(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2015-513401
(P2015-513401A)
(43)公表日　平成27年5月14日(2015.5.14)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 5/0784	(2010.01)	C12N	5/00	202M	4B065
A61P 31/18	(2006.01)	A61P	31/18		4C085
A61K 35/12	(2015.01)	A61K	35/12		4C087
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	B	
A61K 39/21	(2006.01)	A61K	39/21		

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 43 頁）

(21)出願番号　特願2014-559235 (P2014-559235)
(86)(22)出願日　平成25年3月1日 (2013.3.1)
(85)翻訳文提出日　平成26年10月31日 (2014.10.31)
(86)国際出願番号　PCT/EP2013/054121
(87)国際公開番号　WO2013/127976
(87)国際公開日　平成25年9月6日 (2013.9.6)
(31)優先権主張番号　12382078.9
(32)優先日　平成24年3月2日 (2012.3.2)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　500031124
ラボラトリオス・デル・ドクトル・エステベ・ソシエダッド・アノニマ
スペイン、エ－０８０４１バルセロナ、アベニーダ・マレ・デ・ドゥ・デ・モンセラット２２１番

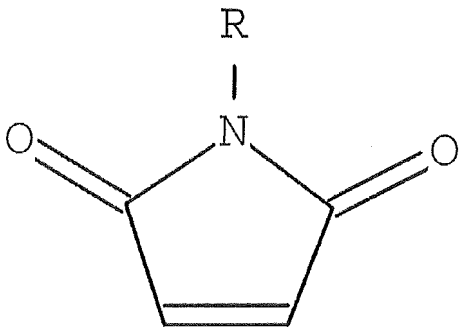
最終頁に続く

(54)【発明の名称】樹状細胞ワクチンの調製方法

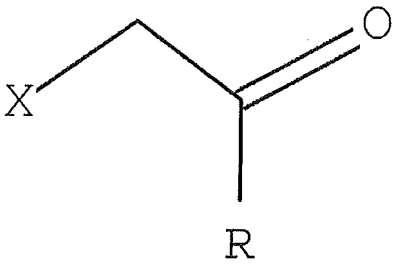
(57)【要約】
本発明は、より高い生存能およびリンパ節に対する遊走能を示す抗原負荷樹状細胞を得るための方法に関する。本発明はまた、前記樹状細胞を含有するワクチン、および感染性疾患、特にＡＩＤＳを治療するためのその使用に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
抗原負荷樹状細胞を得るためのインビトロ方法であって、未成熟樹状細胞を、前記抗原を含む免疫原と、前記未成熟樹状細胞の成熟に適した条件下で、および細胞が基材に接着するのを防止する条件下で接触させることを含んでなる、インビトロ方法。
【請求項２】
抗原負荷樹状細胞を回収することをさらに含んでなる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
未成熟樹状細胞の成熟に適した条件が、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の組み合わせと接触させることを含んでなるものである、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
未成熟樹状細胞の成熟に適した条件が、炎症促進性サイトカインカクテルと接触させることをさらに含んでなるものである、請求項１～３のいずれかに記載の方法。
【請求項５】
炎症促進性サイトカインカクテルが、ＩＬ－１受容体アゴニスト、ｇｐ１３０利用サイトカインおよびＴＮＦスーパーファミリーメンバーを少なくとも含んでなるものである、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
ＩＬ－１受容体アゴニストがＩＬ－１βであり、ｇｐ１３０利用サイトカインがＩＬ－６であり、および／またはＴＮＦスーパーファミリーメンバーがＴＮＦ－αである、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
炎症促進性サイトカインカクテルがプロスタグランジンをさらに含んでなるものである、請求項４～６のいずれかに記載の方法。
【請求項８】
プロスタグランジンがプロスタグランジンE_2（PGE_2）である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
培地組成が、３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１β、１０００ＩＵ／ｍＬのＴＮＦ－α、１０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－６および１μｇ／ｍＬのPGE_2である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
細胞が基材に接着するのを防止する条件が低接着性基材の使用を含んでなるものである、請求項１～９のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
未成熟樹状細胞が単球由来未成熟樹状細胞である、請求項１～１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
免疫原がＨＩＶ免疫原である、請求項１～１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
ＨＩＶ免疫原が不活性化ＨＩＶ粒子である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
不活性化ＨＩＶ粒子が、加熱不活性化ＨＩＶ粒子、化学的不活性化ＨＩＶ粒子および光化学的不活性化ＨＩＶ粒子からなる群より選択されるものである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
不活性化ＨＩＶ粒子が、ＣＣＨＣジンクフィンガーを破壊する薬剤を使用して得られる化学的不活性化ＨＩＶ粒子である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
不活性化ＨＩＶ粒子が加熱不活性化ＨＩＶ粒子である、請求項１４に記載の方法。

【請求項１７】
ＣＣＨＣジンクフィンガーを破壊する薬剤が、
（ｉ）Ｃ－ニトロソ化合物、
（ｉｉ）アゾジカルボンアミド、
（ｉｉｉ）構造Ｒ－Ｓ－Ｓ－Ｒを有するジスルフィド、
（ｉｖ）下記構造：
【化１】



を有するマレイミド、
（ｖ）下記構造：
【化２】



を有するα－ハロゲン化ケトン、
（ｖｉ）式Ｒ－ＮＨ－ＮＨ－Ｒを有するヒドラジド、
（ｖｉｉ）酸化窒素およびＮＯ基を含有するその誘導体、
（ｖｉｉｉ）第二銅イオンおよびＣｕ$^{2+}$を含有する錯体、
（ｉｘ）第二鉄イオンおよびＦｅ$^{3+}$を含有する錯体
（式中、Ｒは、任意の原子または分子であり、Ｘは、Ｆ、Ｉ、ＢｒおよびＣｌからなる群から選択される）
からなる群から選択される、請求項１５に記載の方法。
【請求項１８】
ジスルフィドが、ジスルフィラムまたはアルドリチオール－２（２，２’－ジチオジピリジン）である、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
不活性化ＨＩＶ粒子が、ソラレン化合物および前記ソラレン化合物を活性化することができる波長の放射線照射を使用して得られる光化学的不活性化ＨＩＶ粒子である、請求項１３に記載の方法。
【請求項２０】
ソラレン化合物がアモトサレンである、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
ＨＩＶがＨＩＶ－１である、請求項１～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
請求項１～２１のいずれかに定義される方法によって得られ得る、抗原パルス樹状細胞。

【請求項２３】
請求項２２に記載の抗原パルス樹状細胞を含む、樹状細胞ワクチン。
【請求項２４】
医薬に使用するための、請求項２３に記載の樹状細胞ワクチン。
【請求項２５】
ＨＩＶ感染症またはＨＩＶ感染症に関連する疾患の治療または予防に使用するため請求項２４に記載の樹状細胞ワクチンであって、免疫原がＨＩＶ免疫原である、樹状細胞ワクチン。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、より高い生存能およびリンパ節に対する遊走能を示す抗原負荷樹状細胞を得るための方法に関する。本発明はまた、前記樹状細胞を含有するワクチン、および感染性疾患、特にヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）を治療するためのその使用に関する。
【背景技術】
【０００２】
抗レトロウイルス併用療法（ｃＡＲＴ）は、ＨＩＶ－１複製を抑制してＣＤ４Ｔ細胞数の再構成を可能にするのに有効であるが、ＨＩＶ－１を根絶するものではない。加えて、ｃＡＲＴは、ＨＩＶ－１特異的Ｔ細胞免疫応答を回復させるものではない。実際、ＨＩＶ－１複製は、治療前と同様のまたはそれよりもさらに高いレベルに急速に戻る。その結果として、ＨＩＶ被験体は、生涯にわたるｃＡＲＴ、コンプライアンスに関する特に負担となるオプション、抗ウイルス耐性を発症するリスク、代価および副作用（脂肪再分布症候群などの深刻な代謝異常を含む）を受け入れなければならない。例えば、Ｍａｒｔｉｎｅｚ Ｅ，ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ ２００１；３５７：５９２－５９８参照。
【０００３】
ＨＩＶ－１に対する強力かつ特異的なＣＤ４＋ヘルパーＴ細胞応答は、マカクおよびヒトにおけるＨＩＶ－１複製を制御することができる持続的、効果的かつ特異的なＣＤ８＋細胞傷害性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）応答を達成するのに重要であるという証拠がある。これらの知見は、マウスモデルにおける慢性ウイルス感染症に関する最近のデータと一致している。インターフェロンガンマ（ＩＦＮ－γ）を分泌するＨＩＶ－１特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞およびＣＤ４＋Ｔ細胞は、ほとんどのＨＩＶ－１感染個体で見られ得るが、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖応答はなく、ＣＤ８Ｔ細胞の細胞溶解活性が欠損している。一部のデータは、ＨＩＶ－１感染被験体においても樹状細胞（ＤＣ）の抗原提示細胞（ＡＰＣ）機能が損なわれており、これがＨＩＶ－１特異的ヘルパーおよびＣＴＬ応答の機能不全に寄与する可能性があることを示唆している。
【０００４】
生涯にわたる持続的なｃＡＲＴの必要性を制限するためのアプローチとして、治療免疫が提案されている。骨髄樹状細胞は、ＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞の両方に対する一次および二次免疫応答を誘導する固有の能力を有する最も強力なプロフェッショナルＡＰＣである。ｉｎ ｖｉｖｏおよびｉｎ ｖｉｔｒｏの実験データは、ＤＣが、外因性可溶性タンパク質、腫瘍細胞溶解物、不活性化ウイルスおよびアポトーシスウイルス感染細胞を貪食し、これらの物質をプロセシングし、派生抗原性ペプチドを提示することができることを示している。ＭＨＣクラスＩＩ経路を介して抗原をヘルパーＣＤ４＋Ｔ細胞（Ｔｈ）に提示することに加えて、ＤＣはまた、ＭＨＣクラスＩ経路で抗原を細胞傷害性ＣＤ８＋Ｔリンパ球（ＣＴＬ）に提示することができる（これは、「クロスプライミング」または「クロスプレゼンテーション」として公知の現象である）。Ｂａｎｃｈｅｒｅａｕ，Ｎａｔｕｒｅ ３９２（１９９８）：２４５－２５２およびＡｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０００）１８；７６７－８１１およびＬａｒｓｓｏｎ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｕ

ｒｒ．Ｔｏｐ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００３；２７６：２６１－２７５．参照。

【０００５】

様々な不活性化病原体および腫瘍抗原でｅｘ　ｖｉｖｏパルスされた自己骨髄ＤＣ（例えば、単球由来ＤＣ（ＭＤＤＣ））は、ヒト感染症および腫瘍の実験的マウスモデルにおいて強力な防御免疫を誘導することが示されている。動物におけるいくつかの研究は、ＨＩＶ－１ウイルス溶解物、エンベロープ糖タンパク質、不活化ウイルスまたはナノ粒子で負荷したＤＣが、ＨＩＶ－１に対する強力な免疫応答を開始することを示唆している。

【０００６】

ヒトにおけるＨＩＶ－１感染症に関するいくつかのＤＣベースのワクチン接種臨床試験が、これまでに公表されている。Ｋｕｎｄｕ　Ｓ，ｅｔ　ａｌ．，ＡＩＤＳ　Ｒｅｓ．Ｈｕｍ．Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ　１９９８；１４：５５１－５６０、Ｌｕ　Ｗ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．２００４；１０：１３５９－１３６５、Ｇａｒｃｉａ　Ｆ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．２００５；１９５：１６８０－１６８５、Ｉｄｅ　Ｆ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｖｉｒｏｌ．２００６；７８：７１１－７１８、Ｃｏｎｎｏｌｌｙ　Ｎ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｖａｃｃｉｎｅ　Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００８；１５：２８４－２９２、Ｇａｎｄｈｉ　Ｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ　２００９；２７：６０８８－６０９４、Ｋｌｏｖｅｒｐｒｉｓ　Ｈ，ｅｔ　ａｌ．，ＡＩＤＳ　２００９；２３：１３２９－１３４０、Ｒｏｕｔｙ　Ｊ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１０；１３４：１４０－１４７およびＧａｒｃｉａ　Ｆ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｉｎｆｅｃｔ．Ｄｉｓ．２０１１；２０３：４７３－４７８参照。治療ワクチンとしてＤＣを使用する進行中の臨床試験もいくつかある。残念ながら、おそらくは、選択された免疫原、不活性化の方法、ＤＣの培養およびパルス条件、ならびにワクチン投与計画が大きく違うために、報告された結果は不均一であった。当技術分野では、安全性および有効性プロファイルを高める標準的な工程下で調製された樹状細胞ベースのＨＩＶ－１ワクチンに関する必要性が依然として存在する。

【発明の概要】

【０００７】

第１の態様にあって、本発明は、抗原負荷樹状細胞を得るためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法であって、未成熟樹状細胞を、前記抗原を含む免疫原と、前記未成熟樹状細胞の成熟に適した条件下で、および細胞が基材に接着するのを防止する条件下で接触させることを含むｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法に関する。

【０００８】

別の態様にあって、本発明は、本発明の方法によって得られ得る抗原パルス樹状細胞に関する。

【０００９】

別の態様にあって、本発明は、本発明の抗原パルス樹状細胞を含む樹状細胞ワクチンに関する。

【００１０】

別の態様にあって、本発明は、医薬に使用するための本発明の樹状細胞ワクチンに関する。

【００１１】

さらに別の態様にあって、本発明は、ＨＩＶ感染症またはＨＩＶ感染症に関連する疾患の治療または予防に使用するための本発明の樹状細胞ワクチンであって、免疫原がＨＩＶ免疫原である樹状細胞ワクチンに関する。

【図面の簡単な説明】

【００１２】

【図１ＡＢ】治療ＨＩＶ被験体から単離したＭＤＤＣにおけるＣＤ８０およびＣＤ８３の発現レベル。

【図１Ｃ】図１ＡＢに同じ。

【図２】治療ＨＩＶ被験体から単離したＭＤＤＣの生存率および数。
【図３】治療ＨＩＶ被験体から単離したＭＤＤＣの走化特性。
【図４】治療ＨＩＶ被験体から単離したＭＤＤＣのＴ細胞特異的ＨＩＶ応答。
【図５ＡＢ】免疫感作および２回目の抗レトロウイルス療法中断後におけるベースライン（任意の抗レトロウイルス療法前）からのｐＶＬの変化。（Ａ）中央値。（Ｂ）個別の値。下の数字は、リスクを有する患者を表す。０週目、８週目、１２週目、２４週目、３６週目および４８週目において、マン－ホイットニーＵ検定のＰ値を示す。曲線下面積（ＡＵＣ）のＰ値も示す。
【図５Ｃ】（Ｃ）ワクチン接種の８週間、１２週間、２４週間、３６週間および４８週間後における治療ＨＩＶ被験体内のＨＩＶウイルス負荷。治療群Ｉ、治療群ＩＩおよび治療群ＩＩＩについて、（－４、－２、０、８、１２、２４、３６および４８）週目の値を示す。
【図６】臨床試験デザインのスキーム。抗レトロウイルス治療した慢性ＨＩＶ－１感染患者３６人を、加熱不活性化自己ウイルスでパルスした少なくとも１０７個のＭＤ－ＤＣで無作為に３回免疫感作した（投与１回当たり１０９コピー）。１回目の免疫感作の後、患者を最大４８週間経過観察した。０週目を２回目のｃＡＲＴ中断日（２回目の中止）とみなした。ＤＣ－ＨＩＶ－１群では、－４週目、－２週目および０週目に患者１２人を免疫感作し、０週目、２週目および４週目に患者１２人を免疫感作した。これら２つの異なるスケジュールを選択して、ｃＡＲＴが免疫感作に対する応答にいかなる影響を及ぼし得るかを評価した。これら２つのスケジュール間では、ｐＶＬの変化またはＨＩＶ特異的Ｔ細胞応答に有意差が認められなかったので、免疫感作した患者を単一群として分析した。ＤＣ対照群の患者には、－４週目、－２週目および０週目に注射した。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
本発明は、本質的に不活性化されたヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）の溶解物により単球由来樹状細胞（ＭＤＤＣ）細胞をパルスする新たなかつ有利な方法を開示する。特に、本発明のパルスＭＤＤＣは、ＩＬ－１－β、ＩＬ－６、ＴＮＦ－αおよびＰＧＥ$_2$から構成される成熟カクテルを含む超低接着性フラスコ中で培養される。細胞接着の欠如および培養培地の組み合わせは、ＭＤＤＣにおける成熟マーカー（すなわち、ＣＤ８０、ＣＤ８３）の発現、ならびにパルスＭＤＤＣの全体的な量および生存能を有意に増加させる。本発明の方法はまた、ＭＤＤＣのｅｘ　ｖｉｖｏ遊走能を増加させて、それらがＨＩＶ－１抗原をＴ細胞に提示するのを改善することから、ＨＩＶ－１に対するより高特異的な免疫応答を促進する。このようにしてパルスされたＭＤＤＣは、ヒトの健康のための樹状細胞ワクチンとして使用することができる。
【００１４】
１．一般的な用語および表現の定義
本明細書で使用される「ＡＩＤＳ」という用語はＨＩＶ感染症の症候性期を指し、後天性免疫不全症候群（一般的にはＡＩＤＳとして公知である）および「ＡＲＣ」またはＡＩＤＳ関連症候群の両方を含む。Ａｄｌｅｒ　Ｍ，ｅｔ　ａｌ．，Ｂｒｉｔ．Ｍｅｄ．Ｊ．１９８７；２９４：１１４５－１１４７参照。ＡＩＤＳの免疫学的および臨床的な徴候は当技術分野で周知であり、例えば、免疫不全に起因する日和見感染および癌が挙げられる。
【００１５】
「アジュバント」という用語は、免疫原性物質に付加すると、この混合物に曝露されたレシピエント宿主における該物質に対する免疫応答を非特異的に増強または強化する物質を指す。
【００１６】
本明細書で使用される「ＩＬ－１受容体アゴニスト」という用語は、インターロイキン－１受容体（ＩＬ－１Ｒ）のアゴニストとして作用するサイトカインを指す。ＩＬ－１受容体アゴニストとしては、限定されないが、ＩＬ－１αおよびＩＬ－１βが挙げられる。

