

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6290078号
(P6290078)

(45) 発行日 平成30年3月7日(2018.3.7)

(24) 登録日 平成30年2月16日(2018.2.16)

(51) Int. Cl.	F I
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A
C 1 2 N 5/0784 (2010.01)	C 1 2 N 5/0784

請求項の数 13 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-520633 (P2014-520633)
(86) (22) 出願日	平成24年7月16日 (2012.7.16)
(65) 公表番号	特表2014-523252 (P2014-523252A)
(43) 公表日	平成26年9月11日 (2014.9.11)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/063932
(87) 国際公開番号	W02013/010998
(87) 国際公開日	平成25年1月24日 (2013.1.24)
審査請求日	平成27年7月15日 (2015.7.15)
(31) 優先権主張番号	11382240.7
(32) 優先日	平成23年7月15日 (2011.7.15)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

前置審査

(73) 特許権者	514012753 インスティトゥト、ディンベスティガシオ、 ピオメディカ、デ、ベイビッジエ (イデ イベル) INSTITUT D' INVESTIG ACIO BIOMEDICA DE B ELLVITGE (IDIBELL) スペイン国 エー08908 バルセロナ 、オスピタレト、デ、リョブレガット、1 99、グラン、ピア、デ、ルオスタピレト 、オスピタル、デュラン、イ、レイナルス 、テルセラ、ブランタ Hospital Duran i Re ynals, 3a planta, Gra n Via de l' Hospital 最終頁に続く
-----------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(54) 【発明の名称】 免疫調節のための組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫系の望ましくない活性化により引き起こされる免疫疾患の予防および/または治療のための薬剤であって、前記薬剤が 鎖を欠く C 4 B P アイソフォームを含んでなり、前記アイソフォームが C 4 B P 鎖の C C P 6 領域を保持するものであり、前記免疫疾患が、

- (i) 敗血症、
- (i i) 移植拒絶、
- (i i i) 移植片対宿主病、および
- (i v) 過敏性疾患

からなる群から選択される、薬剤。

【請求項 2】

前記免疫疾患が移植拒絶である、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 3】

前記免疫疾患が移植片対宿主病である、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 4】

前記免疫疾患が敗血症である、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 5】

前記免疫疾患が過敏性疾患である、請求項 1 に記載の薬剤。

【請求項 6】

C4BPアイソフォームが 7₀ および 6₀ からなる群から選択される、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の薬剤。

【請求項 7】

寛容原性樹状細胞および/または制御性 T 細胞集団を増加させることにより免疫疾患の予防および/または治療に使用するための組成物であって、

(i) H 因子または天然型 H 因子と少なくとも 90% の配列同一性を有するその機能的に等価な変異体、

(ii) H 因子または天然型 H 因子と少なくとも 90% の配列同一性を有するその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および

(iii) H 因子または天然型 H 因子と少なくとも 90% の配列同一性を有するその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター

からなる群から選択される材料を含んでなり、前記免疫疾患が敗血症、移植拒絶、移植片対宿主病および過敏性疾患から選択される、組成物。

【請求項 8】

寛容原性樹状細胞集団の *in vitro* での生成方法であって、

(i) 単離された樹状前駆細胞集団を未熟樹状細胞集団の形成に十分な条件下で培養する工程、および

(ii) 工程 (i) で得られた未熟樹状細胞集団を成熟樹状細胞の形成に十分な条件下で培養する工程

を含んでなり、工程 (i) および/または (ii) が、

(a) 鎖を欠く C4BP アイソフォーム、

(b) H 因子または天然型 H 因子と少なくとも 90% の配列同一性を有するその機能的に等価な変異体、

(c) H 因子または天然型 H 因子と少なくとも 90% の配列同一性を有するその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および

(d) H 因子または天然型 H 因子と少なくとも 90% の配列同一性を有するその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター

からなる群から選択される材料を含んでなる組成物の存在下で行われる、方法。

【請求項 9】

前記樹状細胞前駆体集団が単球集団である、請求項 8 に定義される方法。

【請求項 10】

寛容原性樹状細胞および/または制御性 T 細胞集団をそれを必要とする対象において増加させることに使用するための、

(i) H 因子または天然型 H 因子と少なくとも 90% の配列同一性を有するその機能的に等価な変異体、

(ii) H 因子または天然型 H 因子と少なくとも 90% の配列同一性を有するその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および

(iii) H 因子または天然型 H 因子と少なくとも 90% の配列同一性を有するその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター

からなる群から選択される材料を含んでなる組成物。

【請求項 11】

寛容原性樹状細胞集団を増加させるための剤であって、鎖を欠く C4BP アイソフォームを含んでなり、前記アイソフォームが C4BP 鎖の CCP6 領域を保持するものである、剤。

【請求項 12】

前記 C4BP アイソフォームが 7₀ および 6₀ からなる群から選択される、請求項 11 に記載の剤。

【請求項 13】

関節リウマチに使用するための剤を除く、請求項 11 または 12 に記載の剤。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫学の分野に関し、より詳しくは、樹状細胞において免疫寛容誘導状態を誘導することができ、鎖を欠く補体C4BPのアイソフォームおよびH因子に基づく組成物、ならびに免疫系の望ましくない活性化を特徴とする疾患の予防および/または治療のためのその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

樹状細胞(DC)は、免疫系の専門的APCである。DCは、その未熟な状態では、食作用または飲作用の手段によって細胞外抗原を取り込み、エンドソームおよびファゴソームなどのエンドサイトーシスコンパートメントでこれらの抗原を処理してペプチドとし、そこでペプチドはMHCクラスII分子と結合する。これらの分子はまた、外因性タンパク質に由来するペプチドをMHCクラスII提示経路に負荷するユニークな能力も有し、このプロセスは「交差提示」と呼ばれる。適当な分化シグナル(微生物産物など)が与えられれば、未熟DCは、ナイーブT細胞とメモリーT細胞の両方を活性化する能力を備えた免疫原性DCへと発達することができる。他方で、未熟DCは寛容原性表現型へも分化することができ、この表現型は末梢性免疫寛容の維持に重要な役割を果たすと考えられる(Steinman, Ann. Rev. Immunol. 2003, 21: 685-711; Morelli, Immunol Rev 2003: 125-146)。

【0003】

*in vitro*で寛容原性DCを生成するための多くのプロトコールが記載されている(Xiao et al., J. Immunother. 2006 (29) 465-471)。最もよく特徴付けられている方法では、薬理学的メディエーター(例えば、ビタミンD3類似体、グルココルチコイド、エストロゲンを含む免疫抑制剤)、サイトカインおよび増殖因子(例えば、IL-10、TGF- β 、IL-4およびIFN- γ)またはT細胞共刺激分子(例えば、CD86およびCD40)の発現を抑制するか、またはT細胞阻害分子(例えば、CTLA-4およびインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ)の発現を増強するための遺伝子工学が利用される。

【0004】

ビタミンDの活性化形態である1,25-ジヒドロキシビタミンD3(1,25(OH) $_2$ D3)は、カルシウムおよび骨代謝におけるその中枢的機能に加えて多くの細胞種の増殖および分化に対する重要な作用ならびに顕著な免疫調節特性を有するセコステロイドホルモンである(van Etten et al., J Steroid Biochem and Mol Biol 2005 (97) 93-101)。1,25(OH) $_2$ D3の生物学的作用はビタミンD受容体(VDR)(ビタミンD応答性遺伝子内の特定のDNA配列エレメントであるビタミンD応答性エレメントと結合し、最終的には、それらのRNAポリメラーゼIIを介する転写速度に影響を及ぼすアゴニストにより活性化される転写因子として機能する核ホルモン受容体スーパーファミリーのメンバー)により媒介される。APC、特にDCは、VDRを発現し、*in vitro*および*in vivo*におけるVDRアゴニストの重要な標的である。IL-10は、主として、活性化されたリンパ球、単球およびマクロファージにより産生される。IL-10は2つのサブユニット、すなわち、リガンド結合IL-10R1とシグナル伝達IL-10R2から構成される受容体と結合する。IL-10は、MHCクラスIIおよび共刺激分子の発現、IL-12および炎症性サイトカインの分泌、ならびにいくつかのAPCのT細胞刺激機能をダウンレギュレートする(Moore et al., Ann Rev Immunol 2001 (19) 683-785)。

【0005】

アンチセンスオリゴヌクレオチドに使用によるT細胞共刺激分子CD40、CD80およびCD86の阻害など、DCの遺伝子操作は、寛容原性DCの生成に効果的であることが分かった(Machen et al., J. Immunol. 2004, 173: 4331-4341)。このようなDCは、IL-12p70およびTNF- α レベルの低減をもたらし、非肥満糖尿病マウスにおける

糖尿病を予防した。

【0006】

これまでに自己免疫疾患に関してU S F D Aが承認した療法の大部分は、免疫炎症活性の全身的阻害に集中していた。非特異的免疫抑制は自己反応性免疫細胞機能の阻害に部分的には効果があるが、免疫応答を抑制するために使用される薬物には多くの副作用があり、継続的療法は長期宿主生存に貢献しない。従って、免疫系の感染排除能を維持しつつ、自己反応性免疫細胞機能の有害な作用の特異的遮断を可能とする自己抗原特異的処置を開発することが望ましい。よって、抗原特異的免疫寛容を効果的に誘導することができる、適切に備えられたD Cを生成する方法に対する強い需要がある。

