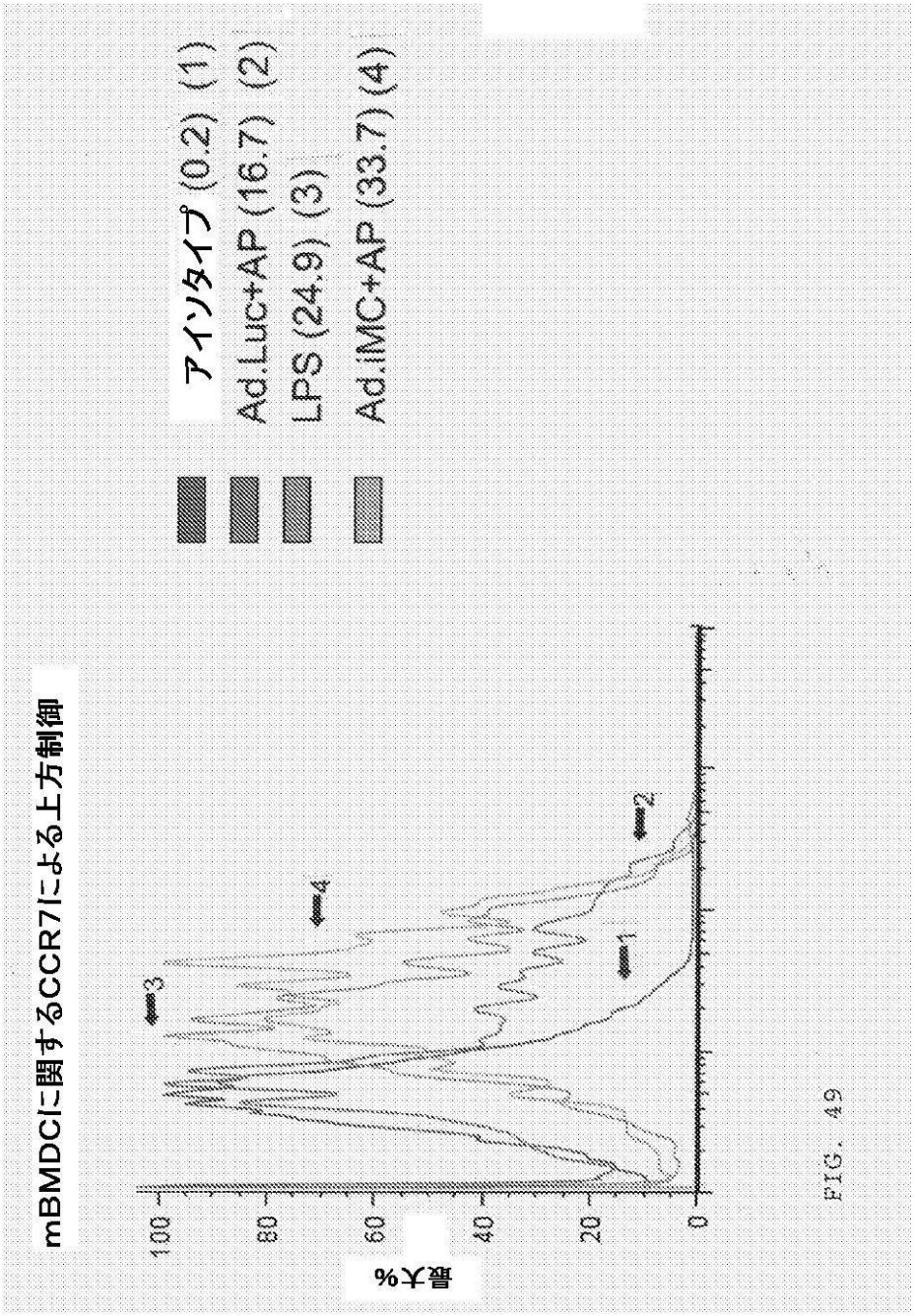


FIG. 49

【配列表】
2012503019000001.app
【手続補正書】
【提出日】平成23年5月19日(2011.5.19)
【手続補正１】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】００５０
【補正方法】変更
【補正の内容】
【００５０】
ある実施形態における核酸は、例えばアデノウイルスベクターなどのようなウイルスベクター内に含有される。いくつかの実施形態における抗原提示細胞は、時にｅｘ　ｖｉｖｏにおいて抗原と接触させる。ある実施形態では、抗原提示細胞は、被験体中にあり、細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答などのような免疫応答は、抗原に対して生成され