【００１７】
本明細書で使用される「アルドリチオール－２」または「２，２－ジチオジピリジン」という用語は、内部ビリオンタンパク質、特にヌクレオカプシドタンパク質のシステインの遊離スルフヒドリル基の選択的な共有結合修飾によってＨＩＶの感染力を排除する穏やかな酸化試薬である化学物質（「アルドリチオール」またはＡＴ－２としても公知である）を指す。ＡＴ－２不活化ビリオンは非感染性であるが、細胞表面受容体および樹状細胞と相互作用することができる。
【００１８】
本明細書で使用される「アモトサレン」という用語は、ＤＮＡおよびＲＮＡのヘリックス領域に可逆的にインターカレートする合成ソラレン化合物を指す。アモトサレンは光活性化合物であるので、ＨＩＶを光化学的に治療するためには長波長紫外線（ＵＶＡ）照射を使用する必要がある。３２０～４００ｎｍのＵＶＡ光で照射すると、アモトサレンは、核酸中のピリミジン塩基と共有結合を形成する。このように架橋された病原体および白血球のゲノムは、もはや機能または複製することができない。
【００１９】
本明細書で使用される「抗原」という用語は、体内に導入されると、免疫系による特異的免疫応答（すなわち、体液性または細胞性）を誘導する任意の分子または分子断片を指す。抗原は、抗体の抗原結合部位と結合する能力を有する。抗原は、通常、タンパク質または多糖である。本発明に適切な抗原は、細菌、ウイルス、寄生生物および他の微生物の一部、例えば、コート、カプセル、細胞壁、鞭毛、線毛および毒素である。本発明の抗原の例としては、ピコルナウイルス、コロナウイルス、トガウイルス、フラビウイルス（ｆｌａｖｉｒｖｉｒｕｓ）、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、オルソミクソウイルス、ブンヤウイルス、アレナウイルス、レオウイルス、レトロウイルス、パピローマウイルス、パルボウイルス、ヘルペスウイルス、ポックスウイルス、ヘパドナウイルスおよび海綿状ウイルスファミリー由来の抗原；または他の病原体、例えば、トリパノソーマ、サナダムシ、回虫、蠕虫またはマラリア由来の抗原が挙げられる。適切なウイルス抗原の例は、限定されないが、ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）由来のレトロウイルス抗原（ｇａｇ、ｐｏｌ、ｅｎｖおよびｎｅｆ遺伝子の遺伝子産物ならびに他のＨＩＶ成分を含む）；肝炎ウイルス抗原、例えばＢ型肝炎ウイルスのＳ、ＭおよびＬタンパク質、Ｂ型肝炎ウイルスのプレＳ抗原ならびに他の肝炎（例えば、Ａ型、Ｂ型およびＣ型肝炎ウイルス成分、例えばＣ型肝炎ウイルスＲＮＡ）；インフルエンザウイルス抗原、例えばヘマグルチニンおよびノイラミニダーゼならびに他のインフルエンザウイルス成分；麻疹ウイルス抗原、例えば麻疹ウイルス融合タンパク質および他の麻疹ウイルス成分；風疹ウイルス抗原、例えばタンパク質Ｅ１およびＥ２ならびに他の風疹ウイルス成分；ロタウイルス抗原、例えばＶＰ７ｓｃおよび他のロタウイルス成分；サイトメガロウイルス抗原、例えばエンベロープ糖タンパク質Ｂおよび他のサイトメガロウイルス抗原成分；呼吸器合胞体ウイルス抗原、例えばＲＳＶ融合タンパク質、Ｍ２タンパク質および他の呼吸器合胞体ウイルス抗原成分；単純ヘルペスウイルス抗原、例えば前初期タンパク質、糖タンパク質Ｄおよび他の単純ヘルペスウイルス抗原成分；水疱瘡ウイルス抗原、例えばｇｐＩ、ｇｐＩＩおよび他の水疱瘡ウイルス抗原成分；日本脳炎ウイルス抗原、例えばタンパク質Ｅ、Ｍ－Ｅ、Ｍ－Ｅ－ＮＳ１、ＮＳ１、ＮＳ１－ＮＳ２Ａ、８０％Ｅおよび他の日本脳炎ウイルス抗原成分；狂犬病ウイルス抗原、例えば狂犬病糖タンパク質、狂犬病核タンパク質および他の狂犬病ウイルス抗原成分である。ウイルス抗原のさらなる例については、Ｆｉｅｌｄｓ Ｂ，Ｋｎｉｐｅ Ｄ，Ｅｄｓ．，“Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ”，２ｎｄ Ｅｄ．（Ｒａｖｅｎ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ＮＹ，ＵＳ，１９９１）参照。
【００２０】
本明細書で使用される「抗原負荷抗原提示細胞」という用語は、抗原を捕捉して、それぞれＨＬＡ－クラスＩＩおよびＨＬＡ－クラスＩ分子と結合しているＣＤ４Ｔヘルパー細胞およびＣＤ８細胞傷害性Ｔリンパ球への提示のためにそれをプロセシングしている樹状細胞を指す。

【００２１】
本明細書で使用される「抗レトロウイルス療法」または「ＡＲＴ」という用語は、１つ以上の抗レトロウイルス薬を投与してＨＩＶの複製を阻害することを指す。典型的には、ＡＲＴは、少なくとも１つの抗レトロウイルス剤（または、一般的には抗レトロウイルス薬のカクテル）、例えば、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（例えば、ジドブジン、ＡＺＴ、ラミブジン（３ＴＣ）およびアバカビル）、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（例えば、ネビラピンおよびエファビレンツ）およびプロテアーゼ阻害剤（例えば、インジナビル、リトナビルおよびロピナビル）の投与を含む。高活性抗レトロウイルス療法（「ＨＡＡＲＴ」）という用語は、ウイルス複製およびＨＩＶ疾患の進行を積極的に抑制するために設計された治療計画を指し、通常、３つ以上の異なる薬物、例えば２つのヌクレオシド逆転写酵素阻害剤およびプロテアーゼ阻害剤からなる。
【００２２】
本明細書で使用される「自己」という用語は、ＨＩＶ－１ウイルス粒子および樹状細胞のドナーおよびレシピエントが同じ被験体であることを意味する。
【００２３】
本明細書で使用される「細胞」という用語は「宿主細胞」と同等であり、本発明のウイルスゲノム、ベクターまたはＨＩＶ－１ウイルス粒子が導入された細胞を指すことを意図する。このような用語は特定の被験細胞だけではなく、このような細胞の子孫または潜在的な子孫も指すことを理解するべきである。変異または環境の影響のいずれかによりある特定の改変が後代に生じ得るので、このような子孫は実際には親細胞と同一ではなくてもよいが、本明細書で使用される用語の範囲内に依然として含まれ得る。
【００２４】
本明細書で使用される「含んでなる」または「含む」という用語は、一般に認められている特許実務に従って「からなる」も開示する。
【００２５】
本明細書で使用される「成熟に適切な条件」という表現は、未成熟樹状細胞を、前記細胞の成熟を達成するのに適切な条件下で培養することを指す。成熟に適切な条件は、当業者には周知である。成熟樹状細胞は、未成熟樹状細胞を、有効量または有効濃度の樹状細胞成熟剤と接触させることによって調製する（すなわち、成熟させる）ことができる。樹状細胞成熟剤としては、例えば、ＢＣＧ、ＩＦＮ－γ、ＬＰＳ、モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬ）、エリトラン（ＣＡＳ番号１８５９５５－３４－４）、ＴＮＦ－αおよびそれらの類似体が挙げられ得る。ＢＣＧの有効量は、典型的には、組織培養培地１ミリリットル当たり約10^5～10^7ｃｆｕの範囲である。ＩＦＮ－γの有効量は、典型的には、組織培養培地１ミリリットル当たり約１００～１０００Ｕの範囲である。カルメット－ゲラン菌（ＢＣＧ）は、Ｍ．ｂｏｖｉｓの非病原性株である。本明細書で使用されるＢＣＧは、ＢＣＧ全体、ならびに細胞壁構成成分、ＢＣＧ由来のリポアラビドマンナン（ｌｉｐｏａｒａｂｉｄｏｍａｎｎａｎｓ）、および２型免疫応答の誘導に関連する他のＢＣＧ成分を指す。ＢＣＧは場合により不活性化されていてもよく、例えば、加熱熱不活性化ＢＣＧまたはホルマリン処理されたＢＣＧである。典型的には、未成熟ＤＣを、有効量のＢＣＧおよびＩＦＮ－γと約１時間～約４８時間接触させる。適切な培養培地としては、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）、ＲＰＭＩ１６４０、ＤＭＥＭまたはＸ－ＶＩＶＯ１５（商標）が挙げられる。細胞の成熟を促進するために、アミノ酸、ビタミン、サイトカイン（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ）または二価陽イオンを組織培養培地に補充することができる。典型的には、約５００単位／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦが使用される。
【００２６】
本明細書で使用される「免疫原のプロセシングおよび抗原提示細胞による提示に適した条件」という表現は、免疫原の捕捉、および前記免疫原をプロセシングして免疫系の他の細胞に提示することを可能にする適切な培地中で樹状細胞をインキュベートすることを指す。
【００２７】

本明細書で使用される「接触させる」という用語は、樹状細胞に負荷しようとする免疫原の存在下で、未成熟樹状細胞をインキュベートすることを指す。未成熟ＤＣは前記免疫原を捕捉してインターナライズし、それにより、抗原負荷樹状細胞（抗原パルス樹状細胞とも称される）になることができる。未成熟ＤＣによる抗原の捕捉は、マクロピノサイトーシス（受容体を介した抗原の捕捉およびアポトーシス小体の貪食）によって媒介される。好ましくは、前記インキュベーションは、３７℃で６時間実施される。抗原負荷工程またはパルスの成功は、パルス樹状細胞を洗浄して捕捉されていない免疫原を除去し、前記パルス樹状細胞を溶解して細胞内抗原含有量をＥＬＩＳＡアッセイによって測定することによってアッセイすることができる。例えば、免疫原がＨＩＶウイルス粒子である場合、ウイルス粒子のカプシド表面上に存在するｐ２４^{Ｇａｇ}抗原の細胞内含有量をアッセイすることができる。

【００２８】

本明細書で使用される「樹状細胞」という用語は、リンパ組織または非リンパ組織に見られる形態学的に類似の細胞型の多様な集団の任意のメンバーを指す。樹状細胞は「プロフェッショナル」抗原提示細胞の一種であり、ＨＬＡ拘束性Ｔ細胞を感作する高い能力を有する。具体的には、樹状細胞としては、例えば、形質細胞様樹状細胞、骨髄樹状細胞（未成熟樹状細胞および成熟樹状細胞を含む一般に使用される樹状細胞）、ランゲルハンス細胞（皮膚の抗原提示細胞として重要な骨髄樹状細胞）、指状嵌入細胞（リンパ節および脾臓のＴ細胞領域に分布しており、Ｔ細胞への抗原提示において機能すると考えられている）が挙げられる。これらのＤＣ集団はすべて、骨髄造血細胞に由来する。樹状細胞としては、Ｂ細胞への抗原提示細胞として重要であるが骨髄造血細胞に由来しない濾胞樹状細胞も挙げられる。樹状細胞は、機能によって、または表現型によって、特に細胞表面の表現型によって認識され得る。これらの細胞は、それらの独特の形態（細胞表面上にベール様の突起を有する）を特徴とし、高レベルの表面ＨＬＡ－クラスＩＩ発現およびＴ細胞（特に、ナイーブＴ細胞）への抗原提示能を媒介する。Ｓｔｅｉｎｍａｎ　Ｒ，ｅｔ　ａｌ．，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９１；９：２７１－１９６参照。樹状細胞の細胞表面は、細胞表面マーカーＣＤ１ａ＋、ＣＤ４＋、ＣＤ８６＋またはＨＬＡ－ＤＲ＋の発現を特徴とする。

【００２９】

本明細書で使用される「樹状細胞成熟剤」という用語は、樹状細胞と共にインキュベートすると、樹状細胞の成熟をもたらすことができる化合物を指す。

【００３０】

本明細書で使用される「樹状細胞前駆体」という用語は、適切なサイトカイン（すなわち、Ｇ－ＣＳＦ、ＧＭ－ＣＳＦ、ＴＮＦ－α、ＩＬ－４、ＩＬ－１３、ＳＣＦ（ｃ－ｋｉｔリガンド）、Ｆｌｔ－３リガンドまたはそれらの組み合わせ）の存在下で未成熟樹状細胞に分化することができる任意の細胞を指す。樹状前駆細胞の例としては、限定されないが、骨髄樹状前駆細胞、リンパ系樹状前駆細胞、形質細胞様樹状前駆細胞、特に単球が挙げられる。樹状前駆細胞の様々なサブセットによって発現される表現型表面マーカーは当技術分野で周知であり、例えば、フローサイトメトリーによって、または免疫組織化学的技術を使用して同定の目的に使用することができる。

【００３１】

本明細書で使用される「樹状細胞ワクチン」という用語は、免疫応答が望まれる抗原が負荷された樹状細胞を含むワクチンを指す。

【００３２】

本明細書で使用される「ＨＩＶ感染症に関連する疾患」という表現は、被験体がＡＩＤＳを発症している状態を含むが、ＨＩＶに感染した被験体が疾患のいかなる兆候または症候も示していない状態も含む。

【００３３】

本明細書で使用される「抗原提示細胞に負荷された抗原に対する免疫応答を必要とする疾患」という表現は、抗原の投与によって予防または治療可能な任意の疾患を指す。適切

な疾患としては、限定されないが、感染性疾患（例えば、ＨＩＶ）および癌が挙げられる。

【００３４】

本明細書で使用される「ジスルフィラム」という用語は、アルコール依存症の治療に広く使用されているＦＤＡ承認薬である化学物質（Ａｎｔａｂｕｓｅ（登録商標）またはテトラエチルチウラムジスルフィドとしても公知である）を指す。前記化合物はまた、ＨＩＶヌクレオカプシドタンパク質のジンクフィンガードメインからの金属放出を促進する。

【００３５】

本明細書で使用される「ＧＭ－ＣＳＦ」という用語は、任意の種または供給源由来の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｎｇ ｆａｃｔｏｒ）または顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ｇｒａｎｕｌｏｃｙｔｅ ｍａｃｒｏｐｈａｇｅ ｃｏｌｏｎｙ ｓｔｉｍｕｌａｔｉｏｎ ｆａｃｔｏｒ）を指し、タンパク質マウスＧＭ－ＣＳＦ（ＧｅｎＢａｎｋ ＮＭ００９９６９）およびヒトＧＭ－ＣＳＦ（ＧｅｎＢａｎｋ ＢＣ１０８７２４）の全長タンパク質および断片または部分を含む。一実施形態では、ＧＭ－ＣＳＦは、ヒトまたはマウスに由来する。別の実施形態では、ＧＭ－ＣＳＦタンパク質は、全長ＧＭ－ＣＳＦと比較して、カルボキシ末端の最後の１０アミノ酸の配列を欠いている。本明細書で使用される「ＧＭ－ＣＳＦ断片」という用語は、幹細胞を刺激して顆粒球（好中球、好酸球および好塩基球）および単球を産生させることができるＧＭ－ＣＳＦポリペプチドの全長の少なくとも１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％またはそれ以上を含有するＧＭ－ＣＳＦペプチドの部分を意味する。

【００３６】

本明細書で使用される「ｇｐ１３０利用サイトカイン」という用語は、ｇｐ１３０を含有する受容体を介してシグナリングするサイトカインを指す。シグナル伝達成分の糖タンパク質１３０（ｇｐ１３０）（ＣＤ１３０とも称される）は、ＩＬ－６受容体ファミリー内でＩ型サイトカイン受容体の１個のサブユニットを形成する膜貫通タンパク質である。本発明に有用なｇｐ１３０利用サイトカイン（ＩＬ－６様サイトカインとしても公知である）としては、インターロイキン６（ＩＬ－６）、インターロイキン１１（ＩＬ－１１）、インターロイキン２７（ＩＬ－２７）、毛様体神経栄養因子（ＣＮＴＦ）、カルジオトロフィン－１（ＣＴ－１）、カルジオトロフィン様サイトカイン（ＣＬＣ）、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、オンコスタチンＭ（ＯＳＭ）およびカポジ肉腫関連ヘルペスウイルスインターロイキン６様タンパク質（ＫＳＨＶ－ＩＬ６）が挙げられる。

【００３７】

本明細書で使用される「ＨＩＶ免疫原」という用語は、被験体において免疫応答を生じさせることができるＨＩＶ由来のタンパク質またはペプチド抗原を指し、さらには、ウイルス粒子全体であるか、または１つ以上のウイルス成分を欠いているが免疫応答を生じさせる能力を保持しているウイルス粒子であるＨＩＶウイルス粒子を指す。本発明にしたがって使用するためのＨＩＶ免疫原は、任意のＨＩＶ単離株（例えば、任意の初代または培養ＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２またはＨＩＶ－３単離株、株またはクレード）から選択され得る。ＨＩＶ単離株は、現在、個別の遺伝子サブタイプに分類されている。ＨＩＶ－１は、少なくとも１０個のサブタイプ（Ａｌ、Ａ２、Ａ３、Ａ４、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、ＰＬ Ｆ２、Ｇ、Ｈ、ＪおよびＫ）を含むことが公知である。Ｔａｙｌｏｒ Ｂ，ｅｔ ａｌ．，Ｎｅｗ Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ ２００８；３５９（１８）：１９６５－１９６６参照。ＨＩＶ－２は、少なくとも５個のサブタイプ（Ａ、Ｂ、Ｃ、ＤおよびＥ）を含むことが公知である。サブタイプＢは、世界中で男性同性愛者および静注薬物使用者におけるＨＩＶの蔓延に関連している。ほとんどのＨＩＶ－１免疫原、実験適合単離株、試薬およびマッピングされたエピトープは、サブタイプＢに属する。新たなＨＩＶ感染症の発生率が高い地域であるサハラ以南のアフリカ、インドおよび中国では、ＨＩＶ－１サブタイプＢは感染のごく少数を占めるに過ぎず、ＨＩＶ－１サブタイプＣが最も多く感染しているサブタイプのようである。したがって、ある特定の実施形態では、特定のサブタイプ（例えば、H

ＩＶ－１のサブタイプＢまたはＣ）から免疫原を選択することが好ましい場合がある。複数のＨＩＶサブタイプ（例えば、ＨＩＶ－１サブタイプＢおよびＣ、ＨＩＶ－２サブタイプＡおよびＢ、またはＨＩＶ－１、ＨＩＶ－２もしくはＨＩＶ－３サブタイプの組み合わせ）に由来する免疫原を単一の免疫学的組成物中に含めることが望ましい場合がある。

【００３８】

本明細書で使用される「ＨＩＶ－１ウイルス粒子」という用語は、２，０００コピーのウイルスタンパク質ｐ２４から構成される円錐形のカプシドによって囲まれた９個のウイルス遺伝子をコードする２コピーのプラス一本鎖ＲＮＡから構成される直径約１２０ｎｍのほぼ球形の構造を指す。一本鎖ＲＮＡは、ヌクレオカプシドタンパク質ｐ７およびビリオンの発達に必要な酵素、例えば逆転写酵素、プロテアーゼ、リボヌクレアーゼおよびインテグラーゼに強固に結合している。ウイルスタンパク質ｐ１７から構成されるマトリックスはカプシドを取り囲んで、ビリオン粒子の完全性を保証している。これが今度は、新たに形成されたウイルス粒子がヒト細胞から出芽するとその細胞の膜から取り込まれる二層の脂肪分子（リン脂質と称される）から構成されるウイルスエンベロープによって取り囲まれている。宿主細胞由来のタンパク質と、ウイルス粒子の表面から突出する約７０のコピーの複合ＨＩＶタンパク質とがウイルスエンベロープに埋め込まれている。このタンパク質（Ｅｎｖとして公知である）は、糖タンパク質（ｇｐ）１２０と称される３個の分子から構成されるキャップと、この構造をウイルスエンベロープにアンカリングする３個のｇｐ４１分子からなるステムとからなる。この糖タンパク質複合体は、ウイルスが標的細胞に接着してそれと融合し、感染サイクルを開始することを可能にする。

【００３９】

本明細書で使用される「ヒト免疫不全ウイルス」または「ＨＩＶ」という用語は、ＨＩＶ－１およびＨＩＶ－２を含むことを意味する。「ＨＩＶ－１」は、１型ヒト免疫不全ウイルスを意味する。ＨＩＶ－１としては、限定されないが、ＨＩＶ－１感染細胞に関連する細胞外ウイルス粒子およびＨＩＶ－１形態が挙げられる。「ＨＩＶ－２」は、２型ヒト免疫不全ウイルスを意味する。ＨＩＶ－２としては、限定されないが、ＨＩＶ－２感染細胞に関連する細胞外ウイルス粒子およびＨＩＶ－２形態が挙げられる。好ましくは、ＨＩＶはＨＩＶ－１である。