【0007】

さらに、e x v i v oで生成された、適当な免疫寛容誘導機能を有するD Cは、アレルギーの処置における、また、移植免疫寛容の誘導のための治療用ワクチンとして実行され得る。自己免疫疾患に対する免疫療法の場合と同様に、有害な免疫応答の効果的な抑制には、C D 4 +およびC D 8 +の両T細胞の免疫寛容誘導が含まれる。従って、e x v i v oで生成される寛容原性D Cは自己免疫疾患、アレルギーを治療する場合、および移植片拒絶を予防する場合と同様の特徴を有するべきであると予想することができる。

【0008】

しかしながら、異なる寛容原性表現型を有し、かつ、寛容原決定基の発現を示す寛容原性樹状細胞を生産する新規かつ代替の方法は、常に当技術分野における研究の繰り返し発生する課題である。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、免疫疾患の予防および/または治療に使用するための鎖を欠くC 4 B Pアイソフォームに関する。本発明はまた、C 4 B P鎖のC C P 6ドメインまたはその機能的に等価な変異体を含んでなるポリペプチド(ただし、前記ポリペプチドは全長C 4 B P鎖を含まず、かつ、前記ポリペプチドは、C 4 B Pとは異なるタンパク質の領域を含まない)、配列番号2、3、4および5からなる群から選択される配列を有するペプチドまたはその機能的に等価な変異体、前記ポリペプチドまたはペプチドをコードするポリヌクレオチド、ならびに前記ポリヌクレオチドを含んでなるベクターに関する。

【0010】

別の面において、本発明は、本発明によるポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチドまたはベクターを含んでなる医薬組成物に関する。

【0011】

別の面において、本発明は、免疫疾患の予防および/または治療に使用するための、
 (i) H因子またはその機能的に等価な変異体、
 (i i) H因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、
 (i i i) H因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター
 からなる群から選択される材料の組成物に関する。

【0012】

別の面において、本発明は、寛容原性樹状細胞集団の作成方法に関し、その方法は、
 (i) 樹状前駆細胞集団を未熟樹状細胞集団の形成に十分な条件下でインキュベートする工程、および
 (i i) 工程 (i) で得られた未熟樹状細胞集団を成熟樹状細胞の形成に十分な条件下でインキュベートする工程
 を含んでなり、工程 (i) および/または (i i) は、
 (a) 鎖を欠くC 4 B Pアイソフォーム、
 (b) 本発明によるポリペプチド、
 (c) 本発明によるペプチド、
 (d) 本発明によるポリヌクレオチド、

10

20

30

40

50

(e) 本発明によるベクター、
 (f) H因子またはその機能的に等価な変異体、
 (g) H因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および
 (h) H因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んで
 なるベクター

からなる群から選択される材料の組成物の存在下で行われる。

【0013】

さらに別の面では、本発明は、本発明による方法により得られる寛容原性樹状細胞、
 本発明の寛容原性樹状細胞集団を含んでなる医薬組成物、ならびに免疫疾患の予防および
 /または治療のための本発明の寛容原性樹状細胞集団の使用に関する。

10

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】 鎖を欠くC4BPアイソフォームはヒトMo-DCの活性化表現型をダウンレ
 ギュレートする C4BP 7 0および組換え 6 0 (7 1はそうではない)
 は、ヒトMo-DC由来の重要な表面マーカーのアップレギュレーションを阻害する。ヒ
 トMo-DCは、それらの分化および成熟過程を通して、示された濃度のC4BPアイソ
 フォームとともにインキュベートした。DC成熟はLPS処理により達成された(詳しく
 は、材料および方法を参照)。次に、細胞を回収し、洗浄し、フローサイトメトリーにより
 、CD14、CD40、CD80、CD83、CD86、CD1aおよびHLA-DRの
 細胞表面発現を分析した。柱は、陽性細胞(A)およびMFI(B)のパーセンテージを
 種々の表面マーカーに関して表す。iDCは、非処理の未熟DC；mDCは、非処理のL
 PS成熟DC。示されている結果は、8回の独立した実験からの平均+/-SDである(
 *はmDCに対して $p < 0.05$ ；**は $p < 0.01$ ；***は $p < 0.001$)。

20

【図2】 C4BP処理はヒトMo-DCの生存率に影響を及ぼさない C4BP 7
 0またはC4BP 7 1処理(2 μ g/ml)により得、LPSで成熟させたMo-
 DCの生存率を、材料および方法に記載されているように、アネキシン-Vおよび7-A
 DD染色ならびにフローサイトメトリー分析により評価した。参照として、本発明者ら
 は免疫抑制剤ビタミンD3(カルシトリオール、Calcigex(登録商標)、Abbott
 Laboratories、S.A.；2.4 μ M)で処理したMo-DCを含めた
 iDCは、非処理の未熟DC；mDCは、非処理のLPS成熟DC。示されている結
 果は、8回の独立した実験からの平均+/-SDである。

30

【図3】 鎖を欠くC4BPアイソフォームに曝されたヒトMo-DCはCCR7ならび
 にDC成熟マーカーIDOおよびBIC-1の発現が低い (A)C4BP処理かつLPS
 成熟Mo-DCの遺伝子発現プロファイル。LightCycler(登録商標)技術
 を用いたRT-qPCRによるCCR7、IDO、およびBIC-1遺伝子発現の比較定
 量。示されている結果は、6回(CCR7)、4回(IDO)、および3回(BIC-1
)の独立した実験からの平均+/-SDである。(B)フローサイトメトリーによるC4
 BP処理かつLPS成熟Mo-DCに対するCCR7表面発現分析(MFI)。示されて
 いる結果は、3回の独立した実験からの平均+/-SDである。iDCは、非処理の未熟
 DC；mDCは、非処理のLPS成熟DC(*はmDCに対して $p < 0.05$ ；**は p
 < 0.01)。

40

【図4】 鎖を欠くC4BPアイソフォームはLPS成熟ヒトMo-DCによる炎症性サ
 イトカインの放出を阻害する 2 μ g/mlの種々のC4BPアイソフォームで処理した
 Mo-DCをLPSで成熟させ、各上清中のIL-12p70、IL-10、IL-6、
 IL-8、TNF- α およびIFN- γ の濃度を分析した。示されている結果は、2反復
 で実施した3回の独立した実験からの平均+/-SDである。iDCは、非処理の未熟D
 C；mDCは、非処理のLPS成熟DC(*はmDCに対して $p < 0.05$ ；**は $p <$
 0.01 ；***は $p < 0.001$)。

【図5】 鎖を欠くC4BPアイソフォームはヒトMo-DCの形態を改変する 2 μ g
 /mlの主要なC4BPアイソフォーム(7 0または 7 1)で処理し、LPSで

50

成熟させたM o - D Cの表面形態をS E Mにより調べ、非処理の未熟D C (i D C) およびL P S成熟D C (m D C)の両方から得られたものと比較した。C 4 B P 7 0で処理されたD Cに長い樹状突起が存在しないことが、より密接に未熟D C表現型に似ていることを注記しておく。

【図6】鎖を欠くC 4 B PアイソフォームはヒトM o - D Cの走化性を変化させる L P S成熟後の非処理M o - D CおよびC 4 B P処理M o - D Cの、ケモカインC C L 2 1へと向かう移動を、トランスウェルアッセイで評価した。2時間のインキュベーション後に下方のC C L 2 1含有チャンバーへと移動したD Cの、非処理のL P S成熟D C (m D C)で得られた移動値(100%)に対するパーセンテージを示す。C C L 2 1を含まない下方チャンバーへのD Cの自然移動も評価した。結果は、2反復で実施した4回の独立した実験からの平均+/-SDである(*はm D Cに対して $p < 0.05$)。

10

【図7】鎖を欠くC 4 B Pアイソフォームに曝されたヒトM o - D Cは同種異系T細胞の増殖を阻害する 非処理(m D C)、C 4 B P処理(70もしくは71、 $2 \mu\text{g}/\text{ml}$)またはV i t D 3処理(カルシトリオール、C a l c i g e x (登録商標)、A b b o t t L a b o r a t o r i e s、S . A . ; $2.4 \mu\text{M}$)を行い、かつ、L P Sで成熟させたM o - D Cを、同種異系の精製C D 3 + T細胞(10^5 /ウェル)とともに1:40($n=10$)、1:80および1:160(両方とも $n=4$)D C:T細胞比で5日間、3反復で培養した。[^3H]チミジン($1 \mu\text{Ci}$ /ウェル)を培養の最後の16時間に加え、組み込みをプレートカウンターにより測定した(*はm D Cに対して $p < 0.05$; **は $p < 0.01$; ***は $p < 0.001$)。i D Cは、非処理の未熟D C。

20

【図8】C 4 B P AのC C P 6ドメインはヒトM o - D Cに対するC 4 B Pの「免疫寛容誘導」活性に必要なである ヒトM o - D Cを、それらの分化および成熟過程を通して、示された濃度のC 4 B P鎖C C P欠失突然変異体(C C P 1 ~ C C P 8; 総て $2 \mu\text{g}/\text{ml}$)とともにインキュベートした(A)。D C成熟はL P S処理($5 \mu\text{g}/\text{ml}$)により達成された。次に、細胞を回収し、洗浄し、C D 1 4、C D 8 3、C D 1 aおよびH L A - D Rの細胞表面発現をフローサイトメトリーにより分析した。柱は、陽性細胞(B)、およびM F I(C)のパーセンテージを種々の表面マーカーに関して表す。i D Cは、非処理の未熟D C; m D Cは、非処理のL P S成熟D C。示されている結果は、8回の独立した実験からの平均+/-SDである(*はm D Cに対する $p < 0.05$; **は $p < 0.01$; ***は $p < 0.001$)。

