(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4762887号
(P4762887)
(45)発行日　平成23年8月31日(2011.8.31)　(24)登録日　平成23年6月17日(2011.6.17)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 5/0784 (2010.01)　C12N 5/00 202M

請求項の数 21 (全 26 頁)

(21)出願番号	特願2006-503922 (P2006-503922)
(86)(22)出願日	平成16年2月27日 (2004.2.27)
(65)公表番号	特表2006-519021 (P2006-519021A)
(43)公表日	平成18年8月24日 (2006.8.24)
(86)国際出願番号	PCT/US2004/006119
(87)国際公開番号	WO2004/076651
(87)国際公開日	平成16年9月10日 (2004.9.10)
審査請求日	平成19年2月16日 (2007.2.16)
(31)優先権主張番号	60/451,015
(32)優先日	平成15年2月27日 (2003.2.27)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　500513619
ノースウエスト　バイオセラピューティクス，インコーポレイティド
アメリカ合衆国　メリーランド，　ベセスダ，　モンゴメリー　レーン　４８００，　スイート　８００
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100062409
弁理士　安村　高明
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹

最終頁に続く

(54)【発明の名称】付加的なサイトカインの非存在下でＧＭ－ＣＳＦを用いる単球樹状前駆細胞からの樹状細胞の産生

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
単球樹状細胞前駆体を未熟樹状細胞に分化させるための方法であって、該方法は、以下：
ａ）非活性化単球樹状細胞前駆体を含む細胞集団を提供する工程；
ｂ）付加的なサイトカインの非存在下で、培養容器中の該非活性化樹状細胞前駆体と、該培養容器への該単球樹状細胞前駆細胞の接着を阻害するための因子および顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子が補充された血清を含まない樹状細胞培養培地とを接触させる工程、
を包含する、方法。
【請求項２】
前記非活性化単球樹状細胞前駆細胞の接着が、高濃度の動物タンパク質またはヒトタンパク質を含む、血清を含まない樹状細胞培養培地と該細胞とを接触させることによって阻害される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記動物タンパク質またはヒトタンパク質が、アルブミン、血清、血漿、ゼラチン、またはポリアミノ酸である、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記非活性化単球樹状前駆細胞の活性化が、金属キレート剤をさらに含む、血清を含まない樹状細胞培養培地と該細胞とを接触させることによって阻害される、請求項１に記載の方法。

【請求項５】
前記金属キレート剤が、ＥＤＴＡまたはＥＧＴＡを含む、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記培養容器が、低細胞結合力の培養容器である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記低細胞結合力の培養容器が、ポリプロピレン、またはＰＦＴＥを含む、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記タンパク質が、ヒト血清アルブミンである、請求項３に記載の方法。
【請求項９】
前記ヒト血清アルブミンが、少なくとも１％の濃度で存在する、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記ヒト血清アルブミンが、２％～１０％の濃度で存在する、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記細胞集団が、末梢血、白血球搬出産物、アフェレーシス産物、臍帯血、脾臓、リンパ節、胸腺、または骨髄を含む、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記細胞集団が、凍結保存されていた、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記培養容器が、ポリスチレン、ガラスコーティングされたポリスチレン、スチレンまたはガラスを含む、請求項２に記載の方法。
【請求項１４】
前記単球樹状細胞前駆体が、クロスフロー濾過によってさらに濃縮される、請求項１１に記載の方法。
【請求項１５】
請求項１４に記載の方法であって、フィルターが、５．５ミクロンの孔径と、１４００ｍｌ／分の再循環（入力）速度と、１７ｍｌ／分の濾過速度と、９０分の濾過時間とを有する、方法。
【請求項１６】
請求項１に記載の方法であって、該方法が、抗原取り込みに十分な時間の間、前記未熟樹状細胞と目的の抗原とを接触させる工程をさらに包含する、方法。
【請求項１７】
請求項１６に記載の方法であって、該方法が、前記未熟樹状細胞と樹状細胞成熟剤とを接触させる工程をさらに包含する、方法。
【請求項１８】
前記成熟剤が、Ｂａｃｉｌｌｕｓ－Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ（ＢＣＧ）、リポ多糖類（ＬＰＳ）、ＴＮＦα、インターフェロンγ（ＩＦＮγ）、またはこれらの組み合わせを含む、請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
前記成熟剤が、ＢＣＧおよびＩＦＮγの組み合わせである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記抗原が、腫瘍特異性抗体、腫瘍関連抗原、ウイルス抗原、細菌性抗原、腫瘍細胞、腫瘍細胞から単離された抗原をコードする核酸、細菌細胞、抗原を発現する組換え細胞、細胞溶解物、膜調製物、組換え的に産生された抗原、ペプチド抗原、または単離された抗原である、請求項１６に記載の方法。
【請求項２１】
請求項８に記載の方法であって、該方法が、前記樹状細胞の凍結保存工程をさらに包含する、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】

【０００１】
（関連出願の相互参照）
本出願は、米国仮特許出願第６０／４５１，０１５号（２００３年2月２７日出願）の利益を主張する。この米国仮特許出願６０／４５１，０１５号の開示は、本明細書中でその全体が援用される。
【背景技術】
【０００２】
（発明の背景）
抗原提示細胞（ＡＰＣ）は、有効な免疫応答を誘発することに重要である。ＡＰＣは、抗原特異性レセプターを有するＴ細胞に抗原を提示するだけでなく、Ｔ細胞活性化に必要なシグナルも提供する。このようなシグナルは、不完全に定義されたままであるが、種々の細胞表面分子およびサイトカインまたは成長因子に関わることが公知である。未処理のＴ細胞またはプライムされていないＴ細胞の活性化に必要とされる因子は、事前にプライムされた（ｐｒｉｍｅｄ）記憶Ｔ細胞の再活性化に必要な因子とは異なり得る。単球およびＢ細胞は、コンピテントＡＰＣであると示されたが、これらの抗原提示能力は、事前に感作されたＴ細胞の再活性化に限定されるように見える。従って、単球およびＢ細胞は、機能的に未処理のＴ細胞集団またはプライムされていないＴ細胞集団を直接的に活性化することが可能ではない。他方、樹状細胞は、未処理のＴ細胞および事前にプライムされたＴ細胞を両方活性化することが可能である。
【０００３】
樹状細胞は、特有の形態および広範な組織分布（血液を含む）を有する異質な細胞集団である（例えば、Ｓｔｅｉｎｍａｎ，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．９：２７１－９６（１９９１）を参照のこと）。樹状細胞の細胞表面は独特であり、特徴的なベール様の突起を有する。成熟樹状細胞は、一般的には、ＣＤ３$^{-}$、ＣＤ１１ｃ$^{+}$、ＣＤ１９$^{-}$、ＣＤ８３$^{+}$、ＣＤ８６$^{+}$およびＨＬＡ－ＤＲ$^{+}$として同定される。
【０００４】
樹状細胞は、抗原をプロセシングおよび提示し、そして未処理のＴ細胞およびプライムされていないＴ細胞ならびに記憶Ｔ細胞からの応答を刺激する。特に、樹状細胞は、ＭＨＣ制限Ｔ細胞を感作するための高い能力を有し、Ｔ細胞に抗原（Ｔ細胞発生およびＴ細胞寛容の間の自己抗原、ならびに免疫応答の間の異種抗原の両方）を提示することに非常に有効である。抗原提示におけるこれらの役割に加えて、樹状細胞はまた、非リンパ組織と直接的に連絡し、そして傷害シグナル（例えば、虚血、感染、もしくは炎症）または腫瘍成長について非リンパ組織を調査する。一旦シグナルが送られると、樹状細胞は、リンパ球および単球の活性を刺激するサイトカインを放出することによって、免疫応答を開始する。
【０００５】
抗原提示におけるこれらの有効性に起因して、インビトロおよびエキソビボの両方で免疫賦活剤として樹状細胞を使用することに関心が高まっている。しかし、末梢血中の樹状細胞の頻度の低さ、および以前の方法によって単離された樹状細胞の純度の低さに起因して、単離された樹状細胞の免疫賦活剤としての使用は限定されてきた。特に、ヒト末梢血中の樹状細胞の頻度は、細胞全体の約０．１％と見積もられた。同様に、他の組織（例えば、リンパ器官）由来の樹状細胞の接触性は限定的である。樹状細胞の頻度の低さは、樹状細胞前駆体で富化された細胞集団を単離すること、および、エキソビボまたはインビボでこれらの前駆体を培養して未熟樹状細胞または成熟樹状細胞の富化された集団を得ることに関心を高めてきた。樹状細胞前駆体の特性は、まだ不完全に定義されたままであるので、樹状細胞前駆体を単離するために代表的に使用される方法は、所望の前駆体の精製画分をもたらさないが、代わりに、樹状細胞前駆体において富化された白血球の混合集団を一般的に産生する。いくつかの細胞型は、樹状細胞前駆体として機能する可能性を有するとして同定されてきた。血液由来ＣＤ１４$^{+}$単球（特に、成長因子顆粒球－単球コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）についてのレセプターをこれらの表面上に発現する血液由来Ｃ

Ｄ１４$^{+}$単球）は、公知の樹状細胞前駆体である。他の血液由来樹状細胞前駆体は、単球および他の「非樹状細胞前駆体」を最初に除去することによって単離され得る（例えば、米国特許第５，９９４，１２６号および同第５，８５１，７５６号を参照のこと）。さらに他の公知の樹状細胞前駆体としては、ＣＤ３４細胞表面マーカーを発現する骨髄由来細胞が挙げられる。

【０００６】

樹状細胞前駆体において富化された細胞集団は、種々の方法（例えば、密度勾配分離、蛍光表示式細胞分取、免疫学的細胞分離技術（例えば、パニング）、補体溶解、ロゼット形成、磁気細胞分離技術、ナイロンウール分離、およびこのような方法の組み合わせ）によって得られた（例えば、Ｏ’Ｄｏｈｅｒｔｙら，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７８：１０６７－７６（１９９３）；ＹｏｕｎｇおよびＳｔｅｉｎｍａｎ，Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７１：１３１５－３２（１９９０）；ＦｒｅｕｄｅｎｔｈａｌおよびＳｔｅｉｎｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：７６９８－７０２（１９９０）；Ｍａｃａｔｏｎｉａら，Ｉｍｍｕｎｏｌ．６７：２８５－８９（１９８９）；ＭａｒｋｏｗｉｃｚおよびＥｎｇｌｅｍａｎ，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８５：９５５－６１（１９９０）（これらの全ては、本明細書中でその全体が参考として援用される）を参照のこと）。樹状細胞を免疫選択するための方法としては、例えば、樹状細胞前駆体（例えば、基質に結合した抗ＣＤ３４抗体および／または基質に結合した抗ＣＤ１４抗体）に関連する細胞表面マーカーに対する抗体を使用することが挙げられる（例えば、Ｂｅｒｎｈａｒｄら，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５５：１０９９－１０４（１９９５）；Ｃａｕｘら，Ｎａｔｕｒｅ ３６０：２５８－６１（１９９２）を参照のこと）。

【０００７】

１つの代表的な実験法において、白血球は、白血球搬出手順によって単離される。樹状細胞および／または樹状細胞前駆体を含むと考えられる細胞画分を富化するためのさらなる精製のために、さらなる方法が代表的に使用される。同様に、分画遠心法（例えば、軟膜の単離）、特定の細胞表面タンパク質に特異的なモノクローナル抗体でのパニング（例えば、ポジティブ選択およびネガティブ選択）、ならびに濾過のような方法がまた、樹状細胞前駆体を含む白血球の粗混合物を産生する。

【０００８】

増殖性樹状細胞前駆体を単離するための別の報告された方法は、市販されている処理されたプラスチック基材（例えば、ビーズまたは磁気ビーズ）を使用して接着単球および他の「非樹状細胞前駆体」を選択的に除去することである（例えば、米国特許第５，９９４，１２６号および同第５，８５１，７５６号を参照のこと）。この接着単球および非樹状細胞前駆体は、非接着細胞がエキソビボ培養および成熟に保持される間に除去される。別の方法において、アフェレーシス細胞は、バッグの表面積を増大させるためにプラスチック（すなわち、ポリスチレンまたはスチレン）のマイクロキャリアビーズが加えられたプラスチック培養バッグ中で培養された。細胞は、この細胞が上記ビーズに接着するのに十分な時間培養され、そして非接着細胞が上記バッグから洗浄された（Ｍａｆｆｅｉら，Ｔｒａｎｓｆｕｓｉｏｎ ４０：１４１９－１４２０（２０００）；ＷＯ ０２／４４３３８、本明細書中で参考として援用される）。