【００４０】

本明細書で使用される「未成熟樹状細胞」という用語は、Ｔ細胞活性化能力が成熟状態の樹状細胞と比較して有意に低い樹状細胞を指す。具体的には、未成熟樹状細胞は、ＬＰＳ（１μｇ／ｍＬ）を追加して２日間培養することによって成熟誘導された樹状細胞の抗原提示能の１／２未満、好ましくは１／４未満の抗原提示能を有し得る。抗原提示能は、例えば、アロＴ細胞活性化能を使用して定量することができる（混合リンパ球試験：アロＴ細胞および樹状細胞を１：１０のＴ細胞：樹状細胞比で、好ましくは様々な比で共培養し；３Ｈ－チミジンを培養終了の８時間前に追加し、Ｔ細胞のＤＮＡに取り込まれた３Ｈ－チミジンの量に基づいて、Ｔ細胞増殖能を評価する。Ｊｏｎｕｌｅｉｔ Ｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．２０００；７：２４９－２５４参照。あるいは、それは、ペプチドを使用して、特異的細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）を誘導する能力を試験することによって評価することができ、この場合、公知のクラスＩ拘束性ペプチドのある特定の抗原を樹状細胞に追加し；樹状細胞を、樹状細胞を採取した同じ健常ドナーの末梢血から得られたＴ細胞と共に共培養する（３日目以降は、ＩＬ－２を２５Ｕ／ｍＬまたは好ましくは１００Ｕ／ｍＬとする）。好ましくは、樹状細胞を用いてＴ細胞を２１日間で３回刺激し、より好ましくは、樹状細胞を用いてＴ細胞を１４日間で２回刺激する。得られたエフェクター細胞を、５１Ｃｒ標識標的細胞（ペプチド拘束性クラスＩ陽性腫瘍細胞）と共に、１００：１～２．５：１（１００：１、５０：１、２５：１、２０：１、１２．５：１、１０：１、５：１または２．５：１）の比で、好ましくは１０：１の比で４時間共培養し；標的細胞から放出された５１Ｃｒを定量する。Ｈｒｉｓｔｏｖ Ｇ，ｅｔ ａｌ．，Ａｒｃｈ．Ｄｅｒｍａｔｏｌ．Ｒｅｓ．２０００；２９２：３２５－３３２参照。さらに、未成熟樹状細胞は、好ましくは、抗原に対する食作用能を有し、より好ましくは、Ｔ細胞

活性化のための同時刺激を誘導する受容体について低い（例えば、上記のように、ＬＰＳによって誘導された成熟ＤＣと比較して有意に低い）またはネガティブな発現を示す。未成熟樹状細胞は、フローサイトメトリーまたは免疫組織化学染色によってこのような細胞を同定するのに使用することができる表面マーカーを発現する。

【００４１】

本明細書で使用される「免疫原」という用語は、注入した場合にそれ自体によって適応免疫応答を誘発することができる抗原を指す。すべての免疫原は抗原でもあるが、すべての抗原が免疫原であるわけではない。

【００４２】

本明細書で使用される「免疫原性組成物」という用語は、被験体において、特定の免疫原に対して抗体を産生する免疫応答または細胞媒介性免疫応答を引き起こす組成物を指す。免疫原性組成物は、例えば、液体溶液、懸濁液およびエマルジョンなどの注射物質として調製することができる。「抗原性組成物」という用語は、宿主免疫系によって認識され得る組成物を指す。例えば、抗原性組成物は、宿主免疫系の体液性または細胞性成分によって認識され得るエピトープを含有する。

【００４３】

本明細書で使用される場合、「不活性化ＨＩＶウイルス」という用語は、インタクトな不活性化ＨＩＶウイルスを指す。不活性化ＨＩＶは、感染または複製することができないウイルスを指す。不活化ＨＩＶウイルス全体は、一般に、免疫原性を維持して天然ウイルスに対する免疫応答を刺激するために、ウイルス抗原の天然構造を維持している。

【００４４】

本明細書で使用される「インキュベーション」という用語は、未成熟樹状細胞が成熟樹状細胞に形質転換されるまで特定の時間（好ましくは、４８時間）にわたって、成熟培地における樹状細胞の培養を維持することを指す。「培地」という用語は、適切な培養培地、１つ以上の成熟剤を含み、場合により他のサプリメントを含んでいてもよい成熟基質である。

【００４５】

本明細書で使用される「ＩＬ－４」という用語は、天然のヒトＩＬ－４の通常存在する１２９アミノ酸の配列（配列番号１）を有する任意の種の、天然のまたは組換え体のインターロイキン－４、ならびにＴｈ２細胞の分化、免疫グロブリンのクラススイッチおよびＢ細胞における抗体産生を促進する能力を維持しているその変異体を指す。Ｌｅｅ Ｆ，ｅｔ ａｌ．，米国特許第５，０１７，６９１号参照。ＩＬ－４活性は、例えば、ＥＬＩＳＡまたはＥＩＡなどの免疫学的手順によって測定することができる。

【００４６】

「本質的に不活性化されたＨＩＶの溶解物」という用語は、細胞が破壊される際に生じる溶液であって、前記ウイルスの少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％または１００％が不活性化される化学物質による不活性化手順を受けたＨＩＶビリオンを含有する溶液を指す。

【００４７】

本明細書で使用される「成熟樹状細胞」という用語は、Ｔ細胞などに対する抗原提示能が未成熟状態の樹状細胞と比較して有意に強い細胞である。具体的には、成熟樹状細胞は、ＬＰＳ（１μｇ／ｍＬ）を追加して２日間培養することによって成熟誘導された樹状細胞の抗原提示能の半分またはそれ以上（より好ましくは、同等またはそれ以上）の抗原提示能を有し得る。成熟ＤＣは、同時刺激細胞表面分子の発現のアップレギュレートを示し、様々なサイトカインを分泌する。具体的には、成熟ＤＣは、より高レベルのＨＬＡクラスＩおよびクラスＩＩ抗原（ＨＬＡ－Ａ、Ｂ、Ｃ、ＨＬＡ－ＤＲ）を発現し、一般に、ＣＤ８０、ＣＤ８３およびＣＤ８６表面マーカーの発現が陽性である。

【００４８】

本明細書で使用される「５０％組織培養感染用量」または「ＴＣＩＤ５０」という表現

は、接種した細胞培養物について５０％の病理学的変化をもたらすであろう病原体の量を意味する。

【００４９】

本明細書で使用される「薬品」という用語は、本発明の免疫原性組成物を含む医薬組成物、特にワクチンであると理解される。

【００５０】

本明細書で使用される「単球樹状細胞前駆体」またはＭｏＤＣ前駆体という用語は、その表面上にＧＭ－ＣＳＦ受容体を有する単球、およびＧＭ－ＣＳＦ反応性である他の骨髄前駆細胞を含む。これらの細胞は、それらが存在する任意の組織、特にリンパ組織、例えば脾臓、骨髄、リンパ節および胸腺から得ることができる。単球樹状細胞前駆体はまた、循環系から単離することができる。末梢血は、容易に利用可能な単球樹状細胞前駆体源である。臍帯血は、別の単球樹状細胞前駆体源である。

【００５１】

本明細書で使用される「機能的に連結された」という用語は、目的のヌクレオチド配列が、（例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写／翻訳系において、またはベクターが宿主細胞に導入される場合にはその宿主細胞において）そのヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で調節配列に連結されていることを意味することを意図する。Ａｕｅｒ　Ｈ，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００６；２４：４１－４３参照。

【００５２】

本明細書で互換的に使用される「薬学的に許容し得る担体」、「薬学的に許容し得る希釈剤」、「薬学的に許容し得る賦形剤」または「薬学的に許容し得るビヒクル」という用語は、任意の従来型の無毒の固体、半固体または液体の充填剤、希釈剤、カプセル化材料または製剤補助剤を指す。薬学的に許容し得る担体は、用いられる投与量および濃度でレシピエントに対して本質的に無毒であり、製剤の他の成分と適合する。薬学的に許容し得る担体の数および性質は、所望の投与形態に依存する。薬学的に許容し得る担体は公知であり、当技術分野で周知の方法によって調製することができる。例えば、Ｆａｕｌｉ　ｉ　Ｔｒｉｌｌｏ　Ｃ，“Ｔｒａｔａｄｏ　ｄｅ　Ｆａｒｍａｃｉａ　Ｇａｌｅｎｉｃａ”（Ｅｄ．Ｌｕｚａｎ　５，Ｓ．Ａ．，Ｍａｄｒｉｄ，ＥＳ，１９９３）およびＧｅｎｎａｒｏ　Ａ，Ｅｄ．，“Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ”２０ｔｈ　ｅｄ．（Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ＆Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，ＰＡ，ＵＳ，２００３）参照。

【００５３】

本明細書で使用される「予防」という用語は、臨床兆候の出現を防ぐために、感染の初期段階または早期段階で、本発明の免疫原性組成物またはそれを含有する薬品を投与することを意味する。

【００５４】

本明細書で使用される「炎症促進性サイトカインカクテル」という表現は、未成熟樹状細胞の成熟を引き起こすことができる２つ以上のサイトカインの混合物を指す。このようなサイトカインの例は、限定されないが、ＩＬ－１－β、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１８、ＩＬ－１１、ＩＬ－２７およびＩＦＮ－αである。適切な炎症促進性サイトカインカクテルは、限定されないが、ＴＮＦ－αおよびＣＤ４０Ｌによって形成されたカクテル；ＩＦＮ－αおよびＴＮＦ－αによって形成されたカクテル；ＩＦＮ－αおよびＣＤ４０Ｌによって形成されたカクテル；ＩＦＮ－α、ＴＮＦ－αおよびＣＤ４０Ｌによって形成されたカクテル；ＴＮＦ－α、ＩＬ－１－βおよびＩＬ－６によって形成されたカクテル；ＩＬ－１β、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－α、ＩＦＮ－γおよびポリ（Ｉ：Ｃ）によって形成されたカクテル；ＩＬ－１、ＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＦＮ－αおよびＣＤ４０Ｌによって形成されたカクテルである。

【００５５】

本明細書で使用される「プロスタグランジン」という用語は、脂肪酸から酵素的に生成

される脂質化合物であって、動物の体内で重要な機能を有する脂質化合物のグループのメンバーを指す。あらゆるプロスタグランジンは、５炭素環を含む２０個の炭素原子を含有する。本発明に有用なプロスタグランジンの例は、限定されないが、プロスタサイクリンI_2（PGI_2）、プロスタグランジンE_2（PGE_2）およびプロスタグランジン$F_{2\alpha}$（$PGF_{2\alpha}$）である。

【００５６】

本明細書で使用される「ソラレン化合物」という用語は、光活性化合物であるフロクマリンとして公知の天然産物のファミリーに属する化合物を指す。前記化合物はＤＮＡにインターカレートし、紫外線（ＵＶＡ）放射に曝露すると、ゲノム中の５’－ＴｐＡ部位でチミンと共有結合的鎖間架橋を選択的に形成することができる。

【００５７】

本明細書で使用される「ＴＬＲ４リガンド」または「ｔｏｌｌ様受容体４リガンド」という用語は、ｔｏｌｌ様受容体４（ＴＬＲ４）のリガンドを指す。ＴＬＲ４はＣＤ２８４（分化２８４のクラスタ）とも呼ばれており、病原体の認識および先天性免疫系の活性化において基本的な役割を果たすＴｏｌｌ様受容体ファミリーのメンバーである。

【００５８】

本明細書で使用される「ＴＮＦスーパーファミリーメンバー」という用語は、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）スーパーファミリーに関連するサイトカインを指す。ＴＮＦスーパーファミリーのサイトカインは、細胞生存、アポトーシス、炎症反応および細胞分化のシグナリング経路を活性化する多機能的なグループの炎症促進性サイトカインの代表的なものである。ＴＮＦスーパーファミリーメンバーの例としては、限定されないが、腫瘍壊死因子アルファ（ＴＮＦ－α）、ＬＩＧＨＴ、ＣＤ４０リガンド（ＣＤ４０Ｌ）、４－１ＢＢリガンド（４－１ＢＢＬ）、ＡＰＲＩＬ、ＣＤ２７リガンド（ＣＤ２７Ｌ）、ＣＤ３０リガンド（ＣＤ３０Ｌ）、Ｆａｓリガンド、グルココルチコイド誘導性ＴＮＦＲ関連リガンド（ＧＩＴＲＬ）、リンフォトキシンアルファ（ＬＴα）、リンホトキシンベータ（ＬＴβ）、ＯＸ４０リガンド（ＯＸ４０Ｌ）、ＮＦ－κＢリガンドの受容体活性化因子（ＲＡＮＫＬ）、ＴＮＦファミリーのＢ細胞活性化因子（ＢＡＦＦ）、ＴＮＦ関連アポトーシス誘導リガンド（ＴＲＡＩＬ）、ＴＮＦ様アポトーシス弱誘導因子（ＴＷＥＡＫ）およびＶＥＧ１が挙げられる。

【００５９】

本明細書で使用される「治療する」または「治療」という用語は、臨床兆候が現れる前または後において、疾患の進行を制御するために、本発明の免疫原性組成物またはそれを含有する薬品を投与することを指す。疾患の進行の制御は、限定されないが、症候の軽減、疾患期間の短縮、病理学的状態の安定化（具体的には、さらなる悪化の回避）、疾患の進行の遅延、病理学的状態の改善、および寛解（部分的なものおよび完全なものの両方）を含む有利なまたは所望の臨床結果を意味すると理解される。疾患の進行の制御はまた、治療を適用しない場合に予想される生存と比較して、生存を延長することを含む。本発明との関連では、「治療する」または「治療」という用語は、ＨＩＶ－１感染被験体における正常ＣＤ４＋Ｔ細胞の感染および破壊を予防するかまたはこれらを遅らせることを具体的に指す。それはまた、後天性免疫不全疾患の症候、例えば、非常に少ないＣＤ４＋Ｔ細胞数、ならびにＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉａ種、Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｉｎｉｉおよびＰｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓなどの日和見病原体による反復性感染症が発症するのを予防するかまたはこれらを遅らせることを指す。有利なまたは所望の臨床結果としては、限定されないが、完全ナイーブＣＤ４＋Ｔ細胞数の増加（範囲１０～３５２０）、全循環免疫細胞に対するＣＤ４＋Ｔ細胞の割合の増加（範囲１～５０％）、および／または非感染被験体における正常ＣＤ４＋Ｔ細胞数の割合としてのＣＤ４＋Ｔ細胞数の増加（範囲１～１６１％）が挙げられる。「治療」はまた、被験体がいかなるＨＩＶ標的化治療も受けない場合に予想される生存と比較して、感染被験体の生存を延長することを意味し得る。

【００６０】

本明細書で使用される「ワクチン」という用語は、疾患、特にウイルス性疾患に対する保護を宿主（これは、霊長類、特にヒト宿主であり得る）に付与するためのｉｎ　ｖｉｖｏ投与用免疫原性組成物を指す。

【００６１】

本明細書で使用される「ベクター」という用語は、ウイルス粒子を形成するすべてのタンパク質（一部または完全なインテグラーゼタンパク質を除く）をコードするゲノムを含む直鎖状または環状の核酸分子であって、目的の宿主細胞におけるその自律複製を提供するさらなるセグメント機能的に連結された核酸分子を表す。好ましくは、ベクターは発現ベクターであり、これは、宿主細胞における自律複製領域に加えて、本発明のゲノムに機能的に連結された領域を含有し、本発明のゲノムの産物の発現を増強することができるベクターと定義される。

【００６２】

本明細書で使用される「ウイルス粒子」という用語は、タンパク質サブユニットまたはペプチドではなく、ウイルス粒子全体を指す。ウイルス粒子（ビリオンとしても公知である）は、２つまたは３つの部分からなる：ＤＮＡまたはＲＮＡのいずれかから構成されるウイルスの遺伝物質；これらの遺伝子を保護するタンパク質コート；および、いくつかの場合では、それらが細胞外にある際にタンパク質コートを取り囲む脂質エンベロープ。ウイルス粒子の形状は、ウイルスに応じて、単純ならせん状の二十面体形態からより複雑な構造に及ぶ。

【００６３】

２．ｉｎ　ｖｉｔｒｏで抗原負荷抗原提示細胞を得るための方法

第１の態様では、本発明は、抗原負荷樹状細胞を得るためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法（本明細書では以下「本発明の第１の方法」と称される）であって、未成熟樹状細胞を、前記抗原を含む免疫原と、前記未成熟樹状細胞の成熟に適した条件下で、および細胞が基材に接着するのを防止する条件下で接触させることを含むｉｎ　ｖｉｔｒｏ方法に関する。

【００６４】

本発明の方法は、未成熟樹状細胞を、抗原を含む免疫原と、ａ）抗原提示細胞を成熟させ、ｂ）細胞が基材に接着するのを防止するのに適した条件下で接触させることを含む。

【００６５】

好ましい実施形態では、免疫原は、ウイルス粒子、好ましくはＨＩＶウイルス粒子、より好ましくはＨＩＶ－１ウイルス粒子である。ウイルス粒子は、いくつかの抗原を含有し得る。

【００６６】

ＨＩＶ－１ウイルスは、そのゲノム全体を通して非常に高度の遺伝的変異性を示す。配列比較により、Ｍ、ＯおよびＮと呼ばれる３つのＨＩＶ－１遺伝子群が同定されている。２００９年に単離されたウイルスに基づいて、第４の群「Ｐ」の存在が仮説されている。Ｍ群は、Ａ、Ｂ、Ｃ、Ｄ、Ｅ、Ｆ、Ｇ、Ｈ、ＪおよびＫと呼ばれる多遺伝的に関連する主要な遺伝子サブタイプ（またはクレード）にさらに分けられる。異なるサブタイプによる同時感染は、循環組換え型（ＣＲＦ）を生じさせる。循環サブタイプ間組換え型（ＣＲＦ）と共に、Ｍ群は、今日の世界における大部分のＨＩＶ－１変異体を含む。本発明のＨＩＶ－１ウイルスは、ヒトに感染することができる遺伝子群または遺伝子サブタイプのいずれかを表し得、循環組換え型、実験室株および初代単離株を含む。したがって、好ましい実施形態では、免疫原はＨＩＶ免疫原である。

【００６７】

適切なＨＩＶ免疫原としては、ＨＩＶエンベロープ（ｅｎｖ；例えば、ＮＣＢＩ　Ｒｅｆ．Ｓｅｑ．ＮＰＪ３５７８５６）、ｇａｇ（例えば、ｐ６、ｐ７、ｐ１７、ｐ２４、ＧｅｎＢａｎｋ　ＡＡＤ３９４００．１）、ｐｏｌコードプロテアーゼ（例えば、ＵｎｉＰｒｏｔ　Ｐ０３３６６）、ｎｅｆ（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ　ＣＡＡ４１５８５．１、Ｓｈｕｇａｒｓ　Ｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．１９９３；６７（８）：４６３９－４６５０）、ならびにそれらの変異体、誘導体および融合タンパク質が挙げられる。Ｇｏ

ｍｅｚ Ｃ，ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ ２００７；２５：１９６９－１９９２参照。所望により、当業者であれば、適切な株および組み合わせを選択し得る。

【００６８】

本発明のＨＩＶ免疫原は、免疫応答を誘発することができる。特に、「免疫応答」は、ＨＩＶ感染に対するＣＤ４＋Ｔ細胞またはＣＤ８＋Ｔ細胞媒介性免疫応答を指す。ＨＩＶに対する免疫応答は、例えば、ウイルス負荷、Ｔ細胞増殖、Ｔ細胞生存、Ｔ細胞によるサイトカイン分泌、または抗原特異的抗体産生の増加（例えば、抗体濃度）を測定することによって決定することができる。

【００６９】

この方法の第１の工程は、前記抗原提示細胞の成熟に適した条件下で行われる。好ましい実施形態では、未成熟樹状細胞の成熟に適した条件は、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の組み合わせと接触させることを含む。