30

【図9】C C P 6に基づくペプチドP S 6 - 0 4はヒトM o - D Cの成熟表現型を妨げる (A)C C P 6アミノ酸配列および使用した4つのC C P 6に基づくペプチドの直線表示。(B)ヒトM o - D Cを、それらの分化および成熟過程を通して、P S 6 - 0 1、P S 6 - 0 2、P S 6 - 0 3、またはP S 6 - 0 4ペプチド(総て $100 \mu\text{M}$)とともにインキュベートした。D C成熟はL P S処理($5 \mu\text{g}/\text{ml}$)により達成された。次に、細胞を回収し、洗浄し、特異的D C成熟マーカーC D 8 3である細胞表面発現をフローサイトメトリーにより分析した。柱は、陽性細胞のパーセンテージ(%)と蛍光強度中央値(M F I)を表す。i D Cは、非処理の未熟D C; m D Cは、非処理のL P S成熟D C。示されている結果は、3回の独立した実験からの平均+/-SDである(*はm D Cに対する $p < 0.05$; **は $p < 0.01$; ***は $p < 0.001$)。n . d .は、測定せずを表す。

40

【図10】H因子はヒトM o - D Cの活性化表現型をダウンレギュレートする H因子は、ヒトM o - D C由来の重要な表面マーカーのアップレギュレーションを阻害する。ヒトM o - D Cを、それらの分化および成熟過程を通して、示された濃度のH因子とともにインキュベートした。D Cは成熟L P S処理により達成された(詳しくは、材料および方法を参照)。次に、細胞を回収し、洗浄し、C D 1 4、C D 4 0、C D 8 0、C D 8 3、C D 8 6、C D 1 aおよびH L A - D Rの細胞表面発現をフローサイトメトリーにより分析した。柱は、陽性細胞(A)およびM F I(B)のパーセンテージを種々の表面マーカーに関して表す。i D Cは、非処理の未熟D C; m D Cは、非処理のL P S成熟D C。示され

50

ている結果は、5回の独立した実験からの平均 \pm SDである(*はmDCに対する $p < 0.05$; **は $p < 0.01$; ***は $p < 0.001$)。

【図11】H因子はヒトMo-DCの生存率に影響を及ぼさない H因子処理(5 μ g/ml)により得、LPSで成熟させたMo-DCの生存率を、材料および方法に記載されているように、アネキシン-Vおよび7-ADD染色、ならびにフローサイトメトリー分析により評価した。参照として、本発明者らは免疫抑制剤ビタミンD3(カルシトリオール、Calcigex(登録商標)、Abbott Laboratories、S.A.; 2.4 μ M)で処理したMo-DCを含めた。iDCは、非処理の未熟DC; mDCは、非処理のLPS成熟DC。示されている結果は、8回の独立した実験からの平均 \pm SDである。

10

【図12】H因子に曝されたヒトMo-DCはCCR7ならびにDC成熟マーカーIDO、BIC-1およびSOD2の発現が低い (A)H因子処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟Mo-DCの遺伝子発現プロフィール。LightCycler(登録商標)技術を用いたRT-qPCRによるCCR7、IDO、BIC-1、およびSOD2遺伝子発現の比較定量。示されている結果は、4回の独立した実験からの平均 \pm SDである。(B)フローサイトメトリーによるH因子処理かつLPS成熟Mo-DCに対するCCR7表面発現分析(MFI)。示されている結果は、3回の独立した実験からの平均 \pm SDである。iDCは、非処理の未熟DC; mDCは、非処理のLPS成熟DC(*はmDCに対して $p < 0.05$; **は $p < 0.01$; ***は $p < 0.001$)。

【図13】H因子はLPS成熟ヒトMo-DCによる炎症性サイトカインの放出を阻害する 5 μ g/mlの種々のC4BPアイソフォームで処理したMo-DCをLPSで成熟させ、各上清中のIL-12p70、IL-10、IL-6、IL-8、TNF- α およびIFN- γ の濃度を分析した。示されている結果は、2反復で実施した4回の独立した実験からの平均 \pm SDである。iDCは、非処理の未熟DC; mDCは、非処理のLPS成熟DC(*はmDCに対して $p < 0.05$; **は $p < 0.01$; ***は $p < 0.001$)。

20

【図14】H因子はヒトMo-DCの形態を改変する H因子(10 μ g/ml)で処理し、LPSで成熟させたMo-DCの表面形態をSEMにより調べ、非処理の未熟DC(iDC)およびLPS成熟DC(mDC)の両方から得られたものと比較した。H因子で処理されたDCに長い樹状突起が存在しないことが、より密接に未熟DC表現型に似ていることを注記しておく。

30

【図15】H因子はiDCのエンドサイトーシスを低下させる 非処理の、またはH因子で処理した(2、5、および10 μ g/ml)未熟Mo-DCを、蛍光DQ-OVAとともに暗所にて37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートし、フローサイトメトリーにより調べ、特異的取り込みを測定した。H因子処理iDC(iDC)の食作用レベルは、非処理のiDCよりも有意に低かった(*は $p < 0.05$)。結果は、3回の独立した実験からの平均MFI \pm SDとして表す。

【図16】H因子はヒトMo-DCの走化性を変化させる LPSで成熟させた、非処理Mo-DCおよびH因子処理Mo-DCの、ケモカインCCL21へ向かう移動を、トランスウェルアッセイにより評価した。2時間のインキュベーション後に下方のCCL21含有チャンバーへと移動したDCの、非処理DC(mDC)から得られた移動値(100%)に対するパーセンテージを示す。CCL21を含まない下方チャンバーへのDCの自然移動も評価した。結果は、2反復で実施した4回の独立した実験からの平均 \pm SDである(*はmDCに対して $p < 0.05$)。

40

【図17】H因子に曝されたヒトMo-DCは同種異系T細胞の増殖を阻害する 非処理(mDC)、5 μ g/mlのH因子処理またはVitD3処理(カルシトリオール、Calcigex(登録商標)、Abbott Laboratories、S.A.; 2.4 μ M)を行い、かつ、LPSで成熟させたMo-DCを、同種異系の精製CD3 $^{+}$ T細胞(10 5 /ウェル)とともに1:40(n=8)、1:80および1:160(両方ともn=4)DC:T細胞比で5日間、3反復で培養した。[3 H]チミジン(1 μ Ci/

50

ウェル)を培養の最後の16時間に加え、組み込みを - プレートカウンターにより測定した(*はmDCに対して $p < 0.05$; **は $p < 0.01$; ***は $p < 0.001$)。iDCは、非処理の未熟DC。

【図18】C4BP(-)またはFHにより誘導された寛容原性DCは安定な表現型を示す C4BP(-)またはFHで処理し、LPSで成熟させたDCの安定性を、免疫調節剤(C4BP(-)またはFH)を含まない完全培地中、炎症誘発性TNF-(100U/ml)+IFN-(1000U/ml)でさらに24時間誘導を行った後に評価した。DCマーカーCD83(A)およびCD86(B)の蛍光強度中央値(MIF)を総てのDC条件(TNF-+IFN-を含むまたは含まない)について求めた。iDCは、未熟DC;mDCは、非処理のLPS成熟DC;B-5は、C4BP(-)処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟DC;WT5は、C4BP(+)処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟DC;Rec2は、組換えC4BP(-)処理(2 μ g/ml)かつLPS成熟DC;FH5は、FH処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟DC(各群n=6)。

10

【図19】C4BP(-)処理またはFH処理DCで刺激されたTリンパ球によるIFN-の産生および分泌の低下 増殖中のTリンパ球を同種刺激培養から得た。IFN-の産生は、ブレフェルディンの存在下、PMA+イオノマイシンで5時間、細胞を再刺激した後に、細胞内染色により測定した。(A)C4BP(-)またはFHで処理し、LPSで成熟させたDC:T培養からの全T細胞細胞内IFN-産生の結果を、非処理のLPS成熟DC:T培養(100%産生とする)と比較してまとめたもの。(B)自己刺激(CSFE^{1.0}WCD3+細胞)に応答したIFN-産生T細胞のパーセンテージ。各記号は個々のサンプルを表す。iDCは、未熟DC;mDCは、非処理のLPS成熟DC;C4BP(-)またはBは、C4BP(-)処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟DC;WTは、C4BP(+)処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟DC;FHは、FH処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟DC;VitDは、VitD処理かつLPS成熟DC。有意差を示す(mDC/WT:n=3を除き、各群n=4);*は $p < 0.05$;対応のあるt検定)。

20

【図20】C4BP(-)またはFH処理DCは芽細胞T細胞からのCD4+CD25^{hi}CD127^{lo}WFoxP3+誘導を促進する 再刺激もいずれのサイトカイン補給も行わずに培養6日後、細胞サイズをFACSにより、側方散乱(SSC)パラメーターに対して前方散乱(FSC)パラメーターをプロットすることによって評価した(左の列)。CD4+、FoxP3+としてのT細胞の表現型(中央の列)およびCD127発現が低いか無いCD25+(右の列)。4つの代表的な実験のうちの1つを示す。iDCは、未熟DC;mDCは、非処理のLPS成熟DC;Bは、C4BP(-)処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟DC;WTは、C4BP(+)処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟DC;FHは、FH処理(5 μ g/ml)かつLPS成熟DC;VitDは、VitD処理かつLPS成熟DC。