【０００９】

樹状細胞前駆体が富化された細胞集団の調製のための既報告の方法の全ての本質的に後に、この細胞集団は、代表的には、樹状細胞前駆体の分化もしくは維持、および／または樹状細胞の増殖（ｅｘｐａｎｓｉｏｎ）のためにエキソビボまたはインビボで培養される。簡単に言うと、単球樹状細胞前駆体のエキソビボ分化は、細胞成長因子（例えば、サイトカイン）の組み合わせの存在下で樹状細胞前駆体が富化した混合細胞集団を培養することを包含した。例えば、単球樹状細胞前駆体は、抗原取り込み、抗原プロセシング、および／または抗原提示に最適な状態へこの細胞を分化させるために、例えば、インターロイキン４（ＩＬ－４）、インターロイキン１５（ＩＬ－１５）、インターロイキン１３（ＩＬ－１３）、インターフェロンα（ＩＦＮ－α）などのいずれかから選択される少なくと

も１つの他のサイトカインと組み合わせて顆粒球／単球コロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）を必要とする。非単球樹状細胞前駆体（例えば、単球および他の非樹状前駆細胞の除去（プラスチック表面への吸着）またはＣＤ３４$^{+}$細胞の選択によって得られたもの）由来の樹状細胞の数はまた、特定のサイトカインの存在下での培養によって増加した。ＧＭ－ＣＳＦ単独、またはＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の組み合わせのいずれかは、治療用途のために、このような増殖性樹状細胞前駆体由来の樹状細胞集団を産生する方法に使用されてきた。

【００１０】

しかし、このようなエキソビボ分化、維持および／または増殖の有効性は、樹状細胞および樹状細胞前駆体で富化された出発集団の性質によって制限されてきた。いくつかの培養条件下では、好中球、マクロファージおよびリンパ球、またはこれらの組み合わせでひどく夾雑される樹状細胞および樹状細胞前駆体の集団は、後者の細胞に取って代わられ得、樹状細胞の低い収率をもたらす。多くの好中球、マクロファージおよびリンパ球、またはこれらの組み合わせを含む樹状細胞の培養物は、免疫賦活性調製物としての使用にあまり適切ではない。

【００１１】

未熟樹状細胞または成熟樹状細胞は、一旦得られると、代表的には、標的抗原および成熟抗原に曝露され、活性化成熟樹状細胞を提供した。一般的に、この抗原は、適切な培養条件下で未熟樹状細胞または成熟樹状細胞が富化された細胞集団に添加された。未熟樹状細胞の場合、この細胞は、次いで、この抗原を取り込んでプロセシングするのに十分な時間を置かれ、そしてＭＨＣ　Ｉ型マーカーまたはＭＨＣ　ＩＩ型マーカーのいずれかと結合した細胞表面上で抗原性ペプチドを発現する。抗原は、精製形態、半精製形態（例えば、単離されたタンパク質または融合タンパク質（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ－抗原融合タンパク質）、膜溶解物、リポソーム－タンパク質複合体）で、および他の方法で、上記細胞表面上の未熟樹状細胞に提示され得る。さらに、成熟樹状細胞は抗原を取り込んでプロセシングすることが可能でないので、ＭＨＣ　Ｉ型分子またはＭＨＣ　ＩＩ型分子に結合する抗原性ペプチドは、提示のために成熟樹状細胞に添加され得る。

【００１２】

一旦活性化樹状細胞が得られると、この活性化樹状細胞は患者に投与され、免疫応答を刺激した。活性化樹状細胞は、ボーラス注射、持続注入、移植片からの持続的放出、または当該分野で公知の他の適切な技術によって患者に投与され得る。この活性化樹状細胞はまた、生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤、緩衝剤および／または希釈剤と一緒に同時投与され得る。さらに、活性化樹状細胞は、当業者に周知の方法を使用してエキソビボでＴ細胞（例えば、細胞傷害性Ｔ細胞）を活性化するために使用され得る。次いで、この抗原特異性細胞傷害性Ｔ細胞は、例えば、成長する腫瘍または細菌感染もしくはウイルス感染を処置するために患者に投与され得る。これらの組成物は、例えば、外科的切除、化学療法、放射線療法、およびこれらの組み合わせのような他の治療、ならびに処置される条件に適切な他の治療様式に対して、この組成物だけで使用され得るか、またはアジュバントとして使用され得る。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【００１３】

本発明は、以前の方法と対照的に、単球樹状細胞前駆体が、さらなるサイトカインを含まないＧＭ－ＣＳＦ単独の存在下で抗原をプロセシングおよび提示するのに完全に適格である適切な条件下で未熟樹状細胞に分化され得、そして維持され得ることを見出した。この方法は、活性化されなかった樹状細胞前駆体を含む細胞集団を提供する工程、および、ＧＭ－ＣＳＦが補充され、任意のさらなるサイトカインが補充されない樹状細胞培養培地においてインビボまたはエキソビボで上記細胞を培養する工程を包含する。樹状細胞前駆体の細胞集団を富化するのに代表的に使用される方法は、例えば、マクロファージへの細胞の終末分化を開始する前駆細胞を活性化し得る。他のサイトカイン（例えば、ＩＬ－４

、ＩＬ－１３、ＩＬ－１５またはＴＮＦα）の添加は、細胞の単離関連活性化の効果に対抗した。本発明の方法の実施は、選択抗原の取り込み、プロセシングおよび提示について最適化された状態で未熟樹状細胞を得て維持するための、簡単かつよりコスト効率が良い方法を提供する。

【００１４】

（発明の簡単な要旨）

本発明は、選択抗原の取り込み、プロセシングおよび提示について最適化された状態で、エキソビボまたはインビボで未熟樹状細胞を分化および維持するための方法を提供する。この方法は、非活性化単球樹状細胞前駆体（すなわち、これらの表面上にＧＭ－ＣＳＦレセプターを発現する単球、および他のこのような樹状細胞前駆体）を含む細胞集団を提供する工程、ならびに、付加的なサイトカインの非存在下で、非活性化樹状細胞前駆体と顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子が補充された樹状細胞培養培地とを接触させる工程を包含する。以前の方法と対照的に、さらなるサイトカインは、単離された非活性化単球樹状細胞前駆体由来の樹状細胞の発生のためには必要とされない。

【００１５】

単球樹状前駆細胞の活性化は、例えば、代表的な単離および／もしくは富化プロセスの間または細胞培養の間にこの細胞が接触する固体表面への前駆細胞の接着を阻害または遮断することによって防止され得る。上記固体表面は、エキソビボもしくはインビトロで細胞を獲得または維持するために使用される培養容器（例えば、細胞培養フラスコ、細胞培養ボトルまたは細胞培養バッグ）であり得る。この固体表面はまた、樹状細胞前駆体が富化された細胞集団の調製に使用される容器またはデバイスの任意の表面（例えば、フィルター表面；精製に使用されるビーズ（例えば、磁気、ガラスまたはプラスチックビーズ）；チュービング、培養容器など）であり得る。非活性化単球樹状細胞前駆体の接着の阻害は、細胞培養培地または細胞単離培地への高濃度の動物タンパク質またはヒトタンパク質の添加によるものであり得る。本明細書中で使用される場合、高濃度の動物タンパク質またはヒトタンパク質は、約１ｗ／ｖ％～約１０ｗ／ｖ％のタンパク質を含む。上記動物タンパク質は、この動物タンパク質がこれら自体で細胞を活性化しない限り、アルブミン、血清、血漿、ゼラチン、ポリアミノ酸などを含み得る。上記単球樹状前駆細胞の活性化はまた、細胞培養培地および／または細胞単離培地への金属キレート剤の添加によって遮断または阻害され得る。この金属キレート剤は、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡなどを含み得る。これらの樹状細胞薬剤の添加は、上記培養培地中の二価カチオン性金属の濃度を低下させることによって上記前駆細胞の活性化を最小限化すると考えられる。

【００１６】

上記単球樹状前駆細胞の活性化はまた、低細胞結合活性培養容器中の樹状前駆細胞の単離または富化および培養によって阻止または阻害され得る。この低細胞結合活性培養容器は、代表的には、ポリプロピレン、テフロン（登録商標）、ＰＥＴＥなどのような材料を含む。動物タンパク質またはヒトタンパク質を添加することと同様に、上記固体表面への上記樹状前駆細胞の接着を減少または遮断することは、ＧＭ－ＣＳＦが補充され、さらなるサイトカインが全く補充されない樹状細胞培養培地の存在下で、上記細胞の活性化を阻止し、そして上記細胞の未熟樹状細胞への分化および維持を可能にする。約３７℃未満の温度（例えば、室温）で上記前駆細胞の単離を行うことは、細胞集団中の活性化を受ける単球樹状前駆細胞の割合をさらに減少させる。本発明の方法は、これらの薬剤、材料および／または条件のいずれかもしくは全ての組み合わせを含み得る。本発明の１つの特定の実施形態において、上記樹状細胞培養培地は血清を含まず、そして動物タンパク質（例えば、血清アルブミン）が、上記培養容器の表面に対する樹状細胞前駆体の結合活性を減少させるために添加され、上記単球樹状前駆細胞の活性化を阻止および／または低減する。

【００１７】

代表的には、上記単球樹状前駆細胞を含む細胞集団は、末梢血、白血球搬出産物、アフェレーシス産物、臍帯血、脾臓、リンパ節、胸腺または骨髄から得られる。この細胞集団は、本発明の方法の実施の前後に凍結保存され得る。さらに、上記細胞集団は、クロスフ

ロー（ｔａｎｇｅｎｔｉａｌ　ｆｌｏｗ）濾過、抗体パニング、分画遠心法などによって単球前駆体細胞がさらに濃縮され得る。上記細胞集団がクロスフロー濾過によってさらに濃縮される場合、フィルターは代表的に５．５ミクロンの孔を有し、再循環速度は約１４００ｍｌ／分であり、濾過速度はおおよそは１５ｍｌ／分～約２１ｍｌ／分であり、代表的には１７ｍｌ／分であり、そして濾過時間は約６０分～約９０分である（例えば、ＷＯ２００４／０００４４４（２００３年１２月３１日公開、本明細書中で参考として援用される）を参照のこと）。

【００１８】

本発明の方法によって得られた未熟樹状細胞は、抗原の取り込みおよびプロセシングに十分な時間、目的の選択抗原と接触され得る。一旦プロセシングされると、抗原は樹状細胞の表面上に提示される。さらに、この未熟樹状細胞は、目的の抗原との接触の前、同時または後のいずれかに、樹状細胞熟成剤と接触され得る。この樹状細胞熟成剤は、Ｂａｃｉｌｌｕｓ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ（ＢＣＧ）、リポ多糖類（ＬＰＳ）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦ－α）、インターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）、またはこれらの組み合わせを含み得る。本発明の特定の実施形態において、上記樹状細胞熟成剤は、不活性化ＢＣＧおよびＩＦＮ－γの組み合わせである。本発明の方法において有用な選択抗原としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：腫瘍特異性抗原、腫瘍関連抗原、ウイルス抗原、細菌性抗原、腫瘍細胞、腫瘍細胞から得られた核酸、細菌細胞、ウイルス粒子、抗原を発現する組換え細胞、細胞溶解物、膜調製物、組換え的に産生された抗原、目的の抗原に由来するペプチド、または目的の単離された抗原。任意の段階において（樹状細胞の選択抗原との接触の後、樹状細胞の取り込み、樹状細胞のプロセシングおよび樹状細胞の成熟を含む）、上記細胞は、後での使用のために凍結保存され得る。

【００１９】

（発明の詳細な説明）

本発明は、未熟樹状細胞（ＤＣ）に単球樹状細胞前駆体を分化させるための方法を提供する。活性化されている単球樹状細胞前駆体は、唯一のサイトカインとしてＧＭ－ＣＳＦを補充した樹状細胞培地に接触させられ、未熟樹状細胞としての細胞の分化および維持が誘導され得る。単一のサイトカインの添加を唯一必要とする方法は、使用費用がより安価であり、例えば、マクロファージなどを含む他の細胞型への単球樹状細胞の分化を防止するために他のサイトカインの添加を必要とする以前に使用された方法よりも効率的である。

【００２０】

本発明の方法によって作製される未熟樹状細胞は、より複雑な培養条件を使用し、次いで適切な成熟条件下で樹状細胞成熟因子（例えば、ＢＣＧおよびＩＦＮγ）ならびに必要に応じて、所定の抗原と接触させられ得る、以前の方法によって作製される未熟樹状細胞と、表現型的にも機能的にも類似する。抗原は、成熟する際または成熟する前のいずれかに本発明の未熟樹状細胞と接触させられ得る。