【００７０】

ＧＭ－ＣＳＦは、１００～１５００ＩＵ／ｍＬ、好ましくは３００～１３００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは５００～１２００ＩＵ／ｍＬ、例えば７００～１１００ＩＵ／ｍＬなど、最も好ましくは約１０００ＩＵ／ｍＬの濃度で使用することができる。精製ＧＭ－ＣＳＦまたは組換えＧＭ－ＣＳＦ、例えば組換えヒトＧＭ－ＣＳＦ（Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，ＵＳ）またはサルグラモスチム（Ｌｅｕｋｉｎｅ（登録商標），Ｂａｙｅｒ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．，Ｗａｙｎｅ，ＮＪ，ＵＳ）のいずれかを、本明細書に記載される方法に使用することができる。

【００７１】

ＩＬ－４は、１００～１５００ＩＵ／ｍＬ、好ましくは３００～１３００ＩＵ／ｍＬ、より好ましくは５００～１２００ＩＵ／ｍＬ、例えば７００～１１００ＩＵ／ｍＬなど、最も好ましくは約１０００ＩＵ／ｍＬの濃度で使用することができる。

【００７２】

好ましい実施形態では、両方のサイトカイン（ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４）が、１００ＩＵ／ｍＬの濃度で使用される。

【００７３】

ＤＣ成熟のための生理学的環境を再現するために、いくつかのバランスの取れた成熟剤カクテルを使用することができる。したがって、別の好ましい実施形態では、細胞成熟剤は、炎症促進性サイトカインカクテルである。好ましい実施形態では、炎症促進性サイトカインカクテルは、ＩＬ－１受容体アゴニスト、ｇｐ１３０利用サイトカインおよびＴＮＦスーパーファミリーメンバーを少なくとも含む。前記サイトカインカクテルは、他の化合物を含むことができる。

【００７４】

好ましい実施形態では、ＩＬ－１受容体アゴニストはＩＬ－１βである。好ましくは、有効なＩＬ－１β濃度は３００Ｕ／ｍＬである。別の好ましい実施形態では、ｇｐ１３０利用サイトカインはＩＬ－６である。好ましくは、有効なＩＬ－６濃度は１０００Ｕ／ｍＬのＩＬ－６である。別の好ましい実施形態では、ＴＮＦスーパーファミリーメンバーはＴＮＦ－αである。好ましくは、有効なＴＮＦ－α濃度は１０００Ｕ／ｍＬである。

【００７５】

最もよく使用されるカクテルは、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１βおよびＩＬ－６を含有する。したがって、好ましい実施形態では、炎症促進性サイトカインカクテルは、ＩＬ－１β、ＩＬ－６およびＴＮＦ－αの混合物を含む。より好ましくは、培地組成は、３００Ｕ／ｍＬのＩＬ－１β、１０００Ｕ／ｍＬのＴＮＦ－αおよび１０００Ｕ／ｍＬのＩＬ－６である。

【００７６】

プロスタグランジンを炎症促進性サイトカインカクテルに追加することにより、生成されるＤＣの収率、成熟、遊走および免疫刺激能が改善されることが開示されている。Ｊｏ

ｎｕｌｅｉｔ Ｈ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９９７；２７：３１３５－３１４２参照。したがって、好ましい実施形態では、炎症促進性サイトカインカクテルは、プロスタグランジンをさらに含む。より好ましくは、用いられるプロスタグランジンはプロスタグランジンＥ$_2$（ＰＧＥ$_2$）である。好ましくは、有効なＰＧＥ$_2$濃度は１μｇ／ｍＬである。より好ましくは、培地組成は、３００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－１β、１０００ＩＵ／ｍＬのＴＮＦ－α、１０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－６および１μｇ／ｍＬのＰＧＥ$_2$である。

【００７７】

別の実施形態では、接触工程は、細胞をＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の組み合わせと接触させる第１の工程と、細胞を上に定義した炎症促進性サイトカインカクテルと接触させる第２の工程とを含む。別の実施形態では、接触工程は、細胞をＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の組み合わせと接触させる第１の工程と、細胞をＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の組み合わせならびに上に定義した炎症促進性サイトカインカクテルと接触させる第２の工程とを含む。

【００７８】

本発明の第１の方法はまた、細胞が基材に接着するのを防止する条件下で行われる。穏やかな機械力（例えば、フラスコを少しタッピングする）を適用した後に培養レシピエント由来の上清を用いて細胞を収集して、弱く接着している細胞を剥がすことができる場合、細胞は非接着性であると判断される。好ましい実施形態では、低接着性基材を使用して、細胞が基材に接着するのを防止する。これらの基材は広く市販されており、通常、ヒドロゲル（これは親水性かつ中性であるため、負もしくは正に荷電した表面タンパク質との相互作用または疎水性相互作用を介して細胞が接着するのを防止する）によって形成される。基材は、それが単球細胞集団の接着を、接着性基材（例えば、ポリスチレン基材）に対する接着の少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％またはそれ未満にする場合、低接着性であると判断される。表面が低接着性であるかを決定するのに適切なアッセイは、当技術分野で公知である。Ｓｈｅｎ Ｍ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．２００１；５７：３３６－３４５参照。

【００７９】

本発明の方法は、成熟組成物と接触させると成熟樹状細胞に発達する未成熟樹状細胞を使用することによって行われる。

【００８０】

未成熟樹状細胞は、樹状細胞前駆体の集団から得ることができる。好ましくは、樹状細胞前駆体は、４週間以内、より好ましくは２０日間以内、さらにより好ましくは１８日間以内、なおより好ましくは１６日間以内に未成熟樹状細胞に分化することができる細胞である。好ましい実施形態では、樹状細胞前駆体は、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の存在下において７日間未満で、より好ましくは５日間で未成熟樹状細胞に分化する。

【００８１】

好ましい実施形態では、樹状前駆細胞の集団は、単球樹状細胞前駆体の集団である。より好ましくは、単球樹状細胞前駆体は、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に由来する。ＰＢＭＣは、Ｆｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ ＰＬＵＳ（エンドトキシンフリー、カタログ番号１７－１４４０－０３、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ ＡＢ，Ｕｐｐｓａｌａ，ＳＥ）による標準的な遠心分離によって、緩衝生理食塩水で１：１希釈した全血または白血球濃縮物（「バフィーコート」画分、ＭＳＫＣＣ Ｂｌｏｏｄ Ｂａｎｋ）のいずれかから得ることができる。ＭｏＤＣ前駆体は、組織培養プラスチック接着性（カタログ番号３５－３００３、Ｆａｌｃｏｎ，Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｌａｂｗａｒｅ Ｉｎｃ．，Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，ＮＪ，ＵＳ）ＰＢＭＣであり、記載されているように、ＧＭ－ＣＳＦ（１０００ＩＵ／ｍＬ）およびＩＬ－４（５００ＩＵ／ｍＬ）の存在下、完全ＲＰＭＩ１６４０＋１％正常ヒト血清（ＮＨＳ）（または１

０％ウシ胎児血清）（２日毎に交換）中で培養することができる。Ｔｈｕｒｎｅｒ Ｂ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．１９９９；２２３：１－１５およびＲａｔｚｉｎｇｅｒ Ｇ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２００４；１７３：２７８０－２７９１参照。

【００８２】

精製単球集団は、未成熟樹状細胞を得るための培養前に、ＣＤ１４$^{+}$抗体を用いてＰＢＭＣから単離することができる。単球は、通常、染色標本では大きな二葉核によって同定される。ＣＤ１４の発現に加えて、単球また、とりわけ、以下の表面マーカーの１つ以上を発現する：１２５Ｉ－ＷＶＨ－１、６３Ｄ３、アディポフィリン、ＣＢ１２、ＣＤｌＩａ、ＣＤｌＩｂ、ＣＤ１５、ＣＤ５４、Ｃｄｌ６３、シチジンデアミナーゼおよびＦＩｔ－Ｉ。Ｆｅｙｌｅ Ｄ，ｅｔ ａｌ．，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１９８５；１４７：４０９－４１９、Ｍａｌａｖａｓｉ Ｆ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１９８６；９７（２）：２７６－２８５、Ｒｕｐｅｒｔ Ｊ，ｅｔ ａｌ．，Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌ．１９９１；１８２（５）：４４９－４６４；Ｚｉｅｇｌｅｒ－Ｈｅｉｔｂｒｏｃｋ Ｈ，Ｊ．Ｌｅｕｋｏｃ．Ｂｉｏｌ．２０００；６７：６０３－６０６およびＰｉｌｌｉｎｇ Ｄ，ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ ２００９；４（１０）：ｅ－７４７５参照。

【００８３】

一般に、単球樹状細胞前駆体は、ＣＤ１３およびＣＤ３３などのマーカーの発現によって同定することができる。骨髄樹状前駆体は、ＣＤ１４またはのＣＤ１ａ経路を介して樹状細胞に分化し得る。したがって、本発明の樹状前駆細胞は、ＣＤ１４＋ＣＤ１ａ－樹状前駆細胞またはＣＤ１４－ＣＤ１ａ＋樹状前駆細胞であり得る。本発明のある特定の実施形態では、骨髄樹状前駆細胞は、ＳＣＡ－１、ｃ－ｋｉｔ、ＣＤ３４、ＣＤ１６およびＣＤ１４マーカーの発現を特徴とし得る。好ましい実施形態では、骨髄樹状前駆細胞はＣＤ１４＋単球である。ＣＤ１４＋単球はまた、ＧＭ－ＣＳＦ受容体を発現し得る。

【００８４】

本発明の第１の方法の出発物質として使用される未成熟樹状細胞は、治療されるべき被験体と同系であり得る。他の実施形態では、本発明の方法の出発物質として使用される未成熟樹状細胞は、異種樹状細胞である。例えば、移植片対宿主病を治療しようとする場合、出発物質として使用される未成熟樹状細胞は、ドナーから得られた樹状細胞である。被験体は、例えば、マウス、ラット、イヌ、ニワトリ、ウマ、ヤギ、ロバまたは霊長類であり得る。最も好ましくは、被験体はヒトである。好ましい実施形態では、未成熟樹状細胞は単球由来未成熟樹状細胞である。

【００８５】

本発明の第１の方法は、前記未成熟樹状細胞を、前記抗原を含む免疫原と、前記抗原提示細胞の成熟に適した条件下で、および細胞が基材に接着するのを防止する条件下で接触させることを含む。その結果として、抗原負荷抗原提示細胞が得られる。

【００８６】

インキュベーション時間の終了時に、成熟抗原負荷樹状細胞が得られる（すなわち、目的の抗原を有する成熟樹状細胞）。樹状細胞の成熟は、当技術分野で公知の方法によってモニタリングすることができる。ｍＤＣ表面マーカーは、フローサイトメトリーおよび免疫組織化学的染色などのアッセイで検出することができる。ｍＤＣはまた、サイトカイン産生によって（例えば、ＥＬＩＳＡ、別のイムノアッセイによって、またはオリゴヌクレオチドアレイの使用によって）モニタリングすることができる。樹状細胞の成熟は、免疫表現型によってさらに確認することができる。未成熟樹状細胞は、例えば、ＣＤ８０およびＣＤ８６からなる群より選択されるマーカーに基づいて、成熟樹状細胞から区別することができる。未成熟樹状細胞はこれらのマーカーが弱陽性、好ましくは陰性であるが、成熟樹状細胞は陽性である。

【００８７】

未成熟樹状細胞の集団を有する培養物で本発明の方法が行われる場合、成熟に適した条

件は、未成熟樹状細胞の少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％または好ましくは１００％の成熟が達成されるようなものである。

【００８８】

好ましい実施形態では、本発明の第１の方法は、免疫原パルス樹状細胞を回収することをさらに含む。前記回収は、当技術分野で公知の任意の方法によって行うことができる。好ましい実施形態では、免疫原パルス樹状細胞の回収は、成熟樹状細胞のマーカー、例えば、ＣＤ４、ＣＤ８、ＣＤ５４、ＣＤ５６、ＣＤ６６ｂおよびＣＤ８６からなる群の１つ以上に対して特異的な抗体を使用して免疫単離することによって行われる。

【００８９】

好ましい実施形態では、樹状細胞に負荷されるべき免疫原は、ウイルス粒子、好ましくはレトロウイルス粒子である。別の好ましい実施形態では、免疫原は、レンチウイルス粒子、好ましくはＨＩＶウイルス粒子である。より好ましくは、免疫原はＨＩＶ－１ウイルス粒子である。

【００９０】

ＨＩＶ－１ウイルスは、細胞表面上の共受容体を使用することによってヒトＣＤ４細胞に結合し、続いて感染する。異なるＨＩＶ－１株は、異なる共受容体を使用してヒトＣＤ４細胞に侵入する。したがって、ＨＩＶ－１ウイルスは、ウイルス株がＣ－Ｃケモカイン受容体５型（ＣＣＲ５）共受容体のみを使用してＣＤ４細胞に感染する場合にはＣＣＲ５指向性であり得；ウイルス株がＣ－Ｘ－Ｃケモカイン受容体４型（ＣＸＣＲ４）共受容体のみを使用してＣＤ４細胞に感染する場合にはＣＸＣＲ４指向性であり得；ウイルス株がＣＣＲ５またはＣＸＣＲ４共受容体のいずれかを使用してＣＤ４細胞に感染することができる場合には二重指向性であり得る。Ｗｈｉｔｃｏｍｂ Ｊ，ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｍｉｃｒｏｂ．Ａｇｅｎｔｓ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．２００７；５１（２）：５６６－５７５参照。異なる指向性ウイルスを区別するための利用可能ないくつかのアッセイがある（例えば、Ｔｒｏｆｉｌｅ（登録商標），Ｍｏｎｏｇｒａｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ，ＵＳ）。好ましい実施形態では、ＨＩＶ－１ウイルスは、ＣＸＣＲ４指向性ウイルスおよびＣＣＲ５指向性ウイルスから選択される；好ましくは、それはＣＸＣＲ４指向性ウイルスである。

【００９１】

別の実施形態では、免疫原は、不活性化ＨＩＶ粒子または本質的に不活性化されたＨＩＶの溶解物である。ウイルスまたはその溶解物は、加熱、化学物質および光化学物質などの従来の手段を使用して不活性化することができる。

【００９２】

不活性化ウイルスは、ｉｎ ｖｉｔｒｏで検出可能に感染性ではない。適用した不活性化工程によってもたらされる感染用量の減少を定量するために、および不活性化後の試料中に残っている残存感染用量を定量するために、不活性化ＨＩＶをアッセイに供する。この目的のために使用することができる方法は、当技術分野で公知である。Ａｇｒａｗａｌ Ｋ，ｅｔ ａｌ．，ＰＬｏＳ Ｏｎｅ．２０１１；６（６）：ｅ２１３３９参照。この方法は、不活性化上清（ｉｎａｃｔｉｖａｔｅｄ ｓｕｐｅｒｎａｔｎａｔｓ）を使用して許容細胞を感染させ、続いて新たに形成されたウイルスを検出することを含む。前記検出は、細胞によって産生される１ｍＬ当たりのＨＩＶ ＲＮＡコピー数、または上清１ｍＬ当たりのＨＩＶ ｐ２４抗原の量をＥＬＩＳＡ法によって測定することによって行うことができる。本発明の実験の部に記載されているように、ＨＩＶ ｐ２４抗原の産生の検出は、例えば、ＥＬＩＳＡによって行うことができる。

【００９３】

不活性化工程は、上清の感染力を対照上清（すなわち、不活化剤で処理されていない上清、または不活化剤があるのと同様の条件下でビヒクルで処理された上清）よりも少なくとも１０％、少なくとも２０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも９０％または

少なくとも１００％減少させるのに十分な時間行われる。ＨＩＶの不活性化を評価するのに適切な方法は、限定されないが、血液培養物を採取し、続いてＴ細胞培地中で培養して感染力を測定することを伴う。別の方法は、不活性化試行または処理の前後の血中に存在するウイルスコピーを定期的に（例えば、１～７日毎に）決定することである。

【００９４】

一実施形態では、免疫原は、加熱不活性化ウイルスまたはウイルス溶解物である。ＨＩＶ－１などのウイルスは、当技術分野におけるいくつかの公知のプロトコールによって加熱不活化することができる。Ｈａｒｐｅｒ Ｊ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．１９７８；２６（３）：６４６－６５９、Ｅｉｎａｒｓｓｏｎ Ｒ，ｅｔ ａｌ．，Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ １９８９；２９（２）：１４８－１５２およびＧｉｌ Ｃ，ｅｔ ａｌ．，Ｖａｃｃｉｎｅ ２０１１；２９（３４）：５７１１－５７２４参照。

【００９５】

別の実施形態では、免疫原は、化学的不活性化ウイルスまたはウイルス溶解物である。この不活性化は、ウイルスを化学物質と共にインキュベートすることによって達成することができる。本発明のさらなる態様では、ウイルスおよび化学物質の混合物を放射線照射する。好ましくは、ウイルスが不活性化されるまで、混合物を紫外線で照射する。

【００９６】

好ましい実施態様では、化学物質は、ジンクフィンガー修飾化合物である。「ジンクフィンガー修飾化合物」という用語は、ＨＩＶビリオンのヌクレオカプシドタンパク質中の基本的なジンクフィンガーを共有結合的に修飾し、それにより感染力を不活性化する化合物を指す。このような不活性化様式の利点は、ビリオン表面上のタンパク質の立体構造的および機能的完全性が保たれることである。様々な異なる機構を介して作用してヌクレオカプシドジンクフィンガーを共有結合的に修飾し、配位亜鉛の排出および感染力の喪失をもたらす多くの化合物が同定されている。これらの化合物は詳細な作用機構が異なるにもかかわらず、一般的な機構的特徴は、ヌクレオカプシドタンパク質のジンクフィンガーを構成する残基中の亜鉛配位システイン硫黄に対する選択的な化学攻撃を伴う。Ｒｏｓｓｉｏ Ｊ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．１９９８；７２（１０）：７９９２－８００１）参照。

【００９７】

本発明の方法に使用するのに適切なジンクフィンガー修飾化合物としては、限定されないが、

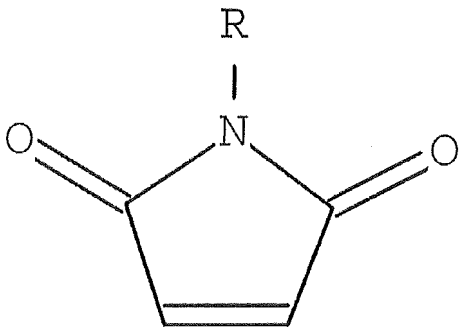
（ｉ）Ｃ－ニトロソ化合物、

（ｉｉ）アゾジカルボンアミド、

（ｉｉｉ）構造Ｒ－Ｓ－Ｓ－Ｒを有するジスルフィド、

（ｉｖ）下記構造：

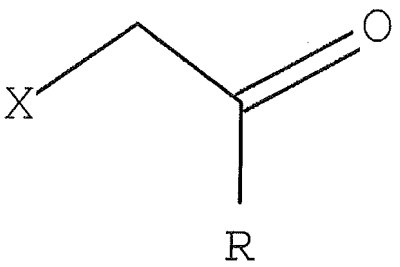
【化１】



を有するマレイミド、

（ｖ）下記構造：

【化２】



を有するα－ハロゲン化ケトン、
（ｖｉ）式Ｒ－ＮＨ－ＮＨ－Ｒを有するヒドラジド、
（ｖｉｉ）酸化窒素およびＮＯ基を含有するその誘導体、
（ｖｉｉｉ）第二銅イオンおよびＣｕ$^{2+}$を含有する錯体、
（ｉｘ）第二鉄イオンおよびＦｅ$^{3+}$を含有する錯体
（式中、Ｒは、任意の原子または分子であり、Ｘは、Ｆ、Ｉ、ＢｒおよびＣｌからなる群から選択される）
が挙げられる。