る。ある実施形態では、免疫応答は、腫瘍抗原（例えばＰＳＭＡ）に対して生成される。いくつかの実施形態では、核酸は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて調製され、例えば、皮内投与または皮下投与によって被験体に投与される。時に、抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいてまたはｉｎ　ｖｉｖｏにおいて核酸を形質導入またはトランスフェクトされる。いくつかの実施形態では、核酸は、ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む。その代わりに、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転写ＲＮＡを含む。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

（項目１）

抗原提示細胞を活性化するための方法であって、上記方法は：

抗原提示細胞に、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、上記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＭｙＤ８８ペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチド、ＮＯＤ２ペプチド、ＲＩＧ－１ペプチド、およびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含む、ステップと

上記抗原提示細胞を、上記リガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガンドと接触させるステップと

を含み、それにより上記抗原提示細胞が活性化される、方法。

（項目２）

抗原提示細胞を活性化するための方法であって、上記方法は：

抗原提示細胞に、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸をトランスフェクトまたは形質導入するステップであって、上記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、および（ｉｉｉ）ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドを含む、ステップと

上記抗原提示細胞を、上記リガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガンドと接触させるステップと

を含み、それにより上記抗原提示細胞が活性化される、方法。

（項目３）

上記キメラタンパク質は、細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域をさらに含む、項目２に記載の方法。

（項目４）

上記ペプチドは、配列番号６、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、および配列番号１６からなる群より選択されるペプチド配列を有するか、または上記ペプチドは、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、および配列番号１５からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、項目１に記載の方法。

（項目５）

上記切断型ＭｙＤ８８は、配列番号６のペプチド配列を有する、項目１から４のいずれか一項に記載の方法。

（項目６）

上記切断型ＭｙＤ８８ペプチドは、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる、項目１から５のいずれか一項に記載の方法。

（項目７）

上記膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、および受容体膜貫通領域からなる群より選択される、項目１から６のいずれか一項に記載の方法。

（項目８）

上記膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域である、項目１から７のいずれか一項に記載の方法。

（項目９）

上記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号２の細胞質領域のペプチド配列を有する、項目１または３から８のいずれか一項に記載の方法。
（項目１０）
上記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号１における細胞質ポリペプチド領域をコードするポリヌクレオチド配列によってコードされる、項目１または３から９のいずれか一項に記載の方法。
（項目１１）
上記リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される、項目１から１０のいずれか一項に記載の方法。
（項目１２）
上記リガンド結合領域はＦｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む、項目１から１１のいずれか一項に記載の方法。
（項目１３）
上記リガンド結合領域はさらなるＦｖ’配列をさらに含む、項目１２に記載の方法。
（項目１４）
上記リガンドは小分子である、項目１から１３のいずれか一項に記載の方法。
（項目１５）
上記リガンドは二量体である、項目１から１４のいずれか一項に記載の方法。
（項目１６）
上記リガンドは二量体ＦＫ５０６または二量体ＦＫ５０６アナログである、項目１５に記載の方法。
（項目１７）
上記リガンドはＡＰ１９０３またはＡＰ２０１８７である、項目１６に記載の方法。
（項目１８）
上記核酸はウイルスベクター内に含有される、項目１から１７のいずれか一項に記載の方法。
（項目１９）
上記ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである、項目１８に記載の方法。
（項目２０）
上記核酸はプラスミドベクター内に含有される、項目１から１７のいずれか一項に記載の方法。
（項目２１）
上記抗原提示細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて上記ベクターと接触させる、項目１８から１９のいずれか一項に記載の方法。
（項目２２）
上記抗原提示細胞を、抗原と接触させる、項目１から２１のいずれか一項に記載の方法。
（項目２３）
上記抗原提示細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて上記抗原と接触させる、項目２２に記載の方法。
（項目２４）
上記抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて上記ベクターでトランスフェクトまたは形質導入され、そして被験体に投与される、項目２１から２３のいずれか一項に記載の方法。
（項目２５）
上記ベクターは、上記被験体に皮内投与または皮下投与によって投与される、項目２４に記載の方法。
（項目２６）