【００２１】

（単球樹状細胞前駆体および未熟樹状細胞）

本明細書中で使用される場合、単球樹状細胞は、それら表面上にＧＭ－ＣＳＦレセプターを有する単球およびＧＭ－ＣＳＦに応答性である他の骨髄性前駆細胞を包含する。これらの細胞は、これらの細胞が常駐する任意の組織、特にリンパ系組織（例えば、脾臓、骨髄、リンパ節、胸腺）から得られ得る。単球樹状細胞前駆体はまた、循環系から単離され得る。末梢血は、単球樹状細胞前駆体の容易に入手可能な供給源である。臍帯血は、単球樹状細胞前駆体の別の供給源である。単球樹状細胞前駆体は、免疫応答が誘発され得る種々の生物から単離され得る。このような生物としては、例えば、ヒト、非ヒト動物（例えば、霊長類、哺乳動物（イヌ、ネコ、マウス、およびラットが挙げられる）、トリ（ニワトリが挙げられる）、およびこれらのトランスジェニック種）が挙げられる。

【００２２】

特定の実施形態において、単球樹状細胞前駆体および／または未熟樹状細胞は、健全な

被験体または免疫刺激を必要とする被験体（例えば、癌患者または細胞性免疫刺激が有益であるか、または所望され得る他の被験体（すなわち、細菌感染、ウイルス感染または寄生生物感染など有する被験体）など）から単離され得る。単球樹状細胞前駆体および／または未熟樹状細胞はまた、未熟樹状細胞への転換、成熟、活性化、そして免疫刺激を必要とするＨＬＡ適合被験体へ投与するために、ＨＬＡ適合した健全な個体から得られ得る。

【００２３】

上記に規定される種々の供給源（血液および骨髄が挙げられる）から非活性化単球樹状細胞前駆体および未熟樹状細胞を単離するための方法は、多くのやり方によって達成され得る。代表的に、細胞集団は、個体から収集され、非活性化単球樹状細胞前駆体について濃縮される。例えば、非活性化単球樹状細胞前駆体を含む細胞の混合集団は、白血球搬出、アフェレーシス、密度遠心分離、差次的な溶解、濾過、抗体パニング、またはバフィーコートの調製によって末梢血から得られ得る。選択した方法は、単球樹状細胞前駆体を活性化してはならない。例えば、前駆体についての細胞集団を濃縮するために抗体パニングを選択する場合、選択した抗体は、例えば、抗体が結合する表面上の分子を架橋することにより生じ得るカルシウムイオンの流入の誘導を介して細胞を活性化してはならない。代表的に、抗体をパニングする場合、マクロファージ、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、Ｔ細胞などを除去する抗体を使用する。抗体はまた、ＣＤ１４を発現する単球様細胞を積極的に選択するために使用され得る。

【００２４】

本発明の一実施形態において、非活性化単球樹状細胞前駆体は、単球樹状細胞前駆体を含む細胞集団の細胞培養容器への密接な接着を防止することによって調製される。密接な接着は、例えば、インビトロまたはエキソビボで樹状細胞前駆体を維持するために使用される培地にブロッキング剤を添加することによって防止され得る。このようなブロッキング剤としては、高濃度のタンパク質（例えば、限定ではないが、動物タンパク質またはヒトタンパク質（例えば、アルブミン、血清、血漿、ゼラチン、ポリアミノ酸など）が挙げられる）が挙げられ得る。特に、ウシ供給源またはヒト供給源由来のアルブミンが、代表的に使用される。代表的に、約１％～約１０％（ｗ／ｖ）濃度のブロッキング剤が使用される。特に、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）は、約１％、２％または５％以下またはそれより高い濃度で使用され得る。それ自体で細胞を活性化しないブロッキング剤を選択しなければならないことに注意するべきである。培地は、単球樹状細胞前駆体を培養するために代表的に使用される任意の培地であり得る（血清を必要としないものを含む）。

【００２５】

本発明の別の実施形態において、金属キレート剤は、培地に添加されて二価カチオン（例えば、カルシウムイオンが挙げられるが、これに限定されない）をキレートすることによって単球樹状細胞の活性化をさらに防止または低下し得る。低接着性または低結合性の培養容器の使用はまた、樹状細胞前駆体の付着または結合のアビディティーを減少して、細胞が活性化されるのを防止し得る。特に好ましい低結合性物質としては、例えば、ポリプロピレン、Ｔｅｆｌｏｎ（登録商標）、ＰＦＴＥなどが挙げられるが、これらに限定されない。金属キレート剤は、上記のブロッキング剤と組み合わせて使用され得る。

【００２６】

単球樹状細胞前駆体および未熟樹状細胞はまた、密閉で無菌的な系において調製され得る。本明細書中で使用される場合、用語「密閉かつ無菌的な系」または「密閉系」とは、非滅菌の空気、周囲の空気、もしくは循環する空気への暴露、または他の非滅菌状態が、最小化されるか、または排除される系を言う。樹状細胞前駆体および未熟樹状細胞を単離するための密閉系は、概して、上部が開放したチューブにおける密度勾配遠心分離、細胞の外気での移動、組織培養プレートまたは非密封フラスコでの細胞培養などを除外する。代表的な実施形態において、密閉系は、非滅菌空気への暴露なしで最初の収集容器から密閉可能な組織培養容器への樹状細胞前駆体および未熟樹状細胞の無菌的移動を可能とする。

【００２７】

特定の実施形態において、非活性化単球樹状細胞前駆体は、ＷＯ０３／０１０２９２（この開示は、本明細書中で参考として援用される）において開示されるような単球結合性基質への部分的接着によって単離される。例えば、（例えば、白血球搬出（ｌｅｕｋｏｐｈｅｒｅｓｉｓ）によって単離される）白血球の集団は、非特異的結合を防止し、そして単球樹状細胞前駆細胞のアビディティーを減少するブロッキング剤の存在下で、単球樹状細胞前駆体が接着する基質（例えば、ガラスコーティングされたマイクロキャリアビーズ）と接触させられ得る。白血球の集団が基質と接触させられる場合、白血球集団における単球樹状細胞前駆体は、好ましくは、この基質にゆるく接着する。他の白血球（他の潜在的樹状細胞前駆体を含む）（例えば、増殖性の樹状細胞前駆体など）は、この基質への結合親和性の減少を示し、それにより単球樹状細胞前駆体の一部がこの基質表面へ優先的に濃縮されることを可能とする。ゆるい接着は、単球の樹状細胞前駆体を活性化しない。細胞結合および非接着細胞の溶離の後、単球樹状細胞前駆体のサブセットは、無毒性のキレート剤が補充され得る緩衝化食塩水によってこの基質から溶離される。「無毒性のキレート剤」により、単球樹状細胞前駆体の生存度を実質的に減少しないキレート剤（例えば、ＥＤＴＡ、ＥＧＴＡなどであるが、これらに限定されない）が意図される。

【００２８】

適切な基質としては、例えば、体積比に対して大きい表面領域を有する基質（例えば、ガラスビーズまたはガラスコーティングされたマイクロキャリア）が挙げられる。このような基質は、例えば、粒子性基質または繊維性基質であり得る。適切な粒子性基質としては、例えば、ガラス粒子、ガラスコーティングされたプラスチック粒子、ガラスコーティングされたポリスチレン粒子、およびタンパク質吸着に適した他のビーズが挙げられる。適切な繊維性基質としては、ガラス製マイクロキャピラリーチューブおよび微絨毛膜またはガラスコーティングされたマイクロキャピラリーチューブおよび微絨毛膜が挙げられる。粒子性または繊維性の基質は、通常、接着細胞の生存度を実質的に減少することなく接着された単球樹状細胞前駆体が溶離されることを可能とする。粒子性または繊維性の基質は、実施的に非多孔性であって基質からの単球樹状細胞前駆体または樹状細胞の溶離を容易にし得る。「実質的に非多孔性」の基質は、少なくとも、基質に存在する孔の大部分が細胞よりも小さく、基質内への細胞の取り込みを最小化する基質である。

【００２９】

活性化なしでの基質への単球樹状細胞前駆体の接着は、必要に応じて、結合培地の添加によって調節され得る。適切な結合培地としては、例えば、サイトカイン（例えば、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＦＳ））、血漿、血清（例えば、自己血清または同種異系間血清のようなヒト血清）、精製タンパク質（例えば、血清アルブミン）、二価カチオン（例えば、カルシウムイオンおよび／またはマグネシウムイオン）ならびに基質への単球樹状細胞前駆体の特異的接着に役立つか、または基質への非単球樹状細胞前駆体の接着を防止する他の分子が個々にまたは任意の組み合わせで補充された単球樹状細胞前駆体培地（例えば、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）、ＲＰＭＩ　１６４０、ＤＭＥＭ、Ｘ－ＶＩＶＯ　１５（登録商標）など）が挙げられる。特定の実施形態において、血漿または血清は、熱で不活化され得る。熱不活化血漿は、白血球に対して自己または異種であり得る。

【００３０】

血液成分のサンプルから単球樹状細胞前駆体について細胞集団を濃縮するための別の方法において、細胞細片、赤血球および血液サンプル中の他の細胞および粒子からの白血球の接線フロー濾過を提供する。このデバイスおよびその使用の説明は、ＷＯ２００４／０００４４４（この全体が、本明細書中で参考として援用される）に記載される。この方法は、以下を包含する：（１）接線フロー濾過（ＴＦＦ）単位に血液サンプルを導入する工程（ＴＦＦ単位は、クロスフローチャンバーと、濾過チャンバーと、クロスフローチャンバーおよび濾過チャンバーを流体連結しているフィルターとを備え、このフィルターは、約１～約１０ミクロン（代表的に５．５ミクロン）の孔サイズを有する）；（２）所定投入速度（代表的に、約１４００ｍｌ／分）および所定濾過速度（代表的に、約１５ｍｌ／

分～約２１ｍｌ／分、より代表的には、１７ｍｌ／分）（所定濾過速度の少なくとも５倍の所定投入速度）における、ＴＴＦ単位を介したサンプルの再循環；ここで、所定濾過速度は、フィルターに対して対向しない濾過速度よりも小さい；および（３）白血球について濃縮された細胞集団を単離する工程。代表的に、濾過時間は、約６０～約９０分である。この方法は、実質的に非白血球血液成分（血漿、血小板および赤血球が挙げられる）を含まない濃縮された細胞集団を生じ得る。この方法によって生じた濃縮細胞集団は、少なくとも約５０％の活性化されていない単球樹状細胞前駆体および好ましくは少なくとも約７０％の活性化されていない単球樹状細胞前駆体を含み得る。この方法はさらに、被験体から血液を収集する工程および接線フロー濾過する前に、白血球搬出、密度遠心分離、差次的な溶解、濾過、またはバフィーコート調製によって血液からサンプルを調製する工程を包含し得る。室温またはそれ未満（３７℃未満）で単球ＤＣ前駆体のＴＦＦ精製を実行する工程は、細胞の活性化を減少するのにさらに役立つ。

【００３１】

非活性化単球樹状細胞前駆体について濃縮される細胞集団は、分化、成熟および／または増殖のためにエキソビボまたはインビトロで培養される。（本明細書中で使用される場合、単離された、未熟樹状細胞、樹状細胞前駆体、Ｔ細胞、および他の細胞とは、人の手によって、細胞の天然環境以外で存在し、従って天然物ではない細胞をいう。単離された細胞は、精製形態、半精製（ｓｅｍｉ－ｐｕｒｉｆｉｅｄ）形態、または非天然環境で存在し得る。）簡単には、エキソビボ分化は、代表的に、１つ以上の分化剤の存在下で、非活性化樹状細胞前駆体、または非活性化樹状細胞前駆体を含む細胞集団を培養する工程を包含する。特に、本発明の分化剤は、他のサイトカインを添加せずに、特にインターロイキン４（ＩＬ－４）を使用せずに、単独使用される顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）である。特定の実施形態において、非活性化単球樹状細胞前駆体は、分化させられて、末梢血の単核細胞の集団において相当の数のＴ細胞の活性化および増殖を誘導し得る単球由来の未熟樹状細胞を形成する。

【００３２】

樹状細胞前駆体は、適切な培養条件で未熟樹状細胞前駆体として分化させられ得、そして維持され得る。適切な組織培地としては、ＧＭ－ＣＳＦが補充された、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）、ＲＰＭＩ　１６４０、ＤＭＥＭ、Ｘ－ＶＩＶＯ　１５（登録商標）などが挙げられる。この組織培地には、血清、アミノ酸、ビタミン、二価カチオンなどが補充されて、樹状細胞への細胞の分化を促進し得る。特定の実施形態において、樹状細胞前駆体は、血清なしの培地で培養され得る。このような培養条件は、必要に応じて、任意の動物由来の生成物を除外し得る。代表的に、ＧＭ－ＣＳＦは、約１００～約１０００単位／ｍｌ、または代表的には５００単位／ｍｌのＧＭ－ＣＳＦ濃度で培地に添加される。樹状細胞前駆体は、未熟樹状細胞を形成するために分化される場合、未熟単球樹状細胞に見られる細胞表面タンパク質の代表的な発現パターンを示し、例えば、この細胞は、代表的にＣＤ１４$^{-}$およびＣＤ１１ｃ$^{+}$、ＣＤ８３$^{-}$であり、低レベルのＣＤ８６を発現する。さらに、未熟樹状細胞は、特殊化された取り込み機構を介して可溶性抗原を捕獲し得る。