【００９８】

ジスルフィド化合物の例としては、限定されないが、以下のものが挙げられる：テトラメチルチウラムジスルフィド、テトラエチルチウラムジスルフィド、テトライソプロピルチウラムジスルフィド、テトラブチルチウラムジスルフィド、ジシクロペンタメチレンチウラムジスルフィド、イソプロピルキサンチンジスルフィド、Ｏ，Ｏ－ジエチルジチオビス－（チオホルメート）、ベンゾイルジスルフィド、ベンゾイルメチルジスルフィド、ホルムアミジンジスルフィド２ＨＣｌ、２－（ジエチルアミノ）エチルジスルフィド、アルドリチオール－２、アルドリチオール－４、２，２－ジチオビス（ピリジンＮ－オキシド）、６，６－ジチオジニコチン酸、４－メチル－２－キノリルジスルフィド、２－キノリルジスルフィド、２，２－ジチオビス（ベンゾチアゾール）、２，２－ジチオビス（４－ｔｅｒｔ－ブチル－１－イソプロピル）－イミダゾール、４－（ジメチルアミノ）フェニルジスルフィド、２－アセトアミドフェニルジスルフィド、２，３－ジメトキシフェニルジスルフィド、４－アセトアミドフェニルジスルフィド、２－（エトキシカルボキシアミド）フェニルジスルフィド、３－ニトロフェニルジスルフィド、４－ニトロフェニルジスルフィド、２－アミノフェニルジスルフィド、２，２－ジチオビス（ベンゾニトリル）、ｐ－トリルジスルホキシド、２，４，５－トリクロロフェニルジスルフィド、４－メチルスルホニル－２－ニトロフェニルジスルフィド、４－メチルスルホニル－２－ニトロフェニルジスルフィド、３，３－ジチオジプロピオン酸、Ｎ，Ｎ－ジホルミル－Ｌ－シスチン、トランス－１，２－ジチアン－４，５－ジオール、２－クロロ－５－ニトロフェニルジスルフィド、２－アミノ－４－クロロフェニルジスルフィド、５，５－ジチオビス（２－ニトロ安息香酸）、２，２－ジチオビス（１－ナフチルアミン）、２，４－ジニトロフェニル－ｐ－トリルジスルフィド、４－ニトロフェニル－ｐ－トリルジスルフィドおよび４－クロロ－３－ニトロフェニルジスルフィドホルムアミジンジスルフィドジヒドロクロリド。

【００９９】

好ましい実施形態では、ジスルフィド化合物は、ジスルフィラムまたはアルドリチオール－２（２，２’－ジチオジピリジン）の群から選択される。別の好ましい実施形態では、ジンクフィンガー修飾化合物はアルドリチオール－２である。さらに好ましい実施形態では、ジンクフィンガー修飾化合物はジスルフィラムである。

【０１００】

マレイミドの例はＮ－エチルマレイミドである。

【０１０１】

ヒドラジドの例は２－（カルバモイルチオ）－酢酸２－フェニルヒドラジドである。

【０１０２】
別の実施形態では、不活性化は光化学的なものある。好ましい実施形態では、光化学的不活性化は、ソラレン化合物を使用し、前記ソラレン化合物を活性化することができる波長でウイルスおよびソラレン化合の混合物を放射線照射することによって行われる。
【０１０３】
不活性化工程に使用することができるソラレンとしてはソラレンおよび置換ソラレンが挙げられ、該置換基は、特に１～３個の炭素原子を有するアルキル（例えば、メチル）；特に１～３個の炭素原子を有するアルコキシ（例えば、メトキシ）；および１～６個、より通常は１～３個の炭素原子と１～２個のヘテロ原子とを有する置換アルキルであり得、該ヘテロ原子は、オキシ、特にヒドロキシもしくは１～３個の炭素原子を有するアルコキシ（例えば、ヒドロキシメチルおよびメトキシメチル）、またはアミノ（モノ－およびジアルキルアミノを含む）、または合計０～６個の炭素原子を有するアミノアルキル（例えば、アミノメチル）であり得る。１～５個、通常は２～４個の置換基が存在し、これらは通常は４位、５位、８位、４’位および５’位、特に４’位に存在するであろう。
【０１０４】
ソラレンの例としては、ソラレン；５－メトキシソラレン；８－メトキシ－ソラレン；５，８－ジメトキシソラレン；３－カルボエトキシソラレン；３－カルボエトキシ－シュードソラレン；８－ヒドロキシソラレン；シュードソラレン；４，５’，８－トリメチル－ソラレン；アロソラレン；３－アセト－アロソラレン；４，７－ジメチル－アロソラレン；４，７，４’－トリメチル－アロソラレン；４，７，５’－トリメチル－アロソラレン；イソシュードソラレン；３－アセトイソシュードソラレン；４，５’－ジメチル－イソシュード－ソラレン；５’，７－ジメチル－イソシュードソラレン；シュードイソソラレン；３－アセト－シュードイソソラレン（ｓｅｕｄｏｉｓｏｐｓｏｒａｌｅｎ）；３／４’，５’－トリメチル－アザ－ソラレン；４，４’，８－トリメチル－５’－アミノ－メチルソラレン；４，４’，８－トリメチル－フタルアミル－ソラレン；４，５’，８－トリメチル－４’－アミノメチルソラレン；４，５’，８－トリメチル－ブロモソラレン；５－ニトロ－８－メトキシ－ソラレン；５’－アセチル－４，８－ジメチル－ソラレン；５’－アセト－８－メチル－ソラレン；および５’－アセト－４，８－ジメチル－ソラレンが挙げられる。より好ましい実施形態では、ソラレン化合物は、好ましくは、アモトサレン塩酸塩（Ｓ－５９）のように塩形態のアモトサレンである。残りのアモトサレンのｉｎ　ｖｉｖｏ薬理効果は意図しない。
【０１０５】
ＵＶ照射の時間は、光強度、ソラレンの濃度、ウイルスの濃度、およびウイルスが受ける放射線照射の様式（放射線照射の強度は培地で変化し得る）に応じて変化するであろう。放射線照射の時間は、光強度に反比例する。合計時間は、通常は少なくとも約５分間かつ約３０分間未満であり、一般には約５～１０分間の範囲であろう。
【０１０６】
用いられる光は、一般に、約３００ｎｍ～４００ｎｍの範囲の波長を有するであろう。通常、紫外線光源は、ＵＶＢ光を除去するためのフィルタと一緒に用いられるであろう。強度は一般に約１５０μＷ／ｃｍ^2～約１５００μＷ／ｃｍ^{2}の範囲であるが、いくつかの場合ではより高くてもよい。
【０１０７】
放射線照射混合物から未消費のソラレンまたはその副生成物を除去することが望ましい場合がある。これは、いくつかの標準的な実験手順の１つ、例えば、放射線照射の終了後に適切なサイズの膜または適切なサイズの中空繊維システムを通した透析によって容易に達成することができる。あるいは、低分子量物質の１つ以上を除去するために、アフィニティー法を使用することができる。
【０１０８】
３．抗原負荷樹状細胞および樹状細胞ワクチン
本発明の方法は、抗原パルス樹状細胞を得ることを可能にする。したがって、別の態様

では、本発明は、本発明の方法を使用することによって得られ得る抗原パルス樹状細胞に関する。

【０１０９】

本発明に適切な樹状細胞は、限定されないが、骨髄ＤＣ、形質細胞様ＤＣ、ランゲルハンス細胞および間質（ｉｎｓｔｅｒｓｔｉｔｉａｌ）ＤＣなどの様々な種類のものであり得る。最も強力なプロフェッショナルＡＰＣは、骨髄起源のＤＣである。したがって、好ましい実施形態では、ＤＣは骨髄ＤＣである。

【０１１０】

樹状細胞は、それらの特定の細胞表面マーカープロファイルによって同定することができる。この決定は、例えば、従来の方法および装置を使用してフローサイトメトリーによって行うことができる。例えば、当技術分野で十分に確立されているプロトコールにしたがって、市販されている抗体を用いた蛍光活性化細胞分類（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｃａｌｉｂｕｒ　ＦＡＣＳ，Ｂｅｃｔｏｎ－Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ　Ｌａｂｗａｒｅ　Ｉｎｃ．，Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ，ＮＪ，ＵＳ）システムを使用することができる。したがって、フローサイトメトリーにおいて、特定の細胞表面マーカーについてバックグラウンドシグナルを超えるシグナルを示す細胞を選択することができる。バックグラウンドシグナルは、従来のＦＡＣＳ分析において各表面マーカーを検出するのに使用される特異的抗体と同じアイソタイプの非特異的抗体によってもたらされるシグナル強度と定義される。マーカーを陽性と判断するためには、従来の方法および装置を使用して、観察される特異的シグナルが、バックグラウンドシグナルの強度よりも２０％超、好ましくは３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、５００％、１０００％、５０００％、１００００％またはそれ以上強くなければならない。

【０１１１】

樹状細胞は、Ｔ細胞免疫を誘導および調整する深い能力を有する。このため、それらは、ＨＩＶ感染に対するＴ細胞免疫を増強する免疫療法戦略に使用するのに理想的な生物学的薬剤になる。したがって、別の実施形態では、本発明は、本発明の方法を使用して得られ得る抗原パルス樹状細胞を含むワクチンに関する。

【０１１２】

前記樹状細胞ワクチンは、好ましくは、被験体と同系である。本明細書で使用される「自己」という用語は、それが後で再導入される被験体と同じ被験体に由来する任意の物質を指すことを意味する。最も有効な免疫療法ワクチンは、自己ＨＩＶベースの抗原を用いる（すなわち、各宿主に固有の準ウイルス種）。これまでの抗ＨＩＶ免疫療法試験における最も印象的な結果は、被験体の自己ウイルス由来の不活性化ＨＩＶビリオン全体を負荷した樹状細胞を使用している。樹状細胞はまた、同じ被験体から得られる。好ましい実施形態では、樹状細胞調製物は、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＣＤ１４＋単球が単離された被験体と同系である。

【０１１３】

別の態様では、本発明は、医薬に使用するための本発明の樹状細胞ワクチンに関する。

【０１１４】

別の態様では、本発明は、ＨＩＶ感染症またはＨＩＶ感染症に関連する疾患の治療または予防に使用するための本発明の樹状細胞ワクチンであって、免疫原がＨＩＶ免疫原である樹状細胞ワクチンに関する。

【０１１５】

別の態様では、本発明は、ＨＩＶ－１感染症またはＨＩＶ感染症に関連する疾患の被験体における治療のための薬品を調製するための本発明の樹状細胞ワクチンの使用であって、免疫原がＨＩＶ免疫原である使用に関する。

【０１１６】

別の態様では、本発明は、ＨＩＶ－１感染症またはＨＩＶ感染症に関連する疾患に罹患している被験体の治療方法であって、免疫原がＨＩＶである本発明の樹状細胞ワクチンを前記被験体に投与することを含む治療方法に関する。

【０１１７】
本発明の樹状細胞ワクチンは、治療ワクチン（すなわち、免疫応答を調節することによって闘病を支援するために、ＡＩＤＳを発症しているＨＩＶ既感染被験体に与えられる物質）であり得る。治療ＨＩＶワクチンは、ＨＩＶに対する現在の抗レトロウイルス療法選択肢の補助または代替として有望な戦略の代表的なものである。
【０１１８】
本発明の樹状細胞ワクチンは、ＡＩＤＳを発症していないＨＩＶ既感染被験体に投与されるように設計された予防ＡＩＤＳワクチンであり得る。本発明のワクチンは、健康な被験体のＨＩＶ感染を予防するために設計された予防ＡＩＤＳワクチンではない。
【０１１９】
好ましい実施形態では、本発明の樹状細胞ワクチンは、抗レトロウイルス療法（ＡＲＴ）、好ましくは高活性抗レトロウイルス療法（ＨＡＡＲＴ）中の被験体に投与される。別の好ましい実施形態では、本発明の樹状細胞ワクチンは、抗レトロウイルス療法を中止した被験体に投与される。
【０１２０】
したがって、治療ワクチンは、既感染被験体におけるＨＩＶ－１の複製を減少させ、ワクチン接種被験体におけるウイルスの感染力を制限するために適用される。
【０１２１】
前記樹状細胞ワクチンは、自己樹状細胞ワクチンであり得る。したがって、好ましい実施形態では被験体は、治療されるべき被験体は、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＣＤ１４＋単球が単離された同じ被験体である。
【０１２２】
樹状細胞ＨＩＶ治療ワクチン組成物は、被験体に再注入される。樹状細胞ＨＩＶ治療ワクチンの適切な送達経路は、静脈内、皮下、皮内または結節内の経路である。異なる経路の組み合わせも可能である。
【０１２３】
本発明の樹状細胞ワクチンは、免疫学的有効量の本発明の本質的に不活性化されたＨＩＶと、薬学的に許容し得る担体とを含む抗原負荷樹状細胞調製物である。
【０１２４】
別の実施形態では、本発明の樹状細胞ベースのワクチンは、例えば、当技術分野で公知の方法によって（例えば、皮下注射器によって）、不活性化サブタイプ特異的ＨＩＶを負荷したＡＰＣを被験体に直接送達することによって投与することができる。
【０１２５】
別の実施形態では、特定のサブタイプの不活化ＨＩＶを負荷したＡＰＣで個体を治療する。最初に、ＡＰＣにｅｘ　ｖｉｖｏで不活化ＨＩＶを負荷する。次いで、任意の適切な技術によって、負荷ＡＰＣを被験体に投与する。好ましくは、負荷ＡＰＣを個体に皮下、皮内または筋肉内注射し、好ましくは皮下注射によって注射する。より好ましくは、ＡＰＣは、治療中の被験体からＰＢＭＣを予めサンプリングすることによって得られる。ＰＢＭＣから単離した単球（ＣＤ１４＋）を未成熟樹状細胞に分化させ、次いでこれを成熟樹状細胞に発達させる。このような方法は当技術分野で周知である。
【０１２６】
別の実施形態では、不活性化ＨＩＶ全体をアジュバントと結合して、ＨＩＶ－１に対する細胞性免疫応答を誘導する。適切なアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント、不完全フロイントアジュバント、サポニン、ミネラルゲル、例えば水酸化アルミニウム、界面活性物質、例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性もしくは炭化水素エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、従来の細菌産物（例えば、コレラ毒素、易熱性エンテロトキシン、弱毒化もしくは不活化ＢＣＧ（カルメット－ゲラン菌）およびＣｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｐａｒｖｕｍまたはＢＣＧ由来のタンパク質）、生化学的分子（例えば、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１－β、ＩＬ－６、PGE_2またはＣＤ４０Ｌ）、またはＣｐＧモチーフを含有す

るオリゴデオキシヌクレオチドが挙げられる。ワクチン組成物に使用するのに適切な材料の例は、以前に開示されている。Ｏｓｏｌ Ａ，Ｅｄ．，Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡ，ＵＳ，１９８０，ｐｐ．１３２４－１３４１）参照。

【０１２７】

本発明に招集し得るアジュバントは、樹状細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞または他の抗原提示細胞内でおよび樹状細胞、Ｔ細胞、Ｂ細胞または他の抗原提示細胞上で発現されている病原体認識受容体（ＰＲＲ）の活性化に適切な任意のリガンドであり得る。ヌクレオチド結合オリゴマー化ドメイン（ＮＯＤ）受容体経路を活性化するリガンドは、本発明の目的に適したものであり得る。これらのリガンドに適切なアジュバントは、ムラミルジペプチド誘導体であり得る。ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）を活性化するリガンドもまた、本発明の目的のために招集し得る。これらの受容体はＰＲＲファミリーのメンバーであり、ＤＣ、マクロファージ、肥満細胞および好中球を含む様々な自然免疫細胞上で広く発現されている。

【０１２８】

ＴＬＲを活性化するリガンドの例として、ＴＬＲ４についてはモノホスホリルリピドＡ、３－Ｏ－脱アセチル化（ｄｅａｃｙｔｙｌａｔｅｄ）モノホスホリルリピドＡ、Ｅ．ｃｏｌｉ由来のＬＰＳ、タキソール、ＲＳＶ融合タンパク質ならびに宿主熱ショックタンパク質６０および７０、ＴＬＲ２についてはリポペプチド、例えばＮ－パルミトイル－Ｓ－２，３（ビスパルミトイルオキシ）－プロピル－システイニル（ｃｖｓｔｅｉｎｙｌ）－セリル－（リシル）３－リジン、Ｓ．ａｕｒｅｕｓのペプチドグリカン、Ｍ．ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ由来のリポタンパク質、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅのザイモサンおよびＰ．ｇｉｎｇｉｖａｌｉｓの高精製ＬＰＳ；ＴＬＲ３についてはｄｓＲＮＡ、ＴＬＲ５についてはフラジェリン、ならびにＴＬＲ７についてはイミダゾキノリンなどの合成化合物；またはＴＬＲ９についてはある種のＣｐＧリッチなＤＮＡが挙げられ得る。本発明に有用な他のアジュバントは、Ｔヘルパーエピトープであり得る。

【０１２９】

本発明のワクチンは、ＨＩＶ慢性感染個体を治療するための医薬組成物（「薬品」とも称される）に製剤化することができる。本発明の医薬組成物は、好ましくは無菌かつパイロジェンフリーであり、薬学的に許容し得る担体も含有する。薬学的に許容し得る適切な担体としては、水、食塩溶液（例えば、生理食塩水）、粘度調整剤および他の従来の医薬賦形剤またはヒトに使用するための医薬組成物の製剤化に使用される添加物が挙げられる。適切な医薬賦形剤としては、安定剤、抗酸化剤、浸透圧調整剤、緩衝液およびｐＨ調整剤が挙げられる。適切な添加物としては、生体適合性緩衝液（例えば、トロメタミン塩酸塩）、キレート剤（例えば、ＤＴＰＡ、ＤＴＰＡ－ビスアミド）もしくはカルシウムキレート錯体（例えば、カルシウムＤＴＰＡ、ＣａＮａＤＴＰＡ－ビスアミド）が挙げられ、または場合によりカルシウム塩もしくはナトリウム塩（例えば、塩化カルシウム、アスコルビン酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、乳酸カルシウム）を追加してもよい。本発明の医薬組成物の製剤化は当業者の能力の範囲内である。Ｇｅｎｎａｒｏ，２００３（前掲）参照。

【０１３０】

能動的療法による細胞性免疫応答によって緩和することができるＨＩＶ慢性感染個体を治療するための典型的な計画は、有効量の上記ワクチン組成物を、投与量の増加または追加にかかわらず、最大１週間～約２４カ月間の期間にわたって単回治療として反復して投与することを含む。

【０１３１】

本発明によれば、本発明の本質的に不活性化されたＨＩＶまたは免疫原性組成物の「免疫学的有効量」は、特異的かつ十分な免疫学的応答を被験体に引き起こして、その後のＨＩＶ曝露に対する保護を被験体に与えるのに十分なものである。この場合、有効量は、ＨＩＶに対する細胞性または体液性応答、好ましくは細胞性免疫応答を引き起こす。

【０１３２】
免疫学的有効量は、ウイルス性障害の１つ以上の症候の改善をもたらすか、またはウイルス性疾患の進行を防止するか、または疾患の退行を引き起こすか、またはウイルス伝播を減少させる。例えば、免疫学的有効量は好ましくは、少なくとも５％、好ましくは少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％またはそれ以上、伝播速度を減少させるか、またはＨＩＶウイルス負荷を減少させるか、または感染細胞の数を減少させる治療剤の量を指す。ＨＩＶに関して、免疫学的有効量はまた、少なくとも５％、好ましくは少なくとも１０％、少なくとも１５％、少なくとも２０％、少なくとも２５％、少なくとも３０％、少なくとも３５％、少なくとも４０％、少なくとも４５％、少なくとも５０％、少なくとも５５％、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％またはそれ以上、ＣＤ４＋細胞数を増加させるか、ＡＩＤＳに進行するまでの時間を増加させるか、または生存時間を増加させる治療剤の量を指す。

