

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5425618号
(P5425618)

(45) 発行日 平成26年2月26日(2014.2.26)

(24) 登録日 平成25年12月6日(2013.12.6)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00 Z N A A
C 12 N 5/10	(2006.01)	C 12 N 5/00 1 O 2
C 07 K 14/705	(2006.01)	C 07 K 14/705
A 61 K 39/00	(2006.01)	A 61 K 39/00 H
A 61 P 37/04	(2006.01)	A 61 P 37/04

請求項の数 20 (全 75 頁)

(21) 出願番号	特願2009-504346 (P2009-504346)
(86) (22) 出願日	平成19年4月6日(2007.4.6)
(65) 公表番号	特表2009-533025 (P2009-533025A)
(43) 公表日	平成21年9月17日(2009.9.17)
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/008734
(87) 国際公開番号	W02007/117682
(87) 国際公開日	平成19年10月18日(2007.10.18)
審査請求日	平成22年4月6日(2010.4.6)
(31) 優先権主張番号	11/400,774
(32) 優先日	平成18年4月7日(2006.4.7)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	505182915 アルゴス セラピューティクス, インコ ポレイティド アメリカ合衆国, ノース カロライナ州 27704, ドゥラム, 4233 テクノ ロジー ドライブ
(74) 代理人	100117787 弁理士 勝沼 宏仁
(74) 代理人	100091487 弁理士 中村 行孝
(74) 代理人	100107342 弁理士 横田 修孝
(74) 代理人	100111730 弁理士 伊藤 武泰

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】成熟樹状細胞組成物およびそれを培養するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

S E Q I D N O : 2 のアミノ酸残基 2 1 2 6 1 からなる組換え C D 4 0 L ポリペプチドをコードするインビトロ転写 R N A を含んでなる、樹状細胞。

【請求項 2】

前記 R N A がキャップ化および/またはポリアデニル化される、請求項 1 に記載の樹状細胞。

【請求項 3】

前記樹状細胞が抗原をコードする R N A によりトランスフェクトされるものである、請求項 1 または 2 に記載の樹状細胞。

10

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の樹状細胞を含んでなる、ワクチン。

【請求項 5】

a. I F N R アゴニストシグナル化成熟樹状細胞を產生するために、インターフェロンガンマレセプター (I F N R) アゴニストおよび T N F R アゴニストを含んでなる第一シグナルにより単離未成熟樹状細胞 (i D C) をシグナリングし、そして

b. C C R 7 + 成熟樹状細胞を產生するために、C D 4 0 L ポリペプチドをコードする R N A により前記 I F N R アゴニストシグナル化成熟樹状細胞をトランスフェクトする連続工程を含んでなり、

ここで、C D 4 0 L ポリペプチドが S E Q I D N O : 2 のアミノ酸残基 2 1 2 6 1

20

からなる、

インビトロで成熟樹状細胞（D C）を作製するための方法。

【請求項 6】

前記 C D 4 0 L タンパク質が、S E Q I D N O : 3 0 もしくはS E Q I D N O : 3 3 の c D N A、またはコドン縮重により異なるバリエントに対応する R N A によりコードされ、前記 R N A が場合によりキャップ化および／またはポリアデニル化される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記 i D C および／または前記シグナル化 D C を P G E ₂ と接触させることを更に含んでなる、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 8】

工程（a）および（b）が、前記細胞を G M - C S F および、I L - 4 または I L - 1 3 の少なくとも一方と接触させることを更に含んでなる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

工程（a）における細胞が T N F と接触させる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

工程（a）における細胞を P G E ₂ と接触させることを更に含んでなる、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記 I F N R アゴニストが I F N である、請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 12】

第一シグナルが I F N 、 T N F 、および P G E ₂ を含んでなる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 13】

ガラクトシルセラミド、グリコシルセラミド、ガラクトフラノシルセラミド、アラビノピラノシルセラミド、C ガラクトシルセラミド、および S ガラクトシルセラミドからなる群より選択される化合物と、未成熟樹状細胞および／または I F N R アゴニストシグナル化樹状細胞および／または C C R 7 ⁺ 成熟樹状細胞とを接触させることを更に含んでなる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 14】

30

前記化合物がガラクトシルセラミドである、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記ガラクトシルセラミドが（2 S , 3 S , 4 R ）1 O (D ガラクトピラノシル) 2 (N ヘキサコサノイルアミノ) 1 , 3 , 4 オクタデカントリオール (K R N 7 0 0 0) である、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

抗原をコードする R N A により前記樹状細胞をトランスフェクトすることを更に含む、請求項 5 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 5 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法により作製された、樹状細胞。

40

【請求項 18】

前記樹状細胞が抗原特異的 T 細胞の集団から C D 2 8 ⁺ C D 4 5 R A ⁻ メモリー／エフェクター T 細胞の集団を優先的に誘導するものである、請求項 17 に記載の樹状細胞。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の樹状細胞を含む、ワクチン。

【請求項 20】

前記 C D 4 0 L ポリペプチドをコードする R N A が、野生型 C D 4 0 L の第一メチオニンをコードする A T G コドンを欠くものである、請求項 1 または 17 に記載の樹状細胞。

【発明の詳細な説明】

【発明の背景】

50

【0001】

発明の分野

本発明は、トランケート化CD40Lタンパク質および核酸、並びにワクチンの使用および成熟樹状細胞の作製のための方法に関する。

【0002】

背景技術

細胞療法においては、患者において免疫応答を開始させるために、修飾された抗原提示細胞（APC）または免疫エフェクター細胞を利用する。抗原提示細胞は免疫応答を開始させるため、抗原提示細胞が細胞療法において重要である。実際、それらはTリンパ球から一次免疫応答を誘導しうる唯一の細胞である。

10

【0003】

樹状細胞（DC）は、適応免疫に関する最も強力なAPCである。それらはナイーブT細胞およびB細胞による免疫応答の開始を調整し、抗原特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）の応答を誘導する。DCは、ヘルパーT細胞およびキラーT細胞をインビボにおいて初回免疫する(prime)ために、数通りに専門化される。例えば、末梢組織に存在する未成熟DCは、抗原を捕捉して、免疫原性MHCペプチド複合体を産生するように準備される。炎症性サイトカインのような成熟誘導刺激に応答して、未成熟DCは接着および補助刺激分子を上方調節することにより強力なT細胞スティミュレーターへ進化する。同時に、それらは希少な抗原特異的T細胞を選択および刺激するために二次リンパ系器官へ移動する。しかしながら、T細胞の強い刺激は、応答T細胞のエフェクター機能を導く補助刺激分子に加えて、細胞表面においてMHC/ペプチド複合体の利用能を増す工程、DC成熟後のみに生じる。実際、未成熟DCは免疫刺激よりむしろ免疫寛容を誘導しうることから、それらは抗腫瘍および他の免疫療法において有害かもしれない。

20

【0004】

補助刺激は、クローン拡大を誘導する十分なサイトカインレベルを生じる上で、典型的にT細胞にとって必要である。自らを強力な抗原提示細胞にする樹状細胞の一つの特性は、それらがTリンパ球において分子CD28を活性化する免疫応答の補助刺激分子、例えば分子CD80およびCD86に豊富なことである。代わりに、DCにおいてCD40と結合するCD40LをTヘルパー細胞は発現する。DCとT細胞とのこれらの相互作用は、前者の‘成熟化’と後者においてエフェクター機能の獲得に至る。分子CD54または分子CD11a/CD18のような接着分子の発現は、樹状細胞とT細胞との協力を促す。樹状細胞の他の特性は、それらの分化段階に応じて異なる機能を展開することである。このように、抗原の捕捉とその変換が未成熟樹状細胞の二つの主要機能であり、一方T細胞を刺激するために抗原を提示するその能力は、樹状細胞が組織およびリンパ神経節へ移動すると増大する。この機能性変化が樹状細胞の成熟化に相当する。このように、未成熟樹状細胞から成熟樹状細胞への推移が免疫応答の開始に際して基礎工程に相当する。伝統的に、この工程に際してDCにおいて表面マーカーの変化を測定することによりこの成熟化が追跡された。樹状細胞の異なる成熟化段階で特徴的なより重要な細胞表面マーカーの一部が、下記表Iにおいて要約される。しかしながら、表面マーカーは成熟化工程に応じて変化しうる。

30

40

【表1】

表 I

細胞種	表面マーカー
造血幹細胞	CD34 ⁺
単球	CD14 ⁺⁺ , DR ⁺ , CD86 ⁺ , CD16 ^{+/-} , CD54 ⁺ , CD40 ⁺
未成熟樹状細胞	CD14 ^{+/-} , CD16 ⁻ , CD80 ^{+/-} , CD83 ⁻ , CD86 ⁺ , CD1a ⁺ , CD54 ⁺ , DQ ⁺ , DR ⁺⁺
成熟樹状細胞	CD14 ⁻ , CD83 ⁺⁺ , CD86 ⁺⁺ , CD80 ⁺⁺ , DR ⁺⁺ , DQ ⁺⁺ , CD40 ⁺⁺ , CD54 ⁺⁺ , CD1a ^{+/-}

10

【0005】

現在、成熟DCは、免疫療法にとり未成熟DCより好まれる。完全成熟DC子孫のみがGM-CSFレセプター(GM-CSF-R)を欠き、GM-CSFの除去/非存在下において安定的に成熟したままである。しかも、成熟DCはT細胞応答をインビトロおよびインビボ誘導する上で優れていることが示されてきた。一方、未成熟DCは、調節性T細胞を誘導することにより、インビトロ(Jonuleit et al.(2000)Exp.Med.192:1213)およびインビボ(Dhadapkar et al.(2001)Exp.Med.193:233)において寛容を誘導することが報告されている。成熟樹状細胞は、インビトロまたはインビボにおいて抗原を取り込みTリンパ球へ提示するためにも有用である。修飾された抗原提示DCおよび/またはこれらの修飾DCから教育されたT細胞は、診断、療法、ワクチン接種、リサーチ、スクリーニング、および遺伝子輸送を含めた多くの適用例を有している。

20

【0006】

白血球の1%未満が成熟樹状細胞のカテゴリーに属するにすぎないため、成熟樹状細胞を末梢血から単離することは困難である。成熟DCは組織から抽出することも困難である。この困難性が、細胞療法におけるDCの潜在的治療利益とともに、別の供給源を用いて成熟樹状細胞を作製しようとする新たな方法に向けた研究および開発を強いることになった。未成熟樹状細胞から成熟DCを作製するためにいくつかの方法が報告されている。

【0007】

例えば、Jonuleitら(Eur.J.Immunol.(1997)12:3135-3142)は、サイトカインカクテル(IL-1、TNF_α、およびPGF₂)を含有した培地においての培養による未成熟ヒトDCの成熟化について開示している。

30

【0008】

WO95/28479号は、末梢血細胞を単離し、CD34⁺血液前駆細胞について富化させ、次いで造血成長因子およびサイトカインの組合せにより拡大させることによる、樹状細胞を作製するための工程について開示している。

【0009】

欧州特許公開EP-A-0922758号は、マクロファージまたは樹状細胞特性を発現しうるポテンシャルを有した多能性細胞由来の未成熟樹状細胞から成熟樹状細胞の産生について開示している。該方法では、IFN-γを含めた樹状細胞成熟化因子と未成熟樹状細胞とを接触させることを必要とする。

40

【0010】

欧州特許公開EP-B-0633930号は、CD1a⁺造血細胞の形成を誘導するために、最初にヒトCD34⁺造血細胞を(i)GM-CSF、(ii)TNF_αおよびIL-3、または(iii)GM-CSFおよびTNF_αと培養することによる、ヒト樹状細胞の産生について開示している。

【0011】

特許公開第2004/0152191号は、樹状細胞をRUF41740と接触させることによる樹状細胞の成熟化について開示している。

【0012】

50

米国特許公開第2004/0146492号は、造血幹細胞を形質転換し、次いでGM-CSF含有培地における培養により幹細胞を樹状細胞へ分化させることによる、組換え樹状細胞を作製するための工程について開示している。

【0013】

米国特許公開第2004/0038398号は、哺乳動物の末梢血からDCおよび単球の実質的精製集団の作製のための方法について開示している。骨髓系細胞が哺乳動物から単離され、単球の単離サブ集団を得るためにDCがこの集団から分離される。DCは次いで、T細胞を除去するために、抗CD2抗体でネガティブ選択により富化される。

【0014】

成熟DCは機能的に適格であり、したがって抗原特異的T細胞を誘導する上で有用であるが、すべての成熟DCがこれらの応答を誘導する上で最適な訳ではない。一部の成熟DCはIL-12を分泌することによりTヘルパー細胞も刺激しうることが示された。Maccatonia et al.(1995) Immunol. 154:507 1、Ahuja et al.(1998) Immunol. 161:868、およびUnintford et al.(1999) Immunol. 97:588。IL-12は、動物モデルにおいて抗原への抗原特異的CD8+T細胞応答を高めることも示された。Schmidt et al.(1999) Immunol. 163:2561。

【0015】

Mosca et al.(2000) Blood, 96:3499においては、可溶性CD40LトリマーおよびIFN-1bを双方とも含有するAIMV培地においてのDCの培養が、可溶性CD40Lトリマーのみを含有する培地での培養と比較して、IL-12発現の増加をもたらすことを開示している。

【0016】

Koya et al.(2003) J. Immunother. 26(5):451においては、CD40リガンドをコードするレンチウイルスベクターにおいて、IFN-の存在下、未成熟DCの安定的形質導入により、IL-12発現が高められることを報告している。CD40L形質導入DCの90%以上がそれらの細胞表面においてCD83を発現した。残念ながら、レンチウイルス形質導入細胞は治療目的に適さず、形質導入細胞のゲノムへのプロウイルス組込みは白血病を生じうる。更に、CD40Lの永続的発現はAPC機能および生存能に有害効果を有することがある。

【0017】

Koyaらの研究は、インビオにおいてDCは抗腫瘍免疫を生じるためにCD40による成熟化を要すると報告した、Mackey et al.(1998) J. Immunol. 161:2094の初期研究を補足した。同様に、Kuniyoshi, J.S. et al.(1999) Cell Immunol. 193:48は、可溶性トリマーCD40リガンド+IFN-により処理されたDCが強力なT細胞増殖を刺激し、抗原特異的溶解性の増したT細胞を誘導することを示した。Kalady, M.F. et al.(2004) J. Surg. Res. 116:24は、同時にまたは順次的に加えられる異なる成熟化刺激へ曝された、黒色腫抗原MART-1またはインフルエンザM1マトリックスタンパク質をコードするmRNAにおいてトランスフェクトされたヒト単球由来DCが、抗原提示、IL-12分泌、およびこれらDCの存在下において生じるエフェクターT細胞の免疫原性に変動性を示すことを報告した。最も重要なことは、IL-1、TNF-、IL-6、およびPGE₂からなる‘サイトカインカクテル’に続く細胞外可溶性CD40Lタンパク質の適用が全物質を同時に適用するよりも優れていることを、この研究が示したことである。しかしながら、これらの著者は連続工程において、IFN-シグナリングと、一過性CD40Lシグナリングとの組合せについては研究しなかった。更に、IFN-およびCD40Lが培地へ同時添加された場合におけるIL-12の産生にもかかわらず、最近の先行技術は、トリプトファンを代謝した酵素の誘導が応答T細胞を枯渇させてその増殖を損なわせることから、得られるDCが前炎症性というより実際にはむしろ免疫抑制性であることを示している(Hwu et al.(2000) J. Immunol. 164:3596、Munn et al.(2002) 297:1867、およびGrohmann et al.(2003) Trends Immunol. 24:242)。このように、現行の文献は、IFN-およびCD40Lの組合せが免疫力を増加させるはずはないことを示唆している。DC成熟

10

20

30

40

50

化のための改良方法と免疫力増加の成熟DCとを提供することが希求されており、本発明はそのことについて取り扱う。

【発明の概要】

【0018】

本発明者らは、インターフェロンガンマレセプター（IFN-R）アゴニストを含んでなる第一シグナルに続き、CD40アゴニストを含んでなる第二シグナルにより未成熟樹状細胞が順次シグナリングされた場合に、強い免疫刺激が生じることを見出した。第二シグナルが与えられる時点で、DCは未成熟でもまたは成熟でもよい。

【0019】

一つの態様において、本発明は、（a）シグナル化樹状細胞を產生するためにインターフェロンガンマレセプター（IFN-R）アゴニストおよび場合によりTNF-Rアゴニストを含んでなる第一シグナルにより単離未成熟樹状細胞（iDC）をシグナリングし、そして（b）CCR7⁺成熟樹状細胞を產生するために有効量のCD40アゴニストを含んでなる第二の一過性シグナルにより前記シグナル化樹状細胞をシグナリングする連続工程を含んでなる成熟樹状細胞（DC）を作製するための方法を提供する。
10

【0020】

好ましい態様において、未成熟DCはPGE₂および場合によりTNFと更に接触させられる。一部の態様において、該方法は、ガラクトシルセラミド、グリコシルセラミド、ガラクトフラノシルセラミド、アラビノピラノシルセラミド、Cガラクトシルセラミド、およびSガラクトシルセラミドからなる群より選択される化合物と、未成熟DC、シグナル化DCおよび/またはCCR7⁺成熟樹状細胞とを接触させることを更に含んでなる。好ましくは、前記化合物はガラクトシルセラミドである。最も好ましくは、ガラクトシルセラミドは（2S, 3S, 4R）1O（Dガラクトピラノシル）2（Nヘキサコサノイルアミノ）1, 3, 4オクタデカントリオール（KRN7000）である。
20

【0021】

本発明の一部の態様において、IFN-Rアゴニストは腫瘍壊死因子アルファレセプター（TNF-R）アゴニストの代わりに用いても、またはTNF-Rアゴニストと併用されてもよい。例えば、一つの態様において、本発明は、腫瘍壊死因子アルファレセプター（TNF-R）アゴニストを含んでなる第一シグナルに続きCD40アゴニストを含んでなる第二シグナルにより未成熟樹状細胞を順次シグナリングし、それにより成熟樹状細胞の富化集団を作製することを含んでなり、該シグナリングが有効量のIL-1またはIL-6の非存在下におけるものである、成熟樹状細胞（DC）の富化集団を作製するための方法を提供する。好ましくは、未成熟DCは更にPGE₂と接触させられる。
30

【0022】

好ましいIFN-Rアゴニストは哺乳動物IFN⁻、好ましくはヒトIFN⁻およびその活性断片である。好ましいTNF-Rアゴニストは哺乳動物TNF⁻、好ましくはヒトTNF⁻およびその活性断片である。好ましいCD40アゴニストは、哺乳動物CD40リガンド（CD40L）、好ましくはヒトCD40Lとその活性断片およびバリエント、並びにCD40レセプターに対するアゴニスト抗体である。最も好ましくは、CD40Lアゴニストは、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基21-261からなるまたは本質的になる、ここで提供される新規CD40Lポリペプチドである。新規CD40Lポリペプチドをコードする核酸、トランスフェクトされたDC、および関連ワクチンも提供される。
40

【0023】

シグナリングは、シグナリングアゴニストを培地に供して、該アゴニストを細胞へ導入させることにより、および/またはアゴニストポリペプチドをコードするmRNAの樹状細胞内翻訳で開始される。該方法はインビボまたはエクスピボにおいて行える。本発明の方法に従いエクスピボにおいて成熟された樹状細胞は次いで、免疫応答を誘導または増強するために対象者へ投与される。
50

【0024】

樹状細胞の各々は、DCへの免疫原の投与により、更に修飾してもよい。DCは免疫原を取込んでプロセッシングし、それをその細胞表面において提示する。免疫原はインビボまたはエクスビボにおいて輸送できる。成熟培養DCが免疫応答を誘導または増強するために対象者へ投与される。更に別の態様において、抗原負荷成熟DCはナイーブ免疫エフェクター細胞を教育するために用いられる。

【0025】

他の態様において、本発明はCD83⁺CCR7⁻成熟DCおよびCD83⁺CCR7⁺成熟DCのようなインビトロ成熟樹状細胞を含んでなる組成物を提供する。本発明の成熟樹状細胞は未成熟樹状細胞と比較して高レベルのIL-12を発現し、および/または樹状細胞百万個当たり500 pg未満のIL-10を発現する。

10

【0026】

他の態様において、本発明は、抗原特異的T細胞の集団からCD28⁺CD45RAメモリー/エフェクターT細胞の集団を優先的に誘導する樹状細胞を提供する。本発明の組成物は、有効量の集団を対象者へ投与することにより、対象者において免疫応答を生じさせるために有用である。

【0027】

本発明は、SEQ ID NO:2のアミノ酸残基21-261からなる、または本質的になる組換えトランケート化CD40Lポリペプチドを更に提供する。他の態様において、本発明は、SEQ ID NO:2のアミノ酸残基21-261と少なくとも80%アミノ酸相同性を有するポリペプチドからなる、または本質的になる、組換えCD40Lポリペプチドを提供する。他の態様において、本発明は、これらのトランケート化CD40Lポリペプチドをコードする核酸、並びにこのような核酸を含んでなるベクター、樹状細胞、およびワクチンを提供する。

20

【0028】

他の態様において、本発明は、a) IFN- γ アゴニストシグナル化樹状細胞を産生するためにインターフェロンガンマレセプター(IFN- γ アゴニスト)および場合によりTNF- α アゴニストを含んでなる第一シグナルで単離未成熟樹状細胞(IDC)をシグナリングし、そしてb) CCR7⁺成熟樹状細胞を産生するために有効量のCD40Lポリペプチドを含んでなる第二の一過性シグナルにより前記IFN- γ アゴニストシグナル化樹状細胞をシグナリングする連続工程を含んでなり、CD40LポリペプチドがSEQ ID NO:2のアミノ酸残基21-261から本質的になる、またはSEQ ID NO:2のアミノ酸残基21-261と少なくとも80%配列同一性を有するポリペプチドである、成熟樹状細胞(DC)を作製するための方法を提供する。好ましくは、第一シグナルはIFN- γ 、TNF- α 、およびPEG₂を含んでなり、工程(b)は該CD40LポリペプチドをコードするRNAで該樹状細胞をトランスフェクトすることを含んでなる。

30

【0029】

配列リストの簡単な説明

SEQ ID NO:1はヒトCD40L cDNAである。ヌクレオチド40-825は、ATG翻訳開始コドンおよびTGA翻訳終止コドンを含むコーディング領域を表す。

40

【0030】

SEQ ID NO:2は全長ヒトCD40Lタンパク質のアミノ酸配列である。

【0031】

SEQ ID NO:3はヒトCD40 cDNAである。ヌクレオチド67-522は、ATG翻訳開始コドンおよびTAG翻訳終止コドンを含むコーディング領域を表す。

【0032】

SEQ ID NO:4はヒトCD40(CD40Lのレセプター)のアミノ酸配列である。

【0033】

50

SEQ ID NO: 5 はヒト IFN cDNA である。ヌクレオチド 109 60
9 は、ATG 翻訳開始コドンおよび翻訳終止コドンを含むコーディング領域を表す。

【0034】

SEQ ID NO: 6 はヒト IFN のアミノ酸配列である。

【0035】

SEQ ID NO: 7 はヒト TNF cDNA である。ヌクレオチド 170 97
1 は、ATG 翻訳開始コドンおよび TGA 翻訳終止コドンを含むコーディング領域を表す。
。

【0036】

SEQ ID NO: 8 はヒト TNF のアミノ酸配列である。

10

【0037】

SEQ ID NO: 9 はマウス CD40L cDNA である。ヌクレオチド 13 79
5 は、ATG 翻訳開始コドンおよび TGA 翻訳終止コドンを含むコーディング領域を表す。
。

【0038】

SEQ ID NO: 10 は全長マウス CD40L タンパク質のアミノ酸配列である。

【0039】

SEQ ID NO: 11 は CD40L 5 プライマーである。

【0040】

SEQ ID NO: 12 は CD40L 3 プライマーである。

20

【0041】

SEQ ID NO: 13 は、最適化ヒト CD40L mRNA に対応する DNA 配列である。

【0042】

SEQ ID NO: 14 は CD40 レセプター 3 UTR である。

【0043】

SEQ ID NO: 15 はヒトベータ アクチン 3 UTR の最終エキソンの非翻訳領域である。

【0044】

SEQ ID NO: 16 はヒトベータ アクチン 3 UTR の最小機能要素である。

30

【0045】

SEQ ID NO: 17 はサルロタウイルス遺伝子 6 3 UTR である。

【0046】

SEQ ID NO: 18 はサルロタウイルス遺伝子 6 3 UTR の最小機能要素である。

【0047】

SEQ ID NO: 19 はヒト Hsp70 5 UTR (HSPA1A) である。

【0048】

SEQ ID NO: 20 はマウス VEGF 5 UTR である。

【0049】

SEQ ID NO: 21 はマウス VEGF 5 UTR の最小機能要素である。

40

【0050】

SEQ ID NO: 22 は脾臓壊死ウイルス LTR RU5 領域である。

【0051】

SEQ ID NO: 23 はタバコエッチャイルス 5 リーダー配列である。

【0052】

SEQ ID NO: 24 ~ 26 は、各々 HLA A201 拘束性 MART APL ペプチド、天然ペプチド、および PSA 1 ペプチドである。

【0053】

SEQ ID NO: 27 はヒト グロビン 3 UTR である。

50

【0054】

SEQ ID NO:28はヒト グロビン3 UTRである。

【0055】

SEQ ID NO:29はヒト グロビン3 UTR、マイナスプリンリッチ要素3である。

【0056】

SEQ ID NO:30は、ポリアデニル化前に、XE met 1プラスミドから転写されたCD40L RNAに対応するcDNA配列を示す。

【0057】

SEQ ID NO:31は、SEQ ID NO:30のRNAから翻訳されたCD40 10 Lポリペプチドの配列を示し、SEQ ID NO:2のアミノ酸残基21 261に相当する。

【0058】

SEQ ID NO:32は、CD40L XE + ロタウイルス遺伝子6 3 UTRプラスミドから転写されたRNAに対応するcDNA配列を示す。

【0059】

SEQ ID NO:33は、CD40L XE met 1 + ロタウイルス遺伝子6 3 UTRプラスミドから転写されたRNAに対応するcDNA配列を示す。

【0060】

SEQ ID NO:34は、pARG CD40L MET 1の配列を示す。CD40L 20 MET 1 RNAの+1は、ヌクレオチド残基3566位である。CD40L MET 1転写物の3 末端はヌクレオチド残基4480位である。翻訳開始コドンはヌクレオチド残基3666 3668位である。

【発明の具体的説明】

【0061】

この開示の全体にわたり、様々な文献、特許、公開特許明細書が具体的に引用されている。これら文献、特許、公開特許明細書の開示は、本発明が関係する技術水準を更に詳細に説明するために、引用することにより本明細書の開示の一部とされる。

【0062】

本発明の実施に際しては、別記されない限り、当業界の技術内に属する、分子生物学(組換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の常用技術を用いる。このような技術は文献において詳細に説明されている。これらの方法は次の文献において記載されている。例えば、Sambrook et al., MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL, 2nd edition(1989)、CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(Ausubel et al.eds.(1987))、the series METHODS IN ENZYMOLOGY(Academic Press, Inc.)、PCR:A PRACTICAL APPROACH(M.MacPherson et al., IRL Press at Oxford University Press(1991))、PCR 2:A PRACTICAL APPROACH(MacPherson, Hames and Taylor eds.(1995))、ANTIBODIES,A LABORATORY MANUAL(Harlow and Lane eds.(1988))、USING ANTIBODIES,A LABORATORY MANUAL(Harlow and Lane eds.(1999))、ANIMAL CELL CULTURE(Freshney ed.(1987))参照。

【0063】

定義

明細書および請求項において用いられている単数形“a”、“a n”、および“the”は、内容が明らかにそれ以外のことを記載していない限り、複数形の言及も含んでいる。例えば、“a cell”という用語は、その混合物を含めて、複数の細胞を含む。

【0064】

ここで用いられている“含んでなる”という用語は、組成物および方法が列挙された要素を含むが、その他を除外しないことを意味する。“から本質的になる”とは、組成物および方法を定義するために用いられている場合に、組合せに必須の重要な他の要素を除外する意味である。そのため、ここで定義されているような要素から本質的になる組成物は、単離および精製法からの微量汚染物、並びに薬学上許容される担体、例えばリン酸緩衝

液、保存剤などを除外しない。所定アミノ酸配列“から本質的になる”ポリペプチドまたはタンパク質は、タンパク質またはポリペプチドのアミノ末端およびカルボキシ末端の一方または双方に、3以下、好ましくは2以下、最も好ましくは1以下、またはゼロの追加アミノ酸を含有している、とここでは定義される。例えば、配列Xから本質的になるポリペプチドはNNNXNNN、NNNX、XN、Xなどを含むが、それらに限定されず、ここでNは何らかのアミノ酸である。所定核酸“から本質的になる”核酸またはポリヌクレオチドは、核酸配列の5末端および3末端の一方または双方に、10、9、8、7以下、好ましくは6、5、4以下、更に好ましくは3、2以下、最も好ましくは1以下またはゼロの追加ヌクレオチドを含有している、とここでは定義される。“からなる”とは、本発明の組成物を投与するために他の成分および実質的な方法ステップの微量以上の要素を除外する意味である。これら遷移用語の各々により定義される態様は本発明の範囲内に属する。

10

【0065】

すべての数値表現、例えばpH、温度、時間、濃度、および分子量は、範囲を含めて、0.1の増加で(+)または(-)に変化する概数である。常に明確に言及されているわけではないが、ここで記載された試薬は単なる例示にすぎず、そのような相当物も当業界で知られている、と理解すべきである。

【0066】

“抗原”という用語は当業界においてよく理解されており、免疫原性である物質、即ち免疫原を含んでいる。抗原の使用が本発明で使用上考えられており、そのため自己抗原(正常または病気関連)、感染性抗原(例えば、微生物抗原、ウイルス抗原など)、または一部他の外来抗原(例えば、食品成分、花粉など)に限定されないが、それらを含むことは明らかであろう。“抗原”または代わりに“免疫原”という用語は二種以上の免疫原の集合にも該当し、そのため複数の免疫原に対する免疫応答が同時に調節されることがある。更に、該用語は免疫原または抗原の様々な異なる処方を含む。

20

【0067】

“天然”、“自然”、または“野生型”抗原は、対象者において、MHC/ペプチド複合体として提示された場合に抗原レセプターと、特にT細胞抗原レセプター(TCR)と特異的に結合しうる、天然生物源から単離された、エピトープを含有するポリペプチド、タンパク質、または断片である。

30

【0068】

“腫瘍関連抗原”または“TAA”という用語は、癌と関連した抗原に関する。周知TAAの例としては、gp100、MART、およびMAGEがある。

【0069】

“主要組織適合遺伝子複合体”または“MHC”という用語は、T細胞への抗原提示および急激な移植片拒絶に必要な細胞表面分子をコードする遺伝子の複合体に関する。ヒトでは、MHCは“ヒト白血球抗原”または“HLA”複合体としても知られている。MHCによりコードされたタンパク質は“MHC分子”として知られ、クラスIおよびクラスII MHC分子に分類される。クラスI MHC分子は、₂ミクログロブリンと非共有結合されたMHCでコードされる鎖から構成されている膜ヘテロダイマータンパク質を含有する。クラスI MHC分子はほぼ全ての有核細胞において発現され、CD8⁺ T細胞への抗原提示で機能することが示されていた。クラスI分子には、ヒトの場合においてHLA-A、B、およびCがある。クラスII MHC分子も、非共有会合および鎖からなる膜ヘテロダイマータンパク質を含有する。クラスII MHC分子はCD4⁺ T細胞において機能することが知られ、ヒトの場合においてはHLA-DP、-DQ、および-DRがある。

40

【0070】

“抗原提示細胞(APC)”という用語は、免疫系の特異的エフェクターT細胞により認識されるペプチドMHC複合体の形で一種以上の抗原を提示し、それにより提示された抗原に対して有効な細胞性免疫応答を誘導しうる細胞のクラスに関する。APCとし

50

ては、未処理の全細胞、例えばマクロファージ、B細胞、内皮細胞、活性化T細胞、および樹状細胞、または天然もしくは合成の他の分子、例えば²ミクログロブリンと複合化された精製MHCクラスI分子がある。多くの種類の細胞がT細胞認識のためにそれらの細胞表面において抗原を提示しうるが、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答へナイーブT細胞を活性化させるために有効な量で抗原を提示しうる能力は樹状細胞のみが有する。

【0071】

“樹状細胞(DC)”という用語は、様々なリンパ系および非リンパ系組織でみられる形態学的に類似した細胞種の多様な集団に関する(Steinman(1991)Ann.Rev.Immunol.,9:271-296)。樹状細胞は、生物において最強の好ましいAPCを構成している。樹状細胞は単球およびCD34⁺細胞から分化できるが、それらは異なる表現型を有する。例えば、具体的な分化マーカーCD14抗原は、樹状細胞において見られないが、単球において有する。しかも、成熟樹状細胞は食細胞でなく、一方単球は強い食作用細胞である。成熟DCはT細胞活性化および増殖に必要な全シグナルを発せていた。

【0072】

“免疫エフェクター細胞”という用語は、抗原と結合でき、免疫応答を媒介する細胞に関する。これらの細胞にはT細胞、B細胞、単球、マクロファージ、NK細胞、および細胞障害性Tリンパ球(CTL)、例えばCTL系、CTLクローン、および腫瘍、炎症または他の浸潤物からのCTLがあるが、それらに限定されない。

【0073】

“ナイーブ”免疫エフェクター細胞とは、その細胞を活性化しうる抗原へ曝されたことがない免疫エフェクター細胞である。ナイーブ免疫エフェクター細胞の活性化には、増殖して抗原特異的武装化工エフェクターT細胞へ分化するために、ペプチド:MHC複合体の認識とプロフェッショナルAPCによる補助刺激シグナルの同時輸送との双方を必要とする。

【0074】

“免疫応答”とは、広義において、外来物質に対するリンパ球の抗原特異的応答に関する。免疫応答を誘起しうる物質は“免疫原性”であると言われ、“免疫原”と称される。すべての免疫原は抗原であるが、しかしながら全ての抗原が免疫原性というわけではない。本発明の免疫応答は体液性(抗体活性による)または細胞性(T細胞活性化による)である。

【0075】

ここで用いられている“教育された抗原特異的免疫エフェクター細胞”という用語は、既に抗原と出会った、上記のような免疫エフェクター細胞である。そのナイーブ対応物とは対照的に、教育された抗原特異的免疫エフェクター細胞の活性化には補助刺激シグナルを必要としない。ペプチド:MHC複合体の認識は十分である。

【0076】

“活性化された”とは、T細胞に関して用いられている場合、細胞がもはやG₀期になく、細胞毒素、サイトカイン、および細胞種に特徴的な他の関連膜結合タンパク質(例えば、CD8⁺またはCD4⁺)の一種以上を産生し始め、表面において特定のペプチド/MHC複合体を示す標的細胞を認識してそれと結合し、そのエフェクター分子を放出しうることを意味する。