【００３３】

未熟樹状細胞は、成熟させられて、成熟樹状細胞を形成し得る。成熟ＤＣは、抗原取り込み能力をゆるめ、この細胞は、同時刺激性細胞表面分子の発現のアップレギュレーションを示し、種々のサイトカインを分泌する。詳細には、成熟ＤＣは、より高レベルのＭＨＣクラスＩ抗原およびＭＨＣクラスＩＩ抗原を発現し、概して、ＣＤ８０$^{+}$、ＣＤ８３$^{+}$、およびＣＤ８６$^{+}$として同定される。より高いＭＨＣ発現は、ＤＣ表面上の抗原密度に増加をもたらし、一方、同時刺激分子であるＣＤ８０およびＣＤ８６のアップレギュレーションは、同時刺激分子の対応物（例えば、Ｔ細胞上のＣＤ２８）を介したＴ細胞活性化シグナルを強化する。

【００３４】

ＧＭ－ＣＳＦ単独での存在下で培養された未熟樹状細胞を有効な量または濃度の樹状細胞成熟剤と接触させることによって、成熟樹状細胞が調製（すなわち、成熟）され得る。

樹状細胞成熟剤としては、例えば、ＢＣＧ、ＩＦＮγ、ＬＰＳ、ＴＮＦαなどが挙げられ得る。有効量のＢＣＧは、代表的に、約10^5～10^7ｃｆｕ／組織培地ｍｌの範囲である。有効量のＩＦＮγは、代表的に、１００～１０００Ｕ／組織培地ｍｌの範囲である。Ｂａｃｉｌｌｕｓ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｉｎ（ＢＣＧ）は、Ｍ．ｂｏｖｉｓの非病原性株である。本明細書中で使用される場合、ＢＣＧとは、ＢＣＧ全体および細胞壁構成成分、ＢＣＧ由来のリポアラビドマンナン（ｌｉｐｏａｒａｂｉｄｏｍａｎｎａｎ）、および２型免疫応答の誘導と関連する他のＢＣＧ構成成分を言う。ＢＣＧは、必要に応じて、不活化される（例えば、熱不活化ＢＣＧ、ホルマリン処理ＢＣＧなど）。

【００３５】

未熟ＤＣは、代表的に、約１時間～約４８時間、有効量のＢＣＧおよびＩＦＮγと接触させられる。未熟樹状細胞は、培養され得、適切な成熟培養条件で成熟され得る。適切な組織培地としては、ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）、ＲＰＭＩ　１６４０、ＤＭＥＭ、Ｘ－ＶＩＶＯ　１５（登録商標）などが挙げられる。この組織培地は、アミノ酸、ビタミン、サイトカイン（例えば、ＧＭ－ＣＳＦ）、二価カチオンなどが補充されて、細胞の成熟を促進し得る。代表的に、約５００単位／ｍｌのＧＭ－ＣＳＦが使用される。

【００３６】

樹状細胞の成熟は、樹状細胞の分野で公知の方法でモニターされ得る。細胞表面マーカーは、当該分野で慣例的なアッセイ（例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学など）で検出され得る。この細胞はまた、（例えば、ＥＬＩＳＡ、別の免疫アッセイ、またはオリゴヌクレオチドアレイの使用によって）サイトカイン産生についてモニターされ得る。本発明の成熟ＤＣはまた、抗原の取り込み能力をゆるめ、これは、当業者で慣例的な取り込みアッセイによって分析され得る。

【００３７】

（抗原）

本発明の方法によって調製された、成熟しプライムした樹状細胞は、Ｔ細胞に抗原を提示し得る。成熟しプライムした樹状細胞は、成熟する前または成熟する際のいずれかに未熟樹状細胞を所定の抗原と接触させることによって形成され得る。

【００３８】

本発明における使用のための適切な所定の抗原としては、Ｔ細胞活性化が所望される任意の抗原が挙げられ得る。このような抗原としては、例えば、細菌細胞、または細菌抗原を含む他の調製物、腫瘍特異的抗原または腫瘍関連抗原（例えば、腫瘍細胞全体もしくは癌細胞全体、腫瘍細胞溶解物、腫瘍細胞膜調製物、腫瘍から単離または部分的に単離された抗原、融合タンパク質、リポソームなど）、ウイルス粒子またはウイルス抗原を含む他の調製物、および任意の他の抗原または抗原のフラグメント（例えば、ペプチドまたはポリペプチド抗原）が挙げられ得る。特定の実施形態において、抗原は、前立腺癌と関連し得、例えば、この抗原は、前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ）、前立腺酸性ホスファターゼ（ＰＡＰ）、または前立腺特異的抗原（ＰＳＡ）であり得るが、これらに限定されない。（例えば、Ｐｅｐｓｉｄｅｒｏら，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．４０：２４２８－３２（１９８０）；ＭｃＣｏｒｍａｃｋら，Ｕｒｏｌｏｇｙ　４５：７２９－４４（１９９５）を参照のこと。）抗原はまた、細菌細胞、細菌溶解物、細胞性溶解物由来の膜フラグメント、または当該分野で公知の任意の供給源であり得る。抗原は、発現もしくは組換え的に産生され得るか、またはさらに化学的に合成され得る。この組換え抗原はまた、宿主細胞の表面上に発現され得るか（例えば、細菌、酵母、昆虫、脊椎動物細胞または哺乳動物細胞）、溶解物中に存在し得るか、または溶解物から精製され得る。あるいは、上記の抗原は、リボ核酸（ＲＮＡ）またはデオキシリボ核酸（ＤＮＡ）であり得る核酸（これらは、腫瘍細胞から精製または増幅される）によってコードされ得る。

【００３９】

抗原はまた、被験体由来のサンプル中に存在し得る。例えば、高増殖性または他の状態の被験体由来の組織サンプルは、抗原の供給源として使用され得る。このようなサンプルは、例えば、生検または外科的切除によって得られ得る。このような抗原は、溶解物、ま

たは単離された調製物として使用され得る。あるいは、被験体（例えば、癌患者）由来の細胞または樹立細胞の膜調製物もまた、抗原、または抗原もしくは抗原をコードする核酸の供給源として使用され得る。

【００４０】

例示的な実施形態において、外科的試料から得られた腫瘍細胞溶解物が、抗原の供給源として使用され得る。例えば、生検または外科的切除で得られた、癌患者が保有する腫瘍のサンプルは、樹状細胞への抗原を提示するために直接使用され得るか、または抗原提示のための細胞溶解物または核酸を提供するために直接使用され得る。あるいは、癌患者の腫瘍細胞の膜調製物が、使用され得る。腫瘍細胞は、例えば、前立腺、肺、卵巣、結腸、脳、黒色腫、または腫瘍細胞の任意の他の型であり得る。溶解物および膜調製物は、当該分野で公知の方法によって、単離された腫瘍細胞から調製され得る。

【００４１】

別の例示的な実施形態において、精製されたかまたは半精製された前立腺特異的膜抗原（ＰＳＭＡ、ＰＳＭ抗原としてもまた公知）（これらは、特異的にモノクローナル抗体７Ｅ１１－Ｃ．５と反応する）は、抗原として使用され得る。（概して、Ｈｏｒｏｓｚｅｗｉｃｚら，Ｐｒｏｇ．Ｃｌｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｒｅｓ．３７：１１５－３２（１９８３），米国特許第５，１６２，５０４号；同第５，７８８，９６３号；Ｆｅｎｇら，Ｐｒｏｃ．Ａｍ．Ａｓｓｏｃ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．３２：（Ａｂｓ．１４１８）２３８（１９９１）（これらの開示は、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。）なお別の例示的な実施形態において、アミノ酸残基配列Ｌｅｕ Ｌｅｕ Ｈｉｓ Ｇｌｕ Ｔｈｒ Ａｓｐ Ｓｅｒ Ａｌａ Ｖａｌ（配列番号１）（ＰＳＭ－Ｐ１と命名）（これは、ＰＳＭＡのアミノ酸残基４～１２に対応する）を有する抗原性ペプチドは、抗原として使用され得る。あるいは、アミノ酸残基配列Ａｌａ Ｌｅｕ Ｐｈｅ Ａｓｐ Ｉｌｅ Ｇｌｕ Ｓｅｒ Ｌｙｓ Ｖａｌ（配列番号２）（ＰＳＭ－Ｐ２と命名）（これは、ＰＳＭＡのアミノ酸残基７１１～７１９に対応する）を有する抗原性ペプチドは、抗原として使用され得る。

【００４２】

特定の実施形態において、アミノ酸残基配列Ｘａａ Ｌｅｕ（またはＭｅｔ）Ｘａａ Ｘａａ Ｘａａ Ｘａａ Ｘａａ Ｘａａ Ｖａｌ（またはＬｅｕ）（ＰＳＭ－ＰＸと命名）を有する抗原性ペプチド（ここでＸａａは、任意のアミノ酸残基を表す）は、抗原として使用され得る。このペプチドは、ＨＬＡ－Ａ０２０１結合モチーフ（すなわち、ＨＬＡ－Ａ２患者に見出される「アンカー残基（ａｎｃｈｏｒ ｒｅｓｉｄｕｅ）」、ロイシンおよびバリンを有する９～１０アミノ酸残基の結合モチーフ）に類似する。（例えば、Ｇｒｅｙら，Ｃａｎｃｅｒ Ｓｕｒｖｅｙｓ ２２：３７－４９（１９９５）を参照のこと。）このペプチドは、ＨＬＡ－Ａ２$^{+}$患者のための抗原として使用され得る（Ｃｅｎｔｒａｌ Ｄａｔａ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ「Ａｌｌｅｌｅ Ｆｒｅｑｕｅｎｃｉｅｓ」，第６．３章，Ｔｓｕｊｉ，Ｋ．ら（編），Ｔｏｋｙｏ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，ｐｐ．１０６６－１０７７を参照のこと）。同様に、他のＨＬＡ結合性モチーフに類似するペプチドが、使用され得る。

【００４３】

代表的に、本発明の方法によって得られる未熟樹状細胞は、樹状細胞成熟剤（例えば、ＢＣＧ、ＩＦＮγ、ＬＰＳ、ＴＮＦα、またはこれらの組合わせ、および上記のような所定の抗原）の存在下で適切な成熟条件下で培養される。必要に応じて、未熟樹状細胞は、ＧＭ－ＣＳＦ、および／または成熟剤を含むかまたは含まない代表的な樹状細胞培地中で、所定の抗原と混合され得る。抗原と培養して少なくとも１０分後～約２日後、この抗原は、除去され、ＢＣＧおよびＩＦＮγが補充された培地が添加され得る。ＧＭ－ＣＳＦはまた、さらなるサイトカイン（例えば、ＩＬ－４）を含まない成熟培地に添加され得る。樹状細胞を抗原と接触させるための方法は、概して当該分野で公知である。（概して、ＳｔｅｅｌおよびＮｕｔｍａｎ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６０：３５１－６０（１９９８）；Ｔａｏら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５８：４２３７－４４（１９９７）；Ｄｏｚｍｏｒ

ｏｖおよびＭｉｌｌｅｒ，Ｃｅｌｌ Ｉｍｍｕｎｏｌ．１７８：１８７－９６（１９９７）；Ｉｎａｂａら，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１６６：１８２－９４（１９８７）；Ｍａｃａｔｏｎｉａら，Ｊ Ｅｘｐ Ｍｅｄ．１６９：１２５５－６４（１９８９）；Ｄｅ Ｂｒｕｉｊｎら，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２：３０１３－２０（１９９２）（これらの開示は、本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。）

結果として生じる成熟したプライムされた樹状細胞は、次いで、Ｔ細胞（例えば、ナイーブＴ細胞）と一緒に共インキュベートされる。Ｔ細胞、またはＴ細胞のサブセットは、応答細胞として用いる種々のリンパ系組織から得られ得る。このような組織としては、脾臓、リンパ節、および／または末梢血液が挙げられるが、これらに限定されない。これらの細胞は、成熟したプライムされた樹状細胞と一緒に、混合されたＴ細胞集団としてか、または精製Ｔ細胞サブセットとして共培養され得る。Ｔ細胞精製は、正の選択または負の選択（ＣＤ２、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ８などに指向する抗体の使用が挙げられるが、これらに限定されない）によって達成され得る。