30

【発明を実施するための形態】

【0015】

鎖を欠くC4BPアイソフォームの治療的使用

40

本発明者らは、鎖を欠くC4BPアイソフォームが成熟刺激の存在下での樹状細胞の成熟を阻害することができ、かつ、寛容原性樹状細胞の特徴を示す樹状細胞の生成を促進することができることを見出した。本発明の実施例1~6に示されるように、鎖を欠くC4BPアイソフォームは、ヒトMo-DCの活性化マーカーおよびLPS成熟ヒトMo-DCによる炎症性サイトカインの放出をダウンレギュレートすることができる。さらに、鎖を欠くC4BPアイソフォームは、樹状細胞への曝露に応答して、ヒトMo-DCの形態を改変し、ヒトMo-DCの走化性および同種異系T細胞の増殖を低下させる。

【0016】

さらに、本発明の筆者らは、鎖を欠くC4BPアイソフォームは、T細胞刺激能が低減され、かつ、炎症誘発条件下でTh1の分化を妨げるだけでなく制御性T細胞生成能を

50

有する寛容原性樹状細胞を生成することを見出した。

【0017】

よって、第1の態様において、本発明は、免疫疾患の予防および/または治療において使用するための鎖を欠くC4BPアイソフォームに関する。

【0018】

別の実施態様では、本発明は、免疫疾患の予防および/または治療用薬剤の製造のための、鎖を欠くC4BPアイソフォームの使用に関する。

【0019】

別の面において、本発明は、必要とする対象において免疫疾患を予防および/または治療するための方法であって、前記対象に鎖を欠くC4BPアイソフォームを投与することを含んでなる方法に関する。

10

【0020】

別の面において、本発明は、必要とする対象において寛容原性樹状細胞および/または制御性T細胞集団を増加させるための方法であって、前記対象に鎖を欠くC4BPアイソフォームを投与することを含んでなる方法に関する。

【0021】

別の面において、本発明は、寛容原性樹状細胞および/または制御性T細胞集団の増加において使用するための、鎖を欠くC4BPアイソフォームに関する。

【0022】

本明細書において用語「C4BP」は、C3bおよびC4bのI因子依存性分解の補因子として働き、古典経路C3/C5-コンベルターゼの減衰を加速化する、主として肝臓細胞により合成される、古典経路の調節成分を意味する。C4BPは、3つのアイソフォームとして血漿中を循環しており、その割合はC4BP(70kDa)とC4BP(45kDa)鎖の相対的レベルに依存している。C4BPの主要なアイソフォームは、7本の同一の鎖と1本の鎖(γ_1)から構成されるが、炎症時には通常、鎖のみから構成される希少なアイソフォーム(γ_0)がアップレギュレートされる。さらに、真核細胞での鎖の組換え発現では、6本鎖(γ_0)を含んでなるオリゴマーが生じる。よって、本発明の方法において有用なC4BPアイソフォームには、複数の鎖の会合から生じ、鎖を欠いているいずれのアイソフォームも含まれる。

20

【0023】

当業者ならば、鎖を欠くC4BPアイソフォームは、それらが下記に定義されるように自然界に本来存在しているので(例えば、ヒト、マウス、ラット、またはウシC4BP鎖)、鎖のみから形成されてもよく、または1以上の鎖変異体を含んでもよいことを理解するであろう。例えば、鎖を欠くC4BPアイソフォームは、少なくとも1本、少なくとも2本、少なくとも3本、少なくとも4本、少なくとも5本、少なくとも6本の鎖変異体を含んでもよく(C4BPアイソフォームが γ_0 である場合)、または少なくとも1本、少なくとも2本、少なくとも3本、少なくとも4本、少なくとも5本、少なくとも6本もしくは少なくとも7本の鎖変異体を含んでもよい(C4BPアイソフォームが γ_0 である場合)。

30

【0024】

本明細書において用語「C4BP鎖」は、PRPまたはプロリンリッチタンパク質としても知られ、NCBIデータベース(2011年4月5日公開)で受託番号P04003として定義されるヒトポリペプチドの成熟プロセシング型を意味し、アミノ酸49~597を含んでなる。用語C4BP鎖はまた、ヒトC4BP鎖の相同分子種、例えば、NCBIデータベースに受託番号P08607として示されるポリペプチドの成熟型(アミノ酸57~469)に相当するマウスC4BP鎖、NCBIデータベースに受託番号Q63514として示されるポリペプチドの成熟型(アミノ酸14~558)に相当するラットC4BP鎖、NCBIデータベースに受託番号Q28065として示されるポリペプチドの成熟型(アミノ酸49~610)に相当するウシC4BP鎖を意味して使用される。

40

50

【 0 0 2 5 】

C 4 B P 鎖は、1 - 3 2 - 4 配置でジスルフィド結合した4つのシステイン残基とほとんど不変のトリプトファン残基の周囲に形成された疎水性コアを有する60アミノ酸残基長の8つの補体調節タンパク質ドメイン(CCP)を含む。鎖および鎖両方のC末端伸張部は、それぞれ2個のシステイン残基と、分子の細胞内重合に必要な両親媒性(amphipatic)ヘリックス領域とを含む。

【 0 0 2 6 】

用語「C 4 B P 鎖」はまた、本発明では、1以上のアミノ酸の改変、挿入または欠失から生じ、かつ、他のC 4 B P 鎖またはその変異体とオリゴマーを形成する能力を実質的に保持している、上記で定義される天然型C 4 B P 鎖のいずれの変異体も意味して使用される。変異体がオリゴマーを形成することができるかどうかを判定する方法は当業者に利用可能であり、例えば、Blom et al. (J. Biol. Chem. 2001, 276: 27136-27144)により記載されているような、真核細胞(例えば、293細胞)で変異体鎖を組換え発現させた後、欠失されていないCCP領域の1つに特異的な抗体を用いてアフィニティー精製することにより得られた精製C 4 B Pの、非変性条件下でのポリアクリルアミド(polyacrylamide)ゲル電気泳動による分析に基づく方法が含まれる。

【 0 0 2 7 】

本発明に従って使用するためのC 4 B P 鎖変異体としては、限定されるものではないが、以下のものが含まれる。

【 0 0 2 8 】

- 天然型多型変異体(すなわち、対立遺伝子)ならびに組換え的に操作または工作された鎖変異体。本発明に従った使用に好適な変異体C 4 B P 鎖としては、限定されるものではないが、上記で定義される天然型C 4 B P 鎖ポリペプチドと、特に、ヒト起源の天然型C 4 B P 鎖と、少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、少なくとも50%の同一性を有するポリペプチドが含まれる。

【 0 0 2 9 】

上記で示されるアミノ酸配列に対する、C 4 B P 鎖変異体のアミノ酸配列の同一性パーセントは、配列比較により、当業者によって容易に決定することができる。本明細書において、2つのアミノ酸配列は、最大の一致が得られるようにアラインした場合にその2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基が同じであれば、100パーセントのアミノ酸配列同一性を有する。ポリペプチドおよびポリヌクレオチド(例えば、本明細書に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド)の配列比較は、当業者に周知のコンピュータアルゴリズムを用いるものなど、いずれの方法を用いてもよい。このようなアルゴリズムには、AlignまたはBLASTアルゴリズム(例えば、Altschul, J. Mol. Biol. 219:555-565, 1991; Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919, 1992参照)が含まれ、これらはNCBIウェブサイト([オンライン]インターネットncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST参照)で利用可能である。デフォルトパラメーターを使用することができる。さらに、LASERGENEバイオインフォマティクスコンピューティングスーツ(DNASTAR, Inc., Madison, Wis.); CLUSTALWプログラム(Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22:4673-80 (1991)); および「GeneDoc」(Nicholas et al., EMBNEW News 4:14 (1991))に含まれているものなどの標準的なソフトウェアプログラムが利用可能である。最適アラインメントを決定することにより2つのアミノ酸配列を比較する他の方法も当業者により実施されている(例えば、Peruski and Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997); Wu et al. (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," in Methods in Gene Biotechnology, pages 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); およびBishop (ed.), Guide to Human Genome Co

10

20

30

40

50

mputing, 2nd Ed. (Academic Press, Inc. 1998)参照)。

【0030】

- C C P 6 領域が保持されている限り、C C P 領域のうちの少なくとも1つを欠く欠突然変異体(実施例7参照)、例えば、C C P 1ドメインを欠く、C C P 2ドメインを欠く、C C P 3ドメインを欠く、C C P 4ドメインを欠く、C C P 5ドメインを欠く、C C P 7ドメインを欠く、および/またはC C P 8ドメインを欠く突然変異体。

【0031】

- C 4 B P 鎖を含んでなる第1の領域と、C 4 B P 鎖の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる第2の領域とを含んでなる融合タンパク質。本発明の融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、(a) C C P 6ドメインを含んでなる領域、および(b) C 4 B P 鎖の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる領域を含んでなり得る。あるいは、本発明の融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、(a) C 4 B P 鎖の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる領域、および(b) C C P 6ドメインを含んでなる領域を含んでなり得る。薬物動態特性を改善する融合タンパク質の例としては、限定されるものではないが、ヒトアルブミン、免疫グロブリンFc領域、Fcドメイン、ポリG l uまたはポリA s p配列、フェリチンおよびトランスフェリンとの融合が含まれる。さらに、アミノ酸P r o、A l a、およびS e rから構成される立体障害ポリペプチド配列との融合(「P A S y l a t i o n」)またはヒドロキシエチルデンプンとの融合(H E S y l a t i o n(登録商標))は、C-ペプチドの流体力学的体積を増す簡単な方法を提供する。この付加的伸張部は嵩高のランダム構造を採り、結果として得られる融合タンパク質のサイズを著しく大きくする。好ましい実施態様では、このC 4 B P 鎖の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる領域は、免疫グロブリンFc領域である。