【0077】

ここで用いられている“対象者において免疫応答を誘導する”という用語は当業界において理解されている用語であり、対象者へ抗原(またはエピトープ)の導入前における免疫応答(もしあれば)と比較して、対象者へ抗原(またはエピトープ)の導入後に検出または測定されうる抗原(またはエピトープ)に対する免疫応答について、少なくとも約2倍、または代わりに少なくとも約5倍、または代わりに少なくとも約10倍、または代わりに少なくとも約100倍、または代わりに少なくとも約500倍、または代わりに少なくとも約1000倍またはそれ以上の増加に関する。抗原(またはエピトープ)に対する

10

20

30

40

50

免疫応答としては、抗原特異的（またはエピトープ特異的）抗体の產生、および抗原（またはエピトープ）と特異的に結合する分子を表面上で発現する免疫細胞の產生があるが、それらに限定されない。所定の抗原（またはエピトープ）に対する免疫応答が誘導されたかどうかを調べる方法は、当業界において周知である。例えば、抗原特異的抗体は、例えば固定抗原（またはエピトープ）へのサンプル中抗体の結合が検出可能標識第二抗体（例えば、酵素標識マウス抗ヒト IgG 抗体）で検出される E L I S A に限定されないが、それを含めた当業界で公知の様々な免疫アッセイを用いて検出される。

【 0 0 7 8 】

“補助刺激分子”は、抗原提示細胞および T 細胞の表面において発現されるレセプターリガンドペア間の相互作用にかかる。過去数年かけて蓄積された研究は、休止 T 細胞がサイトカイン遺伝子発現および増殖の誘導に少なくとも二つのシグナルを要することを、納得のいくように証明してきた (Schwartz,R.H.(1990)Science 248:1349-1356 および Jenkins,M.K.(1992) Immunol.Today 13:69-73)。一つのシグナル、特異性を付与するものは、T C R / C D 3 複合体と適切な M H C / ペプチド複合体との相互作用により生じる。第二のシグナルは抗原特異性でなく、“補助刺激”シグナルと称される。このシグナルは、マクロファージおよび樹状細胞、いわゆる“プロフェッショナル”A P C のような骨髄由来アクセサリー細胞により得られる活性として、当初定義された。いくつかの分子は補助刺激活性を高めることができていた。これらは、熱安定抗原 (H S A) (Liu et al. (1992)J.Exp.Med.175:437-445)、コンドロイチン硫酸修飾 M H C インバリアント鎖 (Ii-CS) (Naujokas,M.F. et al. (1993)Cell 74:257-268)、細胞内接着分子 1 (I C A M 1) (Van Seventer,G.A.(1990)J.Immunol.144:4579-4586)、B 7 - 1 および B 7 - 2 / B 7 0 (Schwartz,R.H.(1992)Cell 71:1065-1068) である。これらの分子は各々、T 細胞でそれらのコグネイトリガンドと相互作用することにより、補助刺激を助けるようである。補助刺激分子は、ナイーブ T 細胞の完全活性化を行うために、正常生理的条件下において、必要な補助刺激シグナルを媒介する。一つの例示レセプター リガンドペアは、A P C 5 の表面における補助刺激分子の B 7 ファミリーと、T 細胞におけるそのカウンターレセプター C D 2 8 または C T L A 4 である (Freeman et al.(1993)Science 262:909-911 および Young et al.(1992)J.Clin.Invest.90:229、および Nabavi et al.(1992)Nature 360:266-268)。他の重要な補助刺激分子は C D 4 0 および C D 5 4 である。“補助刺激分子”という用語は、T 細胞の表面において T C R により結合された M H C / ペプチド複合体と一緒に作用する場合、該ペプチドと結合した T 細胞の活性化を行う補助刺激効果を発揮する、单一分子または分子の組合せを包含している。該用語はそのため、M H C 複合体と一緒に、コグネイトリガンドと結合して、T 細胞の表面にある T C R が該ペプチドと特異的に結合した場合に T 細胞の活性化を生じる、B 7 、または A P C のような抗原提示マトリックス上における他の補助刺激分子、その断片（単独、他の分子と複合化される、または融合タンパク質の一部として）を包含している。常に明確に言及されているわけではないが、野生型または精製補助刺激分子と同様の生物活性を有する分子（例えば、その組換え產生または突然変異タンパク質）も本発明の精神および範囲内で用いられることが、意図されている。

【 0 0 7 9 】

ここで用いられている“サイトカイン”という用語は、細胞において様々な効果を発揮する、例えば成長または増殖を誘導する、多数の因子のいずれか一つに関する。本発明の実施に際して単独でまたは組合せで用いられるサイトカインの例は、限定されないが、インターロイキン 2 (I L 2)、幹細胞因子 (S C F)、インターロイキン 3 (I L 3)、インターロイキン 6 (I L 6)、インターロイキン 12 (I L 12)、G C S F、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M C S F)、インターロイキン 1 アルファ (I L 1)、インターロイキン 1 L (I L 11)、M I P 11 、白血病抑制因子 (L I F) 、c k i t リガンド、トロンボポエチン (T P O) 、および f l t 3 リガンドがある。本発明の一つの態様は、有効量の I L 1 および / または I L 6 が培地から除外される培養条件を含む。サイトカインは、例えば Genzyme (Frami

10

20

30

40

50

ngham, M A) 、 Genentech (South San Francisco, C A) 、 Amgen (Thousand Oaks, C A) 、 R&D Systems (Minneapolis, M N) 、 および Immunex (Seattle, W A) のように、いくつかのベンダーから市販されている。常に明確に言及されているわけではないが、野生型または精製サイトカインと同様の生物活性を有する分子 (例えば、その組換え產生または突然変異タンパク質) も本発明の精神および範囲内において用いられることが、意図されている。

【 0 0 8 0 】

“ ポリヌクレオチド ” 、 “ 核酸 ” 、 および “ 核酸分子 ” という用語は、あらゆる長さのヌクレオチドのポリマー形に言及するために、互換的に用いられる。ポリヌクレオチドにはデオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、 および / またはそれらのアナログを含んでもよい。ヌクレオチドは何らかの三次元構造を有してもよく、既知または未知の何らかの機能を発揮してもよい。 “ ポリヌクレオチド ” という用語は、 例えば一本鎖、二本鎖、 および三重らせん分子、遺伝子または遺伝子断片、エキソン、イントロン、m R N A 、 t R N A 、 r R N A 、リボザイム、 c D N A 、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、何らかの配列の単離 D N A 、何らかの配列の単離 R N A 、核酸プローブ、 およびプライマーを含んでいる。天然核酸分子に加えて、本発明の核酸分子には修飾核酸分子も含んでもよい。ここで用いられている m R N A は、樹状細胞において翻訳されうる R N A に関する。このような m R N A は典型的にはキャップされ、リボソーム結合部位 (Kozak 配列) および翻訳開始コドンを有する。

【 0 0 8 1 】

“ ペプチド ” という用語は、二以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸アナログ、またはペプチドミメティックの化合物に関する、最広義の意味で用いられている。サブユニットはペプチド結合でつながっていてもよい。他の態様において、サブユニットは他の結合、 例えばエステル、エーテルなどでつながれてもよい。ここで用いられている “ アミノ酸 ” という用語は、グリシンと両 D および L 光学異性体、アミノ酸アナログおよびペプチドミメティックを含めた、天然および / または非天然または合成アミノ酸に関する。アミノ酸三個以上のペプチドは、そのペプチド鎖が短ければ、オリゴペプチドと通称されている。ペプチド鎖が長ければ、ペプチドはポリペプチドまたはタンパク質と通称されている。

【 0 0 8 2 】

“ 遺伝子修飾された ” という用語は、細胞またはその子孫の遺伝子型または表現型を変えることになる、外来遺伝子または核酸配列を含有および / または発現することを意味している。換言すると、それは細胞の内在ヌクレオチドに対する何らかの付加、欠失、または分断に関する。

【 0 0 8 3 】

ここで用いられている “ 発現 ” とは、ポリヌクレオチドが m R N A に転写され、 m R N A がペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質に翻訳される工程に関する。ポリヌクレオチドが適切な真核細胞宿主のゲノム D N A から誘導されたものであれば、発現には m R N A のスプライシングを含んでもよい。発現に必要な調節要素には、リボソーム結合のために R N A ポリメラーゼと転写開始配列を結合させるプロモーター配列を含む。 例えば、細菌発現ベクターは、プロモーター、 例えば lac プロモーター、転写開始用には Shine-Dalgarno 配列、 および開始コドン A U G を含む (Sambrook et al. (1989) 前掲) 。同様に、真核細胞発現ベクターは、 R N A ポリメラーゼ II 用の異種または同種プロモーター、下流ポリアデニル化シグナル、開始コドン A U G 、 およびリボソーム解離用の終止コドンを含む。このようなベクターは商業的に得られるか、または当業界で知られている方法、 例えば一般的にベクターを構築する下記方法において記載された順序により組み立てられる。

【 0 0 8 4 】

“ 転写コントロール下 ” は当業界において理解されている用語であり、ポリヌクレオチド配列、通常 D N A 配列の転写が、転写の開始に寄与する、またはそれを促進する要素へ

10

20

30

40

50

それが作動的に結合されているか否かに依存することを示す。“作動的に結合される”とは、各要素がそれらを機能させうる位置関係にあるような配置に関する。

【0085】

“遺伝子輸送ビヒクル”とは、挿入されるポリヌクレオチドを宿主細胞へ運べる分子として定義される。遺伝子輸送ビヒクルの例は、リポソーム、生体適合性ポリマー、例えば天然ポリマーおよび合成ポリマー、リポタンパク質、ポリペプチド、多糖、リポ多糖、人工ウイルスエンベロープ、金属粒子、細菌またはウイルス、例えばバキュロウイルス、アデノウイルスおよびレトロウイルス、バクテリオファージ、コスミド、プラスミド、真菌ベクターと、様々な真核および原核宿主で発現に関して記載されてきた、遺伝子療法と簡単なタンパク質発現に用いられる、当業界において典型的に用いられてもよい他の組換えビヒクルである。

10

【0086】

ここで用いられている“遺伝子輸送”、“遺伝子トランスファー”、“トランスフェクション”などは、導入に用いられる方法とかかわりのない、宿主細胞への外来ポリヌクレオチドの導入に関する用語である。トランスフェクションは細胞の内部への核酸の輸送に関する。遺伝子輸送は、宿主細胞のゲノムへ組み込まれる、または宿主細胞ゲノムとは別に複製してもよい、核酸の輸送に関する。遺伝子輸送または遺伝子トランスファーは細胞へのmRNAの導入に関するものではない。トランスフェクション法は、エレクトロポレーション、タンパク質ベース、脂質ベースおよび陽イオンベース核酸輸送複合体、ウイルスベクター、“遺伝子銃”輸送のような様々な技術、および当業者に知られている様々な他の技術を含む。導入されたポリヌクレオチドは宿主細胞で安定的に維持されるか、または一過性で発現されてもよい。好ましい態様では、mRNAがDCへ導入されて、一過性で発現される。安定的な維持のためには、典型的には、導入ポリヌクレオチドが宿主細胞と適合する複製起点を含むか、あるいは宿主細胞のレプリコン、例えば染色体外レプリコン（例えば、プラスミド）または核もしくはミトコンドリア染色体へ組み込まれることを必要とする。いくつかのベクターは、当業界で知られ、ここで記載されているように、哺乳動物細胞への遺伝子のトランスファーを媒介しうる。

20

【0087】

“ウイルスベクター”は、インビボ、エクスピボ、またはインビトロにおいて宿主細胞へ輸送されるポリヌクレオチドを含んでなる、組換え産生ウイルスまたはウイルス粒子として定義される。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ隨伴ウイルスベクター、アルファウイルスベクターなどがある。アルファウイルスベクター、例えばセムリキ森林(Semliki Forest)ウイルスベースベクターおよびシンドビス(Sindbis)ウイルスベースベクターも、遺伝子療法および免疫療法において使用するためには開発してきた。Schlesinger and Dubensky(1999)Curr.Opin.Biotecnol.5:434-439およびZaks et al.(1999)Nat.Med.7:823-827参照。遺伝子トランスファーがレトロウイルスベクターで媒介される局面において、ベクター構築物はレトロウイルスゲノムまたはその一部と、治療遺伝子とを含んでなるポリヌクレオチドに関する。ここで用いられている“レトロウイルス媒介遺伝子トランスファー”または“レトロウイルス形質導入”という用語は同様の意味を有し、細胞へ入り、そのゲノムを宿主細胞ゲノムへ組み込むウイルスによって遺伝子または核酸配列が宿主細胞へ安定的に移される工程に関する。ウイルスはその通常の感染メカニズムにより宿主細胞へ入り込めるか、またはそれが異なる宿主細胞表面レセプターまたはリガンドと結合して細胞へ入り込めるように修飾される。ここで用いられている“レトロウイルスベクター”とは、ウイルスまたはウイルス様エントリーメカニズムにより外来核酸を細胞へ導入しうるウイルス粒子に関する。

30

【0088】

レトロウイルスはRNAの形態によりそれらの遺伝情報を伝える、しかしながら、ウイルスが細胞に感染すると、そのRNAはDNA形へ逆転写されて、それが感染細胞のゲノムDNAへ組み込まれる。組込みDNA形はプロウイルスと称される。

40

【0089】

50

遺伝子トランスファーが、アデノウイルス (A d) 、偽アデノウイルス、またはアデノ随伴ウイルス (A A V) のような D N A ウイルスベクターにより媒介される局面において、ベクター構築物はウイルスゲノムまたはその部分およびトランスジーンを含んでなるポリヌクレオチドに関する。アデノウイルス (A d) は、50種以上の血清型を含む、ウイルスの比較的詳しく特徴づけられた均一な群である (例えば、W O 9 5 / 2 7 0 7 1 号参照)。A d は成長しやすく、宿主細胞ゲノムへの組み込みを必要としない。組換え A d 由来ベクター、特に野生型ウイルスの組換えおよび生成の可能性を減らしたものも構築されていた (W O 9 5 / 0 0 6 5 5 号および W O 9 5 / 1 1 9 8 4 号参照)。野生型 A A V は、宿主細胞ゲノムへ組み込まれる高い感染力および特異性を有している (Hermonat and Muzyczka (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6466-6470 および Lebkowski et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3988-3996 参照)。 10

【 0 0 9 0 】

ポリヌクレオチドが作動的に結合されるプロモーターおよびクローニング部位を双方とも含有するベクターが当業界において知られている。このようなベクターはインビトロまたはインビトロで R N A を転写でき、Stratagene (La Jolla, C A) および Promega Biotech (Madison, W I) のような供給元から市販されている。発現および / またはインビトロ転写を最適化するためには、クローンの 5' および / または 3' 非翻訳部分を除去、付加、または変更して、転写または翻訳のレベルで発現を妨げるまたは減少させる可能性のある余分で不適切な代替の翻訳開始コドンまたは他の配列を除くことが必要かもしれない。一方、コンセンサスリボソーム結合部位も発現を高めるために開始コドンのすぐ 5' 側に挿入できる。 20

【 0 0 9 1 】

遺伝子輸送ビヒクルには、D N A / リボソーム複合体および標的化ウイルスタンパク質 D N A 複合体を含めた、数種の非ウイルスベクターも含む。標的化抗体またはその断片も含んでなるリボソームが本発明の方法において用いられる。細胞への輸送を高めるために、本発明の核酸またはタンパク質は細胞表面抗原、例えば T C R 、 C D 3 、または C D 4 と結合する抗体またはその結合断片へ接合させてもよい。

【 0 0 9 2 】

“ハイブリッド形成”は、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合により安定化された複合体を形成するように一以上のポリヌクレオチドが反応する反応に関する。水素結合はワトソン クリック塩基対合、ホーグスタイン結合により、またはいずれか他の配列特異的様式により生じてもよい。複合体は、二重らせん構造を形成する二本の鎖、マルチ鎖複合体を形成する三本以上の鎖、一本の自己ハイブリッド形成鎖またはこれらいずれかの組合せを含んでもよい。ハイブリッド形成反応は、より広範な工程における一つの工程、例えば P C R 反応の開始またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的開裂を構成する。 30

【 0 0 9 3 】

ストリン杰ントハイブリッド形成条件は次の通りである：対象の核酸を含有したフィルターのプレハイブリッド形成が、6 × S S C 、 5 0 m M T r i s H C l (p H 7.5) 、 1 m M E D T A 、 0.02% Ficoll 、 0.02% B S A 、および 5 0 0 μ g / m L 变性サケ精子 D N A から構成される緩衝液中、 6 5 °C において 8 時間 ~ 一晩かけて行われる。フィルターは、 1 0 0 μ g / m L 变性サケ精子 D N A および 5 ~ 2 0 × 1 0 6 c p m の ³² P 標識プローブを含有するプレハイブリッド形成混合液中、好ましいハイブリッド形成温度 6 5 °C において、 4 8 時間ハイブリッド形成される。その後で、フィルター洗浄が 2 × S S C 、 0.01% Ficoll および 0.01% B S A を含有する溶液中 3 7 °C において 1 時間行われ、次いで 5 0 °C において 4 5 分間 0.1 × S S C で洗浄される。洗浄工程後、ハイブリッド形成プローブがオートラジオグラフィーにより検出される。このような方法は当業界で周知であり、 Sambrook et al. , 1989 および Ausubel et al. , 1989 において挙げられている。 40

【 0 0 9 4 】

“配列同一性”という用語は、二つのポリヌクレオチドまたはアミノ酸配列が比較ウイ 50

ンド (comparison window) で (即ち、ヌクレオチド対ヌクレオチドまたは残基対残基ベースで) 同一であることを意味する。用語 “ 配列同一性のパーセンテージ ” (例えは、 80 %、 85 %、 90 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 99 %、 または 99 % 超) は、比較のウインドで二つの最適に整列された配列を比較し、同一の核酸塩基 (例えは A 、 T 、 C 、 G 、 U 、または I) または残基が両配列で生じる位置の数を求めて、合致位置の数を算出し、合致位置の数を比較ウインドにおける位置の総数 (即ち、ウインドサイズ) で割り、結果に 100 を掛けて配列同一性のパーセンテージを出すことにより計算される。最適なアライメント後、少なくとも 21 の連続ヌクレオチドまたは 7 連続アミノ酸の比較ウインドで、多くは、少なくとも 150 の連続ヌクレオチドまたは 50 連続アミノ酸の比較ウインドで配列がリファレンス配列と比較され、その際に比較ウインドでリファレンス配列の 20 % 以下に及ぶ欠失または付加を含む配列とリファレンス配列を比較することにより配列同一性のパーセンテージが計算される。

【 0095 】

比較のための配列のアライメント法は当業界において周知である。比較ウインドを整列させるために最適の配列のアライメントは、 Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981) のローカルホモロジーアルゴリズム、 Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970) のホモロジーアライメントアルゴリズム、 Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85, 2444 (1988) の類似度法のサーチ、これらアルゴリズム (Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0 の G A P 、 B E S T F I T 、 F A S T A 、 および T F A S T A (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.) 、 Genework または MacVector ソフトウェアパッケージ) のコンピューター実装、またはマニュアルアライメントおよび視覚検査 (例えは、 Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 supplement) 参照) により行われ、様々な方法で作られた最良アライメント (即ち、比較ウインドでホモロジーの最高パーセンテージを示す) が選択される。相同性または配列同一性のパーセントは、好ましくは、 Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1997) および Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990) において各自記載されている、周知 BLAST または BLAST 2.0 アルゴリズムおよびデフォルトパラメーターを用いて求められる。 BLASTN プログラム (ヌクレオチド配列の場合) においては、デフォルトとして、 11 の wordlength (W) 、 10 の expectation (E) 、 M = 5 、 N = 4 、および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列の場合、 BLASTP プログラムは、デフォルトとして、 3 の wordlength および 10 の expectation (E) と、 BLOSUM62 スコアリングマトリックス (Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989) 参照) 、 50 の alignment (B) 、 10 の expectation (E) 、 M = 5 、 N = 4 、および両鎖の比較を用いる。これらプログラムおよびソフトウェアの詳細は、以下のワールドワイドウェブアドレスにおいて見られる National Center for Biotechnology Information から得られる :

ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST

【 0096 】

“ 単離された ” という用語は、ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片が自然状態で通常会合している、細胞およびその他における諸成分から分離されることを意味する。例えは、ポリヌクレオチドに関して、単離されたポリヌクレオチドとは、それが染色体で通常会合している 5 および 3 配列から分離されたものをいう。当業者に明らかなように、非天然ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片は、それをその天然対応物から区別する上で “ 単離 ” を必要としない。加えて、 “ 濃縮された ” 、 “ 分離された ” 、または “ 希釈された ” ポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片は、容積当たり分子の濃度または数がその天然対応物の場合より “ 濃縮されている ” または “ 分離されて ” いないという点において、その天然対応物から区別しうる。その一次配列でまたは例えはそのグリコシル化パターンで天然対応物とは異なるポリヌクレオチド、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、抗体、またはその断片はその単離形で存在する必要が

10

20

30

40

50

なく、なぜならそれはその一次配列でまたは他の特性、例えばそのグリコシル化パターンでその天然対応物から区別しうるからである。ここで開示されている発明の各々については断言できないが、以下でおよび適切な条件下で開示されている組成物の各々に関する上記態様のすべてが本発明により提供されている、と理解すべきである。そのため、非天然ポリヌクレオチドは単離天然ポリヌクレオチドとは別の態様として提供される。細菌細胞において產生されるタンパク質は、自然に產生されている真核細胞から単離された天然タンパク質とは別の態様として提供される。哺乳動物細胞、例えば樹状細胞は、それが生物でみられる解剖学的部位から除去されていれば、単離されている。

【0097】

“宿主細胞”、“標的細胞”、または“レシピエント細胞”とは、外来核酸分子、ポリヌクレオチド、および／またはタンパク質の取込みのためのベクターのレシピエントであるまたはあった、個別の細胞または細胞培養物を含めた意味である。それは単一細胞の子孫も含めた意味であり、子孫は自然的、偶発的、または意図的突然変異により元々の親細胞とは必ずしも（形態的にまたはゲノムもしくは全DNA相補性において）完全に同一でなくてよい。細胞は原核でもまたは真核でもよく、細菌細胞、酵母細胞、動物細胞、および哺乳動物細胞、例えばネズミ、ラット、サル、またはヒト細胞を含むが、それらに限定されない。

【0098】

“対象者”は脊椎動物、好ましくは哺乳動物、更に好ましくはヒトである。哺乳動物には、ネズミ、サル、ヒト、家畜、スポーツアニマル、およびペットがあるが、それらに限定されない。

【0099】

“コントロール”は比較目的のために実験で用いられる別の対象者またはサンプルである。コントロールは、“陽性”でもまたは“陰性”でもよい。例えば、実験の目的が免疫応答と具体的培養条件との相関性を調べることである場合、陽性コントロールおよび陰性コントロールを用いることが通常好ましい。

【0100】

“癌”とは、癌細胞が細胞増殖制御の有意な喪失で特徴づけられる異常成長表現型を示すように、比較的自律した成長を示す細胞の異常な存在を意味する。癌性細胞は良性でもまたは悪性でもよい。様々な態様において、癌は膀胱、血液、脳、乳房、結腸、消化管、肺臓、卵巣、脾臓、前立腺、または皮膚の細胞に罹患する。癌細胞の定義には、ここで用いられているように、一次癌細胞のみならず、癌細胞原種に由来する細胞も含む。これには転移癌細胞と、癌細胞に由来するインビトロ培養物および細胞系を含む。癌には、固体腫瘍、液体腫瘍、血液悪性疾患、腎臓細胞癌、黒色腫、乳癌、前立腺癌、精巣癌、膀胱癌、卵巣癌、子宮頸癌、胃癌、食道癌、脾臓癌、肺癌、神経芽腫、神経膠芽腫、網膜芽腫、白血病（慢性リンパ性白血病を含む）、骨髄腫、リンパ腫、肝癌、腺腫、肉腫、癌腫、芽腫などがあるが、それらに限定されない。固体腫瘍として通常現れる癌の種類に言及する場合、“臨床的に検出しうる”腫瘍とは、例えばCATスキャン、磁気共鳴画像化（MRI）、X線、超音波、または触診のような手法により、腫瘍マスに基づき検出しうるものである。生化学または免疫学的所見だけでは、この定義を満たす上で不十分かもしれない。

【0101】

“培養”という用語は、適切な培地における細胞のインビトロ維持、分化、および／または増殖に関する。“富化”とは、生物に存在する組織でみられるより、全細胞の多くの割合で存在する細胞を組成物が含んでなることを意味する。例えば、本発明の方法により得られるCD83⁺CCR7⁻DCおよびCD83⁺CCR7⁺DCの富化培養物および調製物は、それらが生物で存在する組織中のそれらの割合と比較して、全細胞の高い割合で存在する（例えば、血液、皮膚、リンパ節など）。

【0102】

“組成物”とは、活性剤と、不活性（例えば、検出可能剤またはラベル）または活性（

10

20

30

40

50

例えば、アジュvant) な他の化合物もしくは組成物との組合せを包含した意味である。

【0103】

“医薬組成物”とは、活性剤と、インピトロ、インピボ、またはエクスピボにおいて診断または治療用に組成物を適したものにする、不活性または活性な担体との組合せを包含した意味である。

【0104】

ここで用いられている“薬学上許容される担体”という用語は、あらゆる標準製薬担体、例えばリン酸緩衝液、水、およびエマルジョン、例えば油／水または水／油型エマルジョン、および様々な種類の湿潤剤を包含している。組成物は安定剤および保存剤も含有する。担体、安定剤、およびアジュvantの例に関しては、Martin REMINGTON'S PHARM. SCI., 18th Ed. (Mack Publ. Co., Easton(1990)) 参照。

10

【0105】

“有効量”は、有益なまたは望ましい結果、例えば高い免疫応答、治療、予防、または病状(疾患、感染など)の改善を得るために十分な量である。有効量が一回以上の投与、塗布、または投薬により投与される。適切な投薬量は、体重、年齢、健康、治療される疾患または状態および投与経路に応じて様々である。

【0106】

ここで用いられている“シグナリング”とは、未成熟または成熟樹状細胞を IFN レセプターアゴニスト、TNF レセプターアゴニスト、CD40L ポリペプチド、または他の CD40 アゴニストと接触させることを意味する。一つの態様において、このようなアゴニストは外部から(例えば、細胞培地に)供される。他の態様において、ポリペプチドアゴニストは、該ポリペプチドをコードする核酸で未成熟または成熟樹状細胞のトランスクレクションにより供される。一方、核酸アブタマーアゴニストは培地でまたはトランスクレクションにより供される。ポリペプチドをコードする核酸により樹状細胞をトランスクレクトすることによりポリペプチドが供される場合、核酸でトランスクレクト時よりもむしろポリペプチドをコードする mRNA の翻訳時にシグナリングが行われる。一つの態様において、本発明はインピボおよび/またはインピトロにおいて強い免疫刺激応答を誘導する成熟樹状細胞(DC)の富化集団を作製するための方法を提供する。ここで用いられている“成熟樹状細胞”という用語は、未成熟 DC (iDC) と比較して、補助刺激分子 CD83 の高い細胞表面発現を呈する樹状細胞を意味する。本発明の成熟 DC には CD83⁺CCR7⁻DC および CD83⁺CCR7⁺DC 双方を含む。第二シグナル CD40 アゴニストは、未成熟 CD83⁻CCR7⁻DC または CD83⁺CCR7⁻成熟 DC に供される。

20

【0107】

文献 (Schaft 2005, Bonehill 2004) は、抗原コード RNA で DC の成熟化後エレクトロポレーションが、免疫応答を惹起させる効力の大きい DC を生じたことを示唆している。こうして、CD83⁺CCR7⁻成熟 DC (表現型成熟化後) への CD40L シグナリングのタイミングを変えることにより、‘CD40L ベース工程’ (CD83⁻iDC の順次的な IFN シグナリングに続く CD40L シグナリング) を変える方法が開発された。この態様では、最初に‘炎症媒介物質’ IFN および TNF 、および場合により PGE₂ を培地へ加え、次いで約 12 ~ 30 時間(好ましくは約 18 時間)後に CD40L mRNA および場合により抗原コード mRNA でエレクトロポレーションすることにより、DC が表現型で成熟化された。この新規工程は、CD83⁺CCR7⁺成熟 DC を產生するための CD40L における Post Maturation Electroporation の略記、‘PME CD40L’ と命名された。エレクトロポレーション後に回収されてワクチンとして処方された細胞が、インピトロアッセイにおいて最大免疫力を媒介することが示された(実施例参照)。一つの態様において、細胞はエレクトロポレーション後、約 5 分間 ~ 3 日間、エレクトロポレーション後約 2 ~ 6 時間、またはエレクトロポレーション後約 4 時間でワクチンに処方される。PME CD40L 工程により作製された樹状細胞は従来の樹状細胞と表現型で異なる。例えば、DC を作製する PME CD40L 工程は長期抗原特

30

40

50

異的 CTL エフェクター機能をサポートすることができ、しかも全重要事象において拡大し、サイトカインを産生し、標的細胞を殺して、頑強な長期 CTL エフェクター機能を媒介しうる能力を留めたエフェクターメモリー CTL の好ましい表現型を誘導することができる。このように、一つの態様において、本発明は抗原特異的 T 細胞の集団から CD 28⁺ CD 45 RA メモリー / エフェクター T 細胞の集団を優先的に誘導する樹状細胞を提供する。抗原特異的 T 細胞はナイーブ T 細胞でもまたは抗原経験 T 細胞でもよい。エフェクター / メモリー T 細胞は IFN- γ 、 IL-2 を産生し、標的細胞を殺す。エフェクター T 細胞は IFN- γ を産生し、標的細胞を殺せるが、 IL-2 は産生しない。メモリー T 細胞は IFN- γ および IL-2 を産生するが、標的細胞は殺さない。

【 0108 】

10

更なる増強として、エフェクター細胞のこの集団を免疫応答ヘリクルートするように、 NKT 細胞のための活性化リガンド、即ち ガラクトシルセラミドにより DC がパルスされる。 NKT 細胞は T ヘルパーおよび T 細胞傷害性細胞双方の側面を呈する： NKT 細胞は IFN- γ を分泌し、 CD 40L を呈し、グランザイム B を分泌でき、後者は標的細胞でアポトーシスを誘導する。このように、 NKT 細胞リクルートは追加 NKT 細胞 CD 40L / DC CD 40 相互作用により DC 機能の増強に至るか、あるいはヘルパーサイトカインを分泌するおよび / または標的細胞において直接溶解効果に寄与することにより細胞性免疫応答を増幅させる。

【 0109 】

20

i DC へ第一シグナル (IFN- γ レセプターアゴニストおよび / または TNF- α レセプターアゴニスト) および CD 83⁻ CCR7⁻ i DC または CD 83⁺ CCR7⁻ 成熟 DC へ第二シグナル (CD 40 アゴニスト) で順次シグナリング後、得られた DC は i) 補助刺激分子 CD 80 、 CD 83 、および CD 86 の高い細胞表面発現を示し、 ii) CCR7⁺ であり、 (iii) IL-12 p 70 ポリペプチドまたはタンパク質を分泌し、および / または有意な低レベル (例えば、 0 ~ 500 pg / DC 百万個) の IL-10 を分泌する。好ましい態様において、本発明の成熟 CD 83⁺ CCR7⁺ DC は少なくとも 1000 pg IL-12 / 10⁶ DC 、好ましくは少なくとも 2000 、 3000 、 4000 、 5000 、または 6000 pg IL-12 / 10⁶ DC 、更に好ましくは少なくとも 7000 、 8000 、 9000 、または 10,000 pg IL-12 / 10⁶ DC 、最も好ましくは少なくとも 12,000 、 15,000 、 17,000 、または 20,000 pg IL-12 / 10⁶ DC を産生する。 IL-10 および IL-12 レベルは、未成熟 DC から DC 成熟化の誘導後 3 ~ 6 時間以内に集められた培養上澄の ELISA により調べられる。 Wierda et al. (2000) Blood 96:2917 . Ajdary et al. (2000) Infection and Immunity 68:1760

30

【 0110 】

未成熟 DC は DC 前駆細胞を含有する適切な組織源から単離または調製され、未成熟 DC を産生するためにインビトロにおいて分化される。例えば、適切な組織源は骨髄細胞、末梢血始原細胞 (P B P C) 、末梢血幹細胞 (P B S C) 、および臍帯血細胞の一種以上である。好ましくは、組織源は末梢血単核細胞 (P B M C) である。組織源は新鮮なものでもまたは凍結されたものでもよい。他の態様において、細胞または組織源は、対象の細胞から容易に分離されることになる、非幹または始原細胞の成長および分化を促す有効量の成長因子で前処理される。これらの方法は当業界において知られており、 Romani et al. (1994) Exp. Med. 180:83 および Caux, C. et al. (1996) Exp. Med. 184:695 において簡単に記載されている。一つの態様において、未成熟 DC が末梢血単核細胞 (P B M C) から単離される。好ましい態様において、 P B M C はインターロイキン 4 (IL-4) および / または IL-13 の存在または非存在下において有効量の顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) により処理され、こうして P B M C が未成熟 DC へ分化する。最も好ましくは、未成熟 DC を産生するために、 P B M C が GM-CSF および IL-4 の存在下で約 4 ~ 7 日間、好ましくは約 5 ~ 6 日間培養される。好ましい態様では、第一シグナルが 4 、 5 、 6 、または 7 日目、最も好ましくは 5 または 6 日目に与えられる。加えて

40

50

、GM-CSF並びにIL-4および/またはIL-13が第一および/または第二シグナリングの時点で培地に存在してもよい。

【0111】

ヒトを含めた動物で樹状前駆細胞の数を増加させるために、造血を刺激する物質で対象者を前処理しうる。このような物質としてはG-CSFおよびGM-CSFがあるが、それらに限定されない。投与される造血因子の量は、該因子が投与されている個体の細胞差を測定することで、当業者により求められる。典型的には、G-CSFおよびGM-CSFのような因子の用量は、細胞傷害剤での処理から回復するよう個体を処理するために用いられる用量と類似している。例として、GM-CSFまたはG-CSFは、樹状細胞前駆体の割合を増やすために、源組織の除去前に標準用量で4~7日間投与される。米国特許第6,475,483号は、5~13日間にわたる1日300μgのG-CSFの用量と4~19日間にわたる1日400μgのGM-CSFの用量が樹状細胞の有意な収量につながることを開示している。

【0112】

本発明の方法は、強い免疫刺激剤である成熟CD83⁺CCR7⁺樹状細胞の富化集団を產生する。具体的には、本発明は：(a)IFN- γ アゴニストシグナル化樹状細胞を產生するためにインターフェロンガンマレセプター(IFN- γ アゴニスト)アゴニストおよび場合によりTNF- α アゴニストを含んでなる第一シグナルで単離未成熟樹状細胞(iDC)をシグナリングし、そして(b)CCR7⁺成熟樹状細胞を產生するために有効量のCD40アゴニストを含んでなる第二の一過性シグナルで該IFN- γ アゴニストシグナル化樹状細胞をシグナリングする連続工程を含んでなる、成熟樹状細胞(DC)を作製するための方法を提供する。本発明はCD83⁺CCR7⁺成熟DCおよびCD83⁺CCR7⁺成熟DCおよび/またはCD83⁺CCR7⁺成熟DCはCD40Lポリペプチドを一過性により発現する。好ましくは、CD40Lは細胞表面よりもむしろ細胞内で主に局在する。最も好ましくは、CD40Lポリペプチドの少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、または少なくとも90%は細胞内に局在する。