【０１３３】
有効投与量は、レシピエントの年齢、性別、健康および体重、もしあれば併用療法の種類、治療の頻度、所望の効果の性質に依存すると理解される。当業者であれば理解しており、過度の実験を行わずに決定可能であるように、最も好ましい投与量は、個々の被験体に合わせられるであろう。Ｇｅｎｎａｒｏ，２００３（前掲）参照。

【０１３４】
本発明の治療の有効性は、様々な手段によって、例えば、感染被験体の血中のウイルス負荷およびＣＤ４＋Ｔ細胞数をモニタリングすることによって、または細胞性免疫を測定することによって評価することができる。

【０１３５】
血中のウイルス負荷およびＣＤ４＋Ｔ細胞数のモニタリングは、標準的な手順によって行われる。ワクチンが有効である場合、治療開始後２～４週間以内に、ウイルス負荷が１ｌｏｇ以上減少するはずであり、好ましくはＨＩＶ－ＲＮＡが１ｍＬ当たり１０，０００コピー未満になるはずである。ウイルス負荷の０．５ｌｏｇ未満の減少が達成されるか、またはＨＩＶ－ＲＮＡが１００，０００を超える場合、薬物を追加または変更することによって治療を調整するべきである。被験体が臨床的に安定である場合、ウイルス負荷の測定を４～６カ月毎に反復するべきである。ウイルス負荷が治療前レベルの０．３～０．５ｌｏｇに戻る場合、治療はもはや効果がないので変更するべきである。治療開始の２～４週間以内に、ＣＤ４＋Ｔ細胞数は、１ｍｍ^{3}当たり少なくとも細胞３０個増加するはずである。これが達成されない場合、治療を変更するべきである。臨床的に安定した期間中は、３～６カ月毎にＣＤ４＋Ｔ細胞数をモニタリングするべきであり、症候性疾患がより頻繁に発生するはずである。ＣＤ４＋Ｔ細胞数がベースライン（または治療前からの増加の５０％未満）に低下した場合、治療を変更するべきである。

【０１３６】
細胞性免疫を測定するために、リンパ系組織由来のＣＤ４＋およびＣＤ８＋Ｔ細胞が豊富な細胞懸濁液を使用して、サイトカイン特異的ＥＬＩＳＰＯＴアッセイによって抗原特異的Ｔ細胞応答を定量する。Ｗｕ　Ｓ，ｅｔ　ａｌ．，１９９５，１９９７（前掲）参照。このようなアッセイは、ＩＬ－２、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－１０およびＩＦＮ－γを分泌する抗原特異的Ｔ細胞の数を測定することができる。すべてのＥＬＩＳＰＯＴアッセイは、市販されている捕捉および検出ｍＡｂ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｉｎｃ．，Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ，ＭＮ，ＵＳＡ；ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ　Ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳＡ）を使用して行われる。Ｗｕ　Ｓ，ｅｔ　ａｌ．，１９９５，１９９７（前掲）；Ｓｈａｔａ　Ｍ，２００１（前掲）参照

。各アッセイには、マイトジェン（ＣｏｎＡ）およびオボアルブミン対照が含まれる。
【０１３７】
本発明との関連では、「ＨＩＶ抗原」は、被験体において免疫応答を生じさせることができる不活性化ＨＩＶウイルス全体である。前記免疫応答は、ウイルスに対する抗体の産生または細胞媒介性免疫応答であり得る。
【０１３８】
特に、「免疫応答」は、ＨＩＶ感染に対するＣＤ８＋Ｔ細胞媒介性免疫応答を指す。ＨＩＶに対する免疫応答は、ウイルス負荷、Ｔ細胞増殖、Ｔ細胞生存、Ｔ細胞によるサイトカイン分泌、または抗原特異的抗体産生の増加（例えば、抗体濃度）などのいくつかのパラメータのいずれか１つを測定することによってアッセイすることができる。
【０１３９】
したがって、本発明の免疫原性組成物は、ＨＩＶ感染症を予防するため、または感染個体におけるＡＩＤＳへの進行を遅らせるために有用である。既知組成の無タンパク質培地中で成長させたＨＩＶから生産したＨＩＶ抗原を含有する組成物およびこのような組成物の使用方法を使用して、保存されたＨＩＶエピトープに対して特異的な強力なＴｈ１細胞性および体液性免疫応答を誘発し、ＨＩＶ特異的ＣＤ４Ｔヘルパー細胞、ＨＩＶ特異的細胞傷害性Ｔリンパ球活性を誘発し、β－ケモカイン、ＩＦＮ－γ、インターロイキン２（ＩＬ－２）、インターロイキン７（ＩＬ－７）、インターロイキン１５（ＩＬ－１５）またはα－デフェンシンなどのケモカインおよびサイトカインの産生を刺激し、記憶細胞を増加させることができる。このようなワクチンは、様々な投与経路を介して投与することができる。新生児、小児および高リスク個体のワクチン接種のために、および感染個体のワクチン接種のために、このようなワクチンを使用してＨＩＶの母性伝播を防止することができる。このようなワクチンは、場合により、ＨＩＶ抗原に対する免疫応答を増強するためのイムノマーまたは免疫刺激配列（ＩＳＳ）を含んでいてもよい。このようなワクチンはまた、ヌクレアーゼおよびプロテアーゼ阻害剤ならびにＴ２０などのウイルス侵入阻害剤の様々な組み合わせによる抗レトロウイルス療法を含む他のＨＩＶ療法と組み合わせて使用することができる。Ｂａｌｄｗｉｎ Ｃ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．２００３；１０：１６３３－１６４２参照。
【０１４０】
本発明の免疫原性組成物は、疾患の発症を予防することができるので、感染の臨床徴候を有しない被験体に投与される場合に予防的活性を有することができる。
【０１４１】
ＨＩＶ感染症またはＡＩＤＳ症候に関するＨＩＶ免疫原性組成物の有利な予防効果または治療効果としては、例えば、ＨＩＶに曝露された個体の初期感染の予防または遅延；ＨＩＶ感染個体におけるウイルス負荷の軽減；ＨＩＶ感染の無症候期の延長；抗レトロウイルス療法（ＡＲＴ）によってウイルスレベルが低下しているＨＩＶ感染被験体における低ウイルス負荷の維持；薬物未投与被験体およびＡＲＴ治療被験体における、ＨＩＶ－１特異的および非特異的なＣＤ４Ｔ細胞レベルの増加またはＣＤ４Ｔ細胞の減少の低減、ＡＩＤＳ個体における全体的な健康または生活の質の向上；ならびにＡＩＤＳ個体の平均余命の延長が挙げられる。臨床医は、免疫感作の影響を治療前の被験体の状態または未治療被験体の予想される状態と比較して、治療がＡＩＤＳの阻害に有効であるかを決定することができる。
【０１４２】
好ましい実施形態では、本発明の免疫原性組成物は、予防組成物である。
【０１４３】
本発明の免疫原性組成物は、ＨＩＶ－１感染症の治療に有用であり得る。ＨＩＶ－１またはその同等物に罹患し得るすべての動物をこの様式で治療することができるが（例えば、チンパンジー、マカク、ヒヒまたはヒト）、本発明の免疫原性組成物は、ヒトにおけるその治療的使用を特に対象とする。多くの場合、所望の治療効果をもたらすために２回以上の投与が必要であり得る；正確なプロトコール（投与量および頻度）は、標準的な臨床

手順によって確立することができる。

【０１４４】

上で言及したすべての刊行物は、その全体が引用することにより本明細書の開示の一部とされる。

【０１４５】

明確にする目的でおよび理解のために本発明を詳細に説明したが、当業者であれば、本開示を読むことで、本発明および添付の特許請求の範囲の真の範囲から逸脱することなく、形式および詳細について様々な変更を行うことができることを理解するであろう。

【実施例】

【０１４６】

一般的な手順

１．自己ＨＩＶの単離および増殖

ＨＩＶ陽性のドナー被験体から新鮮血を抽出し、抗凝固剤としてＡＣＤ（クエン酸デキストロース）、ＣＰＤ（クエン酸リン酸デキストロース）またはＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）を含むチューブに保存した。次いで、Ｆｉｃｏｌｌ密度勾配（Ａｃｃｕｓｐｉｎ Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ（登録商標），Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｏｒｐ．，Ｓａｉｎｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳ）によって、血液から末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を分離した。製造業者の手順にしたがってＣＤ１４抗体磁気マイクロビーズシステム（ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）ＣＤ１４ Ｍｉｃｒｏｂｅａｄｓ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ ＧｍｂＨ，Ｂｅｒｇｉｓｃｈ Ｇｌａｄｂａｃｈ，ＤＥ）によって、ＰＢＭＣからＣＤ１４＋単球を選択した。次に、製造業者の手順にしたがってＣＤ４＋抗体磁気マイクロビーズシステム（ＣｌｉｎｉＭＡＣＳ（登録商標）ＣＤ４ Ｍｉｃｒｏｂｅａｄｓ，Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ ＧｍｂＨ，Ｂｅｒｇｉｓｃｈ Ｇｌａｄｂａｃｈ，ＤＥ）によって、残った溶液（ＰＢＭＣ－ＣＤ１４（－））からＣＤ４＋Ｔ細胞を単離した。最後に、１０％ヒトＡＢ血清を補充したＸ－ＶＩＶＯ１５無血清造血細胞培地（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ Ｉｎｃ．，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ，ＭＤ，ＵＳ）に、ＣＤ１４＋単球およびＣＤ４＋Ｔ細胞を懸濁した。

【０１４７】

２．ＣＤ４＋Ｔ細胞およびＭΦの共培養

ＣＤ３（Ｏｒｔｈｏｃｌｏｎｅ ＯＫＴ３（登録商標），Ｊａｎｓｓｅｎ－Ｃｉｌａｇ，Ｊｏｈｎｓｏｎ＆Ｊｏｈｎｓｏｎ，Ｎｅｗ Ｂｒｕｎｓｗｉｃｋ，ＮＪ，ＵＳ）およびＩＬ－２（１８．００ＩＵ×10^6，Ｐｒｏｌｅｕｋｉｎ（登録商標），Ｐｒｏｍｅｔｈｅｕｓ Ｌａｂｓ．，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ，ＵＳ）を用いて、先の工程のＣＤ４＋Ｔ細胞を活性化した。ＣＤ１４＋単球をマクロファージに分化させた。その後、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびマクロファージを共培養した。

【０１４８】

ＣＤ３によるＣＤ４＋Ｔ細胞の活性化方法（これは、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびマクロファージの共培養の５～７日前に開始する）を開始する。最初に、５μｇ／ｍＬ ＣＤ３のＤＰＢＳ溶液（すなわち、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水）で培養フラスコを前処理し、水平位置、３７℃で少なくとも２時間インキュベートしてＣＤ３抗体をフラスコの壁に接着させた。次いで、この溶液を廃棄し、フラスコをＤＰＢＳで２回洗浄した。その後、１０％ヒトＡＢ血清および１００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２を補充したＸ－ＶＩＶＯ１５培地で構成されるｅｘ ｖｉｖｏ活性化培養培地に、ＰＢＭＣから得られたＣＤ４＋Ｔ細胞を再懸濁した。ＣＤ３で予め活性化したフラスコ中、水平位置、３７℃および５％CO_2で、前記懸濁液を約２４～４８時間インキュベートした。

【０１４９】

共培養の開始５日前に、ＣＤ３によるＣＤ４＋Ｔ細胞の活性化を終了し、新たなＩＬ－２を追加した。簡潔に言えば、前活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞を培養培地に再懸濁し、ＤＰＢＳで２回洗浄した。その後、ＣＤ３を欠く活性化培地（Ｘ－ＶＩＶＯ１５＋１０％ヒトＡＢ血清＋１００Ｕ／ｍＬのＩＬ－２）に細胞10^6個／ｍＬで細胞を再懸濁し、フラスコ中

、垂直位置、３７℃および５％CO_2でさらに３～５日間インキュベートして、ＣＤ４＋Ｔ細胞の増殖を完了した。

【０１５０】

また、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびマクロファージの共培養の５～７日前に、マクロファージへのＣＤ１４＋単球の分化を開始した。１０％ヒトＡＢ血清を補充したＸ－ＶＩＶＯ１５培地で構成されるｅｘ　ｖｉｖｏ培養培地に、ＰＢＭＣから単離したＣＤ１４＋単球を再懸濁した。ＵＬＡフラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標），Ｃｕｌｔｅｋ　ＳＵＬ，Ｂａｒｃｅｌｏｎａ，ＥＳ）中、３７℃および５％CO_2、垂直位置で、懸濁液を５～７日間インキュベートして、成熟マクロファージを得た。

【０１５１】

血液抽出の５～７日後に、ＣＤ４＋Ｔ細胞およびマクロファージの共培養を開始した。ＵＬＡフラスコ中でＣＤ４＋Ｔ細胞およびマクロファージを共培養したところ、ＣＤ１４＋単球の分化が起こった。１０％ヒトＡＢ血清を補充したＸ－ＶＩＶＯ１５培地から構成される培養培地中、ＣＤ４＋Ｔ細胞：マクロファージの関係を１：１にし、密度を細胞10^6個／ｍＬにして、共培養を開始した。ＣＤ４＋Ｔ細胞数が少なくて１：１（ＣＤ４＋Ｔ細胞：マクロファージ）の共培養液を作ることが不可能である場合、培地を調整して共培養液中の細胞密度を細胞10^6個／ｍＬにすることによって、共培養液を１：１０または１：１００（ＣＤ４＋Ｔ細胞：マクロファージ）にすることができる。必要な場合は、ＩＬ－２を追加して、共培養中のＩＬ－２最終濃度を１００ＩＵ／ｍＬにした。垂直位置、３７℃および５％CO_2で、フラスコを７～６０日間、好ましくは７～２１日間インキュベートした。ウイルスを単離および生産するためのＣＤ４＋Ｔ細胞およびマクロファージの共培養は最低期間が７日間であり、４８～６０日間まで延長することができる。共培養を開始したら培地を７日毎に交換しなければならない。

【０１５２】

ウイルス培養をモニタリングして、細胞共培養の７日目、１４日目、２１日目などにおける上清１ｍＬ当たりのＨＩＶ－１　ｐ２４抗原産生（ＥＬＩＳＡ（Ａｇ　ＨＩＶ（登録商標），Ｉｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　ＮＶ，Ｇｈｅｎｔ，ＢＥ）による）および上清１ｍＬ当たりのＨＩＶ－１　ＲＮＡコピー数（リアルタイムＲＴ－ＰＣＲ（ＰＣＲ　Ｒｅａｌ　Ｔｉｍｅ　ＣＯＢＡＳ　ＴＡＱＭＡＮ　ＨＩＶ－１　Ｔｅｓｔ，ｖ１．５，Ｒｏｃｈｅ　Ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ　Ｉｎｃ．，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ，ＵＳ）による）の両方について上清を試験することによって、共培養中のウイルス産生を分析した。

【０１５３】

この方法を用いることで、血漿１ｍＬ当たり５００個超のＣＤ４および４ｌｏｇコピーのＨＩＶ－１　ＲＮＡを有するＨＩＶ－１陽性被験体から、７日目の上清１ｍＬ当たりマイクログラム単位のＨＩＶ－１　ｐ２４抗原を生産することが可能である。

【０１５４】

３．ＨＩＶの加熱不活化

以前に公開されているプロトコールにしたがって、工程２の上清中に含まれるＨＩＶを加熱不活化して、本質的に不活性化されたＨＩＶの溶解物を生成した。Ｇｉｌ，２０１１（前掲）参照。

【０１５５】

ａ）非ｃＡＲＴドナー被験体

ＨＩＶを含有するＣＤ４＋Ｔ細胞およびＭΦ共培養上清のいくつかの１０ｍＬアリコートを、サーモミキサー（ｍｏｄｅｌ　ＡＧ　２２３３１，Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ　ＡＧ，Ｈａｍｂｕｒｇ，ＤＥ）を使用して７５０ｒｐｍで撹拌しながら５６℃で３０分間加熱処理することによって不活性化した。６０００×ｇで滅菌遠心ろ過機（ＶｉｖａＳｐｉｎ　２０，３００ｋＤａ，ｍｏｄｅｌ　ＶＳ２０５１，Ｓａｒｔｏｒｉｕｓ　ＡＧ，Ｇｏｔｔｉｎｇｅｎ，ＤＥ）を使用して２１℃で６０分間限外ろ過することによって、加熱不活性化した上清を濃縮した。各ドナー被験体について、約８０ｍＬの総プール上清容量を濃縮するために、複数のＶｉｖａＳｐｉｎ　２０フィルタが必要であった。生理食塩溶液を使用

して、遠心ろ過濃縮物を洗浄した（２１℃、６０００×ｇで６０分間にわたって３回）。各遠心ろ過機から回収した最終容量０．５ｍＬをプールし、４℃、１５０００×ｇ（ＣＨ００７４６６ローターおよびＨｅｒａｅｕｓ Ｍｕｌｔｉｆｕｇｅ １ＬＲ，Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳ）で２時間遠心分離した。ペレットを再懸濁し、１ｍＬの生理食塩溶液にプールし、５つのアリコート（各０．２ｍＬの免疫原）に分けた。この溶液を使用まで－８０℃で凍結保存した。

【０１５６】

ｂ）ｃＡＲＴドナー被験体

ＨＩＶを含有するＣＤ４＋Ｔ細胞およびＭΦ共培養上清のいくつかの１０ｍＬアリコートを、サーモミキサー（ｍｏｄｅｌ ＡＧ２２３３１，Ｅｐｐｅｎｄｏｒｆ ＡＧ，Ｈａｍｂｕｒｇ，ＤＥ）を使用して７５０ｒｐｍで撹拌しながら５６℃で３０分間加熱処理することによって不活性化した。限外ろ過に代えて超遠心分離によって、加熱不活性化した上清を先の段階のように濃縮した。Ｔ１２５０ ｆｉｂｅｒｌｉｔｅローターを使用して、滅菌ポリアロマーボトル（ｍｏｄｅｌ Ｓ５０８３，Ｓｅｔｏｎ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．，Ｐｅｔａｌｕｍａ，ＣＡ，ＵＳ）中、４℃、１００，０００×ｇで３２分間超遠心分離し、続いてＦ４５Ｌ－２４Ｘ１，５ ｆｉｂｅｒｌｉｔｅローターおよびＳｏｒｖａｌｌ ＷＸ Ｕｌｔｒａ８０遠心分離機（Ｔｈｅｒｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｎｃ．，Ｗａｌｔｈａｍ，ＭＡ，ＵＳ）を使用して、滅菌１．５ｍＬチューブ（ｍｏｄｅｌ ３５７４４８，Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｉｎｃ．，Ｂｒｅａ，ＣＡ，ＵＳ）中、４℃、１９２，０００×ｇでさらに１０分間超遠心分離することによって、上清を濃縮した。最終ペレットを１ｍＬの生理食塩水にプールし、５つのアリコート（各０．２ｍＬの免疫原）に分けた。この溶液を使用まで－８０℃で凍結保存した

【０１５７】

４．ＨＩＶの化学的不活性化

当技術分野で公知の手順にしたがって、工程２の上清中に含まれるＨＩＶを化学物質で不活化して、本質的に不活性化されたＨＩＶの溶解物を生成した。２０１１年１１月２２日に出願された欧州特許出願第１１３８２３５８．７号参照。以下の化学物質を用いた：