【0032】

本明細書において、用語「免疫グロブリンFc領域」は、免疫グロブリン鎖定常領域の、好ましくは免疫グロブリン重鎖定常領域の、カルボキシル末端部分、またはその一部を意味すると理解される。例えば、免疫グロブリンFc領域は、1) C H 1ドメイン、C H 2ドメイン、およびC H 3ドメイン、2) C H 1ドメインおよびC H 2ドメイン、3) C H 1ドメインおよびC H 3ドメイン、4) C H 2ドメインおよびC H 3ドメイン、または5) 2以上のC Hドメインの組合せと、免疫グロブリンヒンジ領域とを含んでなり得る。本発明の融合タンパク質の免疫グロブリンFc領域は、好ましくは、I g G、I g M、I g A、I g D、I g E、さらに好ましくは、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、I g A 2、s I g A、より好ましくは、I g G 2またはI g G 4、最も好ましくは、I g G 2から選択されるアイソタイプの免疫グロブリンのFcまたはFcの一部を含んでなる、またはからなる。

【0033】

本明細書において用語「免疫疾患」は、自然免疫系または適応免疫系、ならびに体液性免疫系または細胞性(cell branch)免疫系を含め、免疫系の望ましくない活性化により引き起こされるいずれの疾患も意味する。

【0034】

好ましい実施形態では、免疫疾患は、免疫炎症性疾患、敗血症、自己免疫疾患、移植拒絶、移植片対宿主病および過敏性疾患からなる群から選択される。

【0035】

本明細書において用語「免疫炎症性疾患」とは、免疫細胞および/またはサイトカインが疾患または障害の病態生理学に関与する、炎症性疾患および障害を意味する。免疫炎症性疾患の例としては、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、骨関節炎、急性呼吸窮迫症候群および喘息などの病態が含まれる。免疫炎症性疾患という用語には、急性および慢性両方の炎症疾患が含まれる。用語「急性炎症性障害」は、炎症性応答を伴う症状の急性発症および比較的短期間の症状を特徴とする障害、および障害のエピソードを含むことを意図し、「慢性炎症疾患」は、炎症性応答を伴う症状の持続的存在および症状の進行期間を特

10

20

30

40

50

徴とする障害を含むことを意図する。本発明による方法で処置可能な免疫炎症性疾患としては、限定されるものではないが、梗塞または卒中などの心血管疾患、アテローム性動脈硬化症、肺線維症、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、骨関節炎、急性呼吸窮迫症候群、喘息、および癌が含まれる。また、本発明に従って処置可能な免疫炎症性疾患の範囲内に含まれるものとしては、子癩前症および子癩などの妊娠中に現れる疾患が含まれる。子癩前症は、高血圧、蛋白尿および浮腫を特徴とする妊娠関連疾患である。子癩前症は、本明細書では、胎盤機能不全、子宮内胎児発育遅延、早期流産、早産、子宮内死および子癩を含む、ある範囲の子癩前症障害を包含し、前記範囲内にあると理解され、また、そのように定義されるべきである。

【0036】

本明細書において用語「敗血症」は、感染の原発部位から離れた末端器官の機能不全を特徴とする、それまでは無菌の組織における、微生物に対する全身性宿主応答を意味する。敗血症として認定するためには、感染、または感染に特徴的な臨床症候群が疑われ、または証明されなければならない（培養、染色またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による）。感染の特定のエビデンスとしては、通常は無菌の流体（例えば、尿または脳脊髄液（CSF））中のWBC、内臓穿孔のエビデンス（腹部X線またはCTスキャンでの遊離ガス、急性腹膜炎の徴候）、肺炎と一致する異常な胸部X線（CXR）（局部的混濁化を伴う）、または点状出血、紫斑病、もしくは電撃性紫斑病が含まれる。敗血症のより重大なサブセットは、重症敗血症（急性臓器不全を伴う敗血症）および敗血性ショック（難治性動脈性低血圧症を伴う敗血症）である。別法として、全身性炎症性応答症候群判定基準の2つ以上が感染のエビデンスを用いずに満たされた場合に、患者は簡単に「SIRS」を有すると診断することができる。SIRSおよび急性臓器不全を有する患者は「重症SIRS」と呼ぶことができる。患者が敗血症と全身性低灌流の徴候（すなわち、末端臓器不全または4 mmol/dLを超える血清乳酸のいずれか）を持てば、その患者は「重症敗血症」を有すると定義される。他の徴候としては、乏尿症および精神状態の変化が含まれる。患者が敗血症と急速輸液蘇生（一般に6リットルまたは晶質40 ml/kgを超える）後の低血圧症を持てば、その患者は敗血性ショックを有すると定義される。末端臓器不全の例としては、急性肺損傷もしくは急性呼吸窮迫症候群、脳症、または肝臓に影響を及ぼす機能不全（タンパク質合成機能および代謝機能の破綻）、腎臓（乏尿症および無尿、電解質異常、容量過負荷）、および心臓（収縮期および拡張期心不全）が含まれる。

【0037】

本発明による組成物で処置することができる好適な敗血症病態としては、限定されるものではないが、重症敗血症、敗血性ショックが含まれる。一実施態様において、敗血症症候群に関連する病態は、臓器不全、好ましくは、腎不全または肝不全、多臓器不全症候群（MODS）、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、および播種性血管内凝固（DIC）からなる群から選択される。

【0038】

敗血症は、グラム陰性菌およびグラム陽性細菌からなる群から選択される1種の細菌または2種以上の細菌により誘発され得る。好ましくは(Preferrably)、グラム陰性菌は、大腸菌(*Escherichia coli*)、クレブシエラ(*Klebsiella*)種、セラチア (*Serratia*) 種、エンテロバクター(*Enterobacter*)種、プロテウス(*Proteus*)種、緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)、ナイセリア(*Neisseria*)種、およびリステリア(*Listeria*)種からなる群から選択される。あるいは、グラム陽性菌は、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、コアグラールゼ陰性ブドウ球菌(*Staphylococci*)、腸球菌(*Enterococcus*)種、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、および緑色連鎖球菌(*Streptococcus viridans*) からなる群から選択される。一実施態様において、敗血症症候群はLPSにより誘導される。さらに別の実施態様において、敗血症は、好気性細菌、真菌、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマ、スピロヘータ、およびウイルスからなる群から選択される1種の微生物または2種以上の微生物により誘発され得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

用語「自己免疫疾患」、「免疫不全／調節不全に関連する疾患」または「免疫炎症性疾患」は、本明細書を通して、患者の免疫系が自己抗原（自己免疫）または外来抗原（免疫不全／調節不全または免疫炎症性疾患）から疾患を生じる病態を意味して用いられる。自己免疫は誰にも、ある程度存在する。自己免疫は通常は無害であり、おそらく脊椎動物の生命に普遍的な現象である。しかしながら、自己免疫は、自己免疫疾患として知られる広範囲のヒト疾病の原因となり得る。ヒト疾病の原因としてのこの自己免疫の概念は比較的新しく、1950年代および1960年代まで、医学的考察の主流には受け入れられていなかった。よって、自己免疫疾患は、良性自己免疫から病的自己免疫へと進行が起こる場合に定義される。この進行は、遺伝的影響と環境的誘因の両方によって決定される。このヒト疾病の実際の原因（結果や無害な付随物ではなく）としての自己免疫の概念は、ある疾患を自己免疫疾患と定義する判定基準の確立に使用することができる。本発明により処置可能な自己免疫疾患または免疫不全もしくは調節不全を含むことを特徴とする疾患（免疫炎症性疾患）としては、他の多くの中でも、全身性紅斑性狼瘡(systemic lupus erythematosus) (SLE)、糖尿病(I型)、喘息、潰瘍性大腸炎、グレーブス病、関節炎(関節リウマチおよび骨関節炎を含む)、悪性貧血、および多発性硬化症が挙げられる。中でも、悪性貧血、自己免疫性溶血性貧血、再生不良性貧血、特発性血小板減少性紫斑病、強直性脊椎炎を含む、自己免疫血液疾患；多発性筋炎および皮膚筋炎を含む、筋肉組織の自己免疫疾患；自己免疫性難聴およびメニエール症候群を含む、耳の自己免疫疾患；モーレン病、ライター症候群およびフォークト-小柳-原田病を含む、自己免疫性眼疾患；糸球体腎炎およびIgA腎症を含む、腎臓の自己免疫疾患；糖尿病(I型)；尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、紅斑性天疱瘡、水疱性類天疱瘡、白斑、後天性表皮水疱症、乾癬および円形脱毛症などの天疱瘡(自己免疫性水疱症)を含む、自己免疫性皮膚疾患；自己免疫性心筋炎、チャージ-ストラウス症候群、巨大細胞動脈炎、川崎病、結節性多発性動脈炎、高安動脈炎およびウエグナー肉芽腫を含む血管炎を含む、心血管自己免疫疾患；アジソン病、自己免疫性上皮小体機能低下症、自己免疫性下垂体炎、自己免疫性卵巣炎、自己免疫性睾丸炎、グレーブス病、橋本甲状腺炎、1型多腺性自己免疫症候群(PAS-I)、2型多腺性自己免疫症候群(PAS-2)、および3型多腺性自己免疫症候群3(PAS-3)を含む内分泌自己免疫疾患；自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、炎症性腸疾患、セリアック病、クローン病を含む、自己免疫性胃腸疾患；多発性硬化症、重症筋無力症、ギラン-バレー症候群および慢性炎症性脱髄神経障害を含む、自己免疫性神経疾患；ならびに全身性紅斑性狼瘡、抗リン脂質抗体症候群、自己免疫性リンパ増殖性疾患、自己免疫性多腺性内分泌障害、ベーチェット病、グッドパスチャー病、関節炎(arthritis)(関節リウマチ、骨関節炎および敗血性関節炎を含む)、サルコイドーシス、硬皮症およびシェーグレン症候群および乾癬を含む、全身性自己免疫疾患といった、多くの自己免疫疾患が本発明の方法を用いて処置可能である。