【0113】

別な態様において、未成熟樹状細胞は有効量のTNF- α レセプターアゴニストでシグナリングされ、次いでCD40アゴニストでシグナリングされる。このように、本発明は、腫瘍壞死因子アルファレセプター(TNF- α アゴニスト)アゴニストを含んでなる第一シグナルに続きCD40アゴニストを含んでなる第二シグナルで単離未成熟樹状細胞を順次シグナリングすることを含んでなり、該シグナリングが有効量のIL-1 α および/またはIL-6の非存在下におけるものである、成熟樹状細胞(DC)を作製するための方法を提供する。

【0114】

どちらの態様(第一シグナルとしてIFN- γ アゴニストまたはTNF- α アゴニスト)でも、第二CD40アゴニストシグナルがCD83⁺CCR7⁺iDCまたはCD83⁺CCR7⁺成熟DCへ与えられる。好ましい態様においては、未成熟DCおよび/または成熟DCがPGE₂と接触させられる。好ましくは、細胞が第一シグナル(IFN- γ アゴニストまたはTNF- α アゴニスト)を受けるのとほぼ同時に、それらはPGE₂と接触させられる。好ましい態様では、樹状細胞が第一および第二シグナルを受ける場合、GM-CSFと、IL-4またはIL-13の少なくとも一方とが培地に存在する。別の態様において、本方法では、CD1d拘束性NKT細胞を活性化することで自然および養子免疫を高められるNKT細胞リガンドと、未成熟樹状細胞、シグナル化樹状細胞および/またはCCR7⁺樹状細胞を更に接触させることを含む。好ましい態様において、NKT細胞リガンドはガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、6

デオキシガラクトシルセラミド、6デオキシガラクトフラノシルセラミド、6デオキシガラクトフラノシルセラミド、アラビノシルセラミド、Cガラクトシルセラミド、およびSガラクトシルセラミドからなる群より選択される化合物

10

20

30

40

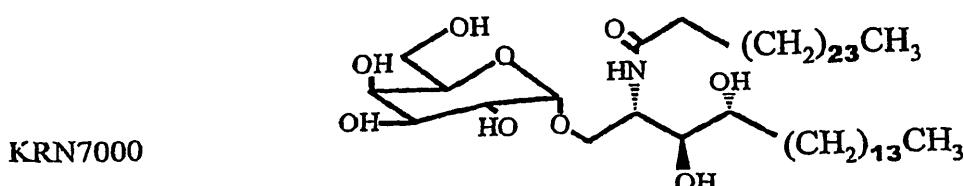
50

である。好ましい化合物は、KRN7000として知られる ガラクトシルセラミド（（2S,3S,4R）1-O（D-ガラクトピラノシリル）2-（N-ヘキサコサノイルアミノ）1,3,4-オクタデカントリオール）である。

【0115】

日本国特許第3068910号において開示されたアゲラスフィン類は、ガラクトシルセラミド（GalCer）構造と免疫刺激および抗腫瘍活性を有する、海綿において最初に発見された化合物のクラスである。KRN7000は米国特許第5,767,092号において開示されたアゲラスフィン類の強力な合成アナログであり、そこでの内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされる。アゲラスフィン類の追加の有用なアナログが米国特許第5,936,076号において開示され、その内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされる。KRN7000の構造は以下で示される：

【化1】



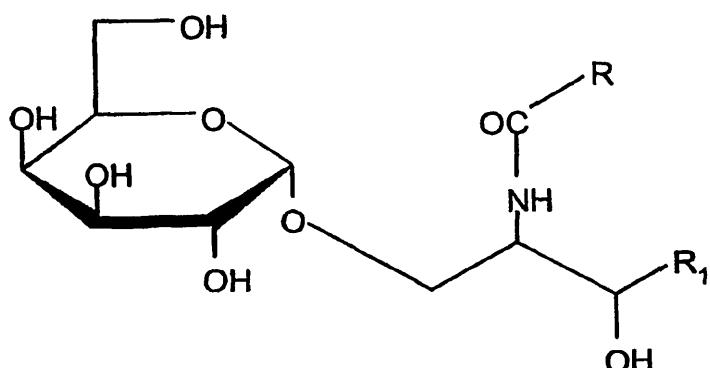
【0116】

KRN7000のグリコシルセラミドアナログ（例えば、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、6-デオキシガラクトシルセラミド、6-デオキシガラクトフラノシリルセラミド、6-デオキシガラクトフラノシリルセラミド、アラビノシリルセラミド）が米国特許第5,849,716号において開示され、その内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされる。米国特許第5,780,441は、その内容が参考のために組み込まれるが、KRN7000のオリゴ糖（二、三、四、五）誘導体について開示している。KRN7000抗原負荷DCを産生して、ヒトNKT細胞を活性化するためにKRN7000および関連アナログを用いる方法が、米国特許第09/721,768号および米国特許第6,531,453号において開示されており、各々の内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされる。

【0117】

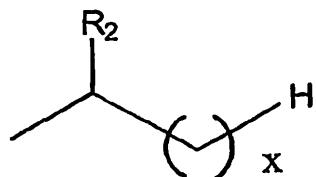
米国特許第5,936,076号は、その内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされるが、下記式で表される ガラクトシルセラミド化合物について開示している：

【化2】



上記式中、脂肪酸鎖Rは以下を表し：

【化3】



(R₂はHまたはOHを表し、Xは0～26の整数を表す)、またはRは(CH₂)₇CH=CH(CH₂)₇CH₃を表し、R₁は下記(a)～(e)において規定される置換基のいずれか一つを表す：

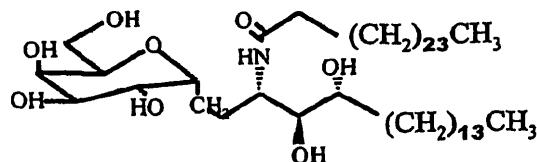
- (a) CH₂(CH₂)_yCH₃
- (b) CH(OH)(CH₂)_yCH₃
- (c) CH(OH)(CH₂)_yCH(CH₃)₂
- (d) CH=CH(CH₂)_yCH₃
- (e) CH(OH)(CH₂)_yCH(CH₃)CH₂CH₃

Yは5～17の整数を表す。

【0118】

内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされるWO03/105769号、米国特許第2004/0127429号と、Shimieg J. et al. (2003) J. Exp. Med. 198:1631-1641は、グリコシルセラミド、例えばガラクトシルセラミドおよびグルコシルセラミドのグリコシド結合における酸素原子が炭素原子で置き換えられた、C糖脂質の構造について開示している。代表的化合物の構造が以下で示される。

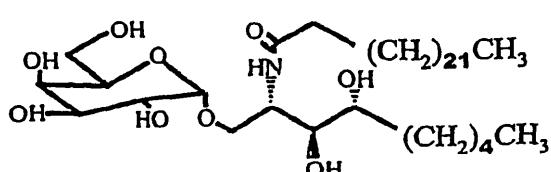
【化4】

C-GalCer

【0119】

WO03/016326号は、その内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされるが、下記構造を有する“C4”または“OCH”のような、トランケート化セラミドのKRN7000アナログについて開示している：

【化5】

C4 (OCH)

【0120】

米国特許第6,635,622号は、その内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされるが、ガラクトシルセラミドのグリコシド結合における酸素原子が(CH₂)_aCH=CH(CH₂)_a、(CH₂)_aS(O)₀₋₂CH₂、またはNHCH₂(aおよびaは各々0～5の整数を示し、a+aは5以下である)で置き換えられた、C、N、またはS糖脂質について開示している。

10

20

30

40

50

【0121】

好ましい態様において、IFN-RアゴニストはIFNまたはその生物活性断片である。好ましくはIFNは哺乳動物IFN、最も好ましくはヒトIFNである。ヒトIFNのcDNAおよびアミノ酸配列が各々SEQ ID NO:5および6において示される。好ましくは、IFNはSEQ ID NO:6において示された配列またはその断片を有している。一つの態様において、IFN-RはSEQ ID NO:6と少なくとも80%配列同一性を有したポリペプチドを含んでなる。好ましくは、IFN-RアゴニストはSEQ ID NO:6と少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、または99%配列同一性を有している。IFN-Rアゴニストの活性を試験するための方法は当業者に知られ、これら方法の一部が以下において記載されている。未成熟DCは、IFN-Rアゴニストを培地へ加えるか、またはIFN-Rアゴニストを樹状細胞において発現させることにより、シグナリングされる。一つの態様においては、IFN-Rアゴニスト、例えばSEQ ID NO:6またはその生物活性断片をコードするmRNAによりDCがトランスフェクトされる。シグナリングは樹状細胞内でmRNAの翻訳時に生じることになる。最も好ましくは、IFN-Rアゴニストが未成熟DCを含有する培地へ加えられる。好ましい態様において、培地は更にPGE₂および/またはGM-CSF+IL-4またはIL-13を含んでなる。

【0122】

IFNのレセプターは二つのサブユニット：IFN-R1、リガンド結合鎖（鎖としても知られる）およびIFN-R2、シグナル伝達鎖（鎖またはアクセサリー因子1としても知られる）を有している。これらのタンパク質は、異なる染色体に位置する別々の遺伝子（各々IFNGR1およびIFNGR2）によりコードされている。リガンド結合（）鎖がIFNと相互作用すると、それらはダイマー化して、二本のシグナル伝達（）鎖と会合するようになる。レセプターアセンブリーは、ヤヌスキナーゼJAK1およびJAK2の活性化と、IFN-R1の細胞内ドメインでチロシン残基のリン酸化に至る。これは、ホモダイマーを形成し、核へ移転して広範囲のIFN応答遺伝子を活性化させる、（‘転写のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター’に関する）STAT1のリクルートおよびリン酸化に至る。シグナリング後、リガンド結合鎖は内在化して、解離する。鎖は次いで細胞表面へリサイクルされる。Bach et al. (1997) Ann. Rev. Immunol. 15, 563-591およびLammas, Casanova and Kumararatne (2000) Clin. Exp. Immunol. 121, 417-425。ヒトIFNと、IFN-Rの可溶性グリコシル化細胞外部分（sIFN-R）との複合体の結晶構造が、多波長異常回折法を用いて2.9分解能で調べられた。Thiel et al. Structure 8:927-936 (2000)。

【0123】

あるアッセイにおいて、IFNレセプターアゴニスト、例えばIFNは、ヒト腸上皮CaCO-2細胞で時間依存的および濃度依存的にNa⁺-K⁺-ATPアーゼ活性を減少させる。Na⁺-K⁺-ATPアーゼ活性は全およびウアバイン感受性ATPアーゼ間の差異として調べられる。IFNでの処理は、ホスホSTAT1の発現を増加させ、p38MAPKの活性化を伴う。p38MAPK活性はp38MAPKキナーゼ抗体を用いて（例えば、New England Biolabs市販のp38MAPKキナーゼアッセイキットを用いて）ウエスタンプロッティングにより解析できる。全およびリン酸化STAT1タンパク質レベルはStat1抗体（例えば、New England BiolabsからPhosphoPlus Stat1 Antibody Kitで市販されているもの）を用いて検出できる。IFN形質導入メカニズムは、PKC下流STAT1リン酸化およびRaf-1、MEK、ERK2、およびp38MAPK経路の活性化を伴う。Magro et al. Br. J. Pharmacol. advance online publication, July 26, 2004, doi:10.1038/sj.bjp.0705895参照、この内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされる。

【0124】

説明の目的のために、IFNレセプターアゴニスト、TNFレセプターアゴニスト、および/またはCD40アゴニストでのシグナリングは、各々IFNポリペプ

チドおよび／またはタンパク質および／またはTNF ポリペプチドまたはタンパク質および／またはCD40アゴニストと直接細胞を接触させることにより行える。一方、IFN Rアゴニスト、TNF Rアゴニスト、またはCD40アゴニストで細胞のシグナリングは、樹状細胞内でこのようなポリペプチドまたはタンパク質をコードするmRNAの翻訳時に生じてもよい。その際、シグナリングはIFN Rアゴニスト、TNF RアゴニストおよびCD40アゴニストポリペプチドおよび／またはタンパク質の発現時に生じる。

【0125】

本発明の方法で用いられる第二シグナルは、CD40アゴニストでの一過性シグナルである。CD40アゴニストポリペプチドの永続的発現、例えばKoyaらの前掲で記載されているようなレンチウイルスベクターからのCD40Lの構成的発現は、一過性発現とみなされない。非限定的な例として、CD40アゴニストを含有する媒体がDCから除去されれば、またはCD40アゴニストをコードするmRNAでDCが負荷されれば、シグナルは一過性とみなされるであろう。CD40アゴニストをコードする発現ベクターでDCが負荷／トランスフェクトされても、1) CD40アゴニスト発現を駆動するプロモーターがDCで構成性でない、または2) 発現ベクターがDCゲノムへ組み込まれずまたはDCで複製されないという条件であれば、CD40アゴニストシグナルは一過性とみなされる。

【0126】

好ましい態様において、CD40アゴニストはCD40LポリペプチドまたはCD40アゴニスト抗体である。一般的に、CD40と結合するリガンドはCD40アゴニストとして作用してもよい。本発明者らは、CD40L mRNAで未成熟または成熟DCのトランスフェクションによる細胞へのCD40Lを含んでなる第二シグナルの投与が、免疫抑制応答よりもむしろ免疫刺激応答を誘導する成熟DCの產生をもたらすことを証明した。一つの態様では、CD40L mRNAトランスフェクト樹状細胞が、有効量のCD40Lシグナルを生じさせるために、CD40L mRNAのトランスフェクション直後でかつ翻訳前にIFN (および好ましくはPGE₂も)を含有する培地で培養される。この態様では、CD40L mRNAでトランスフェクション後にIFN が加えられるが、樹状細胞はCD40L mRNAの翻訳時に生じるシグナル前にIFN シグナルを受け取る。このように、物質が細胞へ輸送される順序は、CD40LシグナリングがIFN

シグナリング後に起きねばならないという点のみで重要である。以下で更に詳細に記載されているように、DCのシグナリングはインビボまたはエクスピボで行い、あるいは一以上のセットはエクスピボで行い、本方法の残りの工程はインビボで行ってもよい。

【0127】

一つの態様において、CD40アゴニストはCD40と結合するアプタマーである。同様に、IFN およびTNF は、類似生物活性を有するアプタマー、抗体などで置き換えられる。最も好ましくは、CD40アゴニストはCD40LをコードするmRNAとして輸送される。

【0128】

ここで用いられている“CD40リガンド”(CD40L)は、CD40レセプターを特異的に認識および活性化して、その生物活性を活性化させる、あらゆるポリペプチドまたはタンパク質を包含している。該用語には貫膜および可溶形のCD40Lを含む。好ましい態様において、CD40アゴニストは哺乳動物CD40L、好ましくはヒトCD40Lである。ヒトおよびマウスcDNAおよびタンパク質のアライメントが図16および17で各々示されている。ヒトCD40L cDNAおよび対応アミノ酸配列がSEQ ID NO:1および2で各々示されている。CD40Lの読み取り枠はSEQ ID NO:1のヌクレオチド40 822で表され、一方TGA終止コドンが823 825位にある。本発明のCD40Lポリヌクレオチド配列のいずれでも、双方ともLysについてコードする、“AAA”コドンを“AAG”コドンへ変える、CD40L配列で102番目コドン(SEQ ID NO:1のヌクレオチド343 345)のサイレント突然変異(

10

20

30

40

50

コドン縮重によるバリエント)が用いられてもよい。本発明の方法では、SEQ ID NO:2の残基47 261(SEQ ID NO:1のヌクレオチド残基178 825によりコードされる)、およびSEQ ID NO:1のヌクレオチド43 825、SEQ ID NO:1の181 825、SEQ ID NO:1の193 825、SEQ ID NO:1の376 825、SEQ ID NO:1の379 825、およびSEQ ID NO:1の400 825によりコードされるCD40L断片に限定されないが、それらを含めたトランケート化CD40Lリガンドも有用である。ある態様においては、CD40Lポリペプチドは：a) SEQ ID NO:2を含んでなるポリペプチド、b) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基47 261を含んでなるポリペプチド、c) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基51 261を含んでなるポリペプチド、d) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基120 261を含んでなるポリペプチド、e) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基113 261を含んでなるポリペプチド、f) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基112 261を含んでなるポリペプチド、g) SEQ ID NO:10 10を含んでなるポリペプチド、h) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基35 261を含んでなるポリペプチド、i) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基34 22 5を含んでなるポリペプチド、j) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基113 22 5を含んでなるポリペプチド、k) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基120 22 5を含んでなるポリペプチド、および1) (a) ~ (k) のいずれかのポリペプチドの断片(該断片はCD40と結合する)からなる群より選択される。最も好ましくは、CD40LポリペプチドはSEQ ID NO:2のアミノ酸残基21 261からなる、または本質的になる。他の態様において、CD40LポリペプチドはSEQ ID NO:2のアミノ酸残基と少なくとも80%配列同一性を有するポリペプチドからなる、または本質的になる。好ましい態様において、配列同一性は少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%である。一部の態様において、CD40Lポリペプチドは、SEQ ID NO:2のアミノ酸残基21 261と比較した場合、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10のアミノ酸置換を有している。好ましくは、アミノ酸置換は保守的置換である。

【0129】

様々な態様において、CD40Lポリペプチドは：a) SEQ ID NO:1のポリヌクレオチド、b) SEQ ID NO:1のヌクレオチド40 822を含んでなるポリヌクレオチド、c) SEQ ID NO:1のヌクレオチド178 822を含んでなるポリヌクレオチド、d) SEQ ID NO:1のヌクレオチド190 822を含んでなるポリヌクレオチド、e) SEQ ID NO:1のヌクレオチド397 822を含んでなるポリヌクレオチド、f) SEQ ID NO:1のヌクレオチド376 822を含んでなるポリヌクレオチド、g) SEQ ID NO:9のポリヌクレオチド、h) SEQ ID NO:13のポリヌクレオチド、i) (a) ~ (h) のいずれかのポリヌクレオチドと少なくとも80%配列同一性を有するポリヌクレオチド、j) (a) ~ (h) のいずれかのポリヌクレオチドとストリンジメント条件下においてハイブリッド形成するポリヌクレオチド、およびk) SEQ ID NO:14、15、16、17、または18の核酸からなる群より選択される3 非翻訳配列および/またはSEQ ID NO:19、20、21、22、または23の核酸からなる群より選択される5 非翻訳配列を更に含んでなる(a) ~ (j) のポリヌクレオチドからなる群より選択されるポリヌクレオチドを含んでなるmRNAによりコードされている。好ましくは、これらのRNAはキャップ化およびポリアデニル化されている。

【0130】

一方、CD40Lポリペプチドは：a) SEQ ID NO:2を含んでなるポリペプチド、b) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基47 261を含んでなるポリペプチド、c) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基51 261を含んでなるポリペプチド、d) SEQ ID NO:2のアミノ酸残基120 261を含んでなるポリペプチド、e) S 50

EQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 113 261 を含んでなるポリペプチド、f) SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 112 261 を含んでなるポリペプチド、g) SEQ ID NO: 10 を含んでなるポリペプチド、h) SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 35 261 を含んでなるポリペプチド、i) SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 34 225 を含んでなるポリペプチド、j) SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 113 225 を含んでなるポリペプチド、k) SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 120 225 を含んでなるポリペプチド、および 1) (a) ~ (k) のいずれかのポリペプチドの断片（該断片は CD40 と結合する）からなる群より選択されるポリペプチドと少なくとも 77% 配列同一性を有するポリペプチドである。

【0131】

10

最も好ましくは、CD40L ポリペプチドは、SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 21 261 からなるまたは本質的になる、ここで提供される新規 CD40L ポリペプチド、あるいはそれと少なくとも 80%、更に好ましくは少なくとも 85%、90%、95%、96%、97%、98%、最も好ましくは少なくとも 99% 相同性を有するポリペプチドである。好ましくは、CD40L ポリペプチドは、SEQ ID NO: 30 または SEQ ID NO: 33 の cDNA、またはコドン縮重により異なるバリアントに対応する RNA によりコードされる。ここで用いられている、cDNA 配列に対応する RNA とは、DNA でチミン(T) 塩基が RNA でウラシル(U) 塩基へ置き換わるように、ヌクレオチドがデオキシリボヌクレオチドの代わりにリボヌクレオチドであることを除き、cDNA 配列と同様の配列を有する RNA 配列に関する。好ましくは、RNA はキャップ化およびポリアデニル化されている。したがって、本発明は SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 21 261 からなるまたは本質的になる CD40L ポリペプチドを提供する。他の態様において、本発明は SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 21 261 からなるまたは本質的になる CD40L ポリペプチドをコードする核酸を提供する。このような核酸でトランスクレプトされた樹状細胞も、このような樹状細胞を含んでなるワクチンと共に提供される。好ましくは、本発明のこれら新規 CD40L ポリペプチドをコードする RNA で樹状細胞が一過性にトランスクレプトされる。

20

【0132】

他の態様において、本発明は：(a) IFN-R アゴニストシグナル化樹状細胞を產生するためにインターフェロンガンマレセプター (IFN-R) アゴニストおよび場合により TNF-R アゴニストを含んでなる第一シグナルで単離未成熟樹状細胞 (iDC) をシグナリングし、および (b) CCR7⁺ 成熟樹状細胞を產生するために有効量の CD40L ポリペプチドを含んでなる第二一過性シグナルにより該 IFN-R アゴニストシグナル化樹状細胞をシグナリングする連続工程を含んでなり、CD40L ポリペプチドが SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 21 261 から本質的になる、または SEQ ID NO: 2 のアミノ酸残基 21 261 と少なくとも 80% 配列同一性を有するポリペプチドである、成熟樹状細胞 (DC) を作製するための方法を提供する。

30

【0133】

CD40 は B リンパ球で発現されるレセプターとして最初に特徴づけられた。Schonbeck and Libby (2001) Cell Mol. Life Sci. 58:4。B 細胞 CD40 と活性化 T 細胞で発現される CD40L との組み合いか T 細胞依存性 B 細胞活性化（即ち、増殖、免疫グロブリン分泌、およびクラススイッチ）に必須であることが、後に見出された。その後で、機能性 CD40 は B 細胞以外の様々な細胞の種類、例えば造血前駆細胞、T リンパ球、好塩基球、好酸球、単球 / マクロファージ、樹状細胞、上皮細胞、内皮細胞、平滑筋細胞、ケラチン細胞、線維芽細胞、および癌腫で発現されることがわかった。Schonbeck and Libby (2001) 前掲。

40

【0134】

CD40 リガンドは 1993 年にクローン化され、Gauchat et al. (1993) FEBS Lett. 315-259 により報告された。Graf はそれを染色体 X q26.3 q27.1 に地図化した (Graf et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:3191-3194)。CD40 リガンドの細胞関連全長

50

39 kDa型の短可溶型が33 kDaおよび18 kDaの分子量で記載されていた。Graf et al.(1995)Eur.J.Immunol.25:1749、Ludewig et al.(1996)Eur.J.Immunol.26:3137、Wykes et al.(1998)Eur.J.Immunol.28:548。細胞質テール、貫膜領域および細胞外ドメインの一部を欠くが、CD40結合ドメインを保持した、細胞内タンパク質分解切断により得られる18 kDa可溶型は、CD40レセプターと結合しうる能力を留めており、したがってCD40レセプターシグナリング物質の例である。Graf et al.(1995)前掲。

【0135】

米国特許第5,981,724号は、ヒトCD40リガンド(CD40L)をコードするDNA配列と、CD40Lポリペプチドを産生する目的のためのベクターおよび形質転換宿主細胞について開示している。米国特許第5,962,406号は、ヒトCD40Lの可溶型をコードするDNA配列について開示している。 10

【0136】

CD40Lとの哺乳動物ホモログの例示配列は次のGenbankアクセス番号を有している: NM_204733 (Gallus gallus(ニワトリ))、DQ054533 (Ovis aries(ヒツジ))、Z48469 (Bos taurus(ウシ))、AY333790 (Canis familiaris(イヌ))、(Macaca nemestrina(ブタオザル))、AF344844 (Callithrix jacchus(シロミミマー)モセット)、AF34481 (Cercicebus torquatus atys(スティマンガベイ))、AF344860 (Aotus trivirgatus(ヨザル))、AF344859 (Macaca mulatta(アカゲザル))、AF116582 (Rattus norvegicus(ノルウェーラット))、およびAF079105 (Felis catus(ネコ))。 20

【0137】

CD40レセプターは、CD40アゴニスト抗体、抗体断片、誘導体、およびそれらのバリエントの使用においても活性化される。CD40アゴニスト抗体はMabtech (Nacka, Sweden)のような商業ベンダーから購入される。これらの物質を作製するための例および方法も以下において示される。該文献はCD40アゴニスト抗体および抗体断片の例も示している。例えば、Osada et al.(2002)25(2):176およびLedbetter, J.A. et al.(1997)Crit.Reviews in Immunol.17:427参照。

【0138】

上記のように、CD40Lの生物活性を有する物質には、CD40Lをコードする外来ポリヌクレオチド(mRNAまたはDNA)から翻訳されたポリペプチドがある。例えば、CD40L mRNAはSEQ ID NO:1またはSEQ ID NO:3の配列を有している。一方、細胞は有効量のCD40Lタンパク質および/またはポリペプチド、例えば、SEQ ID NO:2またはSEQ ID NO:4の配列を有するものでシグナリングされる。修飾CD40Lも本発明の方法で用いられる。例えば、CD40Lには、得られたタンパク質がDCの表面においてCD40と結合するという条件により、いくつかのアミノ酸の保守的または非保守的な付加、欠失、または置換により変えられた分子を含む。“保守的変更”とは、類似した電荷密度、親和性もしくは疎水性、大きさ、および/または立体配置の代替アミノ酸(例えば、Ileに代わるVal)をもたらすものである。比較のために、“非保守的変更”とは、異なる電荷密度、親和性もしくは疎水性、大きさ、および/または立体配置の代替アミノ酸(例えば、Pheに代わるVal)をもたらすものである。このような修飾を行う手段は当業界において周知であり、市販キットおよびベクター(例えば、New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass. ; Clontech, Palo Alto, Calif. 市販のもの)により遂行される。 40

【0139】

物質が該物質をコードするポリヌクレオチドまたは遺伝子として輸送される場合、有効量のポリヌクレオチドが当業界で知られているいずれかの方法により複製される。PCR技術はDNAを複製するための一手段であり、米国特許第4,683,195号、第4,800,159号、第4,754,065号、および第4,683,202号の主題であって、PCR:THE POLYMERASE CHAIN REACTION (Mullis et al.eds, Birkhauser Press, Boston(1995))およびそこで引用されたリファレンスにおいて記載されている。ポリヌクレ 50

オチドを作製する追加方法が以下において示されている。

【0140】

未成熟樹状細胞がTNFレセプターのアゴニストで刺激されてからCD40アゴニストで刺激される本発明の態様において、該方法は有効量のインターロイキン1ベータ(IL-1)および/またはインターロイキン6(IL-6)の非存在下において行われる。IL-1およびIL-6のようなタンパク質の存在を検出するための方法は当業界において知られている。

【0141】

当業者であれば、CD40L mRNAおよび/またはCD40Lポリペプチドを発現する成熟DCの存在について、集団からDCの細胞または小集団をサンプリングすることにより、本発明の目的がいつ達成されたかを調べられる。別の態様において、本発明の成熟CD83⁺CCR7⁺DCはインターロイキン12(IL-12)p35タンパク質を発現する。別の態様において、成熟CD83⁺CCR7⁺DCはIL-12p35タンパク質を発現し、および/または限定されたIL-10(500pg/mL/10⁶DC以下)を発現する。

10

【0142】

本方法の工程はインビボまたはエクスピボにおいて実施される。エクスピボで実施される場合、本方法は開放または閉鎖システムにおいて実施される。細胞集団を培養および富化するための方法およびシステムは当業界において知られている。米国特許公開第2004/0072347号の実施例1および2参照。細胞拡大のための閉鎖システムについて記載する米国特許公開第2003/0235908号も参照。

20

【0143】

本発明の別の態様において、成熟DCによりプロセッシングおよび提示されることになる有効量の抗原を未成熟または成熟DCへ輸送することで、上記方法が更に変更される。このように、本発明の方法においては、抗原負荷CCR7⁺成熟DCを產生するために、一種以上の抗原または一種以上の抗原をコードするポリヌクレオチドをiDC、シグナル化DCまたはCCR7⁺成熟DCへ導入することを更に含んでなる。抗原または抗原コードポリヌクレオチドは上記第一シグナルの前に導入されうる。一方、抗原または抗原コードポリヌクレオチドは該第一シグナルの後で上記第二シグナルの前に輸送される。他の態様において、抗原またはポリヌクレオチドは該第二シグナルの後または該第二シグナルと実質上同時に輸送される。

30

【0144】

例えば、抗原としては病原体、病原体溶解産物、病原体抽出物、病原体ポリペプチド、ウイルス粒子、細菌、タンパク質、ポリペプチド、癌細胞、癌細胞溶解産物、癌細胞抽出物、癌細胞特異的ポリペプチドがあるが、それらに限定されない。抗原は天然でもまたは組換え產生でもよい。以下で簡単に記載されている当業界で公知の方法を用いて、ポリペプチド、タンパク質、または核酸として免疫原が細胞へ輸送される。好ましくは、一種以上の抗原をコードする一種以上のポリヌクレオチドがiDC、シグナル化DC、またはCCR7⁺成熟DCへ導入される。ポリヌクレオチドは当業者に公知の方法でDCへ導入される。好ましい態様において、ポリヌクレオチドはエレクトロポレーションにより導入される。最も好ましくは、ポリヌクレオチドはmRNAである。好ましい態様では、抗原または抗原コードmRNAが、CD40アゴニストをコードするmRNAと一緒に、またはCD40アゴニストシグナリングと実質上同時に導入される。

40

【0145】

本方法は、有効量のサイトカインまたは補助刺激分子、例えばGM-CSF、IL-4、およびPGE₂と細胞を接觸させることで、更に変更してもよい。未成熟DCが(IFN- γ アゴニストの非存在下)TNF- γ アゴニストでシグナリングされ、次いでCD40アゴニストによりシグナリングされる態様においては、有効量のIL-1および/またはIL-6が培養物から特に除外される。

【0146】

50

抗原はその“天然”形で、即ち抗原を作製する上でまたはそれがA P Cと出会う環境に入るようそれを誘導する上でヒトの介入が加わらないように輸送されてもよい。一方または加えて、抗原は、例えば従来のアレルギーショットまたは腫瘍溶解産物で通常投与されている種類の、粗調製物を含んでもよい。抗原は一方で実質的に精製して、例えば少なくとも約90%純粋でもよい。

【0147】

抗原がペプチドである場合、例えば単離タンパク質のタンパク質分解切断により、それが作製される。限定されないが、ペプシン、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシンなどを含めた様々な開裂剤が利用されてもよい。一方、ペプチドは、好ましくは当業界で利用しうるような自動シンセサイザーで、化学的に合成してもよい。対象のペプチドをコードする核酸を作製して、所望の条件下で該ペプチドを発現させるために、組換え技術も用いられてもよい。

10

【0148】

抗原は一方で、いかなる天然化合物とも異なる構造を有しうる。本発明のある態様において、抗原は、天然抗原のものと実質的に同一であるが、天然化合物の正確な構造と1以上の違いを含む構造を抗原が有している、“修飾抗原”である。例えば、天然抗原がタンパク質またはポリペプチド抗原である場合、修飾抗原は、そのタンパク質またはポリペプチド抗原と比較して、一以上のアミノ酸の付加、置換、または欠失で天然抗原のものと異なるアミノ酸配列を有している、および/またはアミノ酸に共有結合された一以上の化学部分の付加、置換、または欠失で天然抗原における対応アミノ酸と異なる一以上のアミノ酸を含有している。一つの態様において、天然および修飾抗原は、少なくとも約75%同一である、少なくとも五つのアミノ酸の少なくとも一つの領域を共有している。当業者であれば理解できるように、二つのアミノ酸配列を比較してそれらの同一性の程度を調べる上で、同一アミノ酸のストレッチ（即ち、少なくとも二つの領域）間の間隔が常に正確に保たれている必要はない。天然および修飾タンパク質またはポリペプチド抗原は、少なくとも五つのアミノ酸の少なくとも一つの領域について、アミノ酸配列で少なくとも約80%同一性、更には85%、90%、95%、または99%以上の同一性を示せる。多くは、アミノ酸配列の更に長い領域（例えば、10、20、50、100、またはそれ以上のアミノ酸）について、所定度の同一性を示すことが有用かもしれない。

20

【0149】

30

好ましい態様においては、遺伝子の発現が治療される個体（インビオにおいて輸送される場合）または細胞培養系（インビトロにおいて輸送される場合）で抗原産生をもたらすように、抗原をコードするポリヌクレオチドまたは遺伝子として抗原が輸送される。発現可能遺伝子を含有する核酸を作製して、該発現可能遺伝子によりコードされたタンパク質が産生される発現系へこのような核酸を導入するための技術は、当業界において知られており、以下で簡単に記載されている。好ましくは、抗原をコードするm R N AがD Cへ導入される。

【0150】

40

一つの態様において、免疫原は上記第一シグナルの前に輸送されるが、ここで第一シグナルはI F N RアゴニストまたはT N F Rである。一方、免疫原は該第一シグナルの後で上記第二シグナルの前に輸送されるか、または免疫原は該第二シグナルの後に輸送される。他の態様において、免疫原は該第二シグナルと実質的に同時に輸送される。

【0151】

いずれか具体的な組成物または適用例において用いられる抗原の量は、当業者であれば直ちに明らかとなるように、具体的な抗原およびそれが用いられている適用例の性質に依存する。

【0152】

50

抗原負荷樹状細胞は、抗原に対する免疫応答を生じさせるために有用である。そのため、一つの態様において、本発明は、有効量の免疫原負荷C C R 7⁺成熟D Cを対象者へ投与することを含んでなる、対象者で免疫応答を生じさせる方法を提供する。負荷D Cは対

象者に対して、同種異系でもまたは自家でもよい。

【0153】

本発明は、刺激された免疫エフェクター細胞を產生するために、本発明の方法により產生された抗原負荷 CCR7⁺ 成熟 DC の存在下において、該細胞を培養することを含んでなる、免疫エフェクター細胞を刺激する方法を更に提供する。他の態様において、本発明は、有効量のこのように刺激された免疫エフェクター細胞を対象者へ投与することを含んでなる、対象者において免疫を高める方法を提供する。