【００４４】

Ｔ細胞を成熟したプライムされた樹状細胞と接触させることによって、抗原反応性Ｔ細胞もしくは活性化され分極した（ｐｏｌａｒｉｚｅｄ）Ｔ細胞またはＴリンパ球が提供される。本明細書で使用される場合、用語「分極した（ｐｏｌａｒｉｚｅｄ）」は、高いレベルのＩＦＮγを生成するか、またはさもなければ１型（Ｔｈ－１）反応についてプライムされるＴ細胞をいう。このような方法は、代表的に、樹状細胞をＢＣＧおよびＩＦＮγに接触させて、成熟したプライムされた樹状細胞を調製する工程を包含する。未熟樹状細胞は、成熟の間かまたは前に、所定の抗原と接触され得る。未熟樹状細胞は、成熟の間、Ｔ細胞（例えば、ナイーブＴ細胞）と共に共培養され得るか、または成熟して１型反応を誘導するために樹状細胞をプライムした後に、Ｔ細胞（例えば、ナイーブＴ細胞）と共に共培養され得る。さらに、未熟樹状細胞または成熟した樹状細胞は、成熟の前に部分的に精製され得るか、または濃縮され得る。加えて、Ｔ細胞は、樹状細胞と接触させる前にリンパ球の集団から濃縮され得る。特定の実施形態において、ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞の濃縮集団または精製集団は、成熟したプライムされた樹状細胞と接触される。成熟したプライムされた樹状細胞をＴ細胞と共培養する工程は、抗原反応性ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞または抗原反応性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞へ成熟する特定のＴ細胞の刺激の原因となる。

【００４５】

別の局面において、未熟樹状細胞の存在下か、または１型（Ｔｈ－１）Ｔ細胞反応の誘導に対してプライムされた成熟した樹状細胞の存在下で細胞を培養することによるインビトロでのＴ細胞の再刺激のための方法が、提供される。このようなＴ細胞は、必要に応じて、支持細胞上で培養され得る。未熟樹状細胞または成熟したプライムされた樹状細胞は、必要に応じてＴ細胞との接触の前に照射され得る。適切な培養条件は、１以上のサイトカイン（例えば、精製ＩＬ－２、コンカナバリンＡで刺激した脾臓細胞上清、インターロイキン１５（ＩＬ－１５）など、およびこれらの組み合わせ）を含み得る。このようなＴ細胞のインビトロでの再刺激は、Ｔ細胞集団の増殖を促進するために使用され得る。

【００４６】

安定した抗原特異的な分極したＴ細胞培養物またはＴ細胞株は、定期的な再刺激によって、長期間インビトロで維持され得る。Ｔ細胞培養物またはこのように作製されるＴ細胞株は、保管され得、そして保存される場合（例えば、低温保存法および冷凍との処方による）、長期間の使用のための所望される間隔において活性化した分極したＴ細胞を再供給するために使用される。

【００４７】

特定の実施形態において、活性化ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞または活性化ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞は、本発明の方法に従って作製され得る。代表的には、抗原反応性の分極したＴ細胞を作製するために使用される成熟したプライムされた樹状細胞は、投与されるべき被験体と同系である（例えば、被験体から得られる）。あるいは、レシピエント被験体を意図されるものと同じＨＬＡハプロタイプを有する樹状細胞は、ＨＬＡ適合ドナーに由来する非癌細胞（例え

ば、正常細胞）を使用してインビトロで調製され得る。特定の実施形態において、抗原反応性Ｔ細胞（ＣＴＬ細胞およびＴｈ－１細胞を含む）は、処理のための細胞の供給源としてインビトロで増殖される。

【００４８】

本発明のさらに別の局面に従って、非活性な単球由来樹状細胞前駆細胞、未熟樹状細胞、および成熟したプライムされた樹状細胞は、例えば、低温保存法によって保存され得る。各集団は、本明細書中で記載されるプロセスを続ける前に、回収され得る。例えば、単球由来樹状細胞前駆細胞は、未熟樹状細胞を形成し、維持するための接着遮断剤およびＧＭ－ＣＳＦが存在する樹状細胞培養培地での培養の前に、白血球搬出またはアフェレーシス生成物の形で患者から得られ得る。未熟樹状細胞の調製に続いて、これらの細胞は、抗原に曝露されて成熟する前または処置される個体に投与される前のどちらかに凍結保存され得る。使用され得る低温保存剤としては、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、グリセロール、ポリビニルピロリドン、ポリエチルグリコール、アルブミン、デキストラン、スクロース、エチレングリコール、ｉ－エリトリトール、Ｄ－リビトール、Ｄ－マンニトール、Ｄ－ソルビトール、ｉ－イノシトール、Ｄ－ラクトース、塩化コリン、アミノ酸、メタノール、アセトアミド、グリセロールモノアセテート、および無機塩が挙げられるが、これらに限定されない。異なる低温保存剤および異なる細胞型は、代表的に異なる最適冷却速度を有する。水が氷に変わる融解相の熱は、代表的には最小であるべきである。冷却手順は、例えば、プログラム可能な凍結デバイスまたはメタノールバスの手順の使用によって実施され得る。プログラム可能な凍結装置は、最適な冷却速度の決定を可能にし、標準的な再現可能な冷却を容易にする。プログラム可能な制御速度のフリーザー（例えば、ＣｒｙｏｍｅｄまたはＰｌａｎａｒ）は、凍結レジメンを所望の冷却速度曲線に変えることを可能にする。

【００４９】

完全に凍結した後、樹状細胞は、長期の極低温保管容器に迅速に移され得る。代表的な実施形態において、サンプルは、液体窒素（－１９６℃）またはその蒸気（－１６５℃）中で極低温で保管され得る。造血幹細胞（特に、骨髄または末梢血由来）の操作、低温保存、および長期貯蔵についての考察および手順は、本発明の非活性化樹状細胞に広く適用可能である。造血幹細胞のための低温保存法の考察は、例えば、以下の参考文献において見出され得、これらは本明細書中に参考として援用される：Ｔａｙｌｏｒら，Ｃｒｙｏｂｉｏｌｏｇｙ ２７：２６９－７８（１９９０）；Ｇｏｒｉｎ，Ｃｌｉｎｉｃｓ ｉｎ Ｈａｅｍａｔｏｌｏｇｙ １５：１９－４８（１９８６）；Ｂｏｎｅ－Ｍａｒｒｏｗ Ｃｏｎｓｅｒｖａｔｉｏｎ，Ｃｕｌｔｕｒｅ ａｎｄ Ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ，Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ ａ Ｐａｎｅｌ，Ｍｏｓｃｏｗ，Ｊｕｌ．２２－２６，１９６８，Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ａｔｏｍｉｃ Ｅｎｅｒｇｙ Ａｇｅｎｃｙ，Ｖｉｅｎｎａ，ｐｐ．１０７－１８６。

【００５０】

凍結細胞は、代表的に素早く解凍され（例えば、３７℃～４１℃で維持されるウォーターバスにおいて）、解凍後即座に冷やされる。解凍時に細胞の凝集を阻害するために、細胞を処理することが所望され得る。凝集を阻害するために、種々の手順が使用され得る。これらの手順としては、凍結の前および／または後の、ＤＮａｓｅの添加（Ｓｐｉｔｚｅｒら，Ｃａｎｃｅｒ ４５：３０７５－８５（１９８０））、低分子量デキストランおよびシトレート、ヒドロキシエチルスターチ（Ｓｔｉｆｆら，Ｃｒｙｏｂｉｏｌｏｇｙ ２０：１７－２４（１９８３））の添加などが挙げられるが、これらに限定されない。この低温保存剤は、ヒトにおいて毒性である場合、解凍した低接着性樹状細胞の治療的使用の前に除去されるべきである。低保存剤を除去する１つの方法は、問題にならない濃度まで希釈することによる。一度、凍結したＤＣが解凍され正常な状態に戻ると、ＤＣは、非凍結ＤＣに関して本明細書中に記載されるようにＴ細胞を活性化するために使用され得る。

【００５１】

（細胞集団のインビトロ投与）

本発明の別の局面において、成熟したプライムされた樹状細胞もしくは活性化された分極したＴ細胞、またはこのような細胞を含む細胞集団を、免疫活性化を必要とする被験体に投与するための方法が提供される。このような細胞集団としては、未熟樹状細胞、部分的に成熟した樹状細胞、成熟したプライムされた樹状細胞集団および／または活性化された分極したＴ細胞集団が挙げられ得る。特定の実施形態において、本方法は、非活性化樹状細胞前駆体細胞または未熟樹状細胞を得ること、これらの細胞を、付加的なサイトカインの非存在下でＧＭ－ＣＳＦを用いて分化すること、およびこれらの細胞を成熟剤（例えば、ＢＣＧ、ならびに／またはＩＦＮγおよびＴｈ－１反応に対してプライムされた成熟した樹状細胞集団を形成するための所定の抗原）の存在下において成熟することによって行われる。これらの未熟樹状細胞は、成熟の前かまたは成熟の間に抗原と接触され得る。このような成熟したプライムされた樹状細胞は、免疫活性化を必要とする被験体に直接的に投与され得る。

【００５２】

関連する実施形態において、この成熟したプライムされた樹状細胞は、被験体由来のリンパ球と接触され、リンパ球集団の中のＴ細胞を刺激し得る。活性化された分極したリンパ球は、必要に応じて抗原反応性ＣＤ４$^{+}$Ｔ細胞および／または抗原反応性ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞の細胞培養におけるクローン増殖が続き、免疫活性化を必要とする被験体に投与され得る。特定の実施形態において、活性化された分極したＴ細胞は、被験体に対して自己由来である。

【００５３】

別の実施形態において、樹状細胞、Ｔ細胞、およびレシピエント被験体は、同じＭＨＣ（ＨＬＡ）ハプロタイプを有する。被験体のＨＬＡハプロタイプを決定する方法は、当該分野で公知である。関連する実施形態において、樹状細胞および／またはＴ細胞は、レシピエント被験体と同種異系である。例えば、樹状細胞は、Ｔ細胞およびレシピエントと同種異系であり得、同じＭＨＣ（ＨＬＡ）ハプロタイプを有する。この同種異系細胞は、代表的には、少なくとも１つのＭＨＣ対立遺伝子と適合される（例えば、少なくとも１つのＭＨＣ対立遺伝子を共有するが、全てのＭＨＣ対立遺伝子を共有するわけではない）。あまり代表的でない実施形態において、樹状細胞、Ｔ細胞およびレシピエント被験体は、互いに対して全て同種異系であるが、全ては共通して少なくとも１つの共通のＭＨＣ対立遺伝子を有する。

【００５４】

１つの実施形態に従って、Ｔ細胞は、未熟樹状細胞が得られた同じ被験体から得られる。インビトロでの成熟および分極の後、自己由来のＴ細胞は、既存の免疫応答を誘発および／または増強するために、被験体に投与される。例えば、Ｔ細胞は、例えば、体表面領域１ｍ^{2}あたり約１０^{8}～１０^{9}細胞の用量において静脈内注入によって投与され得る（例えば、本明細書中に参考として援用されるＲｉｄｅｌｌら，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５７：２３８－４１（１９９２）を参照のこと）。注入は、所望されるの間隔（例えば、月１回）で繰り返され得る。レシピエントは、Ｔ細胞注入の間および後に、副作用のいずれかの徴候についてモニタリングされ得る。

【００５５】

別の実施形態に従って、本適用に記載されるプロセスによって得られる樹状細胞は、ＧＭ－ＣＳＦの存在下においてのみ増殖し、ＢＣＧおよびＩＦＮγで成熟する。そして本発明に従って樹状細胞は、腫瘍、腫瘍の周辺領域、または標的抗原を含む他の組織に直接注入され得る。このような成熟した細胞は、抗原を有し得、インビトロでＴ細胞に対して抗原を与え得る。

【００５６】

以下の実施例は、本発明の種々の局面の単なる説明としてのみ提供され、決して本発明を限定すると解釈されるべきではない。

【実施例】

【００５７】

（実施例１）

この実施例において、インビトロでのＧＭ－ＣＳＦ単独の存在下における単球のＣＤ１ａ$^{+}$樹状細胞への分化は、その細胞が培養容器への最初の接着を形成することが可能でないことを必要とすることを実証した。

【００５８】

手短には、ＣＤ１４$^{+}$ＣＤ１ａ$^{-}$単球を、２ｍＭ Ｌグルタミン（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）を添加したＩｓｃｏｖｅ－ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ ｍｅｄｉｕｍ（ＩＭＤＭ，ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）または３％ ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ，Ｂａｙｅｒ）を添加したＸ－ＶＩＶＯ－１５（登録商標）（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）のどちらかの中に再懸濁した。細胞懸濁液をＴ－２５培養フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に移し、６％ CO_2、３７℃のインキュベーターにおいて３０分間インキュベートした。インキュベーションの後、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ，Ｉｍｍｕｎｅｘ）を添加し、最終濃度の３％ ＨＳＡおよび５００単位／ｍｌ ＧＭ－ＣＳＦを達成した。６％ CO_2、３７℃のインキュベーターにおいて、４日間両方の培養物をインキュベートした。ＣＤ１４およびＣＤ１ａの表面発現を、これらの分子に特異的な標識したモノクローナル抗体の使用およびフローサイトメトリーを使用した検出によって、分析した。点から成るヒストグラムは、アイソタイプコントロール（バックグラウンド）の染色を表した（図１）。