上記抗原提示細胞が、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて上記核酸で形質導入またはトランスフェクトされる、項目１８から２０のいずれか一項に記載の方法。
（項目２７）
上記抗原に対して免疫応答が生成される、項目２４から２６のいずれか一項に記載の方法。
（項目２８）
上記免疫応答は細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答である、項目２７に記載の方法。
（項目２９）
上記免疫応答は腫瘍抗原に対して生成される、項目２７または２８に記載の方法。
（項目３０）
上記抗原提示細胞は樹状細胞である、項目１から２９のいずれか一項に記載の方法。
（項目３１）
上記抗原提示細胞はヒト樹状細胞である、項目３０に記載の方法。
（項目３２）
上記核酸は、上記ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、項目１から３１のいずれか一項に記載の方法。
（項目３３）
上記抗原提示細胞は、アジュバントを追加せずに活性化される、項目１から３２のいずれか一項に記載の方法。
（項目３４）
キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、上記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＭｙＤ８８ペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチド、ＮＯＤ２ペプチド、ＲＩＧ－１ペプチド、およびＴＲＩＦペプチドからなる群より選択されるペプチドを含む、組成物。
（項目３５）
キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、上記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、および（ｉｉｉ）ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ペプチドを含む、組成物。
（項目３６）
上記キメラタンパク質は細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域をさらに含む、項目３５に記載の組成物。
（項目３７）
上記ペプチドは、配列番号６、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、および配列番号１６からなる群より選択されるペプチド配列を有するか、または上記ペプチドは、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、および配列番号１５からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、項目３４に記載の組成物。
（項目３８）
上記切断型ＭｙＤ８８は配列番号６のペプチド配列を有する、項目３４から３７のいずれか一項に記載の組成物。
（項目３９）
上記切断型ＭｙＤ８８ペプチドは、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる、項目３４から３８のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４０）
上記膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、および受容体膜貫通領域からなる群より選択される、項目３４から３９のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４１）
上記膜ターゲティング領域はミリストイル化ターゲティング領域である、項目３４から

４０のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４２）
上記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号２の細胞質領域のペプチド配列を有する、項目３４または３６から４１のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４３）
上記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号１における細胞質ポリペプチド領域をコードするポリヌクレオチド配列によってコードされる、項目３４または３６から４１のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４４）
上記リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される、項目３４から４３のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４５）
上記リガンド結合領域はＦｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む、項目３４から４４のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４６）
上記リガンド結合領域はさらなるＦｖ’配列をさらに含む、項目４５に記載の組成物。
（項目４７）
上記核酸はウイルスベクター内に含有される、項目３４から４６のいずれか一項に記載の組成物。
（項目４８）
上記ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである、項目４７に記載の組成物。
（項目４９）
上記核酸はプラスミドベクター内に含有される、項目３４から４８のいずれか一項に記載の組成物。
（項目５０）
上記核酸は、上記ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、項目３４から４９のいずれか一項に記載の組成物。
（項目５１）
項目３４から５０のいずれか一項に記載の核酸が形質導入された細胞を含む組成物。
（項目５２）
上記細胞は抗原提示細胞である、項目５１に記載の組成物。
（項目５３）
上記細胞は樹状細胞である、項目５１に記載の組成物。
（項目５４）
上記細胞はヒト樹状細胞である、項目５３に記載の組成物。
（項目５５）
免疫応答を増強することによって被験体の状態を治療するための方法であって、項目３４から５４のいずれか一項に記載の組成物を上記被験体に投与するステップを含む方法。
（項目５６）
上記状態は過剰増殖疾患である、項目５５に記載の方法。
（項目５７）
上記状態は感染症である、項目５５に記載の方法。

【手続補正２】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原提示細胞を活性化するための組み合わせ物であって、前記組み合わせ物は：
抗原提示細胞をトランスフェクトまたは形質導入するための、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＭｙＤ８８ポリペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ポリペプチド、ＮＯＤ２ポリペプチド、ＲＩＧ－１ポリペプチド、およびＴＲＩＦポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドを含む、組成物と
前記抗原提示細胞のリガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガンドを含む組成物と
を含む、組み合わせ物。
【請求項２】
抗原提示細胞を活性化するための組み合わせ物であって、前記組み合わせ物は：
抗原提示細胞をトランスフェクトまたは形質導入するための、キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、および（ｉｉｉ）ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ポリペプチドを含む、組成物と
前記抗原提示細胞のリガンド結合領域に結合する非タンパク質多量体リガンドを含む組成物と
を含む、組み合わせ物。
【請求項３】
前記キメラタンパク質は、細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域をさらに含む、請求項２に記載の組み合わせ物。
【請求項４】
前記ポリペプチドは、配列番号６、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、および配列番号１６からなる群より選択される配列を有するか、または前記ポリペプチドは、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、および配列番号１５からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項１に記載の組み合わせ物。
【請求項５】
前記切断型ＭｙＤ８８は、配列番号６のペプチドを有する、請求項１から４のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項６】
前記切断型ＭｙＤ８８ポリペプチドは、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項１から５のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項７】
前記膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、および受容体膜貫通領域からなる群より選択される、請求項１から６のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項８】
前記膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域である、請求項１から７のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項９】
前記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号２の細胞質領域の配列を有する、請求項１または３から８のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項１０】
前記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号１における細胞質ポリペプチド領域をコードするポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項１または３から９のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項１１】