【0154】

本発明の別の態様においては、有効量のサイトカインおよび / または補助刺激分子がインビトロまたはインビボにおいて細胞または患者へ輸送される。これらの物質はポリペプチド、タンパク質として、または一方で、それらをコードするポリヌクレオチドまたは遺伝子として輸送される。サイトカイン、補助刺激分子、およびケモカインは、非純粋調製物（例えば、細胞にとり内在性または外在性のサイトカイン遺伝子を発現する細胞の単離物）としてまたは“精製”形で供される。精製調製物は、好ましくは少なくとも約 90% 純粋、または一方で少なくとも約 95% 純粋、または更には少なくとも約 99% 純粋である。一方サイトカインまたは誘導剤をコードする遺伝子は、治療される個体または発現されたサイトカインもしくは誘導剤が個体への投与向けに得られる他の発現系（例えば、インビトロ転写 / 翻訳系または宿主細胞）において、遺伝子発現がサイトカインまたは誘導剤產生をもたらすように供されてもよい。

【0155】

サイトカインおよび抗原の双方が個体へ輸送される場合、それらは一緒にまたは別々に供されてもよい。それらがポリペプチドまたはタンパク質として輸送される場合、それらは通常の封入デバイスにより、または物理的会合、例えば共有結合、水素結合、疎水性相互作用、ファンデルワールス相互作用などにより輸送される。別の態様においては、化合物が一緒に供され、即ち双方をコードする遺伝子が供される。例えば、双方に関する遺伝子が同一核酸分子の一部として供されてもよい。一部の態様においては、サイトカインおよび抗原がペプチド結合で互いに共有結合された融合タンパク質として、双方の因子が单一の隣接ポリヌクレオチドから発現されるように、この核酸分子が作製されてもよい。一方または加えて、双方の遺伝子が同一刺激に応答して個体内で発現されるように、該遺伝子が同一または相当制御配列へ結合されてもよい。異なる条件下において異なる宿主細胞で活性な様々な異なる制御配列が当業界で知られている。構成的制御配列、誘導性制御配列、および抑制性制御配列を含めたこれらの制御配列は本発明に従い用いられるが、遺伝子発現のタイミングについて追加コントロールが望まれる適用例では誘導性または抑制性配列が特に好ましい。

【0156】

サイトカインおよび / または抗原の投与が、いずれか他の望ましい免疫系調節因子、例えばアジュバントまたは他の免疫調節化合物の投与と場合により組み合わせうることは、当業者にとり明らかである。

【0157】

抗原は、該抗原をコードするポリヌクレオチドまたは遺伝子の形により輸送してもよい。抗原は、第一ポリペプチド（例えば、第一抗原）からの配列の一部を第二ポリペプチド（例えば、第二抗原、シグナル配列、貫膜ドメイン、精製ハンドルなど）からの配列の一部とペプチド結合により結合させることで修飾してもよい。当業者であれば、本発明による使用に際して、このような融合タンパク質の多様性を理解するであろう。組換え技術によれば、アミノ酸配列の置換、欠失、付加、または逆位により、ポリペプチドまたはタンパク質抗原のアミノ酸配列の簡単な修飾を更に行える。

【0158】

免疫原が抗原の断片である場合、例えば単離タンパク質のタンパク質分解切断により、それが作製されてもよい。限定されないが、ペプシン、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシンなどを含めた様々な開裂剤が利用されてもよい。一方、ペプチドは、好ましくは

10

20

30

40

50

当業界において利用しうるような自動シンセサイザーにより、化学的に合成してもよい(例えば、Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2d.Ed., Pierce Chemical Co., 1984参照)。対象のペプチドをコードする核酸を作製して、望ましい条件下において(例えば、宿主細胞でまたはそれが容易に精製されるインビトロ発現系で)、そのペプチドを発現させるために、組換え技術も用いられてもよい。

【0159】

好ましい態様において、抗原は癌細胞または病原体からのものである。好ましくは、新生細胞は腎臓癌細胞、多発性骨髄腫細胞、または黑色腫細胞である。好ましい病原体はHIVおよびHCVである。好ましい態様において、抗原は新生細胞または病原体から単離または誘導されたRNAの形で抗原提示細胞へ輸送される。いずれかの細胞(例えば、新生細胞または病原体細胞)から抽出されたRNAのRT PCRおよびインビトロ転写のための方法は同時係属のWO2006/031870号およびWO2005/052128号において開示されており、それらの内容は引用することにより本明細書の開示の一部とされる。

【0160】

本発明に従い用いられる抗原は、天然化合物であっても、または一方でいかなる天然化合物とも異なる構造を有してもよい。本発明のある態様において、抗原は、天然抗原のものと実質的に同一であるが、天然化合物の正確な構造と一以上の違いを含む構造を抗原が有している、“修飾抗原”である。

【0161】

ここで記載された方法のいずれかで作製された成熟DCの富化集団も本発明により提供される。本発明の方法で作製された成熟DCは高い免疫刺激特性を有している。他の態様において、本発明は、適切な条件下において本発明の富化樹状細胞集団を適切な凍結保存剤と接触させることを含んでなる、成熟DCの富化集団を保存するための方法を提供する。

【0162】

ここで記載された組成物は、細胞、例えばDC、修飾DC、または教育された免疫エフェクター細胞の富化集団の有効量を対象者へ投与することにより、対象者において免疫応答を生じさせるために有用である。細胞は同種異系でもまたは自家でもよい。それらは、上記のような富化集団の有効量を対象者へ投与することにより対象者で免疫応答を惹起または誘導するために、対象者へ投与される。細胞は、対象者にとり同種異系でもまたは自家でもよい。それらは、本発明の成熟DCの存在かつ活用下で免疫エフェクター細胞を培養することにより、T細胞のような免疫エフェクター細胞を教育するために用いられる。教育されたエフェクター細胞も、これら細胞の有効量を対象者へ輸送することにより、対象者において免疫を高めるために用いられる。

【0163】

ポリヌクレオチドを作製および輸送するための方法

本発明のある態様はポリヌクレオチドの使用を必要とする。これらは当業界において知られているいづれかの方法を用いて作製および複製され、例えば当業者であれば、ここで提供された配列と、DNAを複製するための市販DNAシンセサイザーを用いられる。一方、ポリヌクレオチドの線状配列、適切なプライマー分子、酵素のような化学物質、およびそれら複製のための説明書を用意し、ポリヌクレオチドを得るために適正な向きでヌクレオチドを化学的に複製または結合させることによっても、それらは得られる。別の態様においては、これらのポリヌクレオチドが更に単離される。更にそれとは別に、当業者であれば、ポリヌクレオチドを適切な複製ベクターへ挿入し、複製および増幅のための適切な宿主細胞(原核または真核細胞)へ該ベクターを挿入しうる。こうして増幅されたDNAは、当業者に周知の方法により細胞から単離される。この方法でポリヌクレオチドを得るための工程が、こうして得られたポリヌクレオチドと共に、ここで更に提供される。

【0164】

一つの態様において、物質(例えば、CD40L)はmRNAとして輸送される。RN

10

20

30

40

50

Aは、最初にD N Aポリヌクレオチドを適切な宿主細胞へ挿入することにより、または好ましくはインビトロ転写により得られる。該D N Aはいずれか適切な方法で、例えば適切な遺伝子輸送ビヒクル(例えば、リポソーム、プラスミド、またはベクター)の使用により、またはエレクトロポレーションにより挿入される。細胞が複製して、D N AがR N Aへ転写される場合、該R N Aは当業者に周知の方法を用いて、例えばSambrook et al.(1989)前掲で記載されているように単離される。例えば、m R N Aは、Sambrook et al.(1989)前掲で記載された操作に従い様々な溶解酵素または化学溶液を用いて単離されるか、または製造業者により用意される添付説明書に従い核酸結合樹脂により抽出される。

【0165】

好ましい態様において、C D 4 0 L 発現カセットはインビトロ転写に適したプロモーター、例えばT 7プロモーターまたはS P 6プロモーターを含有している。好ましくは、インビトロ転写C D 4 0 L またはC D 4 0 アゴニストm R N Aは翻訳の安定性および効率に関して最適化されている。例えば、S E Q I D N O : 1 3は最適化C D 4 0 L m R N Aを表し、ここで5 非翻訳領域のA T Gコドンは翻訳の不正確な開始を避けるために改変されていた。一つの態様において、C D 4 0 L R N AはS E Q I D N O : 3 1に対応する。対応リボヌクレオチドまたはそれらのアナログがデオキシリボヌクレオチドに代わる(例えば、リボアデニン(r A)がデオキシリボアデニン(d A)に代わり、リボグアニン(r G)がデオキシリボグアニン(d G)に代わり、リボシチジン(r C)がデオキシリボシチジン(d C)に代わり、および(リボ)ウラジン(r U)がデオキシチミジン(d T)に代わる)場合に、ここで用いられているR N AはS E Q I D N Oにおいて示されたD N A配列に“対応する”。10

【0166】

m R N A安定性および/または翻訳効率は、m R N Aに3 U T Rおよび/または5 U T Rを含有させることによっても高められる。3 U T Rの好ましい例には、ヒトC D 4 0、アクチン、およびロタウイルス遺伝子6からのものがある。5 U T Rの好ましい例には、C D 4 0 Lからのもの、およびH s p 7 0、V E G F、脾臓壊死ウイルスR U 5、およびタバコエッチャイルスの5 U T Rにおける翻訳エンハンサーがある。20

【0167】

例えば、C D 4 0 L 発現は一部が3 U T R媒介m R N A不安定性により通常調節され、したがってC D 4 0 L 3 U T Rの大部分は本C D 4 0 L m R N Aに含有されない。C D 4 0 LはD Cにおいて通常発現されない。対照的に、C D 4 0 レセプターがD Cで発現され、特にm R N A安定性のレベルで、その発現が転写後に調節されることを示す証拠は、文献にない。C D 4 0 L m R N Aの3 末端または領域にC D 4 0 レセプター-3 U T R(S E Q I D N O : 1 4またはその活性断片)を含有させると、いかなる望ましくない調節活性も呈することなく、天然C D 4 0 メッセージと類似したR N A 3 非翻訳配列を得られるようになる。30

【0168】

ベータ アクチンはヒト非筋肉細胞において豊富に発現される遺伝子である。ヒトベータ アクチンプロモーターは、哺乳動物細胞系およびトランスジェニックマウスで遺伝子発現を駆動するために広く用いられていた。ベータ アクチン3 U T R + フランкиング領域の含有は、ベータ アクチンプロモーターを含有する遺伝子発現構築物からのm R N A蓄積のレベルを更に高めることが証明されていた。Qin and Gunning(1997)Journal of Biochemical and Biophysical Methods 36, pp.63-72。S E Q I D N O : 1 5はヒトベータ アクチン3 U T Rの最終エキソンの非翻訳領域を表す。S E Q I D N O : 1 6はこの3 U T Rの最小領域を示す。40

【0169】

サルロタウイルス遺伝子6 m R N Aの3 U T R(S E Q I D N O : 1 7)は、そのキャップ化された非ポリアデニル化ウイルス転写物において、翻訳のエンハンサーとして機能する。該3 U T Rは、ウサギ網状赤血球溶解産物において、異種リポーターm R N Aの翻訳も高めることが示された。Yang et al.(2004)Archives of Virology 149:303-50

321。この3 UTRの最小機能要素がSEQ ID NO:18において示される。

【0170】

ヒトhsp70遺伝子の5 UTR (SEQ ID NO:19)は、ストレス誘導の非存在下において、メッセージ安定性に劇的な影響を与えることなく、リポーターmRNAの翻訳を高めることができた。エンハンサー機能がいくつかのヒト細胞系で証明されていた。Vivinus et al. (2001) European Journal of Biochemistry 268:1908-1917。

【0171】

マウスVEGF5 UTR (SEQ ID NO:20)はモノシストロニックリポーターミRNAの翻訳を高め、IRES (Internal Ribosome Entry Site)活性も有する。そのエンハンサー活性はラット、ハムスター、およびヒト細胞系において証明された。全長5

10

UTRは1014ヌクレオチドであるが、163ヌクレオチド変異体バージョン (SEQ ID NO:21)は更に活性であることが示された。Stein et al. (1998) Molecular Cellular Biology 18:3112-3119。

【0172】

脾臓壊死ウイルス (SNV) はトリレトロウイルスである。ウイルス5LTRのRU5領域 (SEQ ID NO:22)は、ヒト293細胞で非ウイルスリポーターミRNAの翻訳効率を刺激する。Roberts and Boris-Lawrie (2000) Journal of Virology 74:8111-8118。

【0173】

タバコエッチウイルスRNAの143ヌクレオチド5リーダー (SEQ ID NO:23)は、植物および動物細胞系でリポーターミRNAのキャップ非依存性翻訳を促進する。リーダー配列はキャップ化転写物の翻訳を更に高めることはないが、樹状細胞においてキャップ非依存性CD40L発現はインビトロキャッピングに代わる非常に魅力的な選択肢である。Gallie et al. (1995) Gene 165:233-238. Niepel and Gallie (1999) Journal of Virology 73:9080-9088. Gallie, Journal of Virology (2001) 75:12141-12152.

20

【0174】

ヒトグロビンmRNAは、16～20時間の半減期で、赤血球前駆細胞において高度に安定である。およびグロビンmRNA安定性に必要なシス作用要素は明確にされており、各メッセージの3非翻訳領域に位置していた。(Holcik and Liebehaber, 1997, PNAS 94, 2410-2414, Yu and Russell, 2001, Molecular and cellular Biology 21(17)5879-5888)。ヒトグロビン3UTRの配列がSEQ ID NO:27において示される。ヒトグロビン3UTRの配列がSEQ ID NO:28において示される。ヒトグロビン3UTR-プリンリッチ要素3の配列がSEQ ID NO:29において示される。

30

【0175】

樹状細胞は、リン酸カルシウム沈降法、マイクロインジェクション、またはエレクトロポレーションに限定されないが、それらを含めた当業界で知られる方法により、核酸によりトランスフェクトされる。それらは単独でまたは適切な担体、例えばリン酸緩衝液のような薬学上許容される担体と組み合わせて加えられる。一方または加えて、核酸は細胞への取込みのために発現または挿入ベクターへ組み込む。ポリヌクレオチドが作動的に結合されるクローニング部位およびプロモーターを双方とも含有したベクターが当業界で知られている。このようなベクターはインビトロまたはインビボにおいてRNAを転写でき、Stratagene (La Jolla, CA) およびPromega Biotech (Madison, WI) のような供給元から市販されている。発現および/またはインビトロ転写を最適化するためには、クローニングの5および/または3非翻訳部分を除去、付加、または変更して、転写または翻訳レベルにおいて発現を妨げるまたは減少させる可能性のある余分で不適切な代替の翻訳開始コドンまたは他の配列を除くことが必要かもしれない。一方、コンセンサスリボソーム結合部位も発現を高めるために開始コドンのすぐ5側に挿入できる。ベクターの例はウイルス、例えばバキュロウイルスおよびレトロウイルス、バクテリオファージ、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、コスミド、プラスミド、真菌ベクターと、様々な真核およ

40

50

び原核宿主で発現に関して記載されてきた、遺伝子療法と簡単なタンパク質発現に用いられる、当業界において典型的に用いられている他の組換えビヒクルである。

【0176】

これらの中には、DNA / リポソーム複合体および標的化ウイルスタンパク質DNA複合体を含めた、数種の非ウイルスベクターがある。細胞への輸送を高めるために、本発明の核酸またはタンパク質は細胞表面抗原と結合する抗体またはその結合断片へ接合させてもよい。標的化抗体またはその断片も含んでなるリポソームが本発明の方法で用いられる。本発明は、ここで開示された方法で使用の標的化複合体も提供する。

【0177】

ポリヌクレオチドは、当業界で知られている方法を用いて、ベクターゲノムへ挿入される。例えば、インサートとベクターDNAが、互いに対合してリガーゼと一緒に結合される相補的末端を各分子で形成するために、制限酵素と適切な条件下において接触させられる。一方、合成核酸リンカーも制限ポリヌクレオチドの末端へ連結しうる。これらの合成リンカーは、ベクターDNAで特定の制限部位に対応する核酸配列を含有している。加えて、終止コドンおよび適切な制限部位を含有するオリゴヌクレオチドが、例えば、次の一部または全部：選択マーカー遺伝子、例えば哺乳動物細胞で安定的または一過性トランスフェクタントの選択のためのネオマイシン遺伝子、高レベルの転写のためのヒトCMVの即時型遺伝子からのエンハンサー / プロモーター配列、mRNA安定性のためのSV40からの転写終結およびRNAプロセッシングシグナル、SV40ポリオーマ複製起点および適正なエピソーム複製のためのC01E1、万能マルチクローニング部位、並びにセンスおよびアンチセンスRNAのインビトロ転写のためのT7およびSP6 RNAプロモーターを含有するベクターへ挿入のために連結しうる。他の手段も当業界で知られ、市販されている。

【0178】

タンパク質およびポリペプチドの作製および単離

ポリペプチドおよびタンパク質は本発明の様々な方法の必要成分である。タンパク質およびポリペプチドは、Perkin Elmer/Applied Biosystems, Inc., Model 430Aまたは431A, Foster City, CA, USAにより製造されているもののような市販自動ペプチドシンセサイザーを用いて、化学合成により得られる。合成されたタンパク質またはポリペプチドは沈降され、例えば高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) で更に精製される。一方、タンパク質およびポリペプチドは、以下で記載されている宿主細胞およびベクター系を用いて、ここで記載されているような公知の組換え法により得てもよい。

【0179】

ペプチドに変化した性質をもたせるために修飾がペプチドに行われることは、当業者に周知である。ここで用いられている“アミノ酸”という用語は、グリシンと両D およびL 光学異性体、アミノ酸アナログおよびペプチドミメティックを含めた、天然および/または非天然または合成アミノ酸に関する。アミノ酸が3個以上のペプチドは、そのペプチド鎖が短ければ、オリゴペプチドと通称されている。ペプチド鎖が長ければ、ペプチドはポリペプチドまたはタンパク質と通称される。本発明において使用されるペプチドは、非天然アミノ酸を含有するように修飾しうる。そのため、特別な性質をペプチドへもたせるために、ペプチドはD アミノ酸、D およびL アミノ酸の組合せおよび様々な“デザイナー”アミノ酸（例えば、メチルアミノ酸、C メチルアミノ酸、およびN

メチルアミノ酸など）を含有してもよい。加えて、特定のカップリング工程に特定のアミノ酸を割り当てることで、ヘリックス、ターン、シート、ターンのペプチドおよび環式ペプチドが作製される。別の態様では、有用な化学的および構造的性質を呈するペプチドのサブユニットが選択される。例えば、D アミノ酸を含んでなるペプチドは、インビオでL アミノ酸特異的プロテアーゼに耐性であってもよい。D アミノ酸による修飾化合物は、retro-inversoペプチドとして本発明のペプチドを产生するために、反対順に並べられたアミノ酸で合成してもよい。加えて、本発明では、新規性質のペプチドを作製するために、うまく確定された構造的性質を有するペプチドの作製と、ペプ

10

20

30

40

50

チドミメティックの使用およびエステル結合のようなペプチドミメティック結合も検討してもよい。他の態様では、還元ペプチド結合、即ち $R_1 - CH_2 - NH - R_2$ (R_1 および R_2 はアミノ酸残基または配列である)を取り込んだペプチドが作製されてもよい。還元ペプチド結合はジペプチドサブユニットとして導入してもよい。このような分子はペプチド結合加水分解、例えばプロテアーゼ活性に耐性である。このような分子は、特有の機能および活性、例えば代謝分解またはプロテアーゼ活性への耐性によりインビボ半減期の延びたペプチドをもたらすことになる。更に、ある系において拘束性ペプチドが高い機能活性を示すことは周知である (Hruby(1982)Life Sciences 31:189-199およびHruby et al.(1990)Biochem.3.268:249-262)、本発明はランダム配列を他の全位置に組み込んだ拘束性ペプチドを產生するための方法を提供する。

10

【0180】

幹細胞を単離するための方法

インビトロ拡大のための $CD34^+$ 幹細胞の単離および拡大と樹状細胞への分化に関して、多くの方法が当業界において知られている。例えば、引用することにより本明細書の開示の一部とされる、米国特許第5,199,942号参照。以下の記載は説明のみの目的であり、決して本発明の範囲を限定するためのものではない。

【0181】

$CD34^+$ 幹細胞は、骨髄細胞から、あるいは例えば $CD4^+$ および $CD8^+$ (T細胞)、 $CD45^+$ (pan B細胞)、および $GR-1$ のような望まれていない細胞と結合する抗体で骨髄細胞または他の供給源をパンニングすることにより単離しうる。このプロトコールの詳細な記載に関しては、Inaba et al.(1992)J.Exp.Med.176:1693-1702参照。ヒト $CD34^+$ 細胞は、臍帯血、骨髄外植片、および動員(mobilized)末梢血を含めた、様々な供給源から得られる。 $CD34^+$ 細胞の精製は抗体アフィニティ操作により行える。例えば、Paczek et al.(2004)J.Exp.Med.199:1503-11、Ho et al.(1995)Stem Cells 13(suppl.3):100-105、Brenner(1993)Journal of Hematology 2:7-17、およびYu et al.(1995)PNAS 92:699-703参照。

20

【0182】

幹細胞を未成熟樹状細胞へ分化させる

$CD34^+$ 幹細胞は、該細胞を適切なサイトカインとインキュベートすることにより、樹状細胞に分化させうる。Inaba et al.(1994)前掲は、幹細胞をネズミ GM-CSF とインキュベートすることによる、樹状細胞へのネズミ幹細胞のインビトロ分化について記載していた。簡単に言えば、単離された幹細胞が、標準 RPMI 増殖培地において、1~200ng/ml ネズミ GM-CSF、好ましくは約 20ng/ml GM-CSF とインキュベートされる。培地は一日おきに約 1 回新鮮な培地と換えられる。培養約 5~7 日後に、表面マーカーの発現および細胞形態で評価すると、細胞の多くの割合が樹状である。樹状細胞は蛍光励起細胞分取(FACS)または他の標準方法により単離される。

30

【0183】

ネズミ $CD34^+$ 幹細胞は、該細胞をネズミ GM-CSF と培養することにより、樹状細胞へ分化される。典型的には、培養物中 GM-CSF の濃度は少なくとも約 0.2ng/ml、好ましくは少なくとも約 1ng/ml である。多くは、範囲が約 20ng/ml ~ 200ng/ml である。多くの好ましい態様において、用量は約 100ng/ml である。IL-4 も、場合により、ネズミ DC を作製するために類似範囲で加えられる。

40

【0184】

ヒト $CD34^+$ 造血幹細胞は、好ましくは、該細胞をヒト GM-CSF および TNF と培養することにより、インビトロにおいて分化される。例えば、Szabolcs et al.(1995)154:5851-5861参照。ヒト GM-CSF が類似範囲で用いられ、TNF も分化を促すために加えられる。TNF も典型的にはほぼ同様の範囲で加えられる。場合により、SCF または他の増殖リガンド(例えば Flt3)がヒト DC を分化させるために類似用量範囲で加えられる。

【0185】

50

当業者に明らかなように、幹細胞および単球を樹状細胞に分化させるための用量範囲は概算である。異なる供給者および同一供給者からの異なるロットのサイトカインは、サイトカインの活性に違いがある。具体的なサイトカインについて最適用量を決めるために用いられるスキルの一つで、各サイトカインについて容易に滴定しうる。

【0186】

樹状細胞への単球の分化

G M C S F および I L 4 または G M C S F および I L 1 3 を含有した培地での培養により、末梢血中で頻出性但し非増殖性の C D 1 4 ⁺ 前駆体（単球）から D C が得られる（例えば、W O 9 7 / 2 9 1 8 2 号参照）。この方法は、Sallusto and Lanzavecchia (1994) J. Exp. Med. 179:1109 および Romani et al. (1994) J. Exp. Med. 180:83 において記載されている。簡単に言えば、（末梢血で C D 3 4 ⁺ 細胞およびよりコミットされた前駆体を増加させるために用いられる）G C S F のようなサイトカインによる患者の前処置がほとんどの症例で不要であると報告されているように、C D 1 4 ⁺ 前駆体は豊富である (Romani et al. (1996) J. Immunol. Methods 196:137)。その他は、このアプローチで作製される D C がどちらかといえば均一なようであり、未成熟状態または完全に分化したまたは成熟した状態で産生される、と報告していた。F C S (ウシ胎児血清) のような非ヒトタンパク質を避けること、および成熟化刺激として自己単球ならし培地を用いることで完全かつ不可逆的な成熟および安定 D C を得ることは、可能であることが示された (Romani et al. (1996) Immunol. Methods 196:137, Bender et al. (1996) J. Immunol. Methods 196:121)。しかしながら、本発明とは対照的に、これらの研究では高レベルの I L 1 2 および/または低レベルの I L 1 0 を有する成熟 D C を生じなかった。

【0187】

抗原負荷

樹状細胞を抗原で負荷する方法は当業者に知られている。一つの態様において、樹状細胞は抗原を含有した培地で培養される。D C は次いで抗原を取り込み、M H C 分子と会合状態にて細胞表面においてそれをプロセッシングする。好ましくは、抗原をコードする核酸でのトランスフェクションにより D C が抗原で負荷される。D C をトランスフェクトする方法は当業者に知られている。

【0188】

T 細胞の単離および拡大

本発明の一部方法において、T 細胞は、それらが成熟修飾 D C によりインビトロで教育（または活性化）されるように、哺乳動物から単離される。一つの方法では、確立された操作に従い赤血球および好中球から P B M C を分離するために、Ficoll-Hypaque密度勾配遠心が用いられる。細胞が 1 % ウシ胎児血清 (F B S) で補充された修正 A I M V (2 mM グルタミン、10 μg / mL 硫酸ゲンタマイシン、50 μg / mL ストレプトマイシン含有の A I M V (GIBCO) からなる) により洗浄される。T 細胞が、標準技術に従いカラムまたは磁気ビーズへカップリングされた適切なモノクローナル抗体で、ネガティブまたはポジティブ選択により富化される。C D 4、C D 8、C D 3、および C D 1 4 を含めた細胞表面表現型に関して一部の細胞が解析される。説明のみの目的であるが、細胞が洗浄され、上記のように修正されて 5 % F B S および 1 0 0 U / mL 組換え I L 2 (r I L 2) を含有する A I M V (補充 A I M V) の mL 当たり約 5 × 1 0 ⁵ 細胞の濃度で再懸濁される。細胞が H I V ⁺ 患者から単離される場合、2 5 n M C D 4 P E 4 0 (トランスロケーションへ結合された H I V 1 結合 C D 4 ドメインおよび Pseudomonas aeruginosa 外毒素 A の A D P リボシリ化ドメインからなる組換えタンパク質) または H I V と選択的にハイブリッド形成する他の類似組換え細胞傷害性分子が、培養物から H I V 感染細胞を選択的に除去するために細胞拡大の残部について細胞培養物へ加えられる。C D 4 P E 4 0 は、H I V 感染細胞培養物において p 2 4 産生を阻害して、H I V 1 感染細胞を選択的に殺すことが示された。

【0189】

増殖を刺激するために、O K T 3 モノクローナル抗体 (Ortho Diagnostics) が 1 0 n

10

20

30

40

50

g / mL の濃度で加えられ、細胞が 24 ウエルプレートへ 0.5 mL / ウエルで入れられる。細胞が 5% CO₂ の保湿インキュベーター中約 37° の温度で 48 時間培養される。培地が細胞から吸引され、1 mL のベクター含有上澄（下記）が 5 μL / mL の硫酸プロタミン、100 U / mL rIL-2、100 U / mL ペニシリン、0.25 μg / mL アンホテリシン B / mL、および追加の 100 μg / mL ストレプトマイシン（25 nM CD4 PE40 も加えられる）で補充される。

【0190】

細胞単離および特徴づけ

他の態様においては、本発明の方法を実施する上で必要な細胞を単離するために細胞表面マーカーが用いられる。例えば、ヒト幹細胞は典型的には CD34 抗原を発現し、一方で DC は MHC 分子および補助刺激分子（例えば、B7-1 および B7-2）を発現するが、顆粒球、NK 細胞、B 細胞、および T 細胞に特異的なマーカーを欠く。表面マーカーの発現はこれら細胞の同定および精製を容易にする。同定および単離のこれら方法としては、FACS、カラムクロマトグラフィー、磁気ビーズでのパンニング、ウエスタンプロット、ラジオグラフィー、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高性能液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、超拡散クロマトグラフィーなど、および様々な免疫学的方法、例えば流体またはゲル沈降反応、免疫拡散（単純または二重）、免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素結合イムノソルベントアッセイ（ELISA）、免疫蛍光アッセイなどがある。一般的な免疫学的および免疫アッセイ操作の総説に関しては、Stites and Terr (eds.) 1991, *Basic and Clinical Immunology* (7th ed.) および Paul 前掲参照。選択された抗原に対する抗体をどのように作製するかという考察に関しては、Harlow and Lane (1989) 前掲参照。

10

20

20

【0191】

細胞精製に際する細胞の検出のための細胞単離または免疫アッセイは、いくつかの方式のうちいずれかで、例えば Maggio (ed.) (1980) *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, Fla.、Tijan (1985) "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam、Harlow and Lane, 前掲、Chan (ed.) (1987) *Immunoassay: A Practical Guide*, Academic Press, Orlando, Fla.、Price and Newman (eds.) (1991) *Principles and Practice of Immunoassays*, Stockton Press, NY、および Ngo (ed.) (1988) *Non-isotopic Immunoassays*, Plenum Press, NY で概説されているものにより行える。

30

【0192】

細胞は FACS 解析のようなフローサイトメトリー法により単離および特徴づけされる。様々なフローサイトメトリー法が知られている。蛍光活性化フローサイトメトリーの一般的概説については、例えば Abbas et al. (1991) *Cellular and Molecular Immunology*, W.B. Saunders Company, 特に chapter 3 および Kuby (1992) *Immunology*, W.H. Freeman and Company, 特に chapter 6 参照。FACS 機器は、例えば Becton Dickinson から入手しうる。

30

【0193】

細胞抗原を標識するために用いられる標識剤には、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、タンパク質、または他のポリマー、例えばアフィニティマトリックス、炭水化物、または脂質があるが、それらに限定されない。イムノプロット法、ウエスタンプロット解析、放射性または生物発光マーカーの追跡、キャピラリー電気泳動、あるいは大きさ、電荷または親和性に基づき分子を追跡する他の方法のような、いずれか公知の方法により検出が進められる。

40

【0194】

抗体

本方法のある態様は抗体の使用を必要とする。このような抗体はモノクローナルでもまたはポリクローナルでもよい。それらは抗体誘導体でもまたは抗体バリアントでもよい。それらはキメラ、ヒト化でも、または全部ヒトでもよい。当業界における技術の一つでタンパク質またはポリペプチドを用いれば、レセプターと特異的に結合する抗体を更に作製

50

しうる。Fab、Fab₁、Fab₂、Fab₂および一本鎖可変領域を含めた、抗体の機能的断片または誘導体も用いられる。抗体は細胞培養、ファージまたは様々な動物、例えば限定されないが、ウシ、ウサギ、ヤギ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ヒツジ、イヌ、ネコ、サル、チンパンジー、類人猿などで産生しうる。断片または誘導体がタンパク質またはその断片と結合する特異性を留めている限り、それも用いられる。一連の所定条件下において、適切な抗原との結合性を、無関係な抗原または抗原混合物との結合性と比較することにより、抗体が結合の特異性について試験される。抗体が無関係な抗原または抗原混合物より少なくとも2、5、7、好ましくは10倍多く適切な抗原と結合するならば、それは特異的であると考えられる。

【0195】

10

このような部分的～完全ヒト抗体を作製するための技術は当業界で公知であり、このようないかなる技術も用いられる。一つの態様によると、完全ヒト抗体配列はヒト重鎖抗体遺伝子および軽鎖抗体遺伝子を発現するように工学処理されたトランスジェニックマウスで作製される。異なるクラスの抗体を産生しうる多数のこのようなトランスジェニックマウス株が作製されていた。望ましい抗体を産生するトランスジェニックマウスからのB細胞は、望ましい抗体の連続産生のためのハイブリドーマ細胞系を作製するために融合させてもよい。例えば、Russel et al.(2000)Infection and Immunity, April 2000:1820-1826、Gallo et al.(2000)European J.of Immun.30:534-540、Green(1999)J.of Immun.Methods 231:11-23、Yang et al.(1999A)J.of Leukocyte Biology 66:401-410、Yang(1999B)Cancer Research 59(6):1236-1243、Jakobovits(1998)Advanced Drug Delivery Reviews 31:20 33-42、Green and Jakobovits(1998)Exp.Med.188(3):483-495、Jakobovits(1998)Exp.Opin.Invest.Drugs 7(4):607-614、Tsuda et al.(1997)Genomics 42:413-421、Sherman-Gold(1997)Genetic Engineering News 17:14、Mendez et al.(1997)Nature Genetics 15:146-156、Jakobovits(1996)WEIR'S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, THE INTEGRATED IMMUNE SYSTEM VOL. IV, 194.1-194.7、Jakobovits(1995)Current Opinion in Biotechnology 6:561-566、Mendez et al.(1995)Genomics 26:294-307；Jakobovits(1994)Current Biology 4:761-763、Arbones et al.(1994)Immunity 1:247-260、Jakobovits(1993)Nature 362:255-258、Jakobovits et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551-2555、Kucherlapati et al.、米国特許第6,075,181号参照。

【0196】

30

抗体はファージディスプレイ技術を用いて作製してもよい。このような技術は初期抗体を単離するために、または特異性またはアビディティ特性が変化したバリアントを作製するために用いられる。一本鎖Fvも便宜上用いられる。所望であれば、それらはワクチン接種トランスジェニックマウスから作製される。

【0197】

本発明の抗体はキメラ抗体を作製するために修飾してもよい。キメラ抗体とは、抗体重鎖および軽鎖の様々なドメインが二種以上からのDNAでコードされているものをいう。例えば、米国特許第4,816,567号参照。

【0198】

40

“抗体バリアント”という用語は、二つの抗原結合部位をもつ小さな抗体断片である“ダイアボディ”も含み、該断片は同一ポリペプチド鎖(VH LL)で軽鎖可変ドメイン(VL)とつながれた重鎖可変ドメイン(VH)を含んでなる。例えば、EP404,097号、WO93/111161号、およびHollinger et al.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448参照。同一鎖の二つドメイン間で対合するには短すぎるリンクを用いることにより、ドメインに他の鎖の相補的ドメインと対合させて、二つの抗原結合部位を作製させる。一以上のアミノ酸を親抗体の超可変領域へ挿入させた、抗原への親抗体の結合親和性より少なくとも約2倍強い標的抗原への結合親和性を有する、抗体バリアントについて開示する、Chenらの米国特許第6,632,926号も参照。該用語は、抗体または断片の線状ポリペプチド配列への翻訳後修飾も含む。“抗体バリアント”という用語は、更に“線状抗体”を含む。このようなバリアントを作製するための操作は当業界で知ら

50

れ、Zapata et al.(1995)Protein Eng.8(10):1057-1062において記載されている。簡単に言えば、これらの抗体は、一対の抗原結合領域を形成する一対のタンデム F d セグメント (V H ~ C H 1 V H ~ C H 1) を含んでなる。線状抗体は二重特異性でもまたは単一特異性でもよい。