【００５９】

細胞（ＨＳＡを含まない培地において最初にインキュベートされた単球）は、位相差顕微鏡によって決定されたように、表面上の細胞を平板化することにより証明されたとおり、プラスチックに対して強い接着を示す一方、ＨＳＡを含む培地においてインキュベートされた細胞は、接着の程度の減少を示した。このことは、位相差顕微鏡によって決定されたように球状の細胞によって証明された。培養の４日後、前者の培養物は、いくらかのＣＤ１４発現を保持し、非常に低いレベルのＣＤ１ａを発現した（図１）。対照的に、培養容器の表面に対して強く接着することが可能でない大部分の細胞は、ＣＤ１４$^{-}$かつＣＤ１ａ$^{+}$特性の未熟樹状細胞であった。

【００６０】

別の実施例において、単球がＴｅｆｌｏｎ（登録商標）培養バッグに対する接着を形成することが可能でない場合に、単球は、インビトロでＧＭ－ＣＳＦ単独の存在下においてＣＤ１ａ$^{+}$樹状細胞に分化することを実証した。

【００６１】

手短には、２人の白血球搬出ドナーに由来する単離した単球を、独立に顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ，Ｉｍｍｕｎｅｘ）およびヒト血清アルブミン（ＨＳＡ，Ｐｌａｓｂｕｍｉｎ^{TM}，Ｂａｙｅｒ）を添加したＸ－ＶＩＶＯ－１５（登録商標）（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）中に再懸濁し、最終濃度５００単位／ｍｌ ＧＭ－ＣＳＦおよび２％ ＨＳＡ（Ｔｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグ中）を達成した。バッグ中の細胞懸濁液を、５日間６％ CO_2、３７℃のインキュベーターに移した。培養期間の終わりにおいて、成熟剤（不活化ＢＣＧ（Ｏｒｇａｎｏｎ－Ｔｅｋｎｉｋａ）の１：４００希釈および５００Ｕ／ｍｌ ＩＦＮ－γ（Ｒ ａｎｄ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ））を培養物に添加した。成熟現象を、４時間進行させた。「生存（ｌｉｖｅ）」細胞について、ＣＤ１４およびＣＤ１ａの表面発現を分析した。これらの分析は、蛍光細胞フロー分析（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｔ ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｃｅｌｌ ｆｌｏｗ ａｎａｌｙｓｉｓ）を使用して、前方散乱光（ＦＳ）および側方散乱光（ＳＳ）ゲートの後に、これらの分子に特異的な標識したモノクローナル抗体を用いて行った（図２Ａおよび図２Ｂ）。アイソタイプのコントロール抗体を、バックグラウンドの蛍光についてのコントロールとして使用した。アイソタイプのコントロール抗体は、ＣＤ１ａに特異的な抗体についてIgG_1であり、ＣＤ１４に特異的な抗体についてIgG_{2b}である。

【００６２】

最初に単離した前駆体細胞は、高いレベルのＣＤ１４を発現し、単球に代表的なＣＤ１

ａは、非常に低いレベルか、または全く発現しなかった（図２Ａおよび図２Ｂ）。対照的に、後の低い接着培養物の大部分の細胞は、樹状細胞に由来する単球であると予測されるＣＤ１４$^{-}$およびＣＤ１ａ$^{+}$であった。

【００６３】

（実施例２）

この実施例において、培養容器の表面に接着することが可能でなかった単球に由来する未熟樹状細胞を、成熟させ、ＩＬ－１２の分泌について試験した。樹状細胞から分泌されたＩＬ－１２の量を、代表的な方法によって単離し、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の存在下で培養した、成熟した樹状細胞と比較した。

【００６４】

手短には、３％　ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ，Ｂａｙｅｒ）の非存在下かまたは存在下において、低温保存した単球を、２ｍＭ　Ｌ－グルタミン（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）を添加したＩｓｃｏｖｅ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ　Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ　ｍｅｄｉａ（ＩＭＤＭ，ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）中に1×10^{6}細胞／ｍｌの濃度において再懸濁した。この細胞懸濁液を、条件あたり２つの組織培養フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に移し、６％　CO_2、３７℃の加湿したインキュベーター中で３０分間培養した。インキュベーション期間の後で、ＨＳＡを添加し、全てのフラスコにおいて最終濃度の３％　ＨＳＡを達成した。顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ，Ｉｍｍｕｎｅｘ）またはＧＭ－ＣＳＦおよびインターロイキン４（ＩＬ－４，Ｒ　＆　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）を、最終濃度の５００単位／ｍｌで各培養条件に添加した。全ての培養物を、６％　CO_2、３７℃の４日間加湿したインキュベーターにおいて、３０分間インキュベートした。培養期間の終わりに、成熟剤（不活化Ｂａｃｉｌｌｕｓ　Ｃａｌｍｅｔｔｅ－Ｇｕｅｒｒｉｎ（ＢＣＧ，Ｏｒｇａｎｏｎ－Ｔｅｋｎｉｋａ）の１：４００希釈および５００Ｕ／ｍｌ　インターフェロンγ（ＩＦＮ－γ，Ｒ　ａｎｄ　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ））をフラスコに添加した。成熟を１８～２４時間進行させた。培養上清を収集し、ＩＬ－１２ｐ７０の分泌についてアッセイした。２つの別々の実験からの結果を比較した。両方の実験において、ＧＭ－ＣＳＦ単独またはＧＭ－ＣＳＦとＩＬ－４とを補充した培養物中で、ＩＬ－１２ｐ７０の分泌を検出した（図３）。加えて、強い最初の接着に供した単球に、ＧＭ－ＣＦＳ単独における培養を続けた。この単球は、両方の実験においてＩＬ－１２ｐ７０の分泌をしなかった。１つの実験において、強い最初の接着に供し、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４の存在下で４日間の培養を続けた培養物において、ＩＬ－１２ｐ７０の分泌を検出した。

【００６５】

（実施例３）

この実施例において、樹状細胞に代表的な細胞表面マーカーの発現を、ＧＭ－ＣＳＦ単独の存在下で培養した非活性化単球においてアッセイした。ＧＭ－ＣＳＦ単独で培養した非活性化単球は、成熟したＤＣに代表的な細胞表面マーカーの発現を実証した。

【００６６】

手短には、Ｘ－ＶＩＶＯ－１５（登録商標）（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）、２％　ヒト血清アルブミン（Ｂａｙｅｒ）、および５００Ｕ／ｍｌ　ＧＭ－ＣＳＦ（Ｉｍｍｕｎｅｘ）を含有するＤＣ培養培地中に、低温保存した単球を1×10^{6}細胞／ｍｌの濃度で再懸濁した。この細胞懸濁液を組織培養フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ）に移し、６％　CO_2、３７℃の加湿したインキュベーターにおいて４日間培養した。培養期間の終わりに、成熟剤（不活化ＢＣＧ（Ｏｒｇａｎｏｎ－Ｔｅｋｎｉｋａ）の１：４００希釈および５００Ｕ／ｍｌ　ＩＦＮ－γ（Ｒ　ａｎｄ　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ））を、フラスコに添加した。成熟現象を１８～２４時間進行させた。成熟させたＤＣを収集し、特徴付けた。ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１ａ、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ５４およびＣＤ８３に特異的な標識したモノクローナル抗体と、これらの細胞を反応させた。加えて、これらの細胞をヨウ化プロピジウムを用いて染色した。フローサイトメトリーによって標識を検出した。これらのデータは、回収した細胞の８０％が生存ＤＣ（ＣＤ１１ｃ$^{+}$かつヨウ化プロピジウム$^{-}$）であることを実証した。加えて、これらの細胞は、代表的なＤＣマーカー（すなわち、

ＣＤ１４発現の欠如ならびにＣＤ１１ｃ、ＣＤ１ａ、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ５４およびＣＤ８３の発現）を発現する（図４）。

【００６７】

（実施例４）

この実施例において、接着遮断剤の存在下で培養した単球由来樹状細胞前駆細胞を、ＧＭ－ＣＳＦ単独を補充した培地におけるインビトロでの樹状細胞への分化の速度論について試験した。

【００６８】

手短には、Ｘ－ＶＩＶＯ－１５（登録商標）（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）、２％ ヒト血清アルブミン（Ｂａｙｅｒ）、および５００Ｕ／ｍｌ ＧＭ－ＣＳＦ（Ｉｍｍｕｎｅｘ）を含むＤＣ培養培地中に、低温保存した単球を1×10^{6}細胞／ｍｌの濃度で再懸濁した。この細胞懸濁液をＴｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグ（Ａｍｅｒｉｃａｌ Ｆｌｕｏｒｏｓｅａｌ）に移し、６％ CO_2、３７℃の加湿したインキュベーターにおいて５日間培養した。５日目に、成熟剤（不活化ＢＣＧ（Ｏｒｇａｎｏｎ－Ｔｅｋｎｉｋａ）の１：４００希釈および５００Ｕ／ｍｌ ＩＦＮ－γ（Ｒ ａｎｄ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ））を、培養バッグに添加した。成熟現象を約１８時間進行させた。ＣＤ１４およびＣＤ１ａの発現のフローサイトメトリー分析（ｆｌｏｗ ｃｙｔｏｍｅｔｒｉｃ ａｎａｌｙｓｅｓ）のために、細胞をバッグから毎日収集した。これらの分析からのデータは、単球（$CD14^{+}$かつ$CD1a^{-}$）からＤＣ（$CD14^{-}$、$CD1a^{+}$）への変換が、培養の開始後１日目と２日目との間に開始することを実証した（図５）。３日目までに、表現型の変換は完了した。

【００６９】

（実施例５）

この実施例において、種々の培養条件下のＴｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグまたはフラスコのどちらかで培養したＤＣの表現型を比較した。ＧＭ－ＣＳＦ単独またはＩＬ－４を補充したＧＭ－ＣＳＦのどちらかにおいて、細胞を増殖させた。成熟剤に曝露したか、または曝露していない細胞の表現型の比較もまた、行った。

【００７０】

手短には、５００Ｕ／ｍｌ ＧＭ－ＣＳＦ単独を補充したＸ－ＶＩＶＯ－１５（登録商標）（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）および２％ ＨＳＡ（Ｂａｙｅｒ）、または５００Ｕ／ｍｌ ＩＬ－４と組み合わせたＧＭ－ＣＳＦ中に、単球を1×10^{6}細胞／ｍｌで再懸濁した。細胞懸濁液（各培養条件について二組のバッグ）を、６％ CO_2、３７℃のインキュベーターにおいてＴｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグ（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｆｌｕｏｒｏｓｅａｌ）、または組織培養フラスコ（ＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ－４の組み合わせのみ）で培養した。５日後に、成熟剤（不活化ＢＣＧ（Ｏｒｇａｎｏｎ－Ｔｅｋｎｉｋａ）の１：４００希釈および５００Ｕ／ｍｌ ＩＦＮ－γ（Ｒ ａｎｄ Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ））を、二組のＴｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグ培養物、およびフラスコ培養物の一方に添加した。６日目に、全ての培養物を収集した。フローサイトメトリーによって検出する、ＣＤ８０、ＣＤ８３、ＣＤ８６およびＨＬＡ－ＤＲに特異的な標識したモノクローナル抗体を用いた染色を使用して、これらの表現型を分析した。

【００７１】

全ての５つの培養条件からのＤＣの大部分は、ＣＤ１ａを発現した（８９～９７％）（図６Ａ）。ＧＭ－ＣＳＦおよびＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ－４培養物の両方において、成熟剤に曝露した培養物においてのみ、ＤＣの成熟マーカー（ＣＤ８３）の顕著な発現を観察した（図６Ｂ）。加えて、これらのＤＣが成熟した時に、共起刺激分子（ＣＤ８０およびＣＤ８６、図６Ｃおよび図６Ｄ）、ならびにＨＬＡ－ＤＲ（図６Ｅ）の表面発現の顕著な増加を観察した。これらの分子の発現のレベルは、全ての３つの成熟したＤＣ集団で類似していた。

【００７２】

加えて、最初の強い接着の工程に供された単球から作製されたＤＣのＴ細胞刺激因子を

、強い接着の非存在下で接着遮断剤の存在下において作製されたＤＣと比較した。この研究において、２つの供給源の単球を開始集団として使用した。強い接着性の単球集団について、組織培養フラスコ（Ｇｒｅｉｎｅｒ）において１時間、末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を１％　熱不活化自己血漿を添加したＯＰＴＩＭＥＭ－１（Ｇｉｂｃｏ　ＢＲＬ）でインキュベートした。インキュベーションの後、非接着性細胞を除き、濃縮した（ｅｎｒｉｃｈｅｄ）接着性活性化単球集団をフラスコの表面上に残した。非活性化単球集団を得るために、ヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）でコートしたガラスマイクロキャリアビーズ（ビーズボックス（ｂｅａｄ　ｂｏｘ））を含むカラムから、単球を得た。