【０１５８】

ａ）アルドリチオール－２（２，２´－ジチオジピリジン）

当技術分野で公知のプロトコールにしたがって、アルドリチオール－２（２，２´－ジチオジピリジン）（ＡＴ－２，Ａｌｄｒｉｔｈｉｏｌ－２（登録商標），カタログ番号１４３０４９、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｏｒｐ．，Ｓａｉｎｔ Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳ）を用いて、ＨＩＶを含有するＣＤ４＋Ｔ細胞およびＭΦ共培養上清１０ｍＬを処理した。Ｒｏｓｓｉｏ Ｊ，ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．１９９８；７２（１０）：７９９２－８００１およびＡｒｔｈｕｒ Ｌ，ｅｔ ａｌ．，ＡＩＤＳ Ｒｅｓ．Ｈｕｍ．Ｒｅｔｒｏｖｉｒｕｓｅｓ １９９８；Ｓｕｐｐｌ ３：Ｓ３１１－Ｓ３１９参照。連続的に撹拌しながら、上清をＡＴ－２ １ｍＭと共に３７℃で２時間あるいは４℃で２４時間インキュベートすることができた。

【０１５９】

ｂ）ジスルフィラム

Ｃｈｅｒｔｏｖａ Ｅ．，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｅｐａｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｉｎａｃｔｉｖａｔｅｄ ａｕｔｏｌｏｇｏｕｓ ｓｕｂｊｅｃｔ ｄｅｒｉｖｅｄ ＨＩＶ－１ ｆｏｒ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｖａｃｃｉｎａｔｉｏｎ，ＨＩＶ Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ：Ｆｒｏｍ Ｉｎｆｅｃｔｉｏｎ ｔｏ Ｉｍｍｕｎｅ Ｃｏｎｔｒｏｌ（Ｘ４）２００９，Ｋｅｙｓｔｏｎｅ，Ｃｏｌｏｒａｄｏ，ＵＳにしたがって、ジスルフィラム（Ａｎｔａｂｕｓｅ（登録商標），Ｏｄｙｓｓｅｙ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ Ｉｎｃ．，Ｅａｓｔ Ｈａｎｏｖｅｒ，ＮＪ，ＵＳ）を用いて、ＨＩＶを含有するＣＤ４＋Ｔ細胞およびＭΦ共培養上清１０ｍＬを処理した。上清をジスルフィラム０．３ｍＭ

と共に３７℃で３時間インキュベートした。
【０１６０】
ｃ）アゾジカルボンアミド
先の工程から得られたＨＩＶを含有する上清に、第１の量のアゾジカルボンアミド（ＡＤＡ）（ＨＰＨ１１６，ＣＡＳ番号１２３－７７－３）を追加してウイルスを不活性化し、３７℃で２時間インキュベートした。第２の量のアゾジカルボンアミドをこの溶液に追加することによって、この不活性化をさらに強化した。この溶液を２時間インキュベートして、４時間の総インキュベーション時間を完了した。次いで、この溶液を遠心分離して第１のペレットを得た。第１のペレットを生理食塩溶液に溶解した。得られた溶液を超遠心分離して第２のペレットを得た。次いで、第２のペレットを生理食塩溶液に溶解して、不活性化ＨＩＶの濃縮物を得た。
【０１６１】
ｄ）アモトサレン
先の工程から得られたＨＩＶを含有する上清に、第１の量のアモトサレン（ＡＭＴ　ＨＣｌ，ＣＡＳ番号１６１２６２－４５－９，ＩＮＴＥＲＣＥＰＴ（登録商標），Ｃｅｒｕｓ　Ｃｏｒｐ．，Ｃｏｎｃｏｒｄ，ＣＡ，ＵＳ）を追加し、３０分間インキュベートした。この溶液を紫外線照射処理してウイルスを不活性化した。次いで、この溶液を超遠心分離して第１のペレットを得た。第１のペレットを生理食塩溶液に溶解した。得られた溶液を遠心分離して第２のペレットを得た。次いで、第２のペレットを生理食塩溶液に溶解して、不活性化ＨＩＶの濃縮物を得た。
【０１６２】
５．品質管理
ウイルスストックの５０％組織培養感染用量（ＴＣＩＤ５０）を計算するために、ならびに不活性化方法によってもたらされた感染力の減少および不活性化方法後に試料中に残っている残存感染力を定量するために、ＨＩＶ滴定アッセイをＰＢＭＣで行った。
【０１６３】
最初に、健康なドナーから新鮮血を得て、抗凝固剤としてＡＣＤ（クエン酸デキストロース）、ＣＰＤ（クエン酸リン酸デキストロース）、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）またはヘパリンを含むチューブに保存した。滴定開始の３日前に、Ｆｉｃｏｌｌ密度勾配によって血液からＰＢＭＣを分離した。ＨＩＶ－１、ＨＢｓＡｇおよびＨＣＶ抗体ならびにＨＣＶ　ＰＣＲは陰性であった。次いで、CO_2インキュベータ内において、フィトヘマグルチニン５μｇ／ｍＬを含むＲＰＭＩ基本培地（ＲＰＭＩ１６４０＋２０％ウシ胎児血清＋抗生物質）中で細胞を３７℃で１～３日間インキュベートすることによって、フィトヘマグルチニンリン酸ＰＨＡ－Ｐ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏｒｐ．，Ｓａｉｎｔ　Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳ）でＰＢＭＣを活性化した。
【０１６４】
その後、ウイルス培養培地（ＲＰＭＩ１６４０＋１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２＋２０％ウシ胎児血清＋抗生物質）に、フィトヘマグルチニンで予め刺激した細胞を再懸濁した。２００μｌの不活性化自己ＨＩＶ－１（濃縮してから生理食塩溶液で１／１５希釈物に希釈したもの）を分析した。前記希釈物は、樹状細胞をパルスするのに使用する希釈物と同等である。加えて、ウイルス培養培地（ＲＰＭＩ１６４０＋１０ＩＵ／ｍＬのＩＬ－２＋２０％ウシ胎児血清＋抗生物質）中で、２００μｌの自己ＨＩＶ－１（不活性化しておらず、濃縮していないもの）を分析した。細胞をウイルス希釈物と共にCO_2下、３７℃で一晩インキュベートした。
【０１６５】
アモトサレン、ジスルフィラム、アルドリチオール－２またはアゾジカルボンアミドによる不活性化方法は、ｐ２４タンパク質の立体構造に影響を与えない。したがって、感染後、ウイルスを接種した細胞を洗浄して上清中の過剰なｐ２４タンパク質を廃棄し、感染後に産生された新たな産物とそれを区別した。次いで、ウイルス培養培地に再懸濁した細胞をCO_2下、３７℃でさらに１０～１１日間インキュベートした。５日目または６日目

に培養培地を交換した。
【０１６６】
ＥＬＩＳＡ（ＨＩＶ－１　ｐ２４抗原－ＥＬＩＳＡ、カタログ番号Ｋ１０４８，Ｉｎｎｏｇｅｎｅｔｉｃｓ　ＮＶ，Ｇｅｎｔ，ＢＥ）によって、抗原ｐ２４を決定した。上清試料が陽性または陰性であるかを結論する基準は、平均感度が２２ｐｇ／ｍＬである、ｐ２４抗原を検出するのに使用したキットからのＨＩＶ　ｐ２４抗原の標準対照の結果に基づく。
【０１６７】
したがって、［（問題のウェルのＯＤ　Ａｇ　ｐ２４）－（対照ウェルのＯＤ　Ａｇ　ｐ２４（ｐ２４バックグラウンド））］が対照に対応するＯＤ（２２ｐｇ／ｍＬ）よりも高い場合、培養上清を陽性であると定性判断した。そして、［（問題のウェルのＯＤ　Ａｇ　ｐ２４）－（対照ウェルのＯＤ　Ａｇ　ｐ２４（ｐ２４バックグラウンド））］が対照に対応するＯＤ（２２ｐｇ／ｍＬ）以下である場合、培養上清を陰性であると定性判断した。ＯＤ：光学密度。
【０１６８】
スピアマン－カルバー（Ｓｐｅａｒｍａｎ－Ｋａｒｂｅｒ）の式：
Ｍ＝ｘｋ＋ｄ［０．５－（１／ｎ）（ｒ）］
（式中、
ｘｋ＝最高希釈の用量
ｒ＝陰性反応の合計
ｄ＝希釈間の間隔
ｎ＝希釈当たりのウェル数）にしたがって、ＴＣＩＤ５０を計算した。
【０１６９】
次いで、濃縮係数（ＣＦ）によって、ＴＣＩＤ５０値を補正した。Ｋａｒｂｅｒ　Ｇ，Ａｒｃｈ．Ｅｘｐｅｒ．Ｐａｔｈｏｌ．Ｐｈａｒｍａｋｏｌ．１９３１；１６２：４８０－４８３およびＳｐｅａｒｍａｎ　Ｃ，Ｂｒ．Ｊ．Ｐｓｙｃｈｏｌ．１９０８；２：２２７－２４２参照。
【０１７０】
実施例１
単球由来樹状細胞（ＭＤＤＣ）のｅｘ　ｖｉｖｏ作製
ドナーＨＩＶ被験体から、１５０ｍＬの新鮮血を抽出した。次いで、Ｆｉｃｏｌｌ密度勾配（Ａｃｃｕｓｐｉｎ　Ｈｉｓｔｏｐａｑｕｅ（登録商標），Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ　Ｃｏｒｐ．，Ｓａｉｎｔ　Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ，ＵＳ）によって、血液から末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を分離した。得られた溶液を１２００ｒｐｍで５分間遠心分離した。
【０１７１】
懸濁液を１８ｍＬアリコートに分けた。これらのアリコートを水平位置の７５ｃｍ^{2}接着性培養フラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃ．，Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ，ＵＳ）に入れ、３７℃で加湿５％CO_2雰囲気のインキュベータ内に２～３時間置いた。吸引によって、非接着細胞（リンパ球）を単離した。接着細胞はほとんどが単球であった。
【０１７２】
３７℃で予熱した１５ｍＬのＸ－ＶＩＶＯ１０（ｃＧＭＰ，Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ　Ｉｎｃ．，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ　ＭＤ，ＵＳ）で接着細胞（単球層）を４回洗浄した。接着単球を除去することなく、重力によって堆積した可能性のあるリンパ球混入物質を排除するために、この溶液を十分に撹拌した。
【０１７３】
続いて、この溶液の上清を廃棄した。１％自己不活性化血清、ゲンタマイシン（５０μｇ／ｍＬ、カタログ番号６３６１８３、Ｂ．Ｂｒａｕｎ　Ｍｅｄｉｃａｌ　Ｓ．Ａ．，Ｂａｒｃｅｌｏｎａ，ＥＳ）、ファンギゾン（２．５μｇ／ｍＬ、カタログ番号７６０６４５、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ　Ｓｑｕｉｂｂ　ＳＬ，Ｅｌｃｈｅ，ＥＳ）およびＡＺＴ（１μＭ、Ｒｅｔｒｏｖｉｒ（登録商標），ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ　ｐｌｃ

，Ｌｏｎｄｏｎ，ＧＢ）を補充したＸ－ＶＩＶＯ１５（ｃＧＭＰ，Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ Ｉｎｃ．，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ ＭＤ，ＵＳ）から構成される培地（「基本培養培地」）に、細胞３～４×１０^{6}個／ｍＬの濃度で、細胞を再懸濁した。

【０１７４】

同じフラスコ中で、接着単球を５日間培養した。１８ｍＬの培地（「基本培養培地」）は、１％自己不活性化血清、ゲンタマイシン（５０μｇ／ｍＬ、カタログ番号６３６１８３、Ｂ．Ｂｒａｕｎ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓ．Ａ．，Ｂａｒｃｅｌｏｎａ，ＥＳ）、ファンギゾン（２．５μｇ／ｍＬ、カタログ番号７６０６４５、Ｂｒｉｓｔｏｌ－Ｍｙｅｒｓ Ｓｑｕｉｂｂ ＳＬ，Ｅｌｃｈｅ，ＥＳ）およびＡＺＴ（１μＭ、Ｒｅｔｒｏｖｉｒ（登録商標），ＧｌａｘｏＳｍｉｔｈＫｌｉｎｅ ｐｌｃ，Ｌｏｎｄｏｎ，ＧＢ）を補充したＸ－ＶＩＶＯ１５（ｃＧＭＰ，Ｂｉｏｗｈｉｔｔａｋｅｒ Ｉｎｃ．，Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ ＭＤ，ＵＳ）から構成されていた。１０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－４および１０００ＩＵ／ｍＬの組換えヒト（ｒｈ）ＧＭ－ＣＳＦ（ｃＧＭＰ ｑｕａｌｉｔｙ ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ ＧｍｂＨ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ，ＤＥ）も各フラスコに追加した。ＩＬ－４およびＧＭ－ＣＳＦを同じ濃度で２日毎に培養物に追加した。

【０１７５】

５日間の培養後、底に依然として接着しているＭＤＤＣの剥離を促すために、１５ｍＬのＸ－ＶＩＶＯ１０でフラスコを４回洗浄することによって、ＭＤＤＣを収集した。ＭＤＤＣを５０ｍＬチューブに収集し、５０ｍＬのＸ－ＶＩＶＯ１０と共に遠心分離（２０００ｒｐｍで５分間）することによって２回洗浄した。ＭＤＤＣペレットを１０ｍＬのＸ－ＶＩＶＯ１０に再懸濁し、使用まで４℃で保存した。２００μｌアリコートを品質管理のために別にした。

【０１７６】

実施例２

接着性表面フラスコにおける自己ＭＤＤＣの成熟および不活性化ＨＩＶ－１によるパルス

５日間の培養後、実施例１で得られた１０５０万個のＭＤＤＣを２０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。沈殿物を２．８ｍＬの基本培地に再懸濁した。実施例１参照。１０^{8}コピーよりも多くのＨＩＶ－１ ＲＮＡを含有する０．２ｍＬアリコートの不活性化ＨＩＶをＸ－ＶＩＶＯ１５培地に予め再懸濁しておいたものを追加した。わずかに傾斜した垂直位置の７５ｃｍ^{2}接着性表面培養フラスコ上に、細胞をプレートした。１０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－４および１０００ＩＵ／ｍＬの組換えヒト（ｒｈ）ＧＭ－ＣＳＦ（ｃＧＭＰ ｑｕａｌｉｔｙ ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ ＧｍｂＨ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ，ＤＥ）を各フラスコ追加し、細胞を３７℃でインキュベートした。

【０１７７】

インキュベーション後、２２ｍＬの基本培養培地を、１０００ＩＵ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４ならびにそれぞれ１０００ＩＵ、１０００ＩＵおよび３００ＩＵ／ｍＬのサイトカインＩＬ－６、ＴＮＦ－αおよびＩＬ－１－βを含む成熟カクテル（ｃＧＭＰ ｑｕａｌｉｔｙ，ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ ＧｍｂＨ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ，ＤＥ）と共に追加した。前記培地中で、細胞をさらに４４時間培養した。

【０１７８】

４８時間の培養後、１アリコートのパルスＭＤＤＣを品質管理（これには、生存成熟細胞の計数、生存率の決定、免疫表現型決定およびグラム染色による微生物制御が含まれていた）のために取り出した。

【０１７９】

１％医薬ヒトアルブミンを補充した臨床生理食塩溶液で細胞を３回洗浄し、２０００ｒｐｍで５分間の連続的な遠心分離サイクルを行って、細胞ペレットを臨床生理食塩溶液に再懸濁した。細胞を０．５ｍＬの前記溶液に再懸濁した。

【０１８０】

実施例３

超低接着性フラスコにおける自己ＭＤＤＣの成熟および不活性化ＨＩＶ－１によるパルス

５日間の培養後、１０５０万個のＭＤＤＣを２０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。沈殿物を２．８ｍＬの基本培地に再懸濁した。実施例１参照。10^8コピーよりも多くのＨＩＶ－１　ＲＮＡを含有する０．２ｍＬアリコートの不活性化ＨＩＶをＸ－ＶＩＶＯ１５培地に予め再懸濁しておいたものを追加した。わずかに傾斜した垂直位置の７５ｃｍ^{2}超低接着性表面培養フラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標），カタログ番号１５３８１４，Ｃｕｌｔｅｋ，ＳＬＵ，Ｍａｄｒｉｄ，ＥＳ）上に、細胞をプレートした。１０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－４および１０００ＩＵ／ｍＬの組換えヒト（ｒｈ）ＧＭ－ＣＳＦ（ｃＧＭＰ　ｑｕａｌｉｔｙ　ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ　ＧｍｂＨ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ，ＤＥ）を各フラスコ追加し、フラスコをわずかに傾斜させて細胞を３７℃で２～４時間インキュベートした。

【０１８１】

インキュベーション後、２２ｍＬの基本培養培地を、１０００ＩＵ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４ならびにそれぞれ１０００ＩＵ、１０００ＩＵおよび３００ＩＵ／ｍＬの濃度のサイトカインＩＬ－６、ＴＮＦ－αおよびＩＬ－１－βを含む成熟カクテルと共に追加した。前記培地中で、細胞を水平位置でさらに４４時間培養した。

【０１８２】

４８時間の培養後、１アリコートのパルスＭＤＤＣを品質管理（これには、生存成熟細胞の計数、生存率の決定、免疫表現型決定およびグラム染色による微生物制御が含まれていた）のために取り出した。

【０１８３】

１％医薬ヒトアルブミン（Ｇｒｉｆｏｌｓ，ＳＡ，Ｂａｒｃｅｌｏｎａ，ＥＳ）を補充した臨床生理食塩溶液で細胞を３回洗浄し、２０００ｒｐｍで５分間の連続的な遠心分離サイクルを行って、細胞ペレットを臨床生理食塩溶液に再懸濁した。細胞を０．５ｍＬの前記溶液に再懸濁した。

【０１８４】

実施例４

PGE_2および超低接着性フラスコの使用がＭＤＤＣの成熟に及ぼす効果

５日間の培養後、１０５０万個のＭＤＤＣを２０００ｒｐｍで５分間遠心分離した。沈殿物を２．８ｍＬの基本培地に再懸濁した。実施例１参照。10^8コピーよりも多くのＨＩＶ－１　ＲＮＡを含有する０．２ｍＬアリコートの不活性化ＨＩＶをＸ－ＶＩＶＯ１５培地に予め再懸濁しておいたものを追加した。わずかに傾斜した垂直位置の７５ｃｍ^{2}超低接着性表面培養フラスコ（Ｃｏｒｎｉｎｇ（登録商標），カタログ番号１５３８１４，Ｃｕｌｔｅｋ，ＳＬＵ，Ｍａｄｒｉｄ，ＥＳ）上に、細胞をプレートした。１０００ＩＵ／ｍＬのＩＬ－４および１０００ＩＵ／ｍＬの組換えヒト（ｒｈ）ＧＭ－ＣＳＦ（ｃＧＭＰ　ｑｕａｌｉｔｙ　ＣｅｌｌＧｅｎｉｘ　ＧｍｂＨ，Ｆｒｅｉｂｕｒｇ，ＤＥ）を各フラスコ追加し、フラスコをわずかに傾斜させて細胞を３７℃で２～４時間インキュベートした。

【０１８５】

インキュベーション後、２２ｍＬの基本培養培地を、１０００ＩＵ／ｍＬのＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４ならびにそれぞれ１０００ＩＵ、１０００ＩＵ、３００ＩＵおよび１μｇ／ｍＬの濃度のサイトカインＩＬ－６、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１－βおよびPGE_2を含む成熟カクテルと共に追加した。前記培地中で、細胞を水平位置でさらに４４時間培養した。

【０１８６】

４８時間の培養後、１アリコートのパルスＭＤＤＣを品質管理（これには、生存成熟細胞の計数、生存率の決定、免疫表現型決定およびグラム染色による微生物制御が含まれていた）のために取り出した。