【 0 1 9 9 】

核酸を検出するための方法

様々な方法が対象の遺伝子（例えば、C D 4 0 L および / または I L 1 2 p 3 5 ）の発現を定量するために知られており、ハイブリッド形成アッセイ（ノーザンプロット解析）および P C R ベースハイブリッド形成アッセイがあるが、それらに限定されない。I L 1 2 p 3 5 m R N A または C D 4 0 L m R N A のような m R N A レベルの変化についてアッセイする場合、サンプル中に含まれる核酸が最初に抽出される。例えば、m R N A はSambrook et al.(1989)前掲において記載された操作に従い様々な溶解酵素または化学溶液を用いて単離されるか、または製造業者により用意される添付説明書に従い市販核酸結合樹脂により抽出される。次いで抽出核酸サンプル中に含まれるm R N A が、標準的な操作に従い核酸プローブおよび / またはプライマーを各々用いて、ハイブリッド形成（例えば、ノーザンプロット解析）および / または增幅操作により検出される。

【 0 2 0 0 】

少なくとも 1 0 のヌクレオチドを有して、検出される核酸と配列相補性または相同性を示す核酸分子が、診断法でハイブリッド形成プローブまたはプライマーとして用いられる。“完全マッチ”プローブは特異的ハイブリッド形成に不要であることが、当業界で知られている。小数の塩基の置換、欠失、または挿入により得られるプローブ配列中のわずかな変化は、ハイブリッド形成特異性に影響を与えない。一般的に、（最適に整列されたときは）2 0 % 塩基対ミスマッチでも許容される。例えば、C D 4 0 L m R N A を検出する上で有用なプローブは、前記配列、例えば S E Q I D N O : 1 または 3 に含まれる匹敵サイズの相同的領域と少なくとも約 8 0 % 同一性である。一方、プローブは相同的領域のアライメント後に対応遺伝子配列と少なくとも 8 5 % または更には少なくとも 9 0 % 同一性である。断片の全ての大きさと相補的ストレッチの大きさは、具体的な核酸セグメントで意図される使用または適用例に依存する。遺伝子の小さな断片は通常ハイブリッド形成態様で使い、その際に相補的領域の長さは検出したい相補配列に応じて様々であり、例えば約 1 0 ~ 約 1 0 0 ヌクレオチドであるか、または更には全長に及ぶ。

【 0 2 0 1 】

長さが約 1 0 ヌクレオチド以上のストレッチにわたり相補的配列を有するヌクレオチドプローブはハイブリッドの安定性および選択性を増加させ、それにより得られる具体的ハイブリッド分子の特異性を改善する。長さが約 2 5 以上、更に好ましくは約 5 0 ヌクレオチド以上、または所望であればそれ以上の遺伝子相補的ストレッチを有する核酸分子を設計してもよい。このような断片は、例えば化学的手段で該断片を直接合成することにより、米国特許第 4,603,102 号において記載されているような二つのプライミングオリゴヌクレオチドでの P C R T M 技術のような核酸複製技術の適用により、または組換え產生のために組換えベクターへ選択配列を導入することにより、容易に作製されてもよい。

【 0 2 0 2 】

ある態様においては、ハイブリッド形成、ひいては相補的配列を検出するために、ラベルのような適切な手段と組み合わせて本発明の核酸配列を用いることが有利であろう。検出可能なシグナルを生じうる蛍光、放射性、酵素、または他のリガンド、例えばアビシン / ビオチンを含めた、様々な適切な指示手段が当業界で知られている。蛍光ラベルまたは酵素タグ、例えばウレアーゼ、アリカリホスファターゼ、またはペルオキシダーゼも、放射性または他の環境上望ましくない試薬の代わりに用いられる。酵素タグの場合には、ヒトの目に見えるまたは分光光度測定による手段を用意して、相補的核酸含有サンプルとの特異的ハイブリッド形成を特定するために用いられる、比色指示基質が知られている。

【 0 2 0 3 】

10

20

30

40

50

ハイブリッド形成反応は、異なる“ストリンジエンシー”の条件下において行われる。関連条件としては、温度、イオン強度、インキュベーションの時間、ホルムアミドのような反応混合液中の追加溶質の存在および洗浄操作がある。高いストリンジエンシー条件とは、安定なハイブリッド形成複合体を形成するためにハイブリッド形成要素間ににおいて高い最少相補性を必要とする、高い温度および低いナトリウムイオン濃度のような条件である。ハイブリッド形成反応のストリンジエンシーを増加させる条件は当業界において広く知られ、出版されている。Sambrook et al. (1989) 前掲参照。Velculescu et al. (1995) Science 270:484-487において記載されているSerial Analysis of Gene Expression (S A G E) のようなハイスループット解析または定量的 PCR を用いて、mRNA レベルまたはその発現を検出および定量することもできる。簡単に言えば、該方法は、転写物を含有していると疑われる細胞または組織サンプルから多種の mRNA を単離することを含んでなる。場合により、遺伝子転写物が cDNA へ変換される。遺伝子転写物のサンプリングは配列特異的解析に付されて、定量される。これらの遺伝子転写物配列アバンダンスが、罹患および健常者のノーマルデータセットを含むリファレンスデータベース配列アバンダンスと比較される。患者は該患者のデータセットが最も近く相關する疾患を有していることになり、本出願の場合それには転写物の差異も含める。

【 0 2 0 4 】

ある態様においては、遺伝子または遺伝子転写物の増幅または検出用のヌクレオチドプローブまたはプライマーとしてポリヌクレオチドを用いることが必要である。示差的に発現される mRNA を検出するために有用なプライマーは、遺伝子またはポリヌクレオチドの匹敵サイズの相同性領域と少なくとも約 80 % 同一性である。本発明の目的にとり、増幅とは、妥当な忠実度で標的配列を複製しうるプライマー依存性ポリメラーゼを用いる方法を意味する。増幅は、天然または組換え DNA ポリメラーゼ、例えば T7DNA ポリメラーゼ、E.coli DNA ポリメラーゼの Klenow 断片、および逆転写酵素により行われる。

【 0 2 0 5 】

PCR の一般的な操作は、MacPherson et al., PCR: A PRACTICAL APPROACH (IRL Press at Oxford University Press (1991))において開示されている。しかしながら、各適用反応に用いられる PCR 条件は実験により調べられる。いくつかのパラメーターは反応の成功に影響を与える。それらの中には、アニーリング温度および時間、伸長時間、Mg²⁺ A T P 濃度、pH およびプライマー、テンプレート、およびデオキシリボヌクレオチドの相対濃度がある。

【 0 2 0 6 】

増幅後、得られた DNA 断片はアガロースゲル電気泳動、次いで臭化工チジウム染色および紫外線照射での視覚化により検出される。対象の示差発現遺伝子の特異的増幅は、増幅 DNA 断片が予想サイズを有し、予想制限消化パターンを示し、および / または正確なクローン化 DNA 配列とハイブリッド形成することを証明することで実証される。遺伝子発現を検出する他の方法も当業者に知られている。例えば、国際 PCT 出願 WO 97/10365 号、米国特許第 5,405,783 号、第 5,412,087 号、第 5,445,934 号、第 5,478,832 号、第 5,631,734 号、および LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 24: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993) 参照。

【 0 2 0 7 】

タンパク質またはポリペプチドを検出および定量するための方法

様々な技術がタンパク質解析のために当業界では利用でき、それにはラジオイムノアッセイ、ELISA (酵素結合イムノラジオメトリックアッセイ) 、“サンドイッチ”イムノアッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、in situ イムノアッセイ (例えば、コロイド金、酵素、または放射性同位元素標識を用いる) 、ウェスタンプロット解析、免疫沈降アッセイ、免疫蛍光アッセイ、および PAGE SDS があるが、それらに限定されない。

【0208】
エクスピボ療法

上記のように、本発明は本発明の方法により產生された樹状細胞または教育T細胞を用いるエクスピボ療法も提供する。例えば、免疫原で形質転換された樹状細胞が、インビトロにおいて細胞傷害性およびヘルパーT細胞を活性化するために用いられる。一方、形質転換された樹状細胞は、インビボでT細胞を活性化するために哺乳動物へ導入される。更には、インビトロで教育されたT細胞が哺乳動物へ導入されるが、そこではT細胞が活性化されてクラスI MHC分子で認識するものと対応する抗原性ペプチドを担持した標的細胞に対してそれらは細胞傷害性である。これらの標的細胞は典型的には癌細胞、またはMHCクラスI表面において特有の抗原性ペプチドを発現する感染細胞である。

10

【0209】

同様に、MHCクラスIIの関係で抗原性ペプチドを認識するヘルパーT細胞も、クラスIおよびクラスII MHC双方の関係で抗原性ペプチドを含んでなる本発明のDCにより刺激される。ヘルパーT細胞は標的細胞に対する免疫応答も刺激する。細胞傷害性T細胞の場合のように、ヘルパーT細胞がインビトロまたはインビボにおいて組換えDCにより刺激される。

【0210】

樹状細胞およびT細胞は、DCおよび/または活性化T細胞が投与されるはずの哺乳動物から単離される。一方、細胞はドナーから同種異系で用意しても、または細胞バンク(例えば、血液バンク)に保存してもよい。

20

【0211】

インビボ療法

本発明の方法により產生されたT細胞または樹状細胞が、選択された免疫原に対して活性なT細胞を產生するために、対象者へ直接投与される。対象者の血液または組織細胞との最終的接觸へ細胞をうまく運ぶための投与は、当業界において公知の方法による。

【0212】

多くは薬学上許容される担体と一緒に、細胞がいずれか適切な手法で投与される。本発明の関係で細胞を対象者へ投与する適切な方法が利用でき、二以上の経路が具体的な細胞組成物を投与するために用いられるが、特定の経路が他の経路よりも即効性の反応を多くの場合に呈する。好ましい投与経路には皮内および静脈内投与があるが、それらに限定されない。

30

【0213】

薬学上許容される担体は、投与される具体的な組成物と、組成物を投与するために用いられる具体的な方法により、一部は定められる。したがって、本発明の医薬組成物の適切な処方物には様々なものがある。最も典型的には、品質コントロール(微生物学的、クローン原性アッセイ、生存能力試験)が行われ、ジフェンヒドラミンおよびヒドロコルチゾンの投与を先行させてから、細胞が対象者へ逆に再注入される。例えば、Korbling et al.(1986)Blood 67:529-532およびHaas et al.(1990)Exp.Hematol.18:94-98参照。

【0214】

例えば関節内(関節部)、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、リンパ節内、および皮下経路のような非経口投与に適した処方物には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および処方物を所定レシピエントの血液と等張にさせる溶質を含有しうる水性等張無菌注射液と、懸濁剤、溶解剤、増粘剤、安定剤、および保存剤を含有しうる水性および非水性無菌懸濁液がある。皮内および静脈内投与が本発明のDCまたはT細胞にとり好ましい投与方法である。

40

【0215】

対象者へ投与される細胞(例えば、活性化T細胞または樹状細胞)の用量は、経時に対象者で望ましい有益な治療応答を発揮させ、癌細胞の成長を抑制し、または感染を抑制するために効果的な、有効量である。

【0216】

50

説明のみの目的であるが、後の解析および比較のために、注入前に対象者から血液サンプルを得て保管することにより、本方法が実施される。通常、少なくとも約 $10^4 \sim 10^6$ 、典型的には $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^{10}$ 細胞が約60～120分間かけて70kg患者へ静脈内または腹腔内注入される。一つの態様において、投与は静脈内注入による。バイタルサインおよび酸素飽和がパルスオキシメトリーにより綿密に測定される。血液サンプルが注入後5分間および1時間で採取され、解析用に保管される。細胞再注入は、1年間にわたりほぼ毎月、全部で10～12回の処理により繰り返される。初回治療後は、医者の裁量により外来患者ベースで注入が行われる。再注入が外来患者として行われるならば、参加者は治療後少なくとも4時間測定される。

【0217】

10

投与に際しては、対象者の大きさおよび総合健康度と合うように、有効用量、細胞タイプのLD₅₀（または他の毒性尺度）および様々な濃度での細胞種の副作用により決められる割合により、本発明の細胞が投与される。投与は1回でまたは用量分割して行われる。本発明の細胞は、細胞傷害剤、ヌクレオチドアナログ、および生物応答調整剤を含めた、公知の従来療法による他の対症治療を補える。同様に、生物応答調整剤が本発明のDCまたは活性化T細胞による治療へ場合により加えられる。例えば、細胞は場合によりアジュバントまたはサイトカイン、例えばGM-CSF、IL-12、またはIL-2と一緒に投与される。

【0218】

20

インビトロアッセイおよびキット

本発明は、本発明の成熟化方法を実施するための商業上有用なキットを提供する。一つの態様において、該キットは、IFN- α ポリペプチドまたはインビボもしくはインビトロでIFN- α mRNAを発現させるための発現力セット、およびCD40LポリペプチドまたはCD40Lのインビボもしくはインビトロ発現でCD40L mRNAを発現させるための発現力セットを含んでなる。他の態様において、該キットは、TNF- α ポリペプチドまたはインビボもしくはインビトロでTNF- α mRNAを発現させるための発現力セット、およびCD40LポリペプチドまたはCD40Lのインビボもしくはインビトロ発現でCD40L mRNAを発現させるための発現力セットを含んでなる。該キットはインビトロ転写のためのRNAポリメラーゼを更に含んもよい。

【0219】

30

免疫原性を評価するための方法

本発明の方法により産生された抗原提示細胞または教育されたT細胞の免疫原性は、以下に限定されないが、それらを含めた周知の方法論により調べられる：

⁵¹Cr放出溶解アッセイ。抗原特異的T細胞によるペプチドパルス⁵¹Cr標識標的の溶解が比較される。“より活性な”組成物ほど時間の関数として標的の大きな溶解を示す。固定時点（例えば4時間）における溶解の動態と全体的標的溶解が、性能を評価するために用いられてもよい。Ware et al. (1983) J. Immunol. 131:1312。

サイトカイン放出アッセイ。修飾APCとの接触時にT細胞により分泌されるサイトカインの種類と量の解析が、機能活性の尺度となる。サイトカイン産生の速度および総量を調べるために、サイトカインがELISAまたはELISPOTアッセイにより測定される。Fujihashi et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:181、Tanquay and Killion (1994) Lymphokine Cytokine Res. 13:259。

インビトロT細胞教育。本発明の組成物が、正常ドナーまたは患者由来PBMNCから反応性T細胞集団を誘起しうる能力に関してアッセイされる。この系では、誘起されたT細胞が、溶解活性、サイトカイン放出、多クローニ性、および抗原エピトープに対する交差反応性について試験される。Parkhurst et al. (1996) Immunol. 157:2539。

トランスジェニック動物モデル。HLAトランスジェニックマウスを本発明の組成物で接種して、誘導された免疫応答の性質および程度を調べることにより、免疫原性がインビボにおいて評価される。一方、hu-PBL-SCIDマウスモデルは、ヒトPBLの適合移植(adoptive transfer)によりマウスでヒト免疫系の再構築を行える。これらの動物

40

50

が本組成物で接種され、Shirai et al. (1995) J. Immunol. 154:2733、Mosier et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2443において以前に述べられたように免疫応答に関して解析される。

増殖アッセイ。T細胞が反応性組成物に応答して増殖する。増殖は、例えば³Hチミジン取込みを測定することにより、定量的に測定される。Caruso et al. (1997) Cytometry 27:71。

靈長類モデル。非ヒト靈長類(チンパンジー)モデル系が、HLA拘束性リガンドのインビオ免疫原性を測定するために利用しうる。チンパンジーはヒトMHC分子とオーバーラップするMHCリガンド特異性を共有し、そのため相対的インビオ免疫原性についてHLA拘束性リガンドを試験しうることが証明されていた。Bertoni et al. (1998) Immuno 10 I. 161:4447。

TCRシグナル伝達事象のモニタリング。いくつかの細胞内シグナル伝達入事象(例えば、リン酸化)は、MHCリガンド複合体によるうまいTCRかみ合いと関連している。これら事象の定性および定量解析が、TCRかみ合いでエフェクター細胞を活性化させる組成物の相対的能力と相關していた。Salazar et al. (2000) Tnt. J. Cancer 85:829、Isakov et al. (1995) J. Exp. Med. 181:375。

【0220】

上記に従い、下記実施例が本発明の様々な態様を実証するためにあるが、本発明を限定するためのものではない。

【実施例】

【0221】

実験例

試薬

Histopaque 1077およびTween 20は、Sigma (St. Louis, MO) から購入した。PBSおよびXIVO 15はCambrex (East Rutherford, NJ) から購入した。AIM V培地、イスコフ改変ダルベッコ培地およびRPMI 1640培地は、トリパンブルーおよびウシ胎児血清(FBS)と一緒に、Invitrogen (Carlsbad, CA) から購入した。Viaspanは、Dupont Pharma Labs (Wilmington, DE) から購入した。GM-CSF、IL-4、TNF、IL-1、IL-6、およびIFNはすべてR&D Systems (Minneapolis, MN) から購入した。PGE₂はCayman Chemicals (Ann Arbor, CA) から購入した。可溶性CD40LはAlexis Biochemicals (San Diego, CA) から購入した。ヒトAB血清はValley Biochemical (Winchester, VA) から購入した。

【0222】

ケモカインCCL19およびCCL21はPeprotech (Rocky Hill, NJ) から購入した。フェノタイピング抗体(HLA ABC、HLA DR、CD80、CD86、CD83、CD14、および陰性イソタイプコントロール)、ELISpot抗体ペア(IFNおよびIL-2)ELISAセット(IL-12およびIL-10)およびストレプトアビシンHRPはすべて、BD OptEIA試薬B pH 9.5と一緒に、BD Pharmingen (San Diego, CA) から購入した。AECペルオキシダーゼ基質はVector labs (Vector Labs, Burlingame, CA) から購入した。遮断抗CD40抗体はeBioscienceから購入した。CD1d/ガラクトシルセラミド(KRN7000)テトラマーおよび天然KRN7000はKirin Brewery, Pharmaceuticals Division, Tokyo, Japanからの贈与された。MART1/HLA-A201テトラマーはBeckman-Coulter (Miami, FL) から購入した。

【0223】

DC作製

Life Blood (Memphis, Tennessee) により供給される健康ボランティアからの白血球搬出コレクションからヒトPBM Cを単離した。PBM CをFicoll-Histopaque密度遠心により調製し、室温にてPBSにより4回洗浄した。2×10⁸ PBM Cを30mL AIM V培地へ再懸濁し、37において2時間かけて150cm³ プラスチックフラスコ

10

20

30

40

50

へ接着させた。非接着細胞を除去し、GM-CSF (1000U/mL) およびIL-4 (1000U/mL) で補充されたXIVO15培地中37℃、5%CO₂で5~6日間にわたり残留細胞を培養した。

【0224】

CD40Lのクローニング

T細胞を RPMI中PMAにより1時間刺激した。細胞を回収し、PBSで1回洗浄した。QIAGEN RNeasy操作を用いて全RNAを抽出した。活性化T細胞からの1μgの全RNAを、高忠実度アドバンテージポリメラーゼ(Clontech)を用いるGene Amp Goldキット(Applied Bioscience)を用いて、ワンチューブRT-PCR反応へ入れた。CD40L配列用の遺伝子特異的プライマーはCD40L配列の塩基47~859に相当する：
 CD40L 5' プライマー：5' GCATCATCGAAACATACAAACC 3' (SEQ ID NO: 11) およびCD40 3' プライマー：5' GTATTATGAAAGACTCCCCAGCG 3' (SEQ ID NO: 12)。PCR断片を精製し、T4DNAリガーゼ(Invitrogen)を用いてpCR2.1ベクターへサブクローニングした。CD40L読み取り枠の配列解析およびGenBankコンセンサス配列とのアライメントでは、二つの突然変異の存在を示した。一つの突然変異は保守的であり、アミノ酸変化へ至らなかった。他のヌクレオチド置換はAsnからSerへのアミノ酸変化を生じた。非保守的アミノ酸変化をアスパラギンへ逆補正するために、部位特異的変異を行った。簡単に言えば、10~40ngのCD40L PCR2.1プラスミドDNAを、カスタム5' リン酸化およびHPLC精製プライマー(QIAGEN)、PFU Ultra酵素と共に10×PCR緩衝液(Stratagene)およびdNTP(Clontech)を用いて、部位特異的変異に用いた。PCR反応後、DpnI制限酵素(Promega)を加え、親テンプレートを消化させるために37℃で1時間インキュベートした。この反応液5μLを次いでOneshot MACH T1Rコンピテント細胞(Invitrogen)へトランスフォームし、調製したばかりのアンピシリン含有LBプレートへ入れた。6個のコロニーを選択し、アンピシリン含有LB中3mL培養物として一晩増殖させた。プラスミドminiprep(QIAGEN)を用いてDNAを単離した。M13FおよびM13Rプライマー(Invitrogen)を用いたCD40L読み取り枠の配列解析のために、各クローニングについて精製DNAのアリコートをUniversity of North Carolina(UNC)配列決定施設へ提出した。次いで、DNASTAR Seqman解析ソフトウェアを用いて、CD40Lに関するコンセンサスGenBank配列とすべてのクローンを整列させてみた。クローン#2(CD40L WT PCR2.1に改名)が正確に変異された塩基を含有することから選択された。

【0225】

DCのトランسفエクションのためのmRNAの作製

SpeI制限酵素を用いてCD40L WT PCR2.1プラスミドを線状化させ、フェノール/クロロホルム抽出に続いてエタノール沈降により精製した。線状テンプレートを水中において再構築させ、製造業者の説明に従いmMessage mMachine T7 Ultraキット(Ambion)を用いてインピトロ転写した。ポリアデニル化反応へ進む前に、最終解析のためにRNAのアリコートを保管した。RNAクリーンアップのプロトコールに従いRNeasyカラム(QIAGEN)を用いてポリアデニル化RNAを精製した。RNAを水で溶出させ、-150℃において個別サイズアリコートとして保存した。RNA Bioanalyzer 2100を用いて非ポリアデニル化RNAおよび最終産物の比較解析によりポリアテール長さを調べた。

【0226】

DCのエレクトロポレーション

エレクトロポレーション前に、DCを回収し、PBSにより洗浄し、次いで0.5mL中4×10⁷/mLまたは0.2mL中、2.5×10⁷/mLで冷却ViaSpan(Barr Laboratories)に再懸濁し、氷上に置いた。DCをmRNA(抗原をコードするmRNAの場合1または2μg/10⁶およびCD40L mRNAの場合4μg/10⁶)と混合し、4mmギャップエレクトロポレーションキュベットに入れ、Bio-Rad装置を用いてエ

10

20

30

40

50

レクトロポレートした。エレクトロポレーション直後に、DCをX VIVO 15培地で洗浄し、最後にGM CSF (800U/mL) およびIL 4 (500U/mL) で補充されたX VIVO 15に 1×10^6 / mLで再懸濁し、低接着性6ウェルプレート (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) 中、37において4または24時間培養した。下記の追加成熟化刺激もこの時点で加えた。

【0227】

DC成熟化 サイトカインカクテル工程

未成熟DCを場合により様々な抗原コードmRNAによりトランスフェクトし、次いでTNF (10ng/mL)、IL 1 (10ng/mL)、IL 6 (100ng/mL)、およびPGE₂ (1μg/mL)含有の“サイトカインカクテル”で処理し、GM CSFおよびIL 4を含有する培地中、37において一晩培養した。 10

【0228】

DC成熟化 CD40Lベース工程

エレクトロポレーション後、CD40L mRNAでトランスフェクトされたDCをIFN (1000U/mL) またはTNF (10ng/mL) またはIFN およびPGE₂の組合せ (1μg/mL) により処理した。比較により、未成熟DCを様々な抗原コードmRNAでトランスフェクトし、次いで1000U/mL IFN の同時または順次添加により、TNF (10ng/mL)、IL 1 (10ng/mL)、IL 6 (100ng/mL)、およびPGE₂ (1μg/mL) または可溶性CD40L (200ng/mL) + エンハンサー (1μg/mL) 含有の“サイトカインカクテル”で処理した。 20

【0229】

DC成熟化 PME CD40L工程

未成熟DCを培養の5日目にTNF (10ng/mL)、IFN (1000U/mL)、およびPGE₂ (1μg/mL)で表現型成熟させた。6日目に成熟DCを回収し、前記のように抗原およびCD40L mRNAでエレクトロポレーションし、ワクチン生産のための回収または処方前に4時間にわたり800U/mL GM CSF および500U/mL IL 4含有のX VIVO 15培地で培養した。 30

【0230】

ガラクトシルセラミド (KRN7000) と組み合わせた、CD40Lベース工程でのDC成熟化

24時間の培養に際して、500U/mL IFN および1μg/mL PGE₂と組み合わせて、エレクトロポレーション直後にCD40Lベース工程DCに100ng/mLのKRN7000でパルスした。

【0231】

DCのフローサイトメトリー解析

10^6 DCを回収し、冷PBS / 1% FCSに再懸濁した。MHC分子 (HLA A B C、HLA DR)、補助刺激分子 (CD80、CD86)、成熟マーカー (CD83) および単球マーカー (CD14) に特異的なフィコエリトリン (PE) またはFITC複合化抗体を96ウェルプレート (BD Biosciences) でウェル当たり 1×10^5 DCと混合し、4において最少15分間インキュベートした。イソタイプ適合抗体をコントロールとして用いた。よく洗浄後、CellQuestソフトウェア (BD Biosciences) を用いてFACS Caliburフローサイトメーター (BD Biosciences) で蛍光解析を行った。 40

【0232】

CD40Lの細胞内発現を次のように調べた： 2×10^5 DCまたはHeLa細胞をCD40L mRNAでトランスフェクション後様々な時点で回収し、4において最少10分間から2時間にわたり250μLのCytofix/Cytoperm溶液 (BD Biosciences) に再懸濁した。細胞を2mL染色用緩衝液 (PBS、BSA、NaN₃、およびEDTA) で2回洗浄し、0.5mL染色用緩衝液に再懸濁し、4において一晩保存した。細胞を15分間にわたり2.0mL Perm/Wash溶液 (BD Biosciences) に再懸濁し、遠心し 50

、 $100\mu\text{L}$ Perm / Wash溶液に再懸濁した。 $20\mu\text{L}$ のマウス抗ヒトCD40L PEおよび抗ヒトCD40 APC (BD Biosciences) またはマウスIgG1 PEおよびIgG1 APC (BD Biosciences) を、各時点で回収および膜透過処理された各DC調製物へ加え、暗所下4℃において30分間インキュベートした。細胞を 1mL Perm / Wash溶液で2回洗浄し、フローサイトメトリー解析前に染色用緩衝液に再懸濁した。

【0233】

細胞内サイトカイン染色 (ICS) を次のように行った： $1 \times 10^6/\text{mL}$ プライム化CD8+T細胞を19日目に同時培養物から取り出し、 $1\mu\text{L}/\text{mL}$ でプレフェルジンA (BD GolgiPlug, Cat No. 555029) の添加前1時間にわたり37℃、5%CO₂において $200\mu\text{L}$ R10培地中PME DC標的 (RCC, survivin, G250、hTERT、またはeGFP) で再刺激した。細胞を37℃で更に16時間インキュベートした。細胞を洗浄し、 $5\mu\text{L}$ CD8/CP cy5.5 (BD341051) 含有の $150\mu\text{L}$ FACS緩衝液に再懸濁し、4℃においてインキュベートした。30分間後に細胞を2回洗浄し、2%パラホルムアルデヒド (PFA) に再懸濁した。その後細胞を10分間後に洗浄し、次いで $2\mu\text{L}$ の遮断抗体、マウスIgG1 pure (BD349040)とのインキュベーション前に室温 (RT) において10分間にわたり0.1%サボニンで膜透過処理した。RTで10分間のインキュベーション後に、 $0.5\mu\text{L}$ IFN-APC (BD554681)、 $10\mu\text{L}$ IL-2 FITC (BD554702)、および $10\mu\text{L}$ CD69 PE (BD555531) 抗体を各サンプルチューブへ加えた。サンプルを暗所下、RTにて30分間インキュベートした。細胞を0.1%サボニンで最終洗浄後に2%PFAへ再懸濁した。解析をFACSサイトメトリーにより行い、100,000の事象を集めた。

【0234】

HeLa細胞でmRNAから発現された場合のCD40L機能解析

HeLa細胞を10%FBS/DMEMで増殖させ、次いで回収し、4mmキュベット中GFPおよびCD40 RNA (各 $20\mu\text{g}/5 \times 10^6$ 細胞) でエレクトロポレーションした。トランスフェクション後の回収率は~70%であり、細胞を6ウェル皿へ入れ、一晩増殖させた。一晩のインキュベーション後、トランスフェクトされたHeLa細胞をスクレーピングにより回収し、CD40Lの細胞表面発現を調べるためにマウスIgG1 PEまたは抗ヒトCD40L PE (双方ともBD Biosciences, San Diego, CA) で染色した。 2×10^5 細胞/チューブを1%FBS/PBS中4℃で30分間かけて $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗体で染色した。FACScaliburフローサイトメーターおよびCellquestソフトウェア (BD Biosciences) を用いて細胞を解析した。HeLa発現CD40Lの機能を解析するために、 1×10^6 未成熟樹状細胞を6ウェル皿 (2mL総容量) 中 $1000\text{U}/\text{mL}$ IFN- γ (R&D Systems, Minneapolis, MN) で補充された5%huAB血清/RPMI中 1×10^6 HeLa細胞と一晩同時培養した。タンパク質の細胞表面発現が樹状細胞を刺激するために必要であることを確認するために、遮断CD40Lモノクローナル抗体 (eBioscienceからの24~31) を適合ウェルに $10\mu\text{g}/\text{mL}$ で含有させた。培養上澄を18~24時間後に回収し、サイトカインIL-10およびIL-12の発現をELISA (BD Biosciences) で解析した。

【0235】

移動アッセイ

DCの走化性を24ウェルトランスウェルチャンバー (Corning Costar, Acton, MA) 中で $8\mu\text{m}$ 孔径ポリカーボネートフィルター内の移動により測定した。3~300ng/mL CCL19、5~250ng/mL CCL21を含有するイスコフ改変ダルベッコ培地またはAIM-V培地、双方の組合せまたは培地単独中の5%ヒトAB血清を下部チャンバーへ加えた。 0.1mL 中 $1 \sim 5 \times 10^5$ DCを上部チャンバーへ加え、37℃において2~3時間インキュベートした。下部チャンバーを 5mL チューブ (BD Biosciences) に回収し、 0.1mL PBSへ再懸濁し、トリパンブルーを用いて生存細胞数カウントを行った。

10

20

30

40

50

【0236】

E L I S p o t

P V D F 膜 E L I S p o t プレート (Millipore, Billerica, MA) を $5 \mu g / mL$ モノクローナル抗 I F N または抗 I L 2 捕捉抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA) で被覆し、4 において 24 時間インキュベートした。インキュベーション後、プレートを P B S / 0.05% Tween 20 により洗浄し、5% ヒト A B 血清 / R P M I 1 6 4 0 培地において 1 時間遮断した。P B M C 、 T 細胞または C D 8 富化 T 細胞を 1×10^5 細胞 / ウェルで、および m R N A トランスフェクトされた抗原負荷 D C 標的を 10 : 1 エフェクター : 標的比の 1×10^4 細胞 / ウェルで入れ、37° 、 5% C O₂ で最少 16 時間インキュベートした。

10

【0237】

インキュベーション後、プレートを 6 回洗浄し、抗 I F N 検出抗体 (BD Pharmingen) または抗 I L 2 検出抗体 (BD Pharmingen) を $1 \mu g / mL$ で適切なプレートへ 2 時間加えた。更に 6 回洗浄後、ストレプトアビジン H R P (BD Pharmingen) を各ウェルへ 1 時間加えた。最後に、更に 1 回の洗浄サイクル後、発色を A E C ベルオキシダーゼ基質により 5 ~ 15 分間行い、水で停止させた。C T L Immunospot Plate Reader (C T L, Cleveland, OH) で解析前にプレートを風乾させた。

【0238】

E L I S A

本方法は、BD Opt E I A 試薬セット B p H 9.5 を用いる I L 1 2 および I L 1 0 E L I S A セット (BD Pharmingen) で、BD Pharmingen により設計された。簡単に言えば、E L I S A プレート (BD Biosciences) を 4 において 24 時間かけて被覆用緩衝液中抗 I L 1 2 p 7 0 または抗 I L 1 0 E L I S A 捕捉抗体で被覆した。100 μL / ウェルで二重に標準 (BD Pharmingen) および上澄サンプルの添加前にプレートを 200 μL / ウェル 10% F C S / P B S で遮断し、室温において 2 時間インキュベートした。プレートを洗浄し、抗サイトカイン検出抗体を加え、1 時間インキュベートし、プレートを洗浄し、溶液を 100 μL のストレプトアビジン H R P と入れ換え、更に室温において 1 時間インキュベートした。再びプレートを洗浄し、発色基質を 10 ~ 20 分間適用し、次いで停止溶液で発色を止めた。K C ジュニアソフトウェア (Winooski, VT) 装備の Bio-Tek 装置 E L x 8 0 0 プレートリーダーを用いてプレート解析を行った。結果は p g / 10^6 D C の値を示す。1 mL が 10^6 D C に相当するようにアッセイがセットアップされたため、結果は p g / 10^6 D C の値としても表示される。例えば、3000 p g / mL / 10^6 D C は 3000 p g / 10^6 D C に相当する。

20

【0239】

C T L 誘導

m R N A によりトランスフェクトされた成熟樹状細胞を C D 8 精製 T 細胞と同時培養した。すべての同時培養は R 1 0 培地 (10 mM H E P E S p H 7.4、1 mM ピルビン酸ナトリウム、0.1 mM 非必須アミノ酸、2 mM グルタミン酸ナトリウム、5.5 μM

メルカプトエタノールで補充された 10% F B S 、 R P M I 1 6 4 0) で行った。すべての細胞培養試薬は Invitrogen (Carlsbad, CA) 製であった。単球接着工程から回収された非接着細胞から、C D 8⁺ T 細胞単離キット (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) を用いて、C D 8⁺ 細胞を精製した。C D 8⁺ 細胞を上記のように作製された樹状細胞と 10 : 1 C D 8⁺ : D C で混合する。初めの 7 日間は、細胞を 0.2 U / mL I L 2 (R&D Systems, Minneapolis, MN) で補充された培地で培養し、次いで 24 ウェル組織培養皿へ 1 mL (1×10^6 C D 8⁺ 細胞) / ウェルで等分した。この初期 7 日間のインキュベーション後に C D 8⁺ 細胞を回収し、カウントし、5 U / mL I L 2 で補充された培地中 10 : 1 で新鮮 D C スティミュレーターと再培養した。再び細胞を 1 週間培養し、次いで新鮮 D C および 20 U / mL I L 2 で再刺激した。C T L アッセイを 3 回目刺激後 3 または 7 日目に行った。