前記リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される、請求項１から１０のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項１２】

前記リガンド結合領域はＦｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む、請求項１から１１のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項１３】

前記リガンド結合領域はさらなるＦｖ’配列をさらに含む、請求項１２に記載の組み合わせ物。

【請求項１４】

前記リガンドは小分子である、請求項１から１３のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項１５】

前記リガンドは二量体である、請求項１から１４のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項１６】

前記リガンドは二量体ＦＫ５０６または二量体ＦＫ５０６アナログである、請求項１５に記載の組み合わせ物。

【請求項１７】

前記リガンドはＡＰ１９０３またはＡＰ２０１８７である、請求項１６に記載の組み合わせ物。

【請求項１８】

前記核酸はウイルスベクター内に含有される、請求項１から１７のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項１９】

前記ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである、請求項１８に記載の組み合わせ物。

【請求項２０】

前記核酸はプラスミドベクター内に含有される、請求項１から１７のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項２１】

前記抗原提示細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて前記ベクターと接触させる、請求項１８から１９のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項２２】

前記抗原提示細胞を、抗原と接触させる、請求項１から２１のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項２３】

前記抗原提示細胞を、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて前記抗原と接触させる、請求項２２に記載の組み合わせ物。

【請求項２４】

前記抗原提示細胞は、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいて前記ベクターでトランスフェクトまたは形質導入され、そして被験体に投与される、請求項２１から２３のいずれか一項に記載の組み合わせ物。

【請求項２５】

前記抗原提示細胞が、前記被験体に皮内投与または皮下投与によって投与されることを特徴とする、請求項２４に記載の組み合わせ物。

【請求項２６】

前記抗原提示細胞が、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて前記核酸で形質導入またはトランスフェクトされることを特徴とする、請求項１８から２０のいずれか一項に記載の組み合わせ物

。
【請求項２７】
前記抗原に対して免疫応答が生成される、請求項２４から２６のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項２８】
前記免疫応答は細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）免疫応答である、請求項２７に記載の組み合わせ物。
【請求項２９】
前記免疫応答は腫瘍抗原に対して生成される、請求項２７または２８に記載の組み合わせ物。
【請求項３０】
前記抗原提示細胞は樹状細胞である、請求項１から２９のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項３１】
前記抗原提示細胞はヒト樹状細胞である、請求項３０に記載の組み合わせ物。
【請求項３２】
前記核酸は、前記ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、請求項１から３１のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項３３】
前記抗原提示細胞は、アジュバントを追加せずに活性化される、請求項１から３２のいずれか一項に記載の組み合わせ物。
【請求項３４】
キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、（ｉｉｉ）細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域、ならびに（ｉｖ）ＭｙＤ８８ポリペプチド、ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ポリペプチド、ＮＯＤ２ポリペプチド、ＲＩＧ－１ポリペプチド、およびＴＲＩＦポリペプチドからなる群より選択されるポリペプチドを含む、組成物。
【請求項３５】
キメラタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する核酸を含む組成物であって、前記キメラタンパク質は、（ｉ）膜ターゲティング領域、（ｉｉ）リガンド結合領域、および（ｉｉｉ）ＴＩＲドメインを欠く切断型ＭｙＤ８８ポリペプチドを含む、組成物。
【請求項３６】
前記キメラタンパク質は細胞質ＣＤ４０ポリペプチド領域をさらに含む、請求項３５に記載の組成物。
【請求項３７】
前記ポリペプチドは、配列番号６、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、および配列番号１６からなる群より選択される配列を有するか、または前記ポリペプチドは、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、および配列番号１５からなる群より選択されるヌクレオチド配列によってコードされる、請求項３４に記載の組成物。
【請求項３８】
前記切断型ＭｙＤ８８は配列番号６の配列を有する、請求項３４から３７のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項３９】
前記切断型ＭｙＤ８８ポリペプチドは、配列番号５のヌクレオチド配列によってコードされる、請求項３４から３８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４０】
前記膜ターゲティング領域は、ミリストイル化ターゲティング領域、パルミトイル化ターゲティング領域、プレニル化領域、および受容体膜貫通領域からなる群より選択される、請求項３４から３９のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項４１】
前記膜ターゲティング領域はミリストイル化ターゲティング領域である、請求項３４から４０のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４２】
前記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号２の細胞質領域の配列を有する、請求項３４または３６から４１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４３】
前記ＣＤ４０細胞質ポリペプチド領域は、配列番号１における細胞質ポリペプチド領域をコードするポリヌクレオチド配列によってコードされる、請求項３４または３６から４１のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４４】
前記リガンド結合領域は、ＦＫＢＰリガンド結合領域、サイ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、サイ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より選択される、請求項３４から４３のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４５】
前記リガンド結合領域はＦｖ’Ｆｖｌｓ配列を含む、請求項３４から４４のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４６】
前記リガンド結合領域はさらなるＦｖ’配列をさらに含む、請求項４５に記載の組成物。
【請求項４７】
前記核酸はウイルスベクター内に含有される、請求項３４から４６のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項４８】
前記ウイルスベクターはアデノウイルスベクターである、請求項４７に記載の組成物。
【請求項４９】
前記核酸はプラスミドベクター内に含有される、請求項３４から４８のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５０】
前記核酸は、前記ポリヌクレオチド配列に作動可能に連結されたプロモーター配列を含む、請求項３４から４９のいずれか一項に記載の組成物。
【請求項５１】
請求項３４から５０のいずれか一項に記載の核酸が形質導入された細胞を含む組成物。
【請求項５２】
前記細胞は抗原提示細胞である、請求項５１に記載の組成物。
【請求項５３】
前記細胞は樹状細胞である、請求項５１に記載の組成物。
【請求項５４】
前記細胞はヒト樹状細胞である、請求項５３に記載の組成物。
【請求項５５】
免疫応答を増強することによって被験体の状態を治療するための組成物であって、請求項３４から５４のいずれか一項に記載の組成物を含む組成物。
【請求項５６】
前記状態は過剰増殖疾患である、請求項５５に記載の組成物。
【請求項５７】
前記状態は感染症である、請求項５５に記載の組成物。
【請求項５８】
前記状態は前立腺癌である、請求項５５に記載の組成物。
【請求項５９】