【０１８７】

１％医薬ヒトアルブミン（Ｇｒｉｆｏｌｓ，ＳＡ，Ｂａｒｃｅｌｏｎａ，ＥＳ）を補充した臨床生理食塩溶液で細胞を３回洗浄し、２０００ｒｐｍで５分間の連続的な遠心分離

サイクルを行って、細胞ペレットを臨床生理食塩溶液に再懸濁した。細胞を０．５ｍＬの前記溶液に再懸濁した。

【０１８８】

ＰＧＥ$_2$を成熟カクテルに追加することにより、ＨＩＶ陽性被験体のＭＤＤＣにおける成熟マーカーＣＤ８０およびＣＤ８３が増加したかを評価するために、実験を行った（ＰＧＥ$_2$、超低接着性フラスコおよびＩＬ－１５の有無）。図１参照。成熟後、フローサイトメトリーによって細胞を分析した。前記クラスタに対する特異的抗体を用いて、マーカーＣＤ８０およびＣＤ８３の蛍光強度を評価した。サイトカインおよびＰＧＥ$_2$のカクテルによる成熟は、ＰＧＥ$_2$が不存在の場合と比較して多くの量のＣＤ８０（ほぼ２倍多い）およびＣＤ８３（ほぼ１．５倍多い）マーカーを誘導した。パルス生存細胞の数がより多いことは免疫応答がより高いことに関連しているので、ＰＧＥ$_2$を成熟カクテルに追加するのと組み合わせて抗接着性フラスコを使用することにより、成熟、生存率、収率および全体的な免疫原性効力の観点から最終産物（ｍＤＣ）の質が大幅に改善された。図１および図２参照。注目するべきことに、抗接着性フラスコ（超低接着性フラスコ）を使用することにより、得られたｍＤＣの量が３倍増加した。マン－ホイットニーノンパラメトリック統計関数検定を適用することによって、いくつかの方法（超低フラスコ、ＰＧＥ$_2$およびＩＬ－１５の有無）対フェーズＩＩ法の間で有意差（ｐ＜０．０５）が認められた。図２参照。

【０１８９】

ＭＤＤＣはとりわけＣＣＲ７受容体を発現するはずであり、それにより、成熟後にリンパ節に遊走することが可能になる。これは、ＣＣＲ７受容体に結合してＭＤＤＣをリンパ節に誘導するいくつかのサイトカイン（すなわち、ＣＣＬ１９、ＣＣＬ２１）の作用を介して達成される。

【０１９０】

ＰＧＥ$_2$有無の下で得られた成熟ＭＤＤＣの遊走能を評価するために、トランスウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ　Ｉｎｃ．，Ｃｏｒｎｉｎｇ，ＮＹ，ＵＳ）において、ｅｘｖｉｖｏ遊走アッセイを実施した。簡潔に言えば、ＰＧＥ$_2$有無の下でサイトカインカクテルを用いて、４人のＨＩＶ陽性被験体のＭＤＤＣを成熟誘導した。ＭＤＤＣ（１ウェル当たり５０，０００個）がウェルの上部コンパートメントに堆積した。ＭＤＤＣ培養培地を陰性対照として使用し、ＭＤＤＣ培養培地中のＣＣＬ１９を特異的遊走を評価するのに使用した。ＣＣＬ１９ケモカインは下部コンパートメントに堆積し、５μｍ膜によって上部コンパートメントから分離した。３時間のインキュベーション後、下部コンパートメントに遊走したＭＤＤＣを収集し、フローサイトメトリー（６０秒間）によって定量した。対応のないデータについてスチューデントＴ統計関数を適用することによって、２つの方法間に有意差（ｐ≦０．００５）が認められた。ＰＧＥ$_2$有りの下でサイトカインカクテルを使用した場合、ＣＣＬ１９媒介性の遊走がより大きかった。図３参照。

【０１９１】

両方法によって得られた成熟ＭＤＤＣが特異的細胞応答を促進することができたかを評価するために、ＨＩＶ特異的Ｔ細胞応答性のＨＩＶ陽性被験体由来のＭＤＤＣを用いて、さらなる実験を行った。ＨＩＶ　Ｂａｌウイルスで ＭＤＤＣをパルスした。次いで、ＰＧＥ$_2$有無の下でサイトカインカクテルを用いて、それらを成熟誘導した。成熟後、細胞を４回洗浄し、９６ウェルプレート中で（同じ被験体由来の）自己Ｔ細胞と接触させた。ＭＤＤＣおよびリンパ球共培養上清中のリンパ球によって分泌されたＩＦＮ－γを測定することによって、ＨＩＶに対する特異的応答を求めた。対応のないデータについてスチューデントＴ統計関数を適用することによって、２つの方法間に有意差（ｐ≦０．０１）が認められた。図４参照。サイトカイン＋ＰＧＥ$_2$のカクテルを用いて成熟誘導したＭＤＤＣは、ＰＧＥ$_2$無しと比較して高い、ＨＩＶに対する特異的応答を誘発した。

【０１９２】

実施例５

非ｃＡＲＴ被験体における不活性化ＨＩＶ－１パルスＭＤＤＣによるワクチン接種

ｃＡＲＴが成功した被験体であって、１ｍｍ^{3}当たりのＣＤ４＋細胞が４５０個超である被験体３６人に、盲検プロトコール（２：１）を無作為に施した：治療群１（症例またはＤＣ－ＨＩＶ－１）：約１０^{9}ビリオンの自己不活性化ＨＩＶ－１でパルスした末梢血ＭＤＤＣ（１０^{7}個の細胞）による２週間毎の免疫感作（合計３回）（ｎ＝２４）；または、治療群２（ＤＣプラセボ治療群またはＤＣ対照）：非パルスＤＣ（ｎ＝１２）。図６参照。Ｗ０をｃＡＲＴ中断日とみなした。主要評価項目は、安全性、ウイルス負荷の変化、ならびにｃＡＲＴ前のベースライン対ｃＡＲＴ中断後１２週目および２４週目を比較した場合にウイルス負荷が１ｌｏｇ$_{10}$以上減少した被験体の割合であった。二次評価項目は、プロトコール当たりの、規定のｃＡＲＴを再開する必要がある被験体（１５日間空けた少なくとも２回の測定において、１ｍｍ^{3}当たりのＣＤ４Ｔ細胞が３００個未満に低下）の割合、ＣＤ４細胞数およびＨＩＶ－１特異的応答の変化であった。

【０１９３】

樹状細胞ワクチンは耐容性良好であり、いかなる有意な副作用もなかった。ｃＡＲＴ前のレベルと比較したウイルス負荷の平均減少は、それぞれ症例および対照（ｐ＝０．０４およびｐ＝０．０３）では、－１．０対－０．４６ｌｏｇ$_{10}$（１２週目）ならびに－０．８６および－０．２２ｌｏｇ$_{10}$（２４週目）であった。１２週目および２４週目において、それぞれ症例および対照（ｐ＝０．１０、ｐ＝０．０３）では、１ｌｏｇ以上のウイルス負荷の減少が、１０人／２２人（４５％）対２人／１１人（１８％）および７人／２０人（３５％）対０人／１０人（０％）で観察された。免疫感作被験体と対照被験体との間では、曲線下面積分析におけるウイルス負荷の変化について有意差が認められた（それぞれ－０．７２対－０．３３、ｐ＝０．０５）。図５Ｃ参照。

【０１９４】

治療群１（ＤＣ－ＨＩＶ－１、被験体１２人）および治療群３（ＤＣ－ＨＩＶ－１、被験体１２人）の曲線を融合することによって、実施例５の結果を再解釈した。治療群２の曲線は依然として対照である（ＤＣ対照、被験体１２人）。被験体は合計３６人である。（ｗｗｗ．ＳｃｉｅｎｃｅＴｒａｎｓｌａｔｉｏｎａｌＭｅｄｉｃｉｎｅ．ｏｒｇの刊行物、２　Ｊａｎｕａｒｙ　２０１３，Ｖｏｌ　５　Ｉｓｓｕｅ　１６６　１６６ｒａ，ｐ．１－９参照）。図５Ａおよび図５Ｂ参照。

【図１ＡＢ】

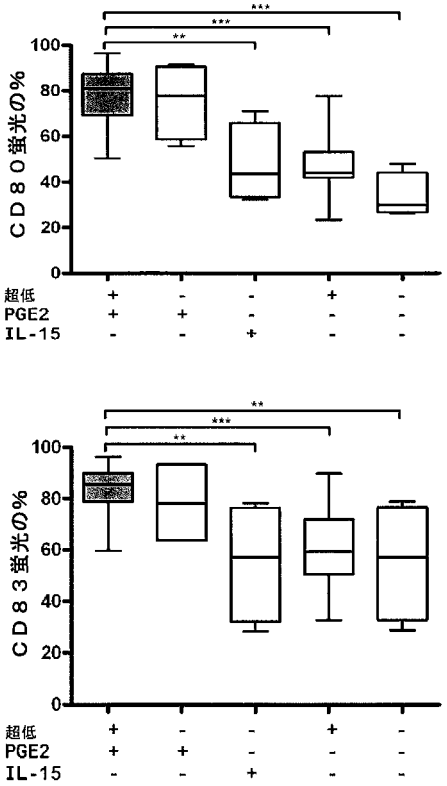


FIG: 1

【図１Ｃ】

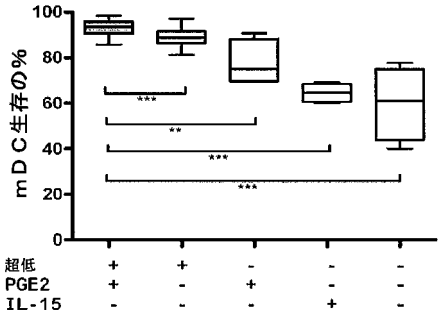


FIG: 1 (cont.)

【図２】

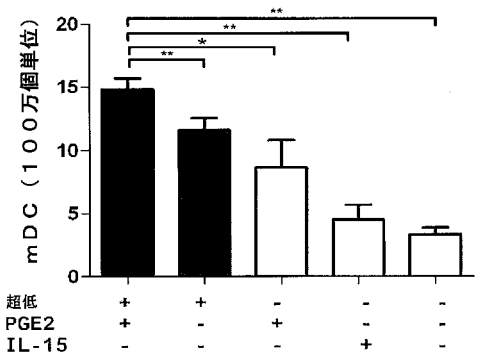


FIG: 2

【図３】

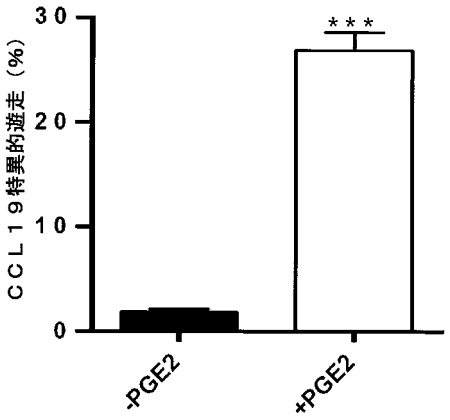


FIG. 3

【図４】

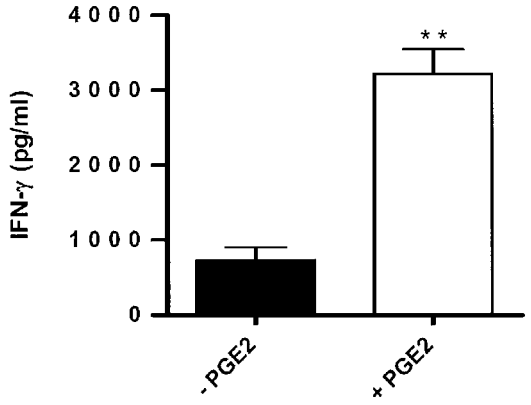


FIG. 4

【図５ＡＢ】

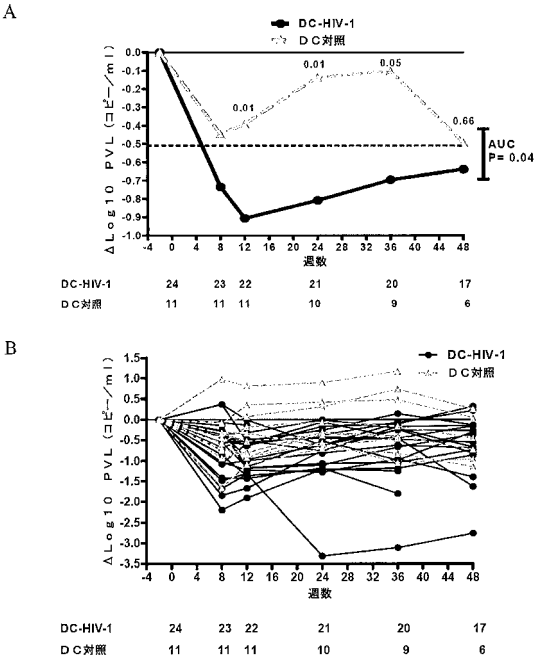


FIG. 5

【図５Ｃ】

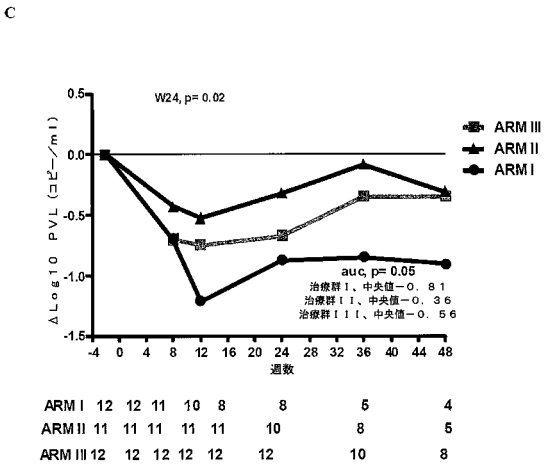


FIG. 5 (cont.)

【図６】

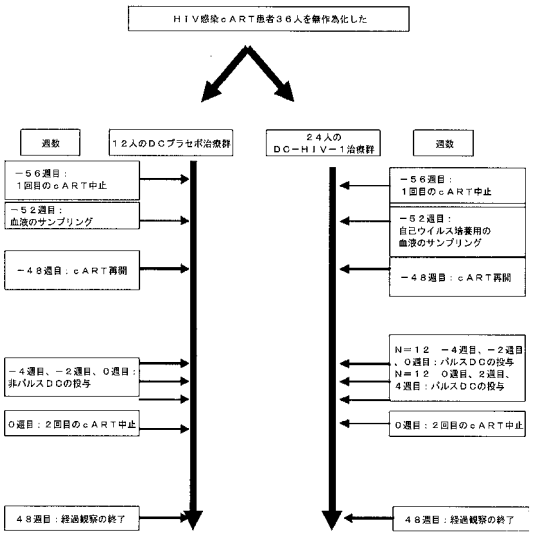


FIG. 6

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/054121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/21 C12N5/0786 A61P31/18 C12N5/0784
ADD.

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)
A61K C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, SCISEARCH, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LU WEI ET AL: "Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection", NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 10, no. 12, 1 December 2004 (2004-12-01), pages 1359-1365, XP002366699, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM1147	22-25
Y	page 1364, left-hand column, paragraph 2	1-21
X	WO 2006/038124 A1 (BIOVAXIM LTD [GB]; ANDRIEU JEAN-MARIE [FR]; WEI-LU LOUIS [FR]) 13 April 2006 (2006-04-13)	22
Y	page 11	1-21, 23-25

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 April 2013	07/05/2013

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Domingues, Helena

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/054121

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ABDOLAMIR LANDI ET AL: "Dendritic cells matured by a prostaglandin E2-containing cocktail can produce high levels of IL-12p70 and are more mature and Th1-biased than dendritic cells treated with TNF-[alpha] or LPS", IMMUNOBIOLOGY, vol. 216, no. 6, 1 June 2011 (2011-06-01), pages 649-662, XP055027884, ISSN: 0171-2985, DOI: 10.1016/j.imbio.2010.11.004 page 650, left-hand column, paragraph 2	1-25
Y	ALLARD S D ET AL: "Functional T-cell responses generated by dendritic cells expressing the early HIV-1 proteins Tat, Rev and Nef", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 26, no. 29-30, 4 July 2008 (2008-07-04), pages 3735-3741, XP022735994, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2008.04.077 [retrieved on 2008-05-20] page 3737, left-hand column	1-25
Y	CHIANG CHERYL L-L ET AL: "Optimizing parameters for clinical-scale production of high IL-12 secreting dendritic cells pulsed with oxidized whole tumor cell lysate.", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE 2011 LNKD- PUBMED:22082029, vol. 9, 2011, page 198, XP002679798, ISSN: 1479-5876 page 7	1-25
Y	WO 2007/110240 A1 (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT [DE]; SCHENDEL DOLORES J [DE]; BIGALKE IR) 4 October 2007 (2007-10-04) pages 18,23,24	1-25

-/--

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/054121

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	MARIA T RODRIGUEZ-PLATA ET AL: "HIV-1 capture and antigen presentation by dendritic cells", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US , vol. 188, no. 12 15 June 2012 (2012-06-15), pages 6036-6045, XP002676521, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/JIMMUNOL.1200267 Retrieved from the Internet: URL:http://www.jimmunol.org/content/188/12/6036 [retrieved on 2012-05-11]	22
Y,P	the whole document	1-21, 23-25

X,P	GARCÍA FELIPE ET AL: "A dendritic cell-based vaccine elicits T cell responses associated with control of HIV-1 replication.", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE 2 JAN 2013, vol. 5, no. 166, 2 January 2013 (2013-01-02), page 166ra2, XP009168872, ISSN: 1946-6242 the whole document	1-25

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2013/054121

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006038124 A1	13-04-2006	AT 401392 T	15-08-2008
		AU 2005290930 A1	13-04-2006
		BR PI0516314 A	02-09-2008
		CA 2582426 A1	13-04-2006
		CN 101056977 A	17-10-2007
		EP 1797175 A1	20-06-2007
		ES 2310848 T3	16-01-2009
		IL 182440 A	31-01-2011
		JP 2008515795 A	15-05-2008
		RU 2007115549 A	10-11-2008
		US 2006093623 A1	04-05-2006
		WO 2006038124 A1	13-04-2006
WO 2007110240 A1	04-10-2007	AU 2007229640 A1	04-10-2007
		CA 2647622 A1	04-10-2007
		EP 1840206 A1	03-10-2007
		EP 2004807 A1	24-12-2008
		US 2010284976 A1	11-11-2010
		WO 2007110240 A1	04-10-2007

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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

(71)出願人 513210116
フンダシオ プリバダ インスティトゥト デ レセルカ デラ シダーカイサ
FUNDACIO PRIVADA INSTITUT DE RECERCA DE LA SIDA－CAIXA
スペイン国 エ－０８９１６ バダロナ、カレテラ デ カニエト（番地なし）、オスピタル ウニベルシタリ ヘルマンス トゥリアス イ プホル
(74)代理人 100094640
弁理士 紺野 昭男
(74)代理人 100103447
弁理士 井波 実
(74)代理人 100111730
弁理士 伊藤 武泰
(74)代理人 100180873
弁理士 田村 慶政
(72)発明者 ガルシア アルカイデ、フェリペ
スペイン国 エ－０８０４１ バルセロナ、カリェ ランブラ ボラルト ２の２、７－１
(72)発明者 ガリャルト、テレサ
スペイン国 エ－０８０２９ バルセロナ、ボルデウス ２２、３－２
(72)発明者 クリメント ビダル、ヌリア
スペイン国 エ－０８０１３ バルセロナ、バレンシア ５３０、３
(72)発明者 ヒル ロダ、クリスティナ
スペイン国 エ－０８０１５ バルセロナ、コンテ ボレル １２２、４－２
(72)発明者 ガテル アルティガス、ジュゼップ マリア
スペイン国 エ－０８０１６ バルセロナ、サンタパウ、６２

Ｆターム(参考) 4B065 AA90X AA96X AC20 BA24 BB07 BB08 BB19 BC01 CA44
4C085 AA03 BA69 DD23 EE01
4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 NA14 ZB33 ZC55