30

【0240】

40

50

CTL アッセイ

T2細胞 (ATCC番号CRL 1992) をFBS/RPMI培地中で一晩インキュベーションにより10 µg/mLのHLA A201拘束性MART APLペプチド (LAGIGILTV、SEQ ID NO: 24)、天然ペプチド (AAGIGILTV、SEQ ID NO: 25)、またはPSA 1ペプチド (FLTPKKLQCV、SEQ ID NO: 26) で予めパルスし、CTL標的として使用前に洗浄した。樹状細胞標的を前記のようにGFP mRNA、MART 1 APL mRNAまたはFlu M1 mRNAでトランスフェクトし、成熟化させずに一晩インキュベートした。パルスT2細胞を100 µCiのNa⁵¹Cr (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences, Inc., Boston, MA) と37において90分間インキュベートした。過剰⁵¹Crを洗い落とし、5000標識標的を様々なE:T比のCD8⁺細胞と4時間インキュベートした。非特異的溶解を25,000細胞/ウェルで非パルスT2細胞の添加により減少させた。放出⁵¹Crをシンチレーションカウントにより上澄で測定した。全放出を標的への1% Triton X 100の添加により計算し、一方で自発放出を培地単独の添加により計算した。式 (放出サンプルcpm - 自発cpm) / (放出全cpm - 放出自発cpm) を用いて溶解率を計算した。

【0241】

KRN7000パルスCD40Lベース工程成熟化DCを用いるMART 1特異的CTLの誘導

'CD40Lベース工程'を用いてDCを前記のように作製し、MART 1をコードするmRNAで負荷した。エレクトロポレーション後、DCをKRN7000、IFNおよびPGE₂とインキュベートした。DCおよびPBMCを20U/mL IL-2の存在下において1:10比で同時培養した。PBMCを同一条件下において3回再刺激し、CTL誘導の頻度をMART 1/A2テトラマーで染色により調べ、FACSによりKRN7000/CD1dテトラマーを用いてNK細胞の拡大を計測した。

【0242】

実験例の結果インターフェロン およびCD40Lでの順次成熟化がIL 12p70分泌を最適化する

GM-CSFおよびIL-4を含むXIVO15培地中で接着細胞PBMCの6日培養により未成熟DCを作製した。DCを6日目に回収し、DC百万個当たり2 µgのeGFPコードmRNAでエレクトロポレーションし、“サイトカインカクテル”で36時間成熟化させた。一方、同時にまたは順次適用されるIFN および可溶性CD40Lの存在下においてDCを培養することにより成熟化を行った。DCを補助刺激分子の発現増加について、但し最も重要なことにはIL 12p70 vs. IL 10の分泌について測定した。図1は、サイトカインカクテルで成熟化されたDCが、36時間の培養期間で培養上澄中へIL 12p70と比較して過剰のIL 10を分泌することを示す。対照的に、可溶性CD40LおよびIFN で同時に成熟化されたDCは、過剰のIL 12p70を分泌している。しかしながら、培養物への直接的な18時間にわたるIFN の順次的な適用に続く可溶性CD40Lの添加と、追加の18時間培養期間は、有意に高レベルのIL 12p70分泌を生じた。意外にも、可溶性CD40Lに続くIFN の適用はIL 12p70の有意な分泌を妨げた。結論として、DC成熟化を“プライムする”自然刺激 (IFN) に続く可溶性CD40Lにより輸送されるサロゲートヘルパー細胞シグナルの順次輸送は、IL 12p70分泌についてDC成熟化を最適化させる。

【0243】

CD40LをコードするmRNAでトランスフェクトされたHeLa細胞と未成熟DCとの同時培養はDC由来IL 12p70の誘導をもたらす

図2は、CD40LをコードするmRNAでトランスフェクトされたHeLa細胞が、抗CD40L抗体およびフローサイトメトリーにより調べられるように、24時間の培養

10

20

40

50

後にCD40Lタンパク質の有意な細胞表面発現を生じることを示す。CD40L mRNAトランスフェクトHeLa細胞を1000U/mL IFN- γ の存在下において、未成熟DCと同時培養した。表IIは、伸長ポリAテール(>100'A')でトランスフェクトされたHeLa細胞が、18時間の培養期間にわたり未成熟DCと培養された場合に、有意なIL-12p70分泌を誘導しうることを示す。重要なことに、遮断抗CD40L抗体の含有はIL-12p70分泌を妨げ、トランスフェクトmRNA配列によりコードされたタンパク質の同一性および機能的重要性を確認させる。

【0244】

CD40LコードmRNAでトランスフェクトされたHeLa細胞は、IFN- γ の存在下で未成熟DCと同時培養された場合に、IL-12p70の分泌をもたらす。培養物中で‘遮断’抗CD40L抗体の含有はIL-12p70の誘導を妨げる。

【表2】

表II

	未成熟DC IL-12p70(pg/mL)	“カクテル”成熟化 および再活性化DC IL-12p70(pg/mL)
DC単独	-	4.9
(a)HeLa/>100ポリA +IFN- γ	372	26.3
(b)HeLa/>100ポリA +IFN- γ +24-31	-	2.5

(a)100ヌクレオチド以上のポリ-Aテールを有するCD40L mRNA 4 μ gでHELA細胞をトランスフェクトし、IFN- γ の存在下でDCとインキュベートした。

(b)(a)と同様、但し遮断抗CD40L抗体(24-31)の存在下

【0245】

CD40L mRNAでトランスフェクトされて、IFN- γ の存在下で培養された樹状細胞はIL-12p70を分泌する

未成熟DCをGM-CSFおよびIL-4含有の培地内で6日後に回収し、滴定量のCD40L mRNA(>100ポリA)でトランスフェクトし、直ちに1000U/mL IFN- γ の存在下において培養した。図3は、18時間の培養後に回収された上澄がIL-10より過剰のIL-12p70を含有し、DC百万個当たり少なくとも4 μ gのCD40L mRNAが最良サイトカイン分泌にとり必要であることを示す。DC百万個当たり4 μ g超にCD40L mRNAペイロードを増すと、成熟後のDC収量で有意な減少を招く(データ示さず)。パラレル実験では、未成熟DCを細胞百万個当たり4 μ gのCD40L mRNAでトランスフェクトし、滴定量のIFN- γ を直ちに培養物へ適用した。図4は、少なくとも100U/mLのIFN- γ がIL-12p70の最良誘導をサポートするために必要であることを示す。図5aは、IL-12p70がトランスフェクションおよびIFN- γ との同時培養後6~8時間の場合に検出可能レベルで出現し、培養上澄中で最大の蓄積が20~24時間で記録されることを示す。対照的に、IFN- γ に代わる10ng/mL TNF- α の使用もIL-12産生をサポートするが、低レベルである(図5b)。更に、IFN- γ はTNF- α の場合より低レベルのIL-10産生を付随的にもたらす(図5c)。

【0246】

CD40L mRNAでトランスフェクトされたDCによるIL-12p70の誘導は、細胞細胞相互作用とは異なり、“細胞内シグナル”に依存する

図2は、mRNAから翻訳されたCD40Lタンパク質がトランスフェクト細胞の細胞表面において発現され、該タンパク質がDC上のその対応物、即ちCD40との相互作用の結果としてIL-12p70分泌についてDCを適切にシグナリングしうる能力を留めていることを証明している。トランスフェクトDC中、CD40Lの細胞分布を調べ、その機能的同一性を確認するために、DCをトランスフェクション後、様々な時点で回

10

20

30

40

50

10
収し、細胞表面上におけるCD40Lの存在または細胞内区画を調べた。図6aおよび6bは、CD40Lの大部分が細胞内区画に局在し、有意なタンパク質発現(27%DCCD40L陽性)がトランスフェクション後60分間までみられなかったことを示す。このように、IFNがトランスフェクション直後に適用されているが、成熟化事象の輸送は順次的であり、IFNシグナルがCD40Lの場合より先である。図1において示されているように、IFNおよびCD40LによるDCの順次成熟化がIL12p70分泌を最適化している。加えて、図7は、CD40LトランスフェクトおよびIFN処理DCが、トランスフェクション後18時間にわたり過剰の遮断抗CD40L抗体の存在下で培養された場合に、なお有意レベルのIL12p70を分泌していることを示す。このデータは、この系においてIL12p70産生に必要なCD40L/CD40相互作用が細胞内区画で生じうることを示す。

【0247】

経時的なCD40L陽性細胞の出現頻度

未成熟DCを 10^6 DC当たり $4\mu\text{g}$ CD40L mRNAでトランスフェクトし、1000U/mL IFNで同時成熟化させた。一方、CD40L染色の陰性コントロールとして、未成熟DCを“サイトカインカクテル”で成熟化させた。最大の発現頻度はCD40L RNAでトランスフェクション後約3~4時間で到達し(図6b参照)、細胞が固定および膜透過処理された場合にDCの80%がCD40Lを発現するが、細胞表面染色ではDCの約15%を検出するにすぎない(図6c)。このデータは、CD40Lタンパク質の大半がDC内に留められ、細胞表面において発現されないことを示す。CD20
40Lタンパク質は一過性で発現され、DCの大部分がトランスフェクション後26時間でCD40L陰性になる。CD40Lのコゲネイトレセプター分子、CD40の発現は、「サイトカインカクテル」のみを受けたDCと比較して、CD40LをコードするmRNAでDCのトランスフェクションにより変わらない。

【0248】

CD40LおよびIFN成熟化でDC移動を誘導するためにPGE₂が必要である

高レベルの補助刺激分子、例えばCD80、CD83、およびCD86を発現する細胞として典型的に規定される、IL12p70を分泌して成熟表現型を示す能力に加えて(表III参照)、DCがインビボにおいてリンパ節へホーミングしうるならば、それらは移動する能力を示すに違いない。PGE₂が、移動について成熟DCをプライムするいくつかの研究により示されてきた(Luft et al.(2002)Blood 100:1362、Scandella et al.(2002)Blood 100:1354)。図8は、IFNに加えて $1\mu\text{g}/\text{mL}$ PGE₂の含有が成熟DCを移動させられ、この移動ポテンシャルの獲得がCD40L mRNAペイロードと比例することを示す。このように、CD40Lは成熟DC表現型および優性IL12p70プロファイルのみならず(表II参照)、移動性のプライミングにも寄与する。対照的に、CD40L mRNAでのトランスフェクションにより成熟化されて、IFNの存在下、但しPGE₂の非存在下で培養されたDCは、ケモカインレセプターCCR7の有意な細胞表面発現を示すにもかかわらず、移動していない(データ示さず)。

【表3】

表 III

‘サイトカインカクテル’またはCD40L+IFN- γ およびPGE₂により誘導される成熟化をうけたDCの表現型解析および分泌サイトカインプロファイル

	未成熟DC	(a)Flu/eGFP mRNA	(b)Mart-APL mRNA	(c)Flu/CD40L mRNA	(d)Mart-APL/CD40L mRNA
DCマーカー		サイトカインカクテル	サイトカインカクテル	IFN-g/PGE ₂	IFN-g/PGE ₂
HLA-ABC	99.7%	98.6%	99.5%	99.9%	99.9%
HLA-DR	95.0%	99.6%	99.7%	99.8%	99.5%
CD83	23.2%	98.3%	99.2%	99.6%	99.3%
CD14	0.3%	1.7%	2.9%	3.2%	4.9%
CD56	2.8%	3.3%	3.2%	2.8%	2.1%
CD19	1.8%	1.1%	2.1%	3.2%	3.2%
CD3	2.8%	2.4%	3.1%	2.8%	3.1%
CD86	59.3%	99.7%	100.0%	100.0%	100.0%
CD80	28.8%	99.0%	99.5%	99.2%	99.5%
CD1a	51.6%	49.1%	52.2%	48.6%	49.9%
CD209	95.8%	95.5%	96.1%	96.4%	95.9%
CCR7	3.2%	47.4%	35.5%	35.4%	36.2%
(e)IL-12 (pg/mL)	N/A	27.5	59.0	1456.3	1350.0
(f)IL-10 (pg/mL)	N/A	948.8	810.0	187.7	165.5

【0249】

DCを接着単球から作製し、GM-CSF/IL-4中において、6日間培養した。回収後、DCを様々なmRNAペイロードでトランスフェクトし、更に24時間にわたり成熟化に付した。DCを再び回収し、細胞を様々な細胞表面マーカー、特に増加した機能、即ち補助刺激および移動と関連するものについて染色した。成熟培養物からの上澄を集め、IL-12p70およびIL-10サイトカイン解析に付した。

(a)細胞百万個当たり4 μ g eGFP mRNAに加えて、抗原コードペイロードとして細胞百万個当たり2 μ g f1u mRNAでDCをトランスフェクトした。eGFP mRNAは、FACSによるトランスフェクションの確認を可能にし、別の工程において細胞百万個当たり4 μ g CD40L mRNA成熟化ペイロードのための代替コントロールとして作用しうる。これらのf1u/eGFPトランスフェクトDCを“サイトカインカクテル”的存在下で成熟化させた。

(b)抗原コードペイロードとして細胞百万個当たり2 μ g MART-APL mRNAでDCをトランスフェクトし、“サイトカインカクテル”での成熟化に付した。

(c)成熟化ペイロードとして細胞百万個当たり4 μ g CD40L mRNAと共に、抗原コードペイロードとして細胞百万個当たり2 μ g f1u mRNAでDCをトランスフェクトした。これらの細胞を直ちに、物質および方法で記載されたように、IFNおよびPGE₂含有培地へ入れた。

(d)成熟化ペイロードとして細胞百万個当たり4 μ g CD40L mRNAと共に、抗原コードペイロードとして細胞百万個当たり2 μ g MART-APLでDCをトランスフェクトした。これらの細胞を直ちに、物質および方法で記載されたように、IFNおよびPGE₂含有培地へ入れた。

(e)成熟化をうけたDCからのIL-12p70分泌

(f)成熟化をうけたDCからのIL-10分泌

【0250】

CD40L mRNAでのトランスフェクションおよびIFN/PGF₂により順次成熟化されたDCは強いT細胞リコール応答を引き起こす

10

20

30

40

50

CD40L mRNA トランスフェクションおよびIFN- γ / PGE₂ で成熟化された DC の “免疫力” を調べるために、CD40L mRNA およびIFN- γ / PGE₂ 培養環境に加えて、DC 百万個当たり 2 μ g f1u マトリックスタンパク質コード mRNA で DC を同時トランスフェクトした。トランスフェクション後 18 時間で DC を回収、洗浄し、IFN- γ ELISpot アッセイで自己 T 細胞と同時培養した。図 9 は、CD40L / IFN- γ / PGE₂ で成熟化された DC が、アッセイで f1u 特異的 IFN- γ スポットの出現頻度で示されるように、f1u mRNA でトランスフェクトされて ‘サイトカインカクテル’ で成熟化された DC と比較して、高い免疫力を呈することを示す。

【0251】

10

CD40L mRNA でのトランスフェクションおよびIFN- γ / PGE₂ により順次成熟化された DC は一次応答を引き起こす

リコール応答、例えば図 9 において記載されたものは、最適化補助刺激分子を発現してサイトカイン環境をサポートする DC の存在にさほど依存しない。したがって、多くの健康ドナーが高ナイーブ T 細胞前駆体出現頻度を維持している黒色腫関連抗原 MART 1 に対して一次免疫応答を引き起こす能力について DC を試験した。HLA A201 ドナーが優先的に用いられたため、A2 拘束性決定基が部位特異的変異誘発による mRNA 配列の変異により最適化され、こうして 27 位のアラニンがロイシンで置き換えられた、ここでは MART APL と称される、MART 1 をコードする mRNA で DC をトランスフェクトした (Valmori, D et al. (1998) J. Immunol. 160:1750)。2 μ g MART APL mRNA と 4 μ g CD40L mRNA で同時トランスフェクトされて直ちに IFN- γ / PGE₂ で 18 時間パルスされた DC を、MART APL 単独で負荷されて “サイトカインカクテル” において一晩成熟化された DC と比較した。抗原負荷および成熟化 DC を精製自己 CD8⁺ T 細胞へ加え、0.2U / mL ヒト IL-2 の存在下で 7 日間培養した。この期間後、T 細胞を回収し、IL-2 ELISpot アッセイで適宜に第二ラウンドの抗原負荷 DC スティミュレーターと同時培養した。図 10 は、CD40L および IFN- γ / PGE₂ で成熟化された DC の存在下において培養された CD8⁺ T 細胞が、MART APL mRNA 配列内で当初コードされた最適化 MART APL エピトープへの特異的応答で IL-2 分泌しうる T 細胞について、高度に有意な増加をもたらすことを示す。結論として、IFN- γ / PGE₂ および CD40L による順次成熟化に曝された DC は、現在認められている標準 “サイトカインカクテル” で成熟化された DC より、一次免疫応答の惹起が有意に強い。更に図 11 は、‘サイトカインカクテル’ 成熟化された MART APL 負荷 DC で生じた CTL が、適切な HLA A2 拘束性 MART APL ペプチドでパルスされた T2 細胞に対して、CD4 非依存性 CD8 媒介細胞傷害性を媒介しないことを示す (図 11b)。対照的に、CD40L / IFN- γ / PGE₂ 成熟化 DC で生じた CTL が完全に活性であり、MART APL ペプチドパルス T2 標的を殺す (図 11a)。

【0252】

30

PME CD40L 工程下における成熟する未成熟 DC の表現型解析

40

ここで記載された PME CD40L 工程で 5 日目に DC を成熟させた。未成熟 CD83⁻ DC を産生するために、特に单球を培地 GM-CSF および IL-4 で 5 日間培養した。5 日目に、未成熟 DC を TNF- α 、 IFN- γ 、および PGE₂ (TIP) 含有培地に供した。6 日目に、TIP 後表現型を調べた (表 IV 参照)。表 IV で示されているように、細胞の大部分は CD80、CD83、CD86、および CD209 に関して陽性であった。これらの DC は CCR7 陰性でもあった (データ示さず)。低率の CD14⁺ 細胞は、樹状細胞へ分化しなかった单球を表す。6 日目に、CD83⁺ CCR7⁻ DC を細胞百万個当たり 1 μ g 増幅腎臓細胞癌 RNA 由来 mRNA および 4 μ g CD40L mRNA で (エレクトロポレーションにより) 同時トランスフェクトした。CD40L 発現をトランスフェクション後 4 時間目に測定した。細胞をトランスフェクション後 4 時間目に液体窒素で凍結保存した。解凍後の回収率および生存率を解凍直後と解凍後 24 時間目に測定

50

した。みられるように、解凍後24時間でDCの大部分はCCR7⁺になった。CCR7⁺DCはCD80、CD83、およびCD86に関して陽性であった。三回の別々なランの結果が表IVで示されている。

【表4】

表IV

ランデータ	ラン1	ラン2	ラン3
接種密度/フラスコ	200×10 ⁶	200×10 ⁶	200×10 ⁶
接種フラスコの数	18	20	20
TIP後回収(%)	8	24	15
TIP後生存(%)	97	95	93
キュベットの数	14	15(限定)	15(限定)
電気穿孔後4hr回収(%)	64	43	73
電気穿孔後4hr生存(%)	91	89	85
ランからのワクチンドーズ数	13	9	15
解凍後回収(%)	86	94	85
解凍後生存(%)	88	88	78
予想ドーズ数/30フラスコ	21	28	30
4hr CD40L発現	84	76	49
TIP後DC表現型			
%CD14	0.8	0.5	1.2
%CD80	100	100	98
%CD83	99	92	82
%CD86	100	100	100
%CD209	98	99	100
mDC表現型(解凍後)			
%CD14	3	0.3	1.4
%CD80	99	100	100
%CD83	100	100	98
%CD86	100	100	100
%CD209	98	100	100
%CCR7	53	12	32
解凍後24hr %CCR7	93	93	95
解凍後24hr 'ウォッシュアウト'			
%生存	50	67	63
%回収	36	46	73
解凍後24hr トランスウェル移動			
%移動 - 培地コントロール	1.1	0.78	1.2
%移動-100ng/mL CCL19及び21	74	107	70

【0253】

PME CD40L工程において成熟化されたDCは、リンパ節ホーミングケモカインCCL19および21に応答して、高度に移動性である

PME CD40L成熟化DCを、全増幅RCC RNAおよびCD40L RNAで同時トランスフェクション後24時間目に、ケモカインCCL19および21に応答する移動性についてアッセイした。図12は、4例の独立ドナーを用いたところ、PME CD40L工程でエレクトロポレーション後24時間目に達した非常に高レベルのCCR7発現と一致して、PME CD40L成熟化DCが高度に移動性であることを示す(表IV参

10

20

30

40

50

照)。

【0254】

PME CD40L工程において成熟化されたDCは、'CD40Lベース工程'において成熟化されたDCより有意に高い免疫力を示す

'CD40Lベース工程'による一次免疫応答の誘導にもかかわらず、DCがCD40L + 抗原コードmRNAでエレクトロポレーション前に最初にTNF、IFN およびPGE₂で成熟化される'成熟化後エレクトロポレーション CD40L'工程は、MART抗原モデル系を用いると、CTL活性で有意な改善を呈する(図13)。加えて、腎臓細胞癌腫患者から得られた完全自己由来物質を用いて、IFN およびIL 2応答の誘導についてPME CD40L工程を試験した:患者DCをPME CD40L工程のために前記のように調製し、自己全増幅RCC腫瘍RNAでエレクトロポレートした。抗原負荷DCを自己患者CD8T細胞と培養し、誘起DCと、腫瘍関連抗原hTERT、SurvivinおよびRCC特異的抗原G250でトランスフェクトされた個別DCに応答する細胞内サイトカイン染色により、得られる応答CTLを研究した。eGFPコードmRNAでトランスフェクトされたDCを陰性コントロールスティミュレーターとして用いた。図14は、患者T細胞が、eGFP mRNAトランスフェクト陰性コントロールにより誘導された場合より高いIFN およびIL 2出現頻度で、全増幅RCC RNA負荷DCと、三種の腫瘍関連抗原にも応答したことを示す(各RCC関連DC標的への全応答からeGFPへの応答を差し引く)。

【0255】

'ベースCD40L工程'で成熟化されてKRN7000でパルスされたDCは、一次CTLの誘導を高めるNKT細胞をリクルートしうる

KRN7000でパルスされた、MART 1 mRNA負荷、CD40Lベース工程成熟化DCは、CD1d / KRN7000 テトラマー染色で調べたところ、KRN7000の代わりにビヒクルでパルスされた同様の成熟RNA負荷DCと比べて、PBM C培養物でNKT細胞の出現頻度を増加させる(図15a)。応答CTL(MART 1 / HLA A2)に関するテトラマー解析を用いたところ、MART 1 mRNAトランスフェクトDCにパルスされるKRN7000の存在はMART反応性T細胞の出現頻度を有意に増加させている(図15b)。このように、PBM C培養物でNKT細胞の拡大は、一次CD8CTL成長をサポートしうる、おそらくNKT細胞性'ヘルプ'により得られる、増幅ループを提供している。

【0256】

CD40L mRNAの最適化

好ましい成熟化手法を実証する原DC実験において用いられたCD40L RNAをプラスミドテンプレートpCR2.1 CD40L WTから転写した。好ましいCD40L RNAはARCAキャップアナログおよびポリAテールを含有している。プラスミドpCR2.1 CD40L WTを開始ATGコドンの5'側に位置するXbaI EcoRV断片の除去により修飾した。該断片はベクター配列の3'2ヌクレオチドを包含し、三つの潜在的開始ATGコドンを含有していた。この修飾の論理的理由(rational)は、これらの余分なATGが正しいCD40L翻訳開始部位と競合することでCD40L翻訳の効率的開始を妨げうるからであった。CD40Lのコード配列はこれらの修飾により影響されないままであった。修飾プラスミドテンプレートから転写されたCD40L RNAは、IL 12発現の誘導により測定したところ、二つの独立DCトランスフェクション実験において本CD40Lリファレンス標準(pCR2.1 CD40L WT)より良く機能した。修飾プラスミドはpCR2.1 CD40L WT Delta X Eと称される。

【0257】

加えて、CD40L開始コドンのすぐ上流にCD40L 5'非翻訳領域を置くことでCD40L RNAの発現が更に最適化されるかどうか調べてみたい、と我々は思った。CD40L翻訳開始部位のすぐ上流に位置させる3'9bp CD40L 5'非翻訳領域の挿入によりpCR2.1 CD40L WT Delta X Eプラスミドを更に修飾し、構築

10

20

30

40

50

物 p C R 2 . 1 C D 4 0 L + 5 U T R を得た。このプラスミド (p C R 2 . 1 C D 4 0 L + 5 U T R) から転写された R N A は C D 4 0 L W T D e l t a X E から転写された R N A ほど良く機能しなかったが、むしろ p C R 2 . 1 C D 4 0 L W T から転写された本 C D 4 0 L と同様に機能した (図 18 および 19) 。 p C R 2 . 1 C D 4 0 L W T D e l t a X E プラスミドから転写された C D 4 0 L R N A に対応する D N A 配列が S E Q I D N O : 1 3 において示されている。 A T G 開始コドンは S E Q I D N O : 1 3 の 4 1 位で始まる。

【 0 2 5 8 】

C D 4 0 L タンパク質の短いイソ型

以下で記載される C D 4 0 L R N A の各々 1 μ g を、トレーサー 35 S 標識メチオニンの存在下で麦芽エキス (Promega) を用いてインビトロにおいて翻訳した。 5 μ L の各翻訳混合物を S D S P A G E 電気泳動により分離させ、ナイロン膜へ移した。膜を Phoshoimager スクリーンへ曝し、 Storm Imager (Amersham) を用いて走査した。結果が図 20 で示されている。 レーン 1 および 2 は、各々非キャップ化およびキャップ化された p C R 2 . 1 C D 4 0 L W T m R N A (W T) からのインビトロ翻訳産物を表わす。 レーン 3 および 4 ~ 5 は、各々非キャップ化およびキャップ化された p C R 2 . 1 C D 4 0 L W T D e l t a X E m R N A (X E) からのインビトロ翻訳産物を表わす。 レーン 6 はキャップ化 p C R 2 . 1 C D 4 0 L + 5 U T R m R N A のインビトロ翻訳産物を表わす。 放射線標識翻訳産物の試験においては、一部の R N A が二種の主タンパク質を生じることを示す。 C D 4 0 L コード領域の配列解析では、該コード領域内で二以上の枠内メチオニン残基が部分的 C D 4 0 L タンパク質配列を生じうることを示す (S E Q I D N O : 2 参照) 。 トランケート化タンパク質は枠内にあるため、それは抗 C D 1 5 4 抗体でなお陽性に染色される。 天然 C D 4 0 L 5 U T R (p C R 2 . 1 C D 4 0 L + 5 U T R) を含有する構築物からのインビトロ翻訳産物の解析では、一種の C D 4 0 L タンパク質のみをコードしている (図 20) 。 しかしながら、この + 5 U T R C D 4 0 L 構築物は最低の I L 1 2 増強も示す (図 19) 。 対照的に、 W T および D e l t a X E 構築物は双方とも全長産物とほぼ等しい割合で短いタンパク質産物を產生し、最高 I L 1 2 誘導能を示すようである。

【 0 2 5 9 】

低分子量タンパク質産物が内部メチオニンから始まり、 I L 1 2 サイトカインの誘導に関してより活性な形の C D 4 0 L であろう、と我々は仮定した。 この仮説は、 A T G 開始コドンから G C G への部位特異的変異誘発により最アミノ末端メチオニンコドンを除去することにより、翻訳が野生型 C D 4 0 L タンパク質の第二内部メチオニンで始まるよう、次の実験セットにおいて試験した。 この構築物を p C D 4 0 L X E M E T 1 (C D 4 0 L X E - 第一メチオニン開始コドン) と命名した。 このプラスミドから転写された m R N A が S E Q I D N O : 3 0 において示されている。 S E Q I D N O : 3 0 は S E Q I D N O : 3 1 のポリペプチドをコードし、これは S E Q I D N O : 2 のアミノ酸残基 2 1 2 6 1 に相当する。 加えて、コンセンサス Kozak 配列で A T G コドンを最適化することにより第一開始メチオニンからの翻訳開始が高められる他の構築物について我々は試験した。 両修飾を D e l t a X E プラスミドバックグラウンドで行ったが、このプラスミドテンプレートが W T プラスミドの場合より活性な C D 4 0 L R N A を一貫してコードしているからである。 コントロールとしてこのアッセイで使用のために非修飾 D e l t a X E R N A の新ロットを作製した。 これら構築物からの R N A を產生し、ポリアデニル化および精製した。 R N A を 35 S 標識メチオニンの存在下でインビトロ翻訳し、 S D S P A G E により解析した。 図 21 において示されているように、 C D 4 0 L タンパク質のイソ型二種が W T および D e l t a X E C D 4 0 L R N A から作製される、という当初の観察を我々は確認した。 C D 4 0 L W T R N A は 2 種のイソ型を產生し、低い方のイソ型は產生された全タンパク質の 5 0 % をやや超えている (図 21 、 レーン 1) 。 D e l t a X E (第二ロットの R N A) はやや高い比率で短い型をコードし、一方天然 5 U T R 含有の C D 4 0 L R N A は長い型を主に生じる (図 21 、 レーン 2 および 5) 。 予

10

20

30

40

50

想通りに、最適化Kozak配列が第一A T Gを取り囲んでいる新RNAは長い型を主に生じる（全体の75%）（図21、レーン4）。最も重要なことに、第一メチオニンを欠くCD40L RNAは短い型のタンパク質を専ら生じた（図21、レーン6）。同時転写でキャップ化されたRNA（図21、レーン2）vs.キャッピング酵素を用いて転写後にキャップ化されたRNA（XE（enz）、図21、レーン3）から産生されたタンパク質で差異は見られなかった。

【0260】

我々は次いで、トランスフェクトDCで各構築物から産生されたCD40L（CD154）タンパク質の量を評価した。CD40L陽性細胞の率（図22、左パネル）は試験された全条件でほぼ同等であり、このことは各RNAについてトランスフェクション効率が類似していることを示す。平均蛍光強度（図22、右パネル）は細胞で産生されたCD40Lタンパク質の量と比例している。我々が一貫して観察してきたように、XE RNAはこのアッセイで野生型コントロールより良く機能するようである。大きなCD40Lイソ型を主にコードするDelta XE+Kozak RNAは意外にも最低量のCD40Lタンパク質を産生したが、その一方で短いイソ型をインビトロで専らコードする XEMet1 RNAはトランスフェクトDCで最高CD40Lタンパク質レベルを生じている。

【0261】

CD40Lタンパク質発現のレベルと長/短CD40Lタンパク質イソ型の相対比が、IL 12分泌レベルと相関があるか否かを調べるために測定された。図23は、このアッセイにおけるIL 12発現のレベルが抗CD154抗体で染色された細胞の平均蛍光強度と相関していたことを示す。同データの詳細な観察が図24において表されている。DCトランスフェクションアッセイにおけるIL 12発現の絶対量は、インビトロ翻訳アッセイにより産生された短CD40Lタンパク質イソ型の量と比例している。（Rot 6 3 UTR XEプラスミドを産生するために） XE構築物へのロタウイルス遺伝子6の3 UTRの付加は、XE Met1で観察されたものと類似するIL 10およびIL 12発現レベルを呈した（図25）。Rot 6 3 UTR XEプラスミドから転写されたmRNAの配列がSEQ ID NO: 32において示されている。XE

MET1ロタウイルス遺伝子6 3 UTR構築物から転写されたRNAをコードするcDNAがSEQ ID NO: 33において示されている。

【0262】

CD40Lの第二内部メチオニン（即ち、SEQ ID NO: 2のアミノ酸残基21）で始まるN末端CD40Lトランケート化タンパク質を産生するには、XE MET1 RNAの翻訳がCD40L CDSの第二A T Gコドンで始まる、と仮定された。この仮説を確認するために、最初の2メチオニンコドン（XE MET1, 2）、最初の3メチオニンコドン（XE MET1 3）または最初の4メチオニンコドン（XE MET1 4）を変える部位特異的変異誘発に XE構築物を付した。これらの構築物で産生されたインビトロ翻訳産物が図26において示されている。これらの修飾CD40L RNAでトランスフェクトされた樹状細胞によるIL 10およびIL 12の分泌レベルが図27において示されている。XE MET1構築物における第一メチオニンの欠失はこのRNAでトランスフェクトされたDCから高IL 12分泌をもたらし、一方で最初の2、3または4メチオニンの欠失はIL 12産生を生じない。したがって、SEQ ID NO: 31のCD40LポリペプチドをコードするRNAでDCのトランスフェクションは、高レベルのIL 12発現をもたらす。対照的に、3番目、4番目、または5番目内部A T Gコドンで始まるCD40Lポリペプチドは、それらがDCで発現される場合に、IL 12分泌を誘導できない。

【0263】

PME CD40L工程により成熟化されたDCでトランスフェクション後、4時間目および24時間目におけるIL 10およびIL 12発現
未成熟DCを培養の5日目にTNF (10ng/mL)、IFN (1000U/mL)、およびPGE₂ (1μg/mL)で表現型成熟させた。6日目にDCを回収し

10

20

30

40

50

、前記のように抗原およびCD40L mRNAでエレクトロポレーションし、4時間または24時間にわたり800U/mL GM-CSFおよび500U/mL IL-4を含有するX VIVO 15培地で培養した。表Vは、トランスフェクション(ワクチン)後4時間で回収された上澄がIL-12p70またはIL-10をほとんどまたは全く産生せず、一方で該レベルはトランスフェクション後24時間で増加することを示す。

【表5】

表V PME-CD40L DCからのサイトカイン分泌

	IL-10 pg/mL (s.d.)	IL-12 pg/mL (s.d.)
4時間	0 (0)	17 (15.4)
24時間	83.3 (26.3)	254.7 (21.8)

n = 3

10

【0264】

PME CD40L工程で成熟化されたDCは、'CD40Lベース工程'で成熟化されたDCと比較して、低レベルのIL-12p70を分泌する

IL-10およびIL-12分泌レベルを比較するために、標準CD40Lベース工程またはPME CD40L工程を用いてDCを調製し、培地中の分泌サイトカインをエレクトロポレーション後18~24時間で測定した。結果を表VIに示す。'CD40Lベース工程'と比較して、'成熟化後エレクトロポレーション CD40L'工程(即ち、CD40L+抗原コードmRNAでエレクトロポレーション前に、DCが最初にTNF、IFN、およびPGE₂で成熟化される)は低レベルのIL-12p70を呈し、一方でIL-10のレベルは類似している。しかしながら、CD40Lベース工程またはPME CD40L工程で成熟化されたDCは、サイトカインカクテル工程(IL-6、IL-1、TNF、およびPGE₂)で成熟化されたDCと比較して、低レベルのIL-10および高レベルのIL-12を分泌する。

20

【表6】

表VI PME-CD40L DCからのサイトカイン分泌

DC成熟化工程	IL-10 pg/mL (s.d.)	IL-12 pg/mL (s.d.)
CD40Lベース工程	89 (51)	1218 (86)
PME-CD40L工程	125 (64)	602 (53)