前記腫瘍抗原が前立腺特異的抗原である、請求項２９に記載の組み合わせ物
【請求項６０】
前記組成物の投与後に、前記被験体の腫瘍のサイズが低下する、請求項５６に記載の組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/57738

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C12N 5/071 (2010.01)
USPC - 435/372
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC: 435/372

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC: 435/372, 375, 455; 424/93.21
(text search)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google; PubMed
Search terms: iCD40, CD40, antigen-presenting cell, membrane targeting region, ligand binding region, MyD88, NOD2, RIG-1, TRIF, TIR domain, lacking, deleted, truncated,

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	WO 2008/049113 A2 (SPENCER et al.) 28 April 2008 (28.04.2008) pg 6, ln 12-20, 30-32; pg 18, ln 7-15	1, 34 --- 2-3, 35-36
Y	LOIARRO et al. Peptide-mediated interference of TIR domain dimerization in MyD88 inhibits interleukin-1-dependent activation of NF-(kappa)B. J. Biol. Chem. 22 April 2005 (22.04.2005), Vol. 280, No. 16, pages 15809-15814; pg 1580, para 2	2-3, 35-36
A	US 2004/0209836 A1 (SPENCER et al.) 21 October 2004 (21.10.2004)	1-3, 34-36

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 January 2010 (12.01.2010)	02 FEB 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 09/57738

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 4-6, 9, 10, 37-39, 42, and 43
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 4-6, 9, 10, 37-39, 42, and 43 have been held unsearchable because they are drawn to sequence identifiers; however, the applicant failed to submit a valid CRF to the ISA/225. No valid CRF was filed in response to the ISA/225 of 28 October 2009.

3. ☒ Claims Nos.: 6-33 and 39-57
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 35/76	*(2006.01)*	Ａ６１Ｋ	35/76	
Ａ６１Ｐ 43/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00	１０５
Ｃ１２Ｎ 15/09	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	15/00	Ａ
Ｃ１２Ｎ 5/10	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/00	１０２

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

(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 ２８１１
(72)発明者 プライヤダーシニ, ナラヤナン
アメリカ合衆国 テキサス ７７０５４, ヒューストン, ケンブリッジ ストリート ７９００, ナンバー３－１ビー

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 CA07 DA02 EA04 FA02 GA11
4B065 AA90X AA90Y AB01 BA02 CA44
4C084 AA02 AA13 BA01 BA22 BA44 CA01 CA53 NA14 ZB212 ZB262 ZB352
4C085 AA03 EE05 EE10 FF13
4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZB21 ZB26 ZB35