10

20

30

【 0 0 4 0 】

本明細書において「移植拒絶」という表現は、移植された細胞、組織または臓器が移植レシピエントの身体に受け入れられない免疫病態を意味する。移植拒絶という表現には、急性および慢性両方の移植拒絶を包含する。

40

【 0 0 4 1 】

「急性拒絶またはAR」は、移植された組織が免疫学的に外来である場合の、組織移植レシピエントの免疫系による拒絶である。急性拒絶は、レシピエントの免疫細胞による移植組織の浸潤を特徴とし、これらの免疫細胞はそれらのエフェクター機能を遂行し、移植組織を破壊する。急性拒絶の発生は急速であり、一般にヒトでは移植手術の後、数週間のうち起こる。

【 0 0 4 2 】

「慢性移植拒絶またはCR」は一般にヒトでは、急性拒絶の免疫抑制が成功していたとしても、数か月～数年のうち起こる。線維症は、総ての種類臓器移植の慢性拒絶において共通の因子である。慢性拒絶は一般に、特定の臓器に特徴的な一定の範囲の具体的障

50

害によって表すことができる。例えば、肺移植では、このような障害として気道の線維増殖性破壊（閉塞性細気管支炎）を含み；心臓移植、または弁置換などの心臓組織の移植では、このような障害として線維性アテローム性動脈硬化症を含み；腎臓移植では、このような障害として閉塞性腎症、腎硬化症、尿細管間質性腎症を含み；肝臓移植では、このような障害として胆管消失症候群を含む。慢性拒絶はまた、虚血発作、移植組織の除神経、高脂血症および免疫抑制薬に関連する高血圧症も特徴とし得る。

【0043】

移植分野で知られているように、移植器官、組織または細胞は同種異系または異種の場合があり、この場合、移植片は同種異系移植片または異種移植片であり得る。対象の方法により検出または特定された移植寛容原性表現型の特徴は、それが免疫抑制療法を行わない場合に生じる表現型であるということ、すなわち、それは免疫抑制療法を受けていない宿主に存在し、従って、免疫抑制剤はその宿主に投与されていないというものである。移植片はいずれの固形臓器および皮膚移植片であってもよい。本発明に記載の方法により分析可能な臓器移植の例としては、限定されるものではないが、腎臓移植、膵臓移植、肝臓移植、心臓移植、肺移植、腸移植、腎臓後膵臓移植、および膵臓 - 腎臓同時移植が含まれる。

【0044】

本発明による方法はまた、虚血 - 再灌流傷害による移植後腎機能発現遅延（DGF）の予防および/または治療にも好適である。本明細書において用語「移植後腎機能発現遅延」は、移植後乏尿症、同種異系移植免疫原性および急性拒絶エピソードリスクの増大、ならびに長期生存の低下をもたらす急性腎不全の一形態を意味する。DGFは、ドナーに関連する様々な因子、およびレシピエントに関連する腎前性、腎性、または腎後性移植因子によって引き起こされ得る。しかしながら、移植後腎機能発現遅延の主要な原因は、虚血、および低温保存後の虚血障害を受けた腎臓における血流の再開である。

【0045】

本明細書において用語「移植片対宿主病」またはGVHDは、ドナー組織中に存在するT細胞が宿主、またはその移植細胞もしくは組織のレシピエントを攻撃する場合に起こる病態を意味する。急性GVHDおよび慢性GVHDを含め、いずれのタイプのGVHDも、本発明の治療薬により処置することができる。

【0046】

用語「過敏性疾患」は、対象がアレルゲンとして知られる無害な因子に異常な感受性を有する場合の病態を意味する。過敏性疾患は、I型、II型、III型およびIV型の4つのタイプに分類することができる。I型は、IgE感作好塩基球および肥満細胞からのメディエーターの放出によって起こるアトピーまたはアナフィラキシー型とされている。II型は、細胞溶解性または抗体依存性細胞傷害性(antibody-dependent cellular cytotoxicity)を有する補体結合抗体を含む細胞傷害型とされている。III型は、可溶性抗原抗体複合体に関連する免疫複合体媒介型とされている。IV型は、抗原との接触後の感作Tリンパ球によるリンホカインの放出によって起こる細胞媒介型または遅延型過敏症とされている。

【0047】

免疫疾患の予防および/または治療は、寛容原性樹状細胞および/または制御性T細胞集団を増加させることによって達成される。

【0048】

「寛容原性樹状細胞集団を増加させる」という表現は、鎖を欠くC4BPアイソフォームの投与が、非処置対象に比べて寛容原性樹状細胞の数の増加をもたらすことを意味すると理解される。寛容原性樹状細胞集団は、非処置対象の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加される。鎖を欠くC4BPアイソフォームの、寛容原性樹状細胞集団を増加させる能力は、例えば実施例1~5に記載のように決定することができる。

【0049】

本明細書において「制御性T細胞集団を増加させる」という表現は、鎖を欠くC4BPアイソフォームが、非処置対象に比べて制御性T細胞の数の増加をもたらすことを意味する。制御性T細胞集団は、非処置対象の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加される。鎖を欠くC4BPアイソフォームの、制御性T細胞集団を増加させる能力は、例えば実施例17に記載のように決定することができる。

【0050】

免疫学的に活性なC4BP鎖変異体およびペプチド

本発明の筆者らは、C4BP鎖の、単離されたCCP6ドメインが樹状細胞の成熟の阻害に必要な領域であること、ならびにC4BP鎖のCCP6ドメインに由来する特定のポリペプチドが、樹状細胞の成熟の阻害および前記細胞による寛容原性表現型の獲得の促進における、鎖を欠くC4BPアイソフォームの効果を再現できることを確認した。

10

【0051】

よって、別の面において、本発明は、C4BP鎖のCCP6ドメインを含んでなるポリペプチド、その機能的に等価な変異体に関し、この場合、前記ポリペプチドは全長C4BP鎖ではない。本明細書において用語「CCPドメイン」は、C4BP鎖に見られる補体制御ドメインの1つを意味する。CCPは、1-3 2-4配置でジスルフィド結合した4つのシステイン残基とほとんど不変のトリプトファン残基の周囲に形成された疎水性コアを含んでなる60アミノ酸残基長である。CCP6は、NCBIデータベースに受託番号P04003として示される配列中に定義されるヒトC4BP鎖に対してアミノ酸363~424の間に見られる領域に相当し(配列番号1)、これは下記配列に相当する。

20

【化1】

LCCPEPKLNN GEITQHRKCR PANHCVYFYG DEISFSCHET CRFSAICQGD
GTWSPRTPSC GD (配列番号1)

【0052】

好ましくは、CCP6ドメインを含んでなるポリペプチドは、C4BPとは異なるタンパク質の領域を含まない。別の実施態様では、C4BP鎖のCCP6ドメインを含んでなるポリペプチドは、C4BP鎖の少なくともCCP1ドメイン、少なくともCCP2ドメイン、少なくともCCP3ドメイン、少なくともCCP4ドメイン、少なくともCCP5ドメイン、少なくともCCP7ドメインおよび/または少なくともCCP8ドメインを欠く。さらにより好ましい実施態様では、C4BP鎖のCCP6ドメインを含んでなるポリペプチドは、C4BP鎖に見られる他のいずれのCCPドメインも含まない。本発明に従って使用するためのC4BP鎖のCCP6ドメインを含んでなる好適なポリペプチドには、限定されるものではないが、

30

- C4BP鎖のCCP5、CCP6およびCCP7ドメインを含んでなるポリペプチド、

40

- C4BP鎖のCCP5、CCP6およびCCP7ドメインを含んでなるが、C4BP鎖に見られる他のいずれか1以上のCCPドメインを欠く、特に、CCP8を欠く、ポリペプチド、