【００７３】

次いでそれぞれの単球の集団（活性化および非活性化）を、ＧＭ－ＣＳＦ単独の存在下かまたはＩＬ－４と組み合わせた２％　ＨＳＡを含むＸ－ＶＩＶＯ－１５（登録商標）で５日間インキュベートした。その結果の未熟ＤＣを、洗浄ならびにＢＣＧ（１：４００希釈）およびＩＦＮ－γ（５００Ｕ／ｍＬ）での成熟の１時間前に、インフルエンザＡＭ１－Ａ４　４０マーペプチドまたはキーホールリンペットヘモシニアン（ＫＬＨ）と共にロードした。成熟したＤＣの収集および洗浄の後、２０ｎｇ／ｍｌ　ＩＬ－２を補充した５％　ヒトＡＢ血清（ＨｕＡＢ　Ｓｅｒａ）を添加したＡＩＭ－Ｖ（登録商標）中で２日目～８日目まで、ＤＣおよび自己ＰＢＭＣとの共培養を１：１０のＤＣ：ＰＢＭＣの比率に設定した。培養の８日後、Ｔ細胞株を収集し、フローサイトメトリーによってＭ１－Ａ４特異的ＣＤ８　Ｔ細胞増殖（Ｖβ１７$^{+}$ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞）について分析した。

【００７４】

ＫＬＨコントロールと比較して、プラスチックへの接着によって作製したＤＣは、インフルエンザ（Ｍ１－Ａ４）特異的反応を引き起こすためにＩＬ－４を必要とした（図７Ａ）。しかし、単球（非活性）を単離したビーズボックスから作製したＤＣは、ＧＭ－ＣＳＦ単独をそれらの作製の間に使用した場合、第二のＣＤ８　Ｔ細胞反応の開始において、最も有効である（図７Ｂ）。

【００７５】

（実施例６）

この実施例において、樹状細胞に代表的な細胞表面マーカーの発現を、クロスフロー濾過（ｔａｎｇｅｎｔｉａｌ　ｆｌｏｗ　ｆｉｌｔｒａｔｉｏｎ）によって濃縮し、ＧＭ－ＣＳＦ単独の存在下で培養した非活性化単球においてアッセイした。ＧＭ－ＣＳＦ単独で培養した樹状細胞は、成熟したＤＣに代表的な細胞表面マーカーの発現を実証した。

【００７６】

手短には、２人の異なる血液ドナーからクロスフロー濾過プロセスを介して、低温保存した単球を前もって単離した。このプロセスは、５．５ミクロンの孔径のフィルターを備えるデバイス中の単球のサンプルのＴＦＦを含んだ。再循環（インプット）速度は約１４００ｍｌ／分であり、濾過速度は約１７ｍｌ／分であり、時間は約９０分であった。Ｘ－ＶＩＶＯ－１５（ＢｉｏＷｈｉｔｔａｋｅｒ）、２％　ヒト血清アルブミン（Ｂａｙｅｒ）、および５００Ｕ／ｍｌ　ＧＭ－ＣＳＦ（Ｉｍｍｕｎｅｘ）を含むＤＣ培養培地で、濃縮した単球由来樹状細胞前駆細胞を、1×10^{6}細胞／ｍｌの濃度において独立に培養した。Ｔｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグ中の細胞懸濁液を、６％　CO_2、３７℃の加湿したインキュベーターにおいて５日間培養した。培養期間の終わりに、成熟剤（不活化ＢＣＧ（Ｏｒｇａｎｏｎ－Ｔｅｋｎｉｋａ）の１：４００希釈および５００Ｕ／ｍｌ　ＩＦＮ－γ（Ｒ　ａｎｄ　Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ））を、これらの培養物に添加した。成熟現象を４時間進行させた。成熟させたＤＣを収集し、特徴付けた。ＣＤ１１ｃ、ＣＤ１ａ、ＣＤ４０、ＣＤ５４、ＣＤ８０、ＣＤ８６およびＣＤ８３に特異的な標識したモノクローナル抗体と、これらの細胞を反応させた。「生存」細胞についてのマーカー発現を、前方散乱光（ＦＳ）および側方散乱光（ＳＳ）ゲートの使用によって分析し、そしてこれらの分子に特異的な標識したモノクローナル抗体およびフローサイトメトリーを使用した検出によって分析した。加えて、細胞をヨウ化プロピジウムを使用して染色した。フローサイトメトリーによって標識を検出した。回収した細胞の８０％を超える細胞は、ＣＤ１１ｃを発

現する単球系統であり、「生存」ＤＣであった（ヨウ化プロピジウム$^{-}$、データは示さず）。注目すべきは、ＩＬ４の非存在下で分化した細胞は、代表的なＤＣマーカーを発現する（すなわち、減少したＣＤ１４発現、ならびにＣＤ１ａ、ＣＤ４０、ＣＤ８０、ＣＤ８６、ＣＤ５４およびＣＤ８３の発現）ことである（図８Ａおよび図８Ｂ）。バックグラウンドの蛍光を、アイソタイプのコントロール抗体を使用して測定した。バックグラウンドの蛍光は、アイソタイプのコントロールがIgG_{2b}抗体であった場合、ＣＤ１４を除きIgG_1であった。

【００７７】

（実施例７）

この実施例において、強い相互作用がヒト血清アルブミン（ＨＳＡ）のような遮断剤の添加によって遮断される場合を除き、プラスチック表面（すなわち、組織培養フラスコ）に曝露された単球が、活性化することを決定した。

【００７８】

３％（ｗ／ｖ）ＨＳＡを含むかまたは含まないＩｓｃｏｖｅ’ｓ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｏｆ Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｅｄｉａ（ＩＭＤＭ）中で１時間、単球（1×10^{6}／ｍｌ）を組織培養フラスコにプレートした。３７℃における１時間のインキュベーションの後、ＨＳＡの非存在下で最初にプレートした培養物に、３％ ＨＳＡを添加し、両方の培養物を３７℃で一晩インキュベートした。次いで、上清を収集し、単球の活性化と代表的に関連する種々のサイトカインのレベルを測定した。このサイトカイン濃度（ｎｇ／ｍｌ）を下の表１に示す。

【００７９】

【表１】

表 1

サイトカイン	HSA なし	3% HSA
インターロイキン8	7,192	710
インターロイキン6	752	200
TNF-α	44	<5

これまでの実施例は、説明のために提供されるが、特許請求される発明の範囲を限定しない。本発明の他の変化物は、当業者には容易に明らかであり、本発明の他の変化物は、添付の特許請求の範囲によって包含される。本明細書中に引用される全ての刊行物、特許、特許出願および他の参考文献は、本明細書によって参考として援用される。

【図面の簡単な説明】

【００８０】

【図１】図１は、樹状細胞上のＣＤ１４およびＣＤ１ａの表面発現のヒストグラムを示し、さらなるサイトカインなしでのＧＭ－ＣＳＦ単独の存在下および細胞培養容器の表面への密着結合を防止するブロッキング剤（３％ヒト血清アルブミン；ＨＳＡ）の存在下での$CD1a^{+}$樹状細胞への単球樹状細胞前駆体のインビトロ分化を評価する。

【図２Ａ】図２は、ＩＬ－４の非存在下でのインビトロ培養の後、単球が樹状細胞（ＤＣ）へ分化する場合のＣＤ１ａおよびＣＤ１４の発現の測定を示す。分化は、「生（ｌｉｖｅ）」$CD11c^{+}$細胞上のマーカーＣＤ１ａおよびＣＤ１４の相反的発現によって示される。図２Ａは、前駆体単球表面でのＣＤ１ａの発現に対する５日目のＤＣ上でのＣＤ１ａの発現のアップレギュレーションを示す。図２Ｂは、前駆体単球でのＣＤ１４の発現レベルに対するＤＣ上でのＣＤ１４の発現のダウンレギュレーションを実証する。データは、（ｉ）サブセットおよび（ｉｉ）平均蛍光強度（ｍｆｉ）によって測定された相対的発現について、単球系統（$CD11c^{+}$）の細胞に電気的ゲートをかけた後のそれぞれの培

養について示される。関連性のアイソタイプコントロール抗体で観察されたバックグラウンドの染色は、差し引かれている。これらのデータは、２つの独立したドナー由来の単離し培養した単球からの平均値を表す。

【図２Ｂ】図２は、ＩＬ－４の非存在下でのインビトロ培養の後、単球が樹状細胞（ＤＣ）へ分化する場合のＣＤ１ａおよびＣＤ１４の発現の測定を示す。分化は、「生（ｌｉｖｅ）」ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞上のマーカーＣＤ１ａおよびＣＤ１４の相反的発現によって示される。図２Ａは、前駆体単球表面でのＣＤ１ａの発現に対する５日目のＤＣ上でのＣＤ１ａの発現のアップレギュレーションを示す。図２Ｂは、前駆体単球でのＣＤ１４の発現レベルに対するＤＣ上でのＣＤ１４の発現のダウンレギュレーションを実証する。データは、（ｉ）サブセットおよび（ｉｉ）平均蛍光強度（ｍｆｉ）によって測定された相対的発現について、単球系統（ＣＤ１１ｃ$^{+}$）の細胞に電気的ゲートをかけた後のそれぞれの培養について示される。関連性のアイソタイプコントロール抗体で観察されたバックグラウンドの染色は、差し引かれている。これらのデータは、２つの独立したドナー由来の単離し培養した単球からの平均値を表す。

【図３】図３は、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４、またはＧＭ－ＣＳＦ単独のいずれかで培養する前に基質に密接に接着するかまたはゆるく接着する単球樹状細胞前駆体からのＩＬ－１２　ｐ７０分泌の定量化を示す。

【図４】図４は、ＧＭ－ＣＳＦ単独で培養した単球樹状細胞前駆細胞についての代表的な樹状細胞マーカーの発現を示す。

【図５】図５は、ＣＤ１ａおよびＣＤ１４の発現によって決定されるような、ＧＭ－ＣＳＦ単独を補充した細胞培地中の非活性化単球のインビトロ樹状細胞分化の反応速度を示す。

【図６Ａ】図６Ａ～図６Ｅは、樹状細胞成熟因子の存在下または非存在下でＧＭ－ＣＳＦ単独またはＩＬ－４に加えＧＭ－ＣＳＦのいずれかを補充した細胞培地中で、Ｔｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグまたはプラスチック組織培養フラスコのいずれかで培養した樹状細胞への非活性化単球の表現型比較を示す。図６Ａは、ＣＤ１ａ陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｂは、ＣＤ８３陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｃは、ＣＤ８０の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｄは、ＣＤ８６の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｅは、ＨＬＡ－ＤＲの発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。

【図６Ｂ】図６Ａ～図６Ｅは、樹状細胞成熟因子の存在下または非存在下でＧＭ－ＣＳＦ単独またはＩＬ－４に加えＧＭ－ＣＳＦのいずれかで補充した細胞培地中で、Ｔｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグまたはプラスチック組織培養フラスコのいずれかで培養した樹状細胞への非活性化単球の表現型比較を示す。図６Ａは、ＣＤ１ａ陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｂは、ＣＤ８３陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｃは、ＣＤ８０の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｄは、ＣＤ８６の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｅは、ＨＬＡ－ＤＲの発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。

【図６Ｃ】図６Ａ～図６Ｅは、樹状細胞成熟因子の存在下または非存在下でＧＭ－ＣＳＦ単独またはＩＬ－４に加えＧＭ－ＣＳＦのいずれかで補充した細胞培地中で、Ｔｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグまたはプラスチック組織培養フラスコのいずれかで培養した樹状細胞への非活性化単球の表現型比較を示す。図６Ａは、ＣＤ１ａ陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｂは、ＣＤ８３陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｃは、ＣＤ８０の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｄは、ＣＤ８６の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｅは、ＨＬＡ－ＤＲの発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。

【図６Ｄ】図６Ａ～図６Ｅは、樹状細胞成熟因子の存在下または非存在下でＧＭ－ＣＳＦ単独またはＩＬ－４に加えＧＭ－ＣＳＦのいずれかで補充した細胞培地中で、Ｔｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグまたはプラスチック組織培養フラスコのいずれかで培養した樹状細胞への非活性化単球の表現型比較を示す。図６Ａは、ＣＤ１ａ陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｂは、ＣＤ８３陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｃは、ＣＤ８０の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｄは、ＣＤ８６の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｅは、ＨＬＡ－ＤＲの発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。