30

【0265】

細胞表面染色および細胞内サイトカイン産生の測定

PME CD40L工程を用いて前記のようにDCを作製し、またはDCをCD40L RNAおよびMART-1 RNAでエレクトロポレートして、IFN、およびPGE₂と4時間培養し、またはDCをTNF、IFN、およびPGE₂(TIP)サントカインで一晩成熟させ、次いでMART-1 RNAでエレクトロポレートして、4時間培養し、または未成熟DCをMART-1 RNAでエレクトロポレーションして、サイトカインカクテル(IL-1、IL-6、TNF、IFN、PGE₂)と4時間同時培養した。DCおよびCD8T細胞を"CTL誘導"について記載されたように同時培養した。指示された日にCTLを回収し、FBS/RPMI培地中において1時間インキュベーションにより10μg/mLのHLA-A201拘束性MART-1ペプチド(LAGIGIGLTV、SEQ ID NO:24)またはPSA-1ペプチド(FLTPKKLQCV、SEQ ID NO:26)で予めパルスされたT2細胞で刺激し、洗浄し、CTLをT2細胞と10:1比で刺激した。1時間の時点でブレフェルジンAを加え、培養物を更に3時間インキュベートした。次いで、抗原特異的CTLの出現頻度を検出するため、CD8レセプターおよびMART-1/A2ペンタマーに対する抗体でCTLを表面染色した。次いでサイトカイン特異的抗体を用いてIL-2およびIFNの細

40

50

胞内産生を検出するために、CTLをサボニン緩衝液で膜透過処理した。一部の場合は、CTLを同時培養物から回収して、CD8レセプター、CD28レセプター、CD45RA分子およびMART1/A2ペントマーに対するモノクローナル抗体で表面染色した。

【0266】

PME CD40L工程で成熟化されたDCは、'CD40Lベース工程'およびDCの成熟化を誘導する他の工程で成熟化されたDCより有意に高い免疫力を示した

図28は、CD40L RNAおよびMart1 RNAによりエレクトロポレーションされてIFN- α およびPGE₂と4時間培養されたDC (CD40L)、またはサイトカイン (TFN、IFN- α 、およびPGE₂)により一晩成熟化され、次いでMart1 RNAでエレクトロポレーションされて4時間培養されたDC (TIP)、またはMart1 RNAによりエレクトロポレーションされてサイトカインカクテル (IL-6、IL-1、TFN、IFN- α 、PGE₂)と4時間同時培養された未成熟DC (サイトカイン)のようなDCを作製する他の方法と比較した、PME CD40L工程で作製されたDCとの同時培養で25日目におけるMart1反応性CTLの増加率について示す。Mart1特異的CTLをMART1/HLA-A2ペントマーおよび抗CD8レセプター抗体での同時染色により同定した。図28(下パネル)および図29は、PME CD40L DCの存在下において作製されたMART1 CTLの大部分が、他のDC調製物の存在下で作製されたCTLとは対照的に、CD28レセプターを発現することを示す。

【0267】

図29において描かれたCD28レセプター発現の時間経過は、同時培養期間中で早くも14日目に、PME CD40L DC同時培養物からのMART1 CTLの89%がCD28レセプターを発現することを示す。更にCTLは同時培養期間中ずっとCD28レセプター発現を維持している。これは、CD28発現が経時的に衰えるTIP DCおよびサイトカインDC双方の同時培養物と対照的である。CD28レセプター陽性細胞は、CD45RA分子に対する抗体との特異的染色の欠如に基づき、抗原経験MART1 CTLとみなされる。

【0268】

図30は、培養の10日目に、他のDC工程TIP(6.5%)、CD40L(50%)およびサイトカイン(14%)と比較して、PME CD40LがIFN- α / IL-2 α 産生CTLの最大値(60%)を誘導できることを示す。

【0269】

図31は、Mart1 CTLにより産生されているサイトカインの全体レベルの尺度として、IFN- α 陽性CTLの平均蛍光強度(MFI)を示す。最高レベルのIFN- α 産生はMart1 CTL PME CD40L DC同時培養物で見られる。

【0270】

PME CD40L工程で成熟化されたDCは、抗原特異的エフェクター/メモリーCTLの集団を優先的に誘導する

'CD40Lベース工程'による一次免疫応答の誘導にもかかわらず、DCがCD40L + 抗原コードmRNAでエレクトロポレーション前に最初にTNF- α 、IFN- α およびPGE₂で成熟化される'PME CD40L'工程は、MART抗原モデル系を用いると、CTL活性で有意な改善を呈する(図13)。これら抗原反応性CTLの更なる解析においては、PME CD40L工程で成熟化されたDCが、図28で記載されたような他の方法を用いて成熟化されたDCより多数のMART1反応性CTLを誘導することを明らかにした。更に、抗原経験MART1反応性CTLは、他のDC同時培養物からアッセイされたMART1 CTLとは対照的に、CD28レセプターの発現を維持し続けている(図28および29)。これらの細胞はCD45RA分子発現の欠如により抗原経験CTLと規定されるが(Tomiyama et al. J. Immunol. (2002) 168:5538-5550)、CD28レセプターの発現とPME CD40L DC同時培養物に存在するそれらの数

10

20

30

40

50

の増加に基づくと最終分化エフェクター CTL とはみなされない。これらの CTL は、ウイルス特異的 CTL が CD28 陰性であり、かつほとんど増殖しない、文献で報告されていた他のエフェクター / メモリー CTL とは異なる (Weekes et al. J. Immunol. (1999) 162: 7569-7577)。PME CD40L DC は、抗原の存在下で増殖しうる能力を留めた抗原特異的 CTL の新集団を誘導する。したがって、これらの CTL は DC を作製する他の方法で作製された CTL の種類とは異なる。これは、ナイーブ T 細胞または抗原特異的 T 細胞の集団から CD28⁺ CD45RA⁻ メモリー / エフェクター T 細胞の集団を優先的に誘導する樹状細胞について最初の報告である。

【0271】

CMV (Topp et al. J. Exp. Med. (2003) 198:947-955) および HIV (Lieberman et al. 10 2001, Blood 98:1667-1677) のようなあるウイルス感染症でみられるものと類似した長期抗原刺激に際して、CD28 の発現の喪失と IL-2 を産生しうる能力の喪失がある。図 30 は、PME CD40L 作製 DC が、成熟 DC を作製する他の方法とは対照的に、IL-2 および IFN- γ 双方を産生しうる能力を留めた MART-1 特異的 CTL を初回免疫しうることを示す。そこでは、PME CD40L DC が、他の DC 工程 TIP (6.5%)、CD40L (50%) およびサイトカイン (14%) と比較して、最高率の IFN- γ / IL-2 ダブルポジティブ CTL (60%) を誘導できた。HIV 特異的 CTL 上で CD28 レセプターの喪失が漸増性 HIV ウィルス複製とパラレルであることが報告されていた (Gamberg et al. Immunology and Cell Biology (2004) 82:38-46)。一方、IFN- γ / IL-2 を産生する HIV 特異的 CTL は HIV 特異的 CTL の増殖をサポートしうる (Zimmerli et al. PNAS (2005) 102:7239-7244)。これらの IFN- γ / IL-2 産生 CTL は CD45RA 陰性エフェクター表現型を有するが、それらは CD28 レセプターを用いて特徴づけられなかった。Toppら (J. Exp. Med. (2003) 198:947-955) は、CD28 レセプターを CD28 陰性 CMV または HIV へ再導入することにより、特異的 CTL が IL-2 産生を復活させて CTL 増殖を持続しうることを示した。DC を作製する PME CD40L 工程は、DC を作製する他の方法と異なり、CD28 陽性でありかつ高レベルの IL-2 および IFN- γ を産生しうる能力を留めた抗原特異的 CTL を誘導しうる。このように、DC を作製する PME CD40L 工程は、長期抗原特異的 CTL エフェクター機能をサポートすることができ、しかも全重要事象において拡大し、サイトカインを産生し、標的細胞を殺して、頑強な長期 CTL エフェクター機能を媒介しうる能力を留めたエフェクターメモリー CTL の好ましい表現型を誘導することができる。

【0272】

CD40L MET1インビトロ転写 (IVT) 、転写後キャップ化およびポリアデニル化 mRNA の大規模作製

トランケート化 CD40L インビトロ転写 (IVT) mRNA の产生のためのプラスミドテンプレートを大規模で产生するために、pCD40L-XE-MET1 の全配列を化学的に合成した。この合成構築物を pARG-CD40L と命名した。pARG-CD40L の配列が SEQ ID NO: 34 で示されている。IVT CD40L MET1 転写物 (ポリアデニル化前) は SEQ ID NO: 34 のヌクレオチド残基 3566 4480 に相当する。CD40L MET1 の第一メチオニンコドンは SEQ ID NO: 34 のヌクレオチド残基 3666 3668 に相当する。この IVT mRNA から翻訳された CD40L MET1 タンパク質は SEQ ID NO: 31 に相当する。

【0273】

第一工程においては、インビトロ転写用の最良テンプレートを产生するために pARG-CD40L を線状化させた。簡単に言えば、60 rpm の速度にセットされた Precision Reciprocal Shaking Water Bath 中 37 °C にて SpeI 制限酵素 (無 BSA) で 12.5 mL の全容量中における消化により 2.5 mg の pARG-CD40L を線状化させた。次いで、Qiagen RNeasy Maxi Spin カラムを用いて線状プラスミドを精製した。特に、62.5 mL の Qiagen Buffer PB を線状プラスミドへ加えた。Buffer PB 中線状プラスミド 7.5 mL を 10 本の Qiagen RNeasy Maxi Spin カラムの各々へ加えた。スイン

10

20

30

40

50

グバケットローターおよび 50 mL チューブアダプター装備のSORVALL RT7 遠心機中 25 で 3 分間にわたり 4000 rpm でカラムを遠心した。フロースルーを捨て、カラムをカラム当たり 7.5 mL のQiagen Buffer PB で洗浄し、25 において 3 分間 4000 rpm で遠心し、次いでエタノール含有Buffer PE (192 mL の無ヌクレアーゼ 100% エタノールと混合された 48 mL Buffer PE) 10 mL で洗浄し、25 において 3 分間 4000 rpm、次いで 25 において 10 分間 4000 rpm で遠心した。各カラムへ 0.8 mL 無ヌクレアーゼ水を加え、ドライインキュベーター中 30 で 5~7 分間インキュベートし、次いで 25 で 10 分間 4000 rpm で遠心により溶出液を集めることにより、線状 pARG CD40L を溶出させた。線状 pARG CD40L を等分し、-85 ± 10 で保存した。

10

【0274】

第二工程においては、Epicentre Biotechnologies AmpliScribe T7-Flash Transcription Kit からの試薬を用いて線状 pARG CD40L からインピトロで CD40L MET1 RNA を転写した。簡単に言えば、6.8 mL 無ヌクレアーゼ水中 1000 µg 線状 pARG CD40L を、2 mL T7 10×反応緩衝液、1.8 mL 100 mM ATP、1.8 mL 100 mM CTP、1.8 mL 100 mM GTP、1.8 mL 100 mM UTP および 2 mL 100 mM DTT と混合し、次いで 2 mL のAmpliScribe T7-Flash T7 酶素溶液の添加前に 37 ± 1 振盪水浴中で 10 分間加温した。この反応混合液を 37 ± 1 振盪水浴中 60 rpm で 60 分間インキュベートした。次いで 1 mL の 1 mg / mL Pulmozyme Enzyme (dornase alpha, Genentech, Inc.) を加えることにより pARG CD40L DNA を IVT RNA 調製物から消化させ、37 ± 1 振盪水浴中 60 rpm で 30~35 分間インキュベートを続けた。60 mL 無ヌクレアーゼ水を消化産物へ加え、次いでこれを 300 mL RLT 緩衝液 (Qiagen) および 3 mL 2

20

メルカプトエタノールを含有した 1000 mL ボトルへ移した。内容物をスワーリングで混合させ、次いで 220 mL 無ヌクレアーゼ 100% エタノールを加え、スワーリングで混合させた。この CD40L MET1 IVT RNA 溶液 15 mL を 20 本のQiagen RNeasy Maxi カラムの各々へ入れた。各カラムをスイングバケットローターおよび 50 mL チューブアダプター装備のSORVALL RT7 遠心機中 25 で 3 分間にわたり 4000 rpm で遠心した。フロースルーを捨て、12 mL の残留 IVT RNA を 20 カラムの各々へ入れた。カラムを 25 において 3 分間 4000 rpm で再び遠心し、フロースルーを捨てた。カラムをカラム当たり 10 mL のエタノール含有Qiagen RPE 緩衝液 (8.5 mL Qiagen RPE 緩衝液および 340 mL の 100% 無ヌクレアーゼエタノール) により 2 回洗浄し、1 回目洗浄後 25 で 3 分間 4000 rpm で 1 回、および 2 回目洗浄後に 2 回遠心した。各カラムへ 1.5 mL 無ヌクレアーゼ水を加え、ドライインキュベーター中 30 ± 1 で 8~10 分間インキュベートし、次いで 25 において、3 分間 4000 rpm で遠心により溶出液を集めることにより、IVT RNA を溶出させた。各カラムへ 1.5 mL 無ヌクレアーゼ水を加え、ドライインキュベーター中 30 ± 1 において 8~10 分間インキュベートし、次いで 25 で 3 分間 4000 rpm で遠心により溶出液を集めることにより、IVT RNA を 2 回目に溶出させた。CD40L MET1 IVT RNA をプールし、等分し、-85 ± 10 において保存した。収量は 6.5 mg CD40L MET1 IVT RNA であった。

30

【0275】

第三工程においては、CD40L MET1 IVT RNA をインピトロでキャップ化およびポリアデニル化した。真核細胞中 RNA 転写物で形成されたキャップから区別しえないタイプ I キャップ構造をもつ RNA を產生するために、ワクシニアウイルスキャッピング酵素および 2'-O-メチルトランスフェラーゼを用いた。簡単に言えば、40 mg CD40L MET1 IVT RNA、47.566 mL 無ヌクレアーゼ水、6.7 mL 10×キャッピング緩衝液 (0.5 M Tris HCl (pH 8.0)、60 mM KCl および 12.5 mM MgCl₂、Epicentre Biotechnologies ScriptCap Cap1 Capping Kit から)、6.7 mL 10 mM GTP および 334 µL 20 mM S アデノシ

40

50

ルメチオニン (S A M) を 2 5 0 m L フラスコ中で混合し、3 7 ± 1 振盪水浴中で 1 5 ± 2 分間加温した。2 . 7 m L の 1 0 , 0 0 0 U / m L ScriptCap キャッピング酵素 (ワクシニアウイルスキャッピング酵素) および 2 . 7 m L の 0 . 1 m g / m L ScriptCap 2 0 メチルトランスフェラーゼ (双方とも Epicentre Biotechnologies 製) を加え、フラスコを 6 0 r p m の速度にセットされた 3 7 ± 1 振盪水浴中において、6 0 ± 5 分間インキュベートした。このインキュベート後、3 3 . 8 m L 無ヌクレアーゼ水、1 3 . 4 m L 1 0 × A Plus 反応緩衝液 (0 . 5 M Tris H C l (p H 8 . 0) 、2 . 5 M Na C l 、および 1 0 0 m M Mg C l ₂) および 1 3 . 4 m L 1 0 m M A T P を 10 フラスコへ加え、次いでこれを 6 0 r p m の速度にセットされた 3 7 ± 1 振盪水浴中において、1 5 ± 2 分間加温した。5 . 4 m L の 4 0 0 0 U / m L A -Plus ポリ (A) ポリメラーゼ (Epicentre Biotechnologies) を加え、スラスコを 6 0 r p m の速度にセットされた 3 7 ± 1 振盪水浴中で 6 0 ± 5 分間インキュベートした。次いで R Neasy Maxi Kit (Qiagen) を用いて キャップ化およびポリアデニル化 R N A を精製した。特に、キャップ化およびポリアデニル化 I V T C D 4 0 L M E T 1 R N A を含有する フラスコの内容物を 5 0 0 m L R L T 緩衝液 (Qiagen) および 5 m L 2 メルカプトエタノール含有の 1 0 0 0 m L ボトルへ移し、スワーリングにより混合させた。3 6 7 m L 無ヌクレアーゼ 1 0 0 % エタノールを加え、強いスワーリングで混合させた。この溶液 1 5 m L を 1 0 本の R Neasy Maxi カラム (Qiagen) の各々へ適用した。各カラムをスイングバケットローターおよび 5 0 m L チューブアダプター装備の SORVALL R T 7 遠心機中 2 5 で 3 分間にわたり 4 0 0 0 r p m で遠心した。フロースルーを捨て、1 5 m L の 残留 I V T R N A を 2 0 カラムの各々へ入れた。カラムを 2 5 において 3 分間 4 0 0 0 r p m で再び遠心し、フロースルーを捨てた。残留 R N A のすべてがカラムへ結合されるまで、この工程を繰り返した。カラムを更に 1 回遠心し、次いでカラム当たり 1 0 m L のエタノール含有 Qiagen R P E 緩衝液 (8 5 m L Qiagen R P E 緩衝液 および 3 4 0 m L の 1 0 0 % 無ヌクレアーゼエタノール) により 2 回洗浄し、1 回目洗浄後 2 5 において 3 分間 4 0 0 0 r p m で 1 回、および 2 回目洗浄後に 2 回遠心した。各カラムへ 1 . 3 m L 無ヌクレアーゼ水を加え、ドライインキュベーター中 3 0 ± 1 において 8 ~ 1 0 分間インキュベートし、次いで 2 5 において 3 分間 4 0 0 0 r p m で遠心により溶出液を集めることにより、I V T キャップ化およびポリアデニル化 C D 4 0 L M E T 1 R N A を溶出させた。各カラムへ 1 . 3 m L 無ヌクレアーゼ水を加え、ドライインキュベーター中 3 0 ± 1 において 8 ~ 1 0 分間インキュベートし、次いで 2 5 において 3 分間 4 0 0 0 r p m で遠心により溶出液を集めることにより、R N A を更に 2 回溶出させた。I V T R N A 溶出液をプールし、無菌 1 5 0 m L P E S 膜フィルター真空ユニットを用いて濾過し、等分し、樹状細胞のトランスフェクトに用いるまで - 1 5 0 において保存した。収量は 4 1 m g キャップ化およびポリアデニル化 C D 4 0 L M E T 1 I V T R N A であった。H I V 抗原 R N A を用いる好ましいトランスフェクションプロトコールでは、1 μ g C D 4 0 L M E T 1 R N A が 1 0 ⁶ 樹状細胞当たり 1 μ g H I V Gag R N A 、1 μ g H I V トランケート化 V p r R N A 、1 μ g H I V R e v R N A 、および 0 . 2 5 μ g H I V N e f R N A と同時トランスフェクトされる。全腫瘍 R N A を用いる好ましいトランスフェクションプロトコールでは、3 μ g C D 4 0 L M E T 1 R N A が 1 0 ⁶ 樹状細胞当たり 2 μ g の全腫瘍 R N A と同時トランスフェクトされる。 30 40

【 0 2 7 6 】

R N A の翻訳を改善するためのロタウイルス遺伝子 6 3 U T R の使用

ロタウイルス遺伝子 6 3 U T R が C D 4 0 L タンパク質の発現を高めるという当初の観察 (前記) をいくつかの代替配列で試験した。肺炎抗原をコードする O m 1 A c D N A が、Vaccine and Infectious Disease Organization (V I D O) から親切にも提供された。3 U T R に 3 R o t 6 配列含有または非含有の R N A 発現ベクター p G E M 4 Z 6 4 A S p h I へ c D N A 配列をサブクローニングした。R N A を転写後反応でキャップ化し、ポリアデニル化させた。O m 1 A または O m 1 A R o t 6 R N A からのインビトロ翻訳産物のウエスタンプロット解析では、特異的抗 O m 1 A 抗血清を用いる O m 50

1 A RNAテンプレート含有反応において、予想分子量の特定バンドを検出した。Om 1 A テンプレートと比較して、Om 1 A Rot 6 テンプレートからのバンド強度には少し増加がある(図32)。

【0277】

黒色腫関連抗原をコードするTryp 2 コード配列をRot 6 3 UTR修飾含有または非含有のpGEM4Z64ASphIプラスミドへサブクローニングした。RNAをARCAで同時転写的に転写かつキャップ化し、転写後にポリアデニル化した。³⁵ S標識Om 1 A またはOm 1 A Rot 6 のインビトロ翻訳研究においては、Tryp 2 Rot 6 からの発現レベルがTryp 2 RNAの場合と比較して高いことを示した(図33)。次いでより詳しい解析をDCを行った。様々なキャップ化RNAをTryp 2 またはTryp 2 Rot 6 テンプレートから作製した。全ARCA RNAについて同時転写キャッピング法を用いた、全m7Gキャップ(タイプ0 またはタイプ1)について転写後キャッピング法を用いた。RNAをDCへトランスフェクトし、エレクトロポレーション後4時間または24時間目に抗Tryp 2 特異的抗体を用いて発現レベルを測定した。図34は、研究されたキャップの全種類について、Rot 6 3 UTRで得られた発現レベルがRot 6 3 UTRなしの相当対応物の場合よりやや高かったことを示す。例えば、Rot 6 3 UTR含有のm7Gタイプ1キャップ化RNAは高レベルの染色強度および陽性細胞率を示した。この傾向は試験された全種類のキャップに当てはまる。

【0278】

IL 4マウスcDNAをRot 6 3 UTR修飾含有または非含有のRNA転写ベクターへサブクローニングした。ARCA同時転写キャッピング法またはm7G(タイプ0 またはタイプ1)転写後キャッピングを用いて様々なキャップ化RNAを合成した。全RNAを転写後ポリアデニル化反応でポリアデニル化した。ロタウイルス遺伝子6 3 UTR配列の効果は、4 μg RNA / DC百万個を用いてARCAで同時転写的にRNAがキャップ化された場合に特に顕著であった。該傾向は、4 μg RNAがトランスフェクションに用いられた場合に試験された全種類のキャップにおいてみられる(図35)。

【0279】

追加実験では、Rot 6 3 UTR含有または非含有のm7Gタイプ1キャップ化およびポリアデニル化RNAからのIL 4の発現レベルを比較した。陽性細胞率、細胞内染色の強度(パネルB)およびELISAにより測定されたIL 4サイトカインの分泌(パネルC)に及ぼすIL 4 RNA中ロタウイルス遺伝子6 3 UTR配列の効果。図36、パネルAでみられるように、Rot 6 3 UTR修飾RNAが用いられた場合にエレクトロポレーション後21時間で陽性染色された細胞のパーセントには増加がある。パネルBは、抗IL 4抗体による細胞内染色の強度が、RNAがRot 6 3 UTRで修飾されたときにエレクトロポレーション後4時間において大きいことを示す。ロタウイルス遺伝子6 3 UTRの効果は、IL 4サイトカイン産生のレベルが4 μg RNA / DC百万個で測定された場合に最も顕著であり、その際にIL 4サイトカインレベル分泌の著しい増加があり、後の試験時点では更に一層顕著である(パネルC)。

【図面の簡単な説明】

【0280】

【図1】図1は、IFN に続く可溶性CD40LにおいてDCの順次成熟化が最もIL 12p70分泌を生じることを示す。DCはサイトカインカクテル、可溶性CD40L単独、または可溶性CD40L + IFN において成熟させた。1000U / mlのIFN で18時間、次いで可溶性CD40Lの添加で更に18時間にわたる未成熟DCのプレインキュベートで、最大IL 12p70放出を生じる。最初に可溶性CD40L、次いでIFN の適用が、IL 10に伴う最少IL 12p70放出で、陰性シグナルとして認められる。

【図2】図2は、CD40Lをコードし、かつ>100ヌクレオチドのポリアテールを有

20

30

40

50

するmRNAでトランスフェクトされたHELA細胞が、抗CD40L(CD154)抗体によるFACS解析で調べたところ、細胞表面タンパク質を発現することを示す。

【図3】図3は、CD40L mRNAトランスフェクト細胞からのIL-12p70分泌がトランスフェクションペイロードの大きさと比例することを示す。DCが、滴定量のCD40L mRNA直後に1000U/ml IFN- γ の添加によりトランスフェクトされた。有意レベルのIL-12p70は、DC百万個当たり2 μ g~4 μ gのCD40L mRNAを用いると放出された。

【図4】図4は、細胞百万個当たり4 μ g CD40L mRNAでトランスフェクトされ、直後に表示量のIFN- γ とインキュベートされたDCによる、IL-12およびIL-10分泌に及ぼすIFN- γ 濃度の効果について示す。IL-12p70およびIL-10が24時間後に培養上澄で測定された。約100U/mlおよびそれ以上の濃度のIFN- γ が、最大IL-12p70分泌を誘導する上で、CD40L mRNAペイロードと相乗作用を示す。

【図5A】図5Aは、CD40L/IFN- γ で誘導されたIL-12p70分泌が、DCのトランスフェクションおよびIFN- γ の存在下において、培養後に20時間および24時間の時点で生じていることを示す。DCが細胞百万個当たり4 μ g CD40L mRNAでトランスフェクトされ、直後に1000U/ml IFN- γ と培養された。上澄が表示時間にレプリカ培養物から集められ、IL-12p70およびIL-10含有量についてアッセイされた。

【図5B】図5Bは、CD40L mRNAトランスフェクトDCへのTNF- α の添加がIL-12p70の産生をもたらすが、発現のレベルが補助成熟化物質としてIFN- γ で得られるよりも低いことを示す。

【図5C】図5Cは、補助成熟化因子としてTNF- α の使用もIFN- γ の使用と比較して高レベルのIL-10をもたらすことを示す。

【図6】図6A~Cは、CD40LをコードするmRNAでトランスフェクトされたDCが、抗CD40L(CD154)抗体によりFACS解析で調べたところ、細胞発現を呈することを示す。DCが細胞百万個当たり4 μ g CD40L mRNAでトランスフェクトされ、様々な時点で解析された。図6Aは、表面発現が著しく低い4時間の時点で調べたところ、CD40Lの大部分が細胞内区画に局在することを示す。図6Bは、有意の細胞内発現が60分間のとき27%陽性DCで明らかであり、3時間で79%に増すことを示す。図6Cは、mRNAをコードするCD40LでDCのトランスフェクション後における、CD40Lタンパク質の一過性発現を示す。

【図7】図7は、CD40L mRNAでトランスフェクトされ、かつIFN- γ の存在下において培養されたDCが、過剰の遮断抗CD40L抗体の存在下にもかかわらず、IL-12p70を分泌し、そのことがCD40L/CD40相互作用が“細胞内”区画で働く示唆であることを示す。DCが4 μ g CD40L mRNAでトランスフェクトされ、直後に10または50 μ g/mlの遮断抗CD40L抗体の存在下において1000U/ml IFN- γ と培養された。IL-12p70放出は50%減少するだけであり、このことは細胞対細胞シグナリングよりもむしろ細胞内シグナリングがIL-12p70の誘導にとり主要経路であることを示す。

【図8】図8は、CD40L mRNAでトランスフェクトされ、かつIFN- γ と同時に培養されたDCが、ケモカイン依存性移動を行わせる上でPGE₂の存在を必要とすることを示す。DCが滴定量のCD40L mRNAによりトランスフェクトされ、直後に1000U/ml IFN- γ および1 μ g/ml PGE₂とインキュベートされた。eGFPによりトランスフェクトされかつPGE₂を含有するサイトカインカクテルで成熟化されたDCが、陽性コントロールを表す。18時間の成熟化後、各培養条件からのDCがリンパ節ホーミングケモカインCCL19および21に対する“トランスウェル”移動アッセイで試験された。DC移動はCD40L mRNAペイロードのサイズと比例していた。

【図9】図9は、CD40L mRNAでトランスフェクションにより成熟化され、かつ

10

20

30

40

50

IFN および PGE₂ の存在下において培養された DC が、 “サイトカインカクテル” の存在下において成熟化された DC と比較して、効率的な T 細胞 “リコール応答” を惹起することを示す。 DC が抗原ペイロードとして細胞百万個当たり 2 μg f1u M1 mRNA および 4 μg eGFP mRNA コントロールで同時トランスフェクトされ、その後サイトカインカクテルで成熟化された。一方、 DC が抗原ペイロードとして細胞百万個当たり 2 μg f1u M1 mRNA および成熟化ペイロードとして 4 μg CD40L mRNA で同時トランスフェクトされた。これらのうち後者の細胞は、成熟化工程を完了させるために、 1000U / mL IFN および 1 μg / mL PGE₂ と直ちに培養された。 24 時間後、 IFN を分泌する応答 T 細胞の出現頻度により調べられるよう 10 な、抗 f1u M1 リコール応答をリクルートするために、 ELISPOT アッセイで各 DC 集団が用いられた。 IFN および PGE₂ の存在下、 CD40L mRNA によりトランスフェクションにより成熟化された DC の方が、強い抗 f1u 応答を惹起した。

【図 10】図 10 は、 CD40L mRNA でトランスフェクションにより成熟化されかつ IFN および PGE₂ の存在下において培養された DC が、 “サイトカインカクテル” の存在下において成熟化された DC と比較して、効率的な “一次 T 細胞応答” を惹起することを示す。 DC が抗原ペイロードとして細胞百万個当たり 2 μg MART APL mRNA でトランスフェクトされ、その後サイトカインカクテルで成熟化された。一方、 DC が抗原ペイロードとして細胞百万個当たり 2 μg MART APL mRNA および成熟化ペイロードとして 4 μg CD40L mRNA で同時トランスフェクトされた。これらのうち後者の細胞は、成熟化工程を完了させるために、 1000U / mL IFN および 1 μg / mL PGE₂ と直ちに培養された。 24 時間後、 0.2U / mL の IL 2 の存在下において 7 日間にわたる自己ナイーブ CD8 + T 細胞の同時培養により、トランスフェクト MART APL mRNA ペイロードから作製された MART APL ペプチド配列に対して T 細胞応答を生じさせるために、各 DC 集団が用いられた。この第一ラウンドの刺激後、 T 細胞が IL 2 ELISPOT アッセイで回収および樹立され、適切な成熟化抗原負荷 DC により再刺激された。 IFN および PGE₂ の存在下、 CD40L mRNA でトランスフェクションにより成熟化された DC の方が、 IL 2 を分泌する応答 CD8 + T 細胞の出現頻度により調べたところ、強い抗 MART APL 応答を惹起した。 20

【図 11】図 11 は、 MART APL mRNA を発現する DC による、細胞傷害性 T 細胞の誘導について示す。図 11a は可溶性インターフェロン / PGE₂ の添加で抗原源として MART APL mRNA および CD40L mRNA での同時トランスフェクションを用いた DC の成熟化が効果的 CTL 応答を惹起することを示し、一方図 11b は MART APL mRNA でトランスフェクトされたが ‘サイトカインカクテル’ で成熟化された DC がそうではないことを示す。 T2 PSA : 陰性コントロール標的として前立腺特異抗原 (PSA) からの HLA A2 拘束性ペプチドでパルスされた T2 細胞。 MART T2 : 天然配列の HLA A2 拘束性 MART エピトープでパルスされた T2 細胞。 MART APL T2 : 好ましい ‘変更ペプチドリガンド’ として HLA A2 拘束性 MART エピトープでパルスされた T2 細胞。 30

【図 12】図 12 は、トランスウェルアッセイにおけるリンパ節ケモカイン CCL19 および 21 への PME CD40L 成熟化 DC の移動能について示す。独立した健康なドナー 4 例が並行して試験されたが、各 DC 調製物は DC 百万個当たり 4 μg CD40L RNA と一緒に 1 μg 増幅全 RCC 腫瘍 RNA でトランスフェクトされた。移動アッセイは mRNA ペイロードでトランスフェクション後に 24 時間で行われた。

【図 13】図 13 は、黒色腫関連抗原 MART 1 に対する健康ドナーからの CTL 応答の誘導について示す。 DC が調製され、 MART 1 RNA で負荷され、 ‘CD40L ベース工程’ で成熟化されたか、または DC が PME CD40L 工程を用いて調製された。 DC および精製 CD8 T 細胞が 1 : 10 比で同時培養され、 IL 2 の存在下において 3 ラウンドの刺激を受けた。データは、ある範囲のエフェクター 標的比で MART 50

1ペプチドパルスT2標的細胞を用いた、 ^{51}Cr 放出細胞傷害アッセイについて示す。

【図14】図14は、全増幅RCC腫瘍RNAで負荷されたDC、PME CD40L成熟化DCに対する完全自己CTL応答の誘導について示す。DCおよび精製CD8 T細胞が1:10比で同時培養され、IL-2の存在下において3ラウンドの刺激を受けた。最後の刺激後5日目に、CD8 T細胞が、全増幅RCC RNA、hTERT RNA、Survivin RNA、G250 RNAによりトランスフェクトされたDCまたはeGFP RNAでトランスフェクトされた陰性コントロールDCで再刺激された。データは、活性化マーカーCD69の細胞表面染色と同時に細胞内IFN- γ およびIL-2の検出により、応答T細胞を同定することから得ている。細胞内サイトカイン応答は、IFN- γ / IL-2ダブルポジティブ(メモリーT細胞)からIFN- γ シングルポジティブ(エフェクターT細胞)を同定するために細分化された。
10

【図15】図15は、KRN7000またはビヒクルでパルスされたMART1 RNAトランスフェクトCD40Lベース工程成熟化DCによる、NKT細胞(a)およびMART1反応性CTL(b)の拡大について示す。データは、KRN7000パルスDCがCD1d / KRN7000テトラマー染色でわかるようにNKT細胞を拡大でき、NKT細胞の拡大集団の存在が、MART1 / HLA-A2テトラマーでテトラマー染色によりわかるように、MART1への一次CTLの同時リクルートを増加させることを明らかに示す。

【図16】図16は、ヒト(SEQ ID NO: 1)およびマウス(SEQ ID NO: 9)CD40L cDNAのアライメントを示す。図16A、16B、および16Cは、SEQ ID NO: 1および2のアライメントの3連続頁を表す。
20

【図17】図17は、ヒト(SEQ ID NO: 2)およびマウス(SEQ ID NO: 10)CD40Lタンパク質のアライメントを示す。

【図18】図18は、mMessage mMachine T7 Ultraキット(Ambion)を用いて100 μ gスケール(Delta X E1)または1mgスケール(Delta X E2)転写反応でpCR2.1 CD40L WT Delta X Eプラスミドから転写されたmRNAによりトランスフェクトされたDCによる、IL-12発現のレベルを示す。リファレンスRNAはプラスミドpCR2.1 CD40L WTから転写された。転写CD40L RNAが、Poly(A)Plusキット(Epicentre)を用いて、ポリAテールの添加により修飾された。RNAがDCへトランスフェクトされた。トランスフェクション後約20時間で、ELISAを用いて成熟DCの上澄でIL-12の量が測定された。陰性コントロール: CD40L RNAなしでエレクトロボレーションされたDCの上澄で測定されたIL-12発現。
30