- C4BP鎖のCCP5、CCP6およびCCP7ドメインを含んでなり、C4BPとは異なるタンパク質の領域を含まない、ポリペプチドが含まれる。

【0053】

用語「機能的に等価な変異体」とは、C4BP鎖のCCP6ドメインを含んでなるポリペプチドに関して、1以上のアミノ酸の挿入、欠失または置換によりそのポリペプチ

50

ドから誘導され、かつ、元のポリペプチドの機能活性を実質的に保持する配列を有するいずれのポリペプチドも意味する。本発明の範囲内に包含される好適な変異体としては、ヒトCCP6ドメインと少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも92%、少なくとも91%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%またはそれより低い同一性を示すCCP6ドメインの変異体を含んでなるポリペプチドが含まれる。2つのポリペプチドの同一性を決定する好適な方法は、上記に詳細に定義されている。好ましい実施態様では、変異体は、1以上のシステイン残基のセリンによる置換を含む。本明細書において「元のポリペプチドの機能活性を実質的に保持する」という表現は、例えば本発明の実施例1~5に示されるように決定される、樹状細胞の成熟を阻害し得るポリペプチドを意味する。よって、ポリペプチドは、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ アイソフォーム、特に、 C_7B_0 または C_6B_0 アイソフォームの活性の少なくとも100%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%または少なくとも50%を示す場合に、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ アイソフォームと機能的に等価であると見なされる。

10

【0054】

例えば、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖のCCP6ドメインを含んでなるポリペプチドの機能的に等価な変異体は、受容体に対する親和性の調節、循環半減期の調節、治療半減期の調節、ポリペプチドの安定性の調節、プロテアーゼによる切断の調節、用量の調節、放出もしくはバイオアベイラビリティの調節、精製の助長、または特定の投与経路の改善もしくは変更を目的に改変することができる。同様に、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖のCCP6ドメインを含んでなるポリペプチドの変異体は、プロテアーゼ切断配列、反応性基、抗体結合ドメイン（限定されるものではないが、FLAGまたはポリ-Hisを含む）または他の親和性に基づく配列（限定されるものではないが、FLAG、ポリ-His、GSTなどを含む）または検出（限定されるものではないが、GFPを含む）、精製もしくは前記ポリペプチドの他の性質を改善する連結分子（限定されるものではないが、ビオチンを含む）を含んでなってもよい。

20

【0055】

別の実施態様では、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖のCCP6ドメインを含んでなるポリペプチドの機能的に等価な変異体は、CCP6ドメインを含んでなる第1の領域と、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる第2の領域とを含んでなる融合タンパク質である。本発明の融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、(a) CCP6ドメインを含んでなる領域、および(b) $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる領域を含んでなり得る。あるいは、本発明の融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、(a) $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる領域、および(b) CCP6ドメインを含んでなる領域を含んでなり得る。好ましくは、融合タンパク質の一部を形成し、かつ、CCP6ドメインを含んでなるポリペプチドは、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖の少なくともCCP1ドメイン、少なくともCCP2ドメイン、少なくともCCP3ドメイン、少なくともCCP4ドメイン、少なくともCCP5ドメイン、少なくともCCP7ドメインおよび/または少なくともCCP8ドメインを欠く。さらにより好ましい実施態様では、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖のCCP6ドメインを含んでなるポリペプチドは、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖に見られる他のいずれのCCPドメインも含まない。本発明による融合タンパク質において使用するための $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖のCCP6ドメインを含んでなる好適なポリペプチドには、限定されるものではないが、

30

- $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖のCCP5、CCP6およびCCP7ドメインを含んでなるポリペプチド、

40

- $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖のCCP5、CCP6およびCCP7ドメインを含んでなるが、 $\text{C}_4\text{B}_1\text{P}$ 鎖に見られる他のいずれか1以上のCCPドメインを欠く、特に、CCP8を欠く

50

、ポリペプチド
が含まれる。

【0056】

好ましい実施態様では、本発明のポリペプチドは、C4BPとは異なるタンパク質の領域を含まない。例えば、本発明のポリペプチドは、C4BPとは異なるタンパク質の一部を形成する領域を含んでなる融合タンパク質とはなり得ない。

【0057】

発明者らは、1以上のシステイン残基がセリンで置換されたC4BP鎖のCCP6ドメインの断片は、元のポリペプチドの機能活性を実質的に保持していることを見出した。具体的には、本発明の筆者らは、配列番号2、3、4および5の4つのペプチドを合成した。

10

【0058】

さらに別の面では、本発明は、配列番号2、3、4および5からなる群から選択される配列を有するペプチドまたはその機能的に等価な変異体に関する(表I参照)。

【0059】

【表1】

ペプチド	配列	配列番号
PS6-01	LSSPEPKL NNGEITQHRK SRPANHSVYF YG	2
PS6-02	HRK SRPANHSVYF YGDEISFSSH ETSRFSFA	3
PS6-03	EISFSSH ETSRFSAISQ GDGTWSPRTP SSG	4
PS6-04	ITQHRK SRPANHSV	5

20

表I. CCP6ドメインから誘導したペプチド

【0060】

好ましい実施形態では、ペプチドは配列番号5である。

【0061】

本明細書において用語「ペプチド」は、ペプチド結合で互いに連結された2~40アミノ酸前後の直鎖に関する。

30

【0062】

本発明のペプチドの機能的に等価な変異体には、限定されるものではないが、上述のペプチドの1以上の(one of more)アミノ酸の挿入、欠失または置換により改変されたペプチド、ならびにペプチドの活性を実質的に維持するそのペプチド模倣物が含まれる。所与のポリペプチドまたはペプチドが単離されたCCP6ポリペプチド(配列番号1)の、または配列番号2~5のポリペプチドの、機能的に等価な変異体と見なせるかどうかを決定するのに十分な方法としては、例えば、本発明の実施例8で示されるアッセイが含まれ、この場合、ペプチドは、未熟樹状細胞への分化段階に単球細胞に加えた場合、および/または成熟樹状細胞への成熟段階に未熟樹状細胞に加えた場合に、寛容原性樹状細胞生成能を示せば、鎖を欠くC4BPアイソフォームの変異体と見なされる。変異体の、寛容原性樹状細胞の生成を促進する能力は、変異体の存在下で成熟させた樹状細胞の成熟マーカー(例えば、CD83、CD14および/またはCD1a)の、樹状細胞における発現レベルを測定することによって決定することができる(本発明の実施例1および2)。よって、ペプチドは、鎖を欠くC4BPアイソフォーム、特に、70または60の活性の少なくとも100%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%または少なくとも50%を示せば、鎖を欠くC4BPアイソフォームと機能的に等価と見なすことができる。

40

【0063】

50

本発明における使用に好適な、単離されたCCP6ポリペプチド（配列番号1）の、または配列番号2～5のポリペプチドの機能的に等価な変異体には、限定されるものではないが、以下のものが含まれる。

【0064】

・アシル化、アミド化、エステル化誘導体などを含む、上記ペプチドのいずれかの誘導体化から生じるペプチド。

【0065】

・置換（例えば、保存的アミノ酸置換）および/または挿入（例えば、小さな単一のアミノ酸の挿入、または2、3、4、5、10、15、20もしくはそれを超える連続するアミノ酸を包含する挿入）および/または欠失（例えば、小さな単一のアミノ酸の欠失、または2、3、4、5、10、15、20もしくはそれを超える連続するアミノ酸を包含する欠失）による、上記ペプチドのいずれかの改変から生じるペプチド。よって、特定の実施態様では、天然ペプチド配列の変異体は、(i) 1以上の（例えば、2、3、4、5、6、またはそれを超える）保存的アミノ酸置換、(ii) 1以上の（例えば、2、3、4、5、6、またはそれを超える）アミノ酸の欠失、または(iii) それらの組合せによって、天然に存在する配列とは異なるものである。欠失または挿入されるアミノ酸は、連続であっても不連続であってもよい。

【0066】

このような変異を作出するに当たっては、アミノ酸のヒドロパシーインデックスが考慮されるが、これは、あるアミノ酸は類似のヒドロパシーインデックスまたはスコアを有する他のアミノ酸で置換することができ、その結果、類似の生物活性を有するポリペプチドが得られるということが知られているからである。例えば、アミノ酸残基の相対的ヒドロパシー特性は得られるポリペプチドの二次構造および三次構造に影響を及ぼし、そして、そのポリペプチドと他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、抗体、抗原などの相互作用を規定する。上記で概説したように、アミノ酸置換は一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。前述の様々な特徴を考慮に入れた例示的置換は当業者に周知であり、下表2に示す。

【0067】

【表2】

アミノ酸置換			
元の残基	例示的残基置換	元の残基	例示的残基置換
Ala	Gly;Ser	Ile	Leu;Val
Arg	Lys	Leu	Ile;Val
Asn	Gln;His	Lys	Arg
Asp	Glu	Met	Leu;Tyr
Cys	Ser	Ser	Thr
Gln	Asn	Thr	Ser
Glu	Asp	Trp	Tyr
Gly	Ala	Tyr	Trp
His	Asn;Gln	Val	Ile;Leu

表2. アミノ酸置換

【0068】

好ましい実施態様では、ペプチドは、1以上のセリン残基をシステインで置換することにより改変される。

【0069】

- 上記のいずれかの配列を有するが、様々な既知の化学基または分子のいずれかを含むように改変されているペプチド。このような改変には、限定されるものではないが、グリコシル化、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ポリエチレングリコールとの共有結合（例えば、ペグ化）、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol)の共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタミン酸の形成、ホルミル化、カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカーの形成、水酸化、アシル化、アミド化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解性プロセシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、ユビキチン化、脂肪酸による修飾、アルギニン化などのトランスファー-RNAにより媒介されるタンパク質へのアミノ酸付加などが含まれる。アミノ酸の類似体（非天然アミノ酸を含む）および置換連結を有するペプチドも含まれる。