【図６Ｅ】図６Ａ～図６Ｅは、樹状細胞成熟因子の存在下または非存在下でＧＭ－ＣＳＦ単独またはＩＬ－４に加えＧＭ－ＣＳＦのいずれかで補充した細胞培地中で、Ｔｅｆｌｏｎ（登録商標）バッグまたはプラスチック組織培養フラスコのいずれかで培養した樹状細胞への非活性化単球の表現型比較を示す。図６Ａは、ＣＤ１ａ陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｂは、ＣＤ８３陽性であった細胞の百分率を示す。図６Ｃは、ＣＤ８０の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｄは、ＣＤ８６の発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。図６Ｅは、ＨＬＡ－ＤＲの発現（ｍｆｉ）の相対レベルを示す。

【図７Ａ】図７Ａおよび図７Ｂは、ＧＭ－ＣＳＦ単独またはＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４のいずれかの存在下で培養し、その後、コントロール抗原であるキーホールリンペットヘモシニアンまたはインフルエンザＡ　Ｍ１－Ａ４　４０マーペプチドおよび樹状細胞成熟剤と接触させた、ガラスコーティングされたマイクロキャリアビーズへの接着によって生じる樹状細胞の抗原特異的Ｔ細胞応答を示す。図７Ａは、ドナーＰ０１６から単離した細胞についての抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞分析を示し、そして図７Ｂは、ドナーＰ０５２についての同様の分析である。

【図７Ｂ】図７Ａおよび図７Ｂは、ＧＭ－ＣＳＦ単独またはＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４のいずれかの存在下で培養し、その後、コントロール抗原であるキーホールリンペットヘモシニアンまたはインフルエンザＡ　Ｍ１－Ａ４　４０マーペプチドおよび樹状細胞成熟剤と接触させた、ガラスコーティングされたマイクロキャリアビーズへの接着によって生じる樹状細胞の抗原特異的Ｔ細胞応答を示す。図７Ａは、ドナーＰ０１６から単離した細胞についての抗原特異的細胞傷害性Ｔ細胞分析を示し、そして図７Ｂは、ドナーＰ０５２についての同様の分析である。

【図８Ａ】図８Ａおよび図８Ｂは、ＩＬ－４の非存在下でのインビトロ培養後に樹状細胞（ＤＣ）に分化した単球系統の細胞上の表現型プロフィールを示す。全てのサブセット上のマーカーおよびこれらのマーカーの発現（ｍｆｉ）の相対レベルが、「生」ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞上に示される。図８Ａは、単球および５日目のＤＣ上の特異的マーカーを共発現するＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞の百分率を示す。図８Ｂは、表現型マーカーの相対的発現を示す。データは、（ｉ）サブセットおよび（ｉｉ）平均蛍光強度（ｍｆｉ）によって測定された相対的発現について、単球系統（ＣＤ１１ｃ$^{+}$）の細胞に電気的ゲートをかけた後の６３６６５および６３６６６と命名された２つの異なるドナー由来の独立した培養物について示される。関連するアイソタイプコントロール抗体で観察されたバックグラウンドの染色は、差し引かれている。

【図８Ｂ】図８Ａおよび図８Ｂは、ＩＬ－４の非存在下でのインビトロ培養後に樹状細胞（ＤＣ）に分化した単球系統の細胞上の表現型プロフィールを示す。全てのサブセット上のマーカーおよびこれらのマーカーの発現（ｍｆｉ）の相対レベルが、「生」ＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞上に示される。図８Ａは、単球および５日目のＤＣ上の特異的マーカーを共発現するＣＤ１１ｃ$^{+}$細胞の百分率を示す。図８Ｂは、表現型マーカーの相対的発現を示す。データは、（ｉ）サブセットおよび（ｉｉ）平均蛍光強度（ｍｆｉ）によって測定された相対的発現について、単球系統（ＣＤ１１ｃ$^{+}$）の細胞に電気的ゲートをかけた後の６３６６５および６３６６６と命名された２つの異なるドナー由来の独立した培養物について示される。関連するアイソタイプコントロール抗体で観察されたバックグラウンドの染色は、差し引かれている。

【図１】

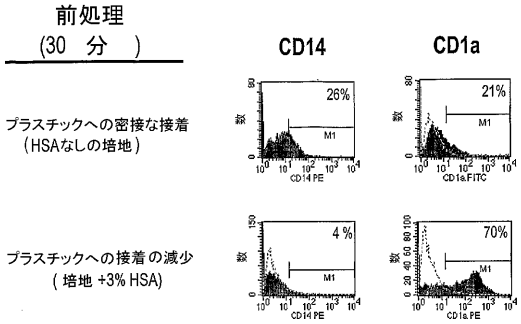


Figure 1

【図２Ａ】

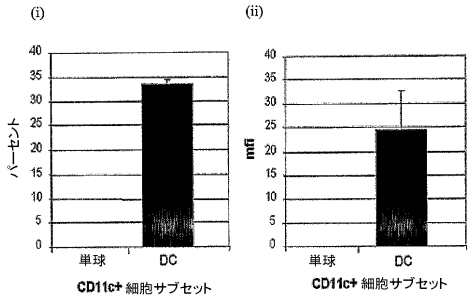


Figure 2A

【図２Ｂ】

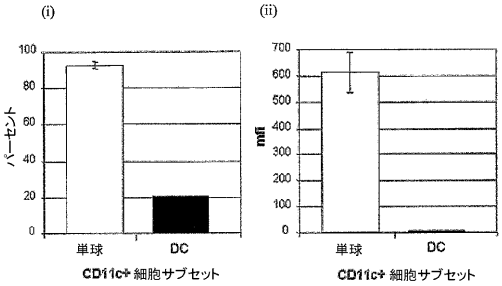


Figure 2B

【図３】

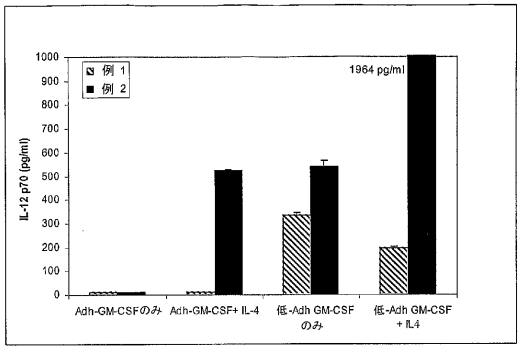


Figure 3

【図４】

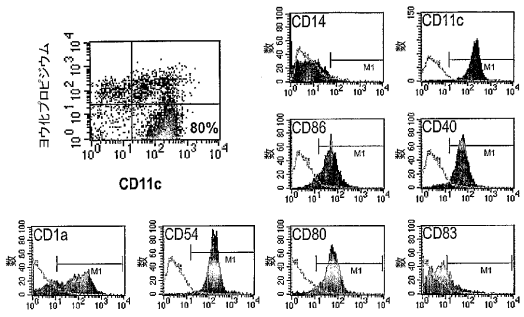


Figure 4

【図５】

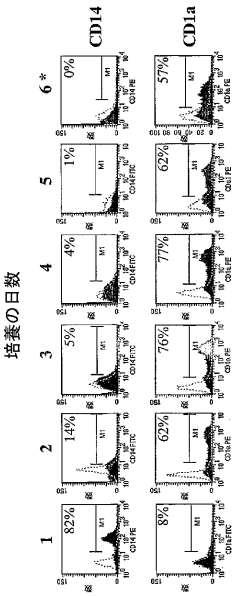


Figure 5

【図６Ａ】

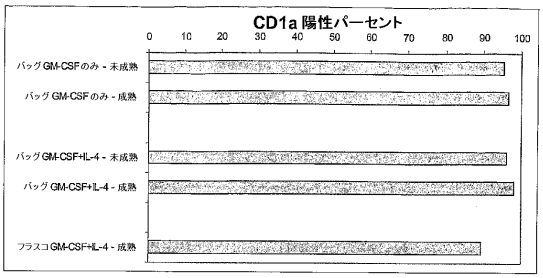


Figure 6A

【図６Ｂ】

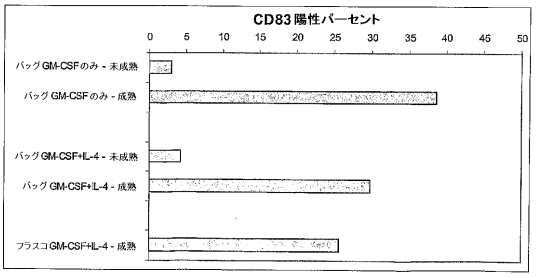


Figure 6B

【図６Ｃ】

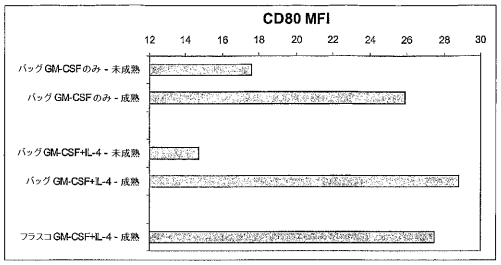


Figure 6C

【図６Ｄ】

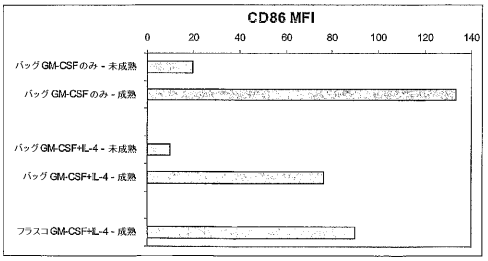


Figure 6D

【図６Ｅ】

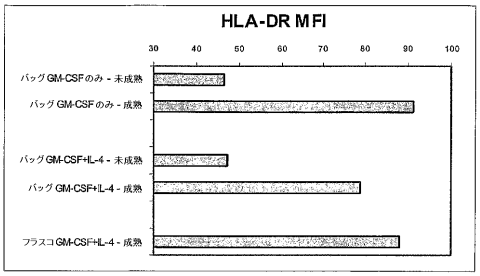


Figure 6E

【図７Ａ】

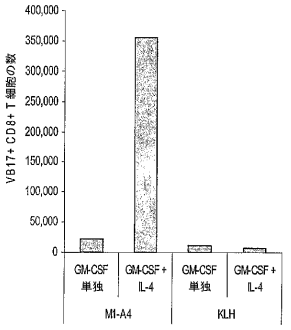


Figure 7A

【図７Ｂ】

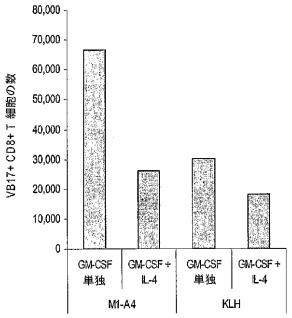


Figure 7B

【図８Ａ】

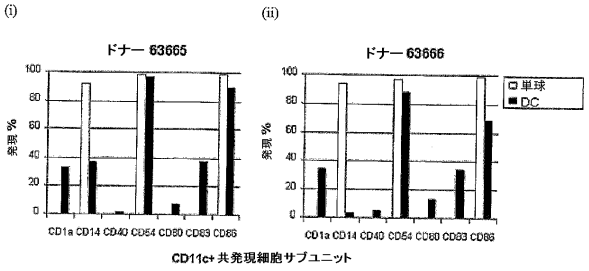


Figure 8A

【図８Ｂ】

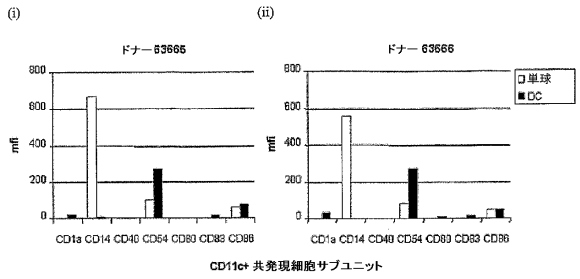


Figure 8B

【配列表】

0004762887000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 チョア, ベンジャミン エー.
アメリカ合衆国 ワシントン ９８１２２, シアトル, イー. デニー ウェイ １８１９, ナンバー２０１
(72)発明者 ボッシュ, マーニックス エル.
アメリカ合衆国 ワシントン ９８０３９, メディナ, エヌイー １４ティーエイチ ストリート ７８１４

審査官 ▲高▼ 美葉子

(56)参考文献 特表２００６－５１７１０８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第０３／０１０２９２（WO，Ａ１）
特表２００５－５０５２７０（ＪＰ，Ａ）
特表２００５－５２９７４６（ＪＰ，Ａ）
J. Clin. Invest., １９９０年, Vol.85, pp.955-961
Bri. J. Haematol., １９９８年, Vol.101, pp.231-241
Nature, １９９７年, Vol.387, pp.713-717
J. Invest. Dermatol., ２００２年, Vol.119, pp.328, 724
J. Exp. Med., １９９６年, Vol.184, pp.747-752
J. Exp. Med., １９９４年, Vol.179, pp.1109-1118
Blood, １９９９年, Vol.93, No.7, pp.2244-2252
Eur. J. Immunol., ２０００年, Vol.30, pp.1813-1822
J. Immunol. Meth., １９９９年, Vol.223, pp.77-92

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 5/00
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed
Science Direct