【図19】図19は、様々なRNA構築物によりトランスフェクトされたDC培養物の上澄におけるIL-12のレベルを示す。CD40Lタンパク質発現およびIL-12サイトカインの誘導に及ぼす様々な5'UTR配列の影響を評価するために、mMessage mMachine T7 Ultra転写キットを用いて、三種のRNAが、プラスミドpCR2.1 CD40L WT、pCR2.1 CD40L XE、およびpCR2.1 CD40L + 5'UTRから作製された。転写RNAがポリアデニル化され、RNaseyキット(Qiagen)を用いて精製された。精製RNAが成熟DC中へトランスフェクトされた。DC培養物におけるIL-12サイトカイン誘導は回収上澄においてELISAにより測定された。
40

【図20】図20は、様々な5'UTRを含有するRNAから誘導されたインビトロ翻訳(^{35}S)メチオニン標識CD40Lタンパク質のSDS-PAGE分離について示す。

【図21】図21は、正常および変異開始コドンを含有するmRNAからインビトロ翻訳された(^{35}S)メチオニン標識CD40Lタンパク質のSDS-PAGE分離について示す。

【図22】図22は、様々なCD40L RNAでトランスフェクトされかつ抗CD154(CD40L)抗体で染色された樹状細胞について示す。左パネル: 4時間後におけるCD40L陽性細胞のパーセンテージ。右パネル: CD40L染色の平均蛍光強度。原R
50

NA構築物CD40L WTは陽性コントロールとして働く。GFT RNAトランスフェクト細胞は陰性コントロールとして働く。

【図23】図23は、様々なCD40L RNAでトランスフェクトされたDCにおける、IL-10およびIL-12の発現プロファイルについて示す。

【図24】図24は、様々なCD40L mRNAから誘導されたインビトロ翻訳産物のイソ型について示す。この図の表は、これらのCD40L mRNAでトランスフェクトされた樹状細胞により発現されたIL-12サイトカインの量を示す。

【図25】図25は、表示の修飾CD40L RNAでトランスフェクトされた樹状細胞によるIL-10およびIL-12の分泌について示す。

【図26】図26は、表示のCD40L RNAから作製されたCD40Lポリペプチドの翻訳産物のSDS-PAGE分離について示す。

【図27】図27は、表示の修飾CD40L RNAでトランスフェクトされた樹状細胞によるIL-10およびIL-12の分泌レベルについて示す。

【図28】図28は、CD40L RNAおよびMart-1 RNAによりエレクトロポレートされてIFN- γ およびPGE₂と4時間培養されたDC (CD40L)、またはサイトカイン (TFN、IFN- γ 、およびPGE₂)により一晩成熟化されMart-1 RNAでエレクトロポレーションされて4時間培養されたDC (TIP)、またはMART-1 RNAでエレクトロポレーションされサイトカインカクテル (IL-6、IL-1、TFN、IFN- γ 、PGE₂)と4時間同時培養された未成熟DC (サイトカイン)のようなDCを作製する他の方法と比較した、PME CD40L工程により作製されたDCとの同時培養で10日目におけるMart-1反応性CTLの増加率について示す。

【図29】図29は、PME CD40L工程、TIP工程、CD40Lベース工程、またはサイトカインカクテル工程により作製されたDCと同時培養されたMART-1 CTLにおける、CD28レセプター発現の時間経過を示す。

【図30】図30は、PME CD40L作製DCが、成熟DCを作製する他の方法とは対照的に、IL-2およびIFN- γ 双方を産生する能力を留めたMART-1特異的CTLを初回免疫しうることを示す。

【図31】図31は、Mart-1 CTLにより産生されるサイトカインの全体レベルの尺度として、IFN- γ 陽性CTLの平均蛍光強度 (MFI) を示す。

【図32】図32は、OmlAまたはOmlA root 6 RNAからのインビトロ翻訳産物のウエスタンプロット解析について示す。M:タンパク質マーカー、レーン1:OmlA RNAからの翻訳産物、レーン2:OmlA root 6 RNAからの翻訳産物、レーンC:無RNAテンプレートのコントロール反応。

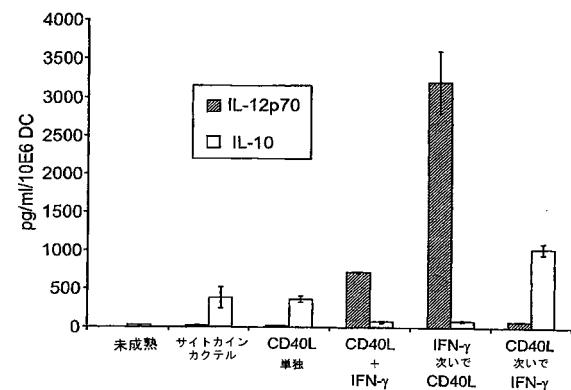
【図33】図33は、S-35標識OmlAまたはOmlA Root 6のインビトロ翻訳研究について示す。レーン1:OmlAをコードするRNAから誘導された産物、レーン2:OmlA Root 6から誘導された産物、レーンC:無RNAテンプレートのコントロール反応。20ngまたは40ngの全タンパク質が、示されたようにSDS-PAGEで分離された。

【図34】図34は、上パネル:抗Tryptase 2抗体で染色された陽性細胞%。下パネル:抗Tryptase 2抗体による細胞の染色強度。

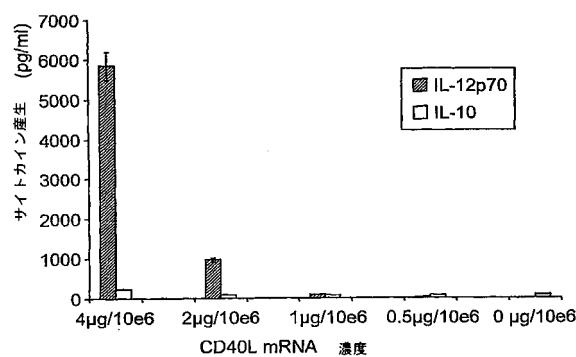
【図35】図35は、陽性細胞% (パネルA)、細胞内染色の強度 (パネルB) およびIL-4サイトカインの分泌 (パネルC) に及ぼす、IL-4 RNA中ロタウイルス遺伝子6-3 UTR配列の効果について示す。

【図36】図36は、陽性細胞% (パネルA)、細胞内染色の強度 (パネルB) 、およびELIZAにより測定されるIL-4サイトカインの分泌 (パネルC) に及ぼす、IL-4 RNA中ロタウイルス遺伝子6-3 UTR配列の効果について示す。

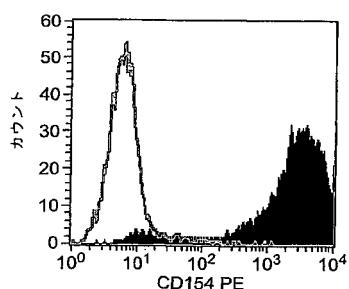
【図1】



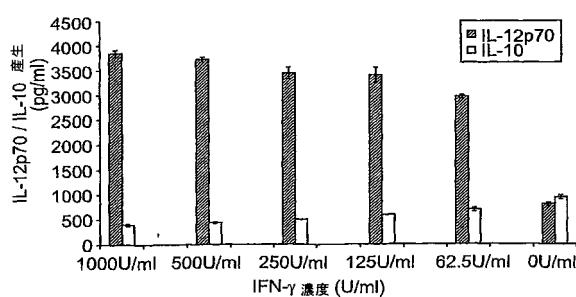
【図3】



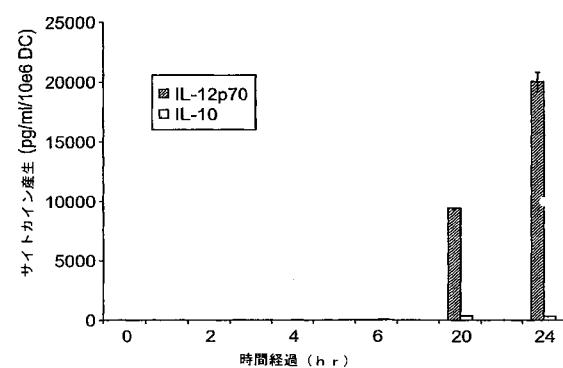
【図2】



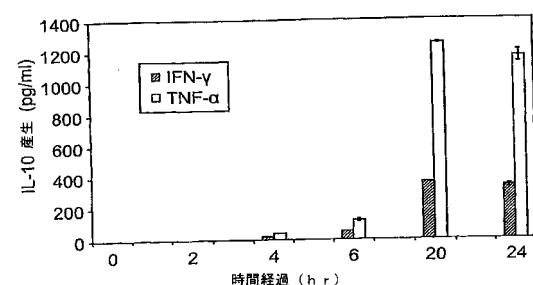
【図4】



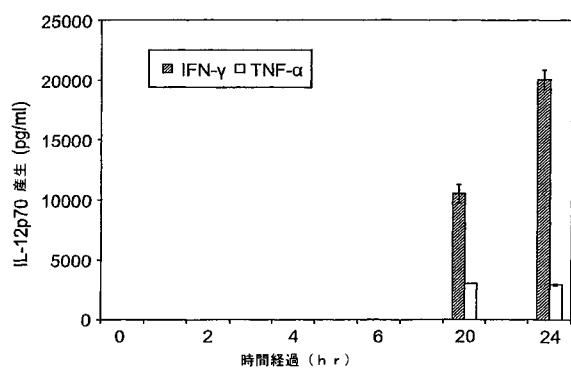
【図5 A】



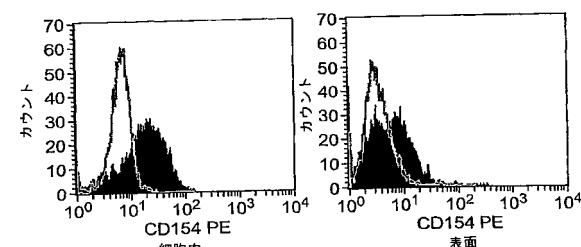
【図5 C】



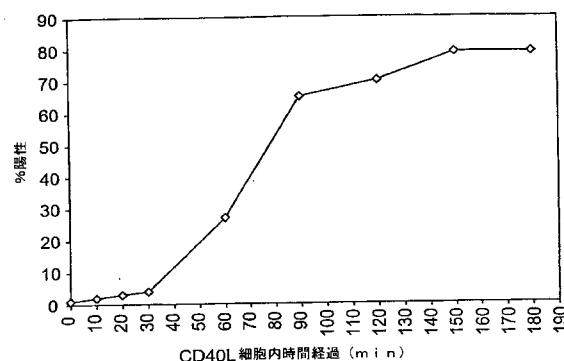
【図5 B】



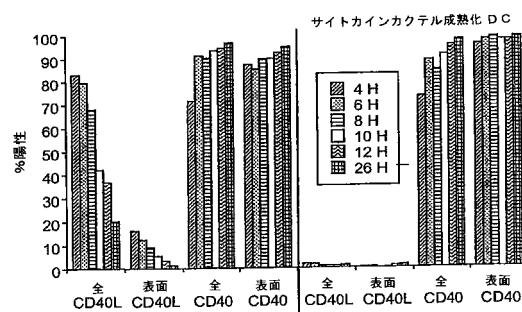
【図6 A】



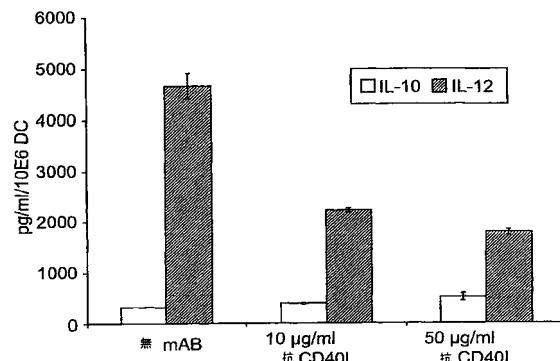
【図 6 B】



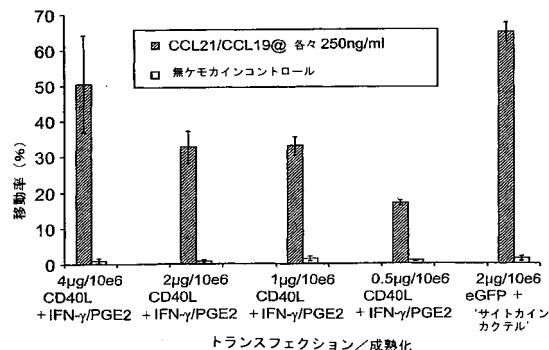
【図 6 C】



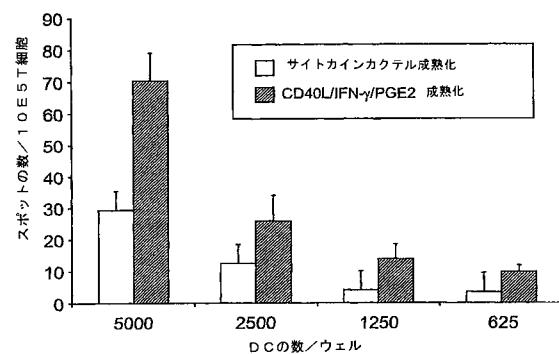
【図 7】



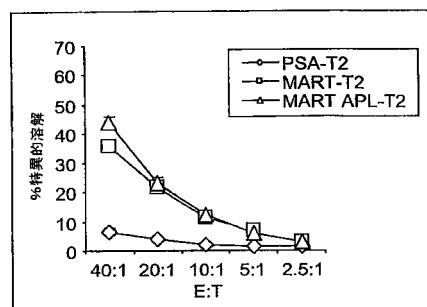
【図 8】



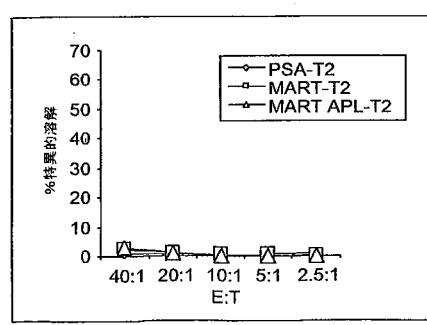
【図 9】



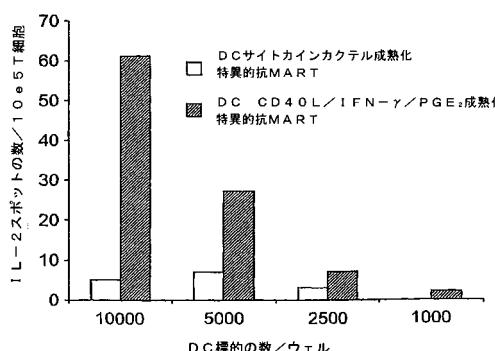
【図 11 A】



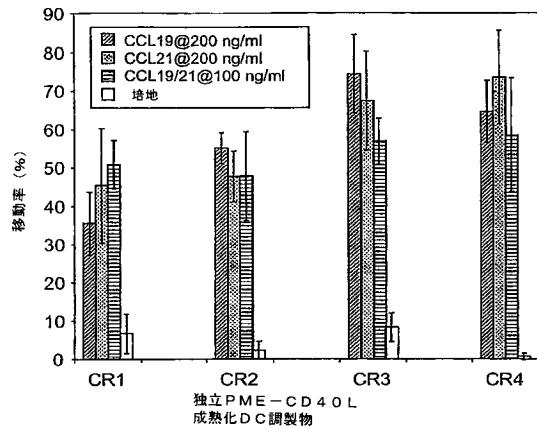
【図 11 B】



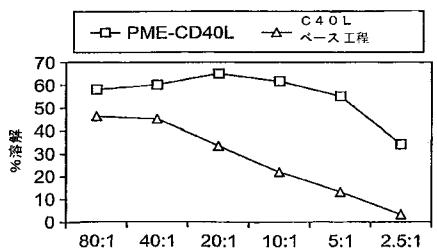
【図 10】



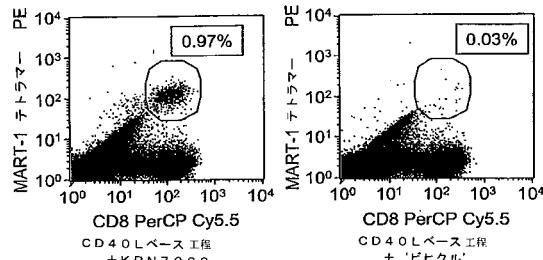
【図 1 2】



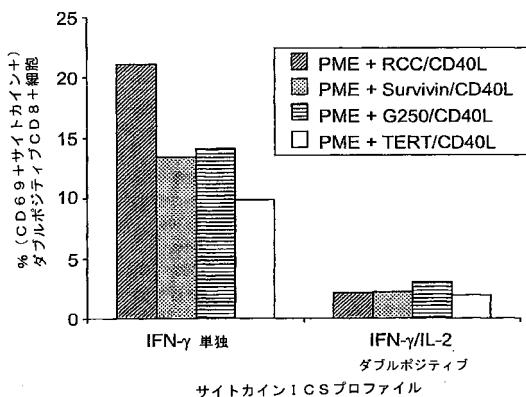
【図13】



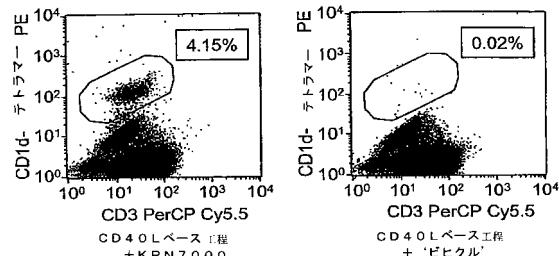
【 図 1 5 B 】



【図14】



【図15A】



【図16A】

FIG. 16A

【図16B】

FIG. 16B

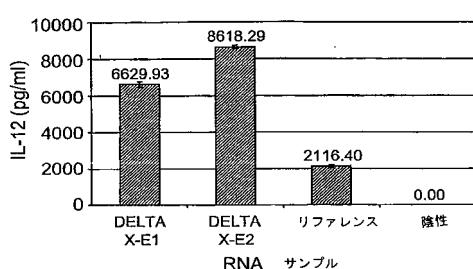
【図16C】

FIG. 16C

【图 17】

```
#####
# Program: needle
# Rundate: Tue Oct 05 21:40:43 2004
# Align_Format: srna/rna
# Region: /usr/local/ncrna/ncrna/ncrna-20041005-21404327122895.output
#####
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOS5_001
# 2: EMBOS5_001
# Matrix: EBL050SM2
# GapPenalty: -10.0
# ExtGapPenalty: -10.0
# Score: 1032.0
#
# Length: 261
# Identity: 202/261 (77.4%)
# Similarity: 225/261 (86.2%)
# Gaps: 1/261 ( 0.4%)
#
# Score: 1032.0
#
#####
# HUMAN CD46D 1 MIEITNTGTPSPRRAANGLYIISMCIPMMLJLJFVLLTOMIGSALFAVYJLKRRL 50
# MOUSE CD46D 1 MIEITNTGTPSPRRAANGLYIISMCIPMMLJLJFVLLTOMIGSALFAVYJLKRRL 50
EMBOS5_001 51 DKEIDLERMADPVEDPFPKTCIQRNGEGRSLSLJLCEBEIKSOFKPFVKDIN 100
EMBOS5_001 51 DKVSEBVNLJEDPVVIIKLLKRKGRGCGLSLSSQCREROFEDLKVDT 100
EMBOS5_001 101 NKERSTTKEENSPMOPQGKCPQIAAHVIIISASAKTTVSQVNAEKGYYINNSN 150
EMBOS5_001 101 NKERG-KKRNNSPQGKCPQIAAHVIIISASAKTTVSQVNAEKGYYINNSN 149
EMBOS5_001 151 MIAVLTGNGKGLUVTIHQGLYIITTAQVPCFSNREASSQCPAFTASCLLSPGR 200
EMBOS5_001 150 NLVLMLENKRCGLVTAHSGLTYVTVTFCFSNREASSQCPFPTVGLWKLPSGR 199
EMBOS5_001 201 PERILLRRAANTHSSAKKPCQGQEEIHLGJGFPFQPGASVSPVNUVTDPSQVSNG 250
EMBOS5_001 200 NLVLMLENKRCGLVTAHSGLTYVTVTFCFSNREASSQCPFPTVGLWKLPSGR 249
EMBOS5_001 251 TGFTFSFGLLKL 261
EMBOS5_001 250 VGFSSGFLKL 260
```

FIG. 17



【図 18】

【図19】

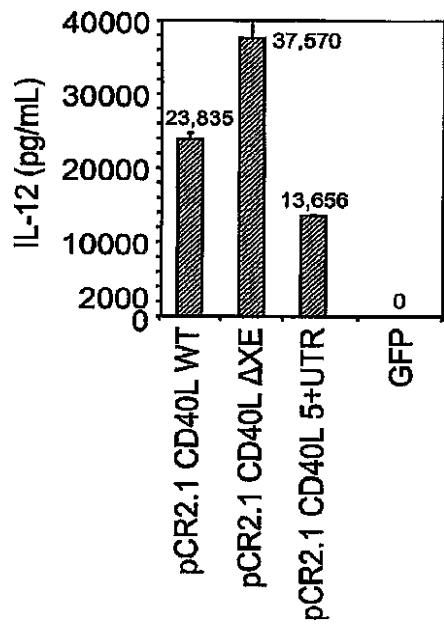
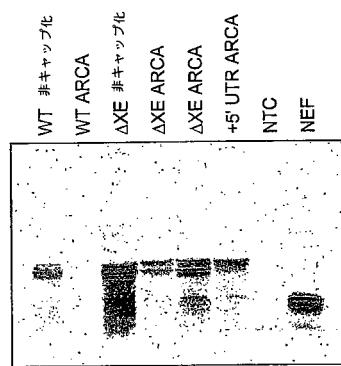


FIG. 19

【図20】



【図21】

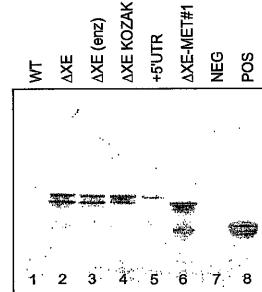
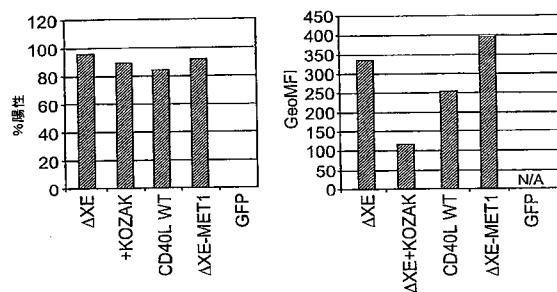
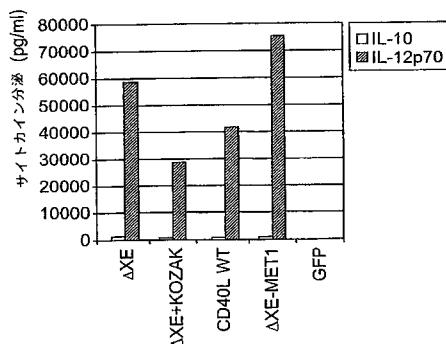


FIG. 21

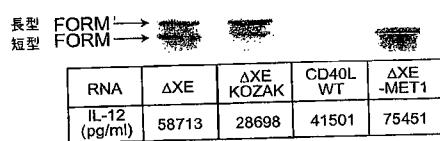
【図22】



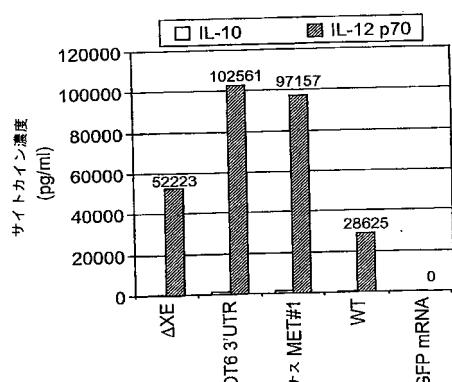
【図23】



【図24】



【図25】



【図26】

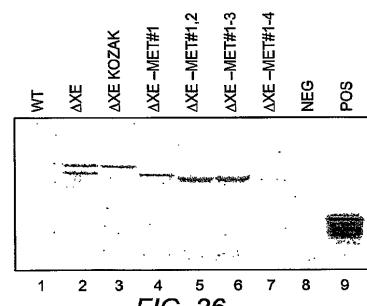
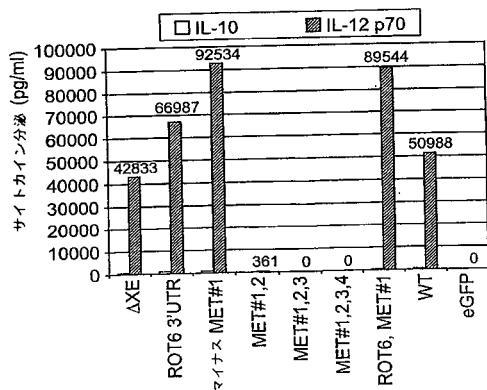
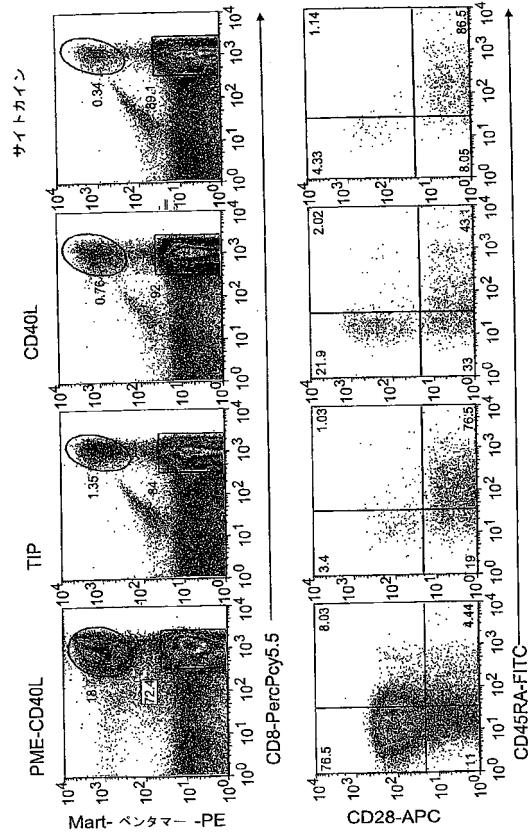


FIG. 26

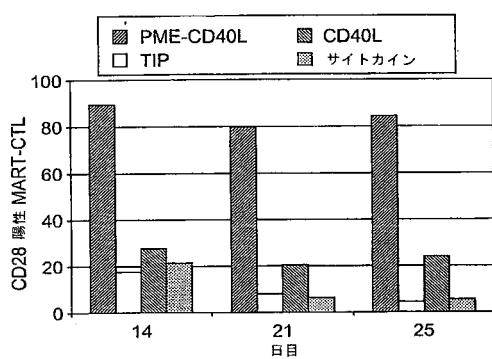
【図27】



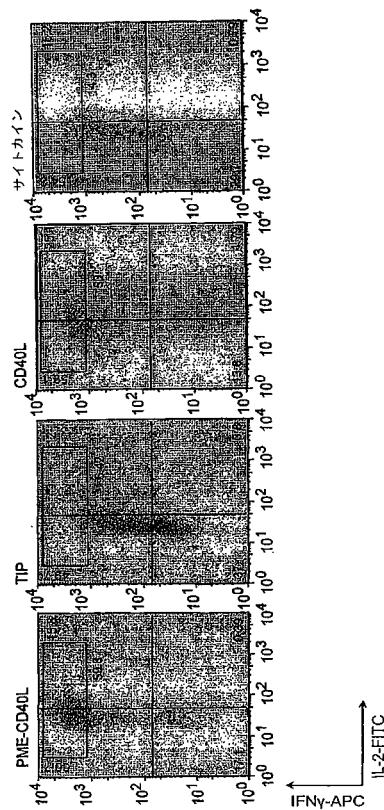
【図28】



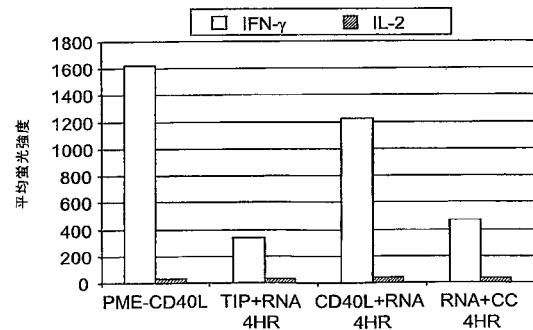
【図29】



【図30】



【図31】



【図32】

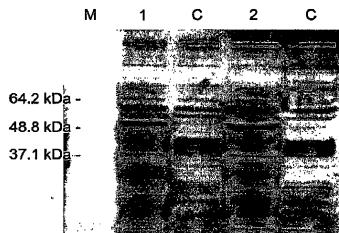


FIG. 32

【図33】

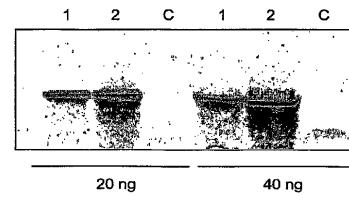
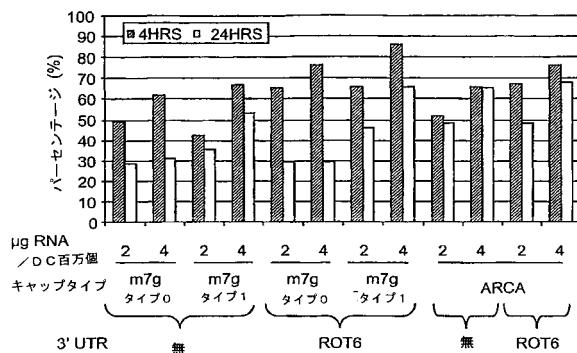
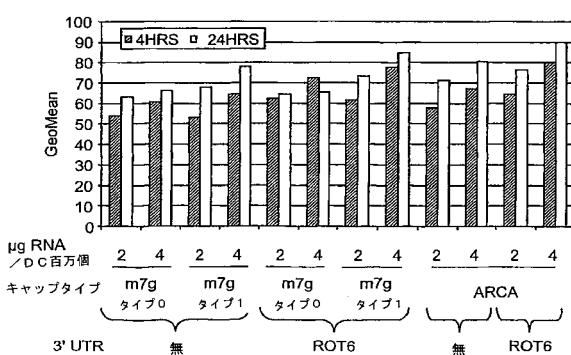


FIG. 33

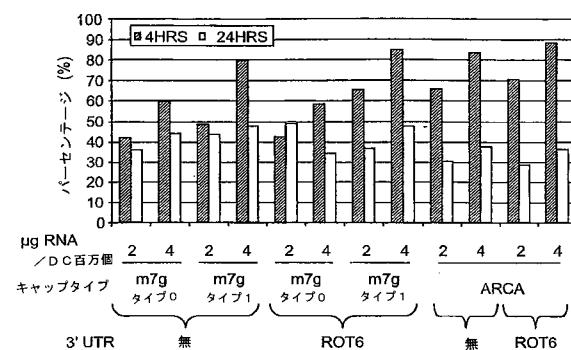
【図34 A】



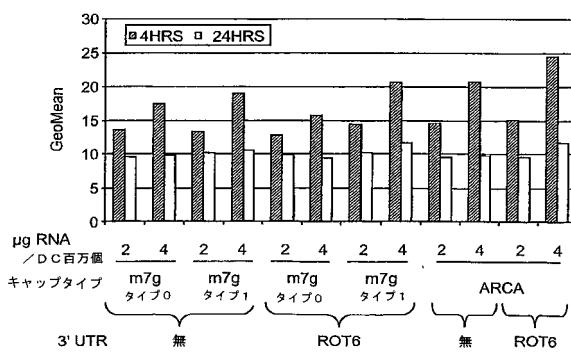
【図34 B】



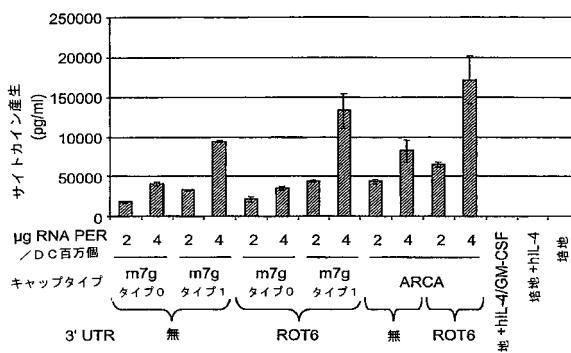
【図35 A】



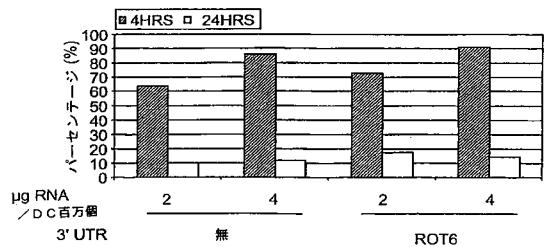
【図35 B】



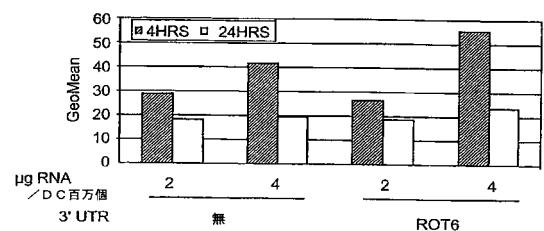
【図35 C】



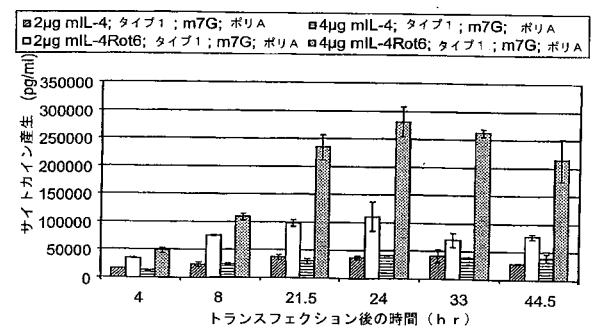
【図36A】



【図36B】



【図36C】



フロントページの続き

(74)代理人 100143971
弁理士 藤井 宏行

(72)発明者 ドナルド、ヒーリー
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ルージュモント、ルックアウト、ポイント、402

(72)発明者 イリナ、チェレパノバ
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ルージュモント、シャーロツ、マウンテン、ロード、89
23

(72)発明者 日野原 敦
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ドゥラム、グレード、クレスト、ウェイ、115、アパート
201

(72)発明者 メリッサ、アダムス
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、チャペル、ヒル、ホワイト、ブレインズ、ロード、1909

(72)発明者 マーク、デベネデット
アメリカ合衆国ノースカロライナ州、ドゥラム、オールド、チャペル、ヒル、ロード、3909

審査官 飯室 里美

(56)参考文献 J Immunother. , 2003年, Vol.26, p.451-460
J Surg Res. , 2004年, Vol.116, p.24-31
Int Immunol. , 2002年, Vol.14, p.367-380
J Immunol Methods. , 2001年, Vol.247, p.61-72
Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No. P29965 , 1993年, URL , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/231718?sat=0&satkey=163452>

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15 / 09
B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S / W P I X (S T N)
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q