【0070】

- 上記ペプチドのペプチド模倣物。「ペプチド模倣物(peptide mimetic or peptidomimetic)」とは、得られる分子が所望のポリペプチド二次（または局部的に三次）構造要素を模倣するまたはそれと似ている限り、様々なタイプまたはクラスを意味する。例えば、ペプチド模倣物は、アミド結合等価体の使用および/または天然ペプチド主鎖の修飾（鎖伸張またはヘテロ原子の組み込みを含む）によりペプチドの二次構造を模倣するオリゴマーであり、その例としては、アザペプチド、オリゴカルバミン酸、オリゴ尿素、ペプチド、ペプチド、オリゴ（フェニレンエチニレン）、ビニローグ性スルホノペプチド、ポリ-N-置換グリシン（ペプトイド）などが挙げられる。ペプチド模倣物を設計および合成するための方法は、当業者に周知である。特定の実施態様では、プロテアーゼ感受性を克服するため、二次構造を安定化させるため、および/または天然型CCP6ペプチド類似体よりもバイオアベイラビリティを改善するためにペプチド模倣物を使用することが企図される。特定の実施態様では、本発明のペプチド模倣物は、リバースターン模倣物、例えば、ターン模倣物、単環式ターン模倣物、二環式ターン模倣物、ターン模倣物または単環式ターン模倣物である。

【0071】

本発明のポリヌクレオチド、ベクターおよび宿主細胞

本発明は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた提供する。よって、別の面において、本発明は、C4BP鎖のCCP6ドメインを含んでなるポリペプチドまたはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドに関し、この場合、前記ポリペプチドは全長C4BP鎖ではなく、かつ、前記ポリペプチドは、C4BPとは異なるタンパク質の領域を含まない。

【0072】

本発明はまた、配列番号2、3、4および5からなる群から選択される配列を有するペプチドまたはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0073】

用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」は、任意の長さの、ポリマー形態のヌクレオチドを意味して互換的に使用される。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、および/またはそれらの類似体を含み得る。ヌクレオチドはいずれの三次元構造を有してもよく、既知または未知のいずれかの機能を遂行し得る。用語「ポリヌクレオチド」には、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、mRNA、tRNA、rRNA、リボザイム、cDNA、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

10

20

30

40

50

一、任意の配列の単離されたDNA、任意の配列の単離されたRNA、核酸プローブ、およびプライマーが含まれる。天然核酸分子の他、本発明の核酸分子はまた、修飾核酸分子を含んでなってもよい。本明細書において、mRNAは、細胞内で翻訳され得るRNAを意味する。

【0074】

本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドをコードする領域の転写を調節する単一のプロモーター領域をさらに含んでなってもよい(ただし、前記プロモーターは本ポリペプチドが発現される細胞内で適合すること)。本発明のポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドは、それ自体単離された形で、または好適な宿主細胞内で前記ポリヌクレオチドの増幅を可能とするベクターの一部を形成して見出すことができる。前記ポリヌクレオチドの挿入に好適なベクターは、原核生物の発現ベクター、例えば、pUC18、pUC19、Bluescriptおよびその誘導体、mp18、mp19、pBR322、pMB9、Co1E1、pCR1、RP4、ファージおよび「シャトル」ベクター(例えば、pSA3およびpAT28);酵母の発現ベクター、例えば、2ミクロンプラスミド、組み込みプラスミド、YEPベクター、セントロメアプラスミドなどのタイプのベクター;昆虫細胞の発現ベクター、例えば、pAC系のベクターおよびpVLのベクター;植物の発現ベクター、例えば、pIBI、pEarleyGate、pAVA、pCAMBIA、pGSA、pGWB、pMDC、pMY、pORE系など;ならびに任意の市販のパキウイルス系を用いて昆虫細胞をトランスフェクトするのに好適なパキウイルスを含む真核細胞の発現ベクターに由来するベクターである。真核細胞用のベクターとしては、好ましくは、ウイルスベクター(アデノウイルス、アデノウイルスに随伴するウイルス、レトロウイルス、特に、レンチウイルス)ならびに非ウイルスベクター、例えば、pSilencer 4.1-CMV(Ambion)、pcDNA3、pcDNA3.1/hyg、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEFI/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pトレーサー-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、pZeoSV2、pCI、pSVLおよびPKSV-10、pBPV-1、pML2dおよびpTDT1が含まれる。

【0075】

これらのベクターはまた、ベクターと接触させた後にベクターが組み込まれた細胞の同定を可能とするリポーターまたはマーカー遺伝子も含んでなってもよい。本発明に関して有用なリポーター遺伝子としては、lacZ、ルシフェラーゼ、チミジンキナーゼ、GFPなどが含まれる。本発明に関して有用なマーカー遺伝子としては、例えば、アミノグリコシドG418に対する耐性を付与するネオマイシン耐性遺伝子;ハイグロマイシンに対する耐性を付与するハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ遺伝子;オルニチンデカルボキシラーゼ(2-(ジフルオロメチル)-DL-オルニチン(DFMO)の阻害剤に対する耐性を付与するODC遺伝子;メトトレキサートに対する耐性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子;ピユーロマイシンに対する耐性を付与するピユーロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ遺伝子;ゼオシンに対する耐性を付与するble遺伝子;9-D-キシロフラノースアデニンに対する耐性を付与するアデノシンデアミナーゼ遺伝子;N-(ホスホンアセチル)-L-アスパラギン酸の存在下で細胞の成長を可能とするシトシンデアミナーゼ遺伝子;アミノプテリンの存在下で細胞の成長を可能とするチミジンキナーゼ;キサンチンの存在下およびグアニンの不在下で細胞の成長を可能とするキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子;トリプトファンに代わりにインドールの存在下で細胞の成長を可能とする大腸菌のtrpB遺伝子;細胞にヒスチジンの代わりにヒスチジノールを使用させる大腸菌のhisD遺伝子が含まれる。選択遺伝子はプラスミドに組み込まれるが、このプラスミドは、真核細胞における前記遺伝子の発現に好適なプロモーター(例えば、CMVまたはSV40プロモーター)、最適化された翻訳開始部位(例えば、いわゆるコザックルールに従った部位またはIRES)、ポリアデニル化(例えば、SV40ポリアデニル化またはホスホグリセリン酸キナーゼ部位)、イントロン(例えば、-グロブリン遺伝子イントロン)が含まれる。あるいは、リ

10

20

30

40

50

ポーター遺伝子およびマーカ遺伝子の両方の組合せを同じベクターで同時に使用することもできる。本発明では、本発明によるポリヌクレオチドが作動可能に連結できるプロモーターおよびクロニング部位の両方を含むベクターも提供される。このようなベクターは *in vitro* または *in vivo* で RNA を転写することができる。発現および/または *in vitro* 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、余分な、潜在的に不適当な選択的翻訳開始コドン、または転写もしくは翻訳のいずれかのレベルで発現を妨げ得るもしくは低下させ得るその他の配列を除去する必要がある場合がある。あるいは、開始コドンのすぐ 5' 側にコンセンサスリボソーム結合部位を挿入して発現を増強することもできる。遺伝子送達ビヒクルとしてはまた、DNA/リボソーム複合体および標的ウイルスタンパク質 - DNA 複合体を含む、数種の非ウイルズベクターが含まれる。標的化抗体またはそのフラグメントもまた含んでなるリボソームが本発明の方法で使用可能である。細胞への送達を高めるために、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フラグメントと結合させることができる。

【0076】

鎖を欠く C4BP アイソフォームを用いて得られる寛容原性樹状細胞の集団を生成するための方法

本発明者らは、鎖を欠く C4BP アイソフォーム、C4BP 鎖の単離された CCP6 ドメインを含んでなるポリペプチド、配列番号 2 ~ 5 に定義されるペプチドまたはそれらの機能的に等価な変異体、前記ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド、前記ポリヌクレオチドを含んでなるベクター、のいずれかと接触させた樹状細胞が寛容原性表現型、すなわちを示すことを見出した。

【0077】

よって、別の面において、本発明は、

(i) 樹状前駆細胞集団を未熟樹状細胞集団の形成に十分な条件下でインキュベートする工程、および

(ii) 工程 (i) で得られた未熟樹状細胞集団を成熟樹状細胞の形成に十分な条件下でインキュベートする工程

を含んでなり、工程 (i) および/または (ii) が、

(a) 鎖を欠く C4BP アイソフォーム、

(b) 本発明のポリペプチド、

(c) 本発明のペプチド、

(d) 本発明のポリヌクレオチド、および

(e) 本発明のベクター

からなる群から選択される材料の組成物の存在下で行われる、寛容原性樹状細胞集団の生成方法に関する。

【0078】

本明細書において用語「樹状細胞」は、リンパまたは非リンパ系組織に見られる形態的に類似した細胞種の多様な集団のいずれのメンバーも意味する。樹状細胞は「専門的」抗原提示細胞の一種であり、MHC 拘束 T 細胞を感作する高い能力を有する。樹状細胞は、機能により、または表現型により、特に細胞表面表現型により認識され得る。これらの細胞は、それらの特有の形態、中～高レベルの表面 MHC クラス II 発現、および T 細胞、特にナイーブ T 細胞に対する抗原提示能を特徴とする (Steinman et al. (1991) Ann. Rev. Immunol. 9:271; そのような細胞の記載に関しては、引用することにより本明細書の一部とされる)。本発明の方法によって影響を受けた樹状細胞は、未熟樹状細胞または成熟樹状細胞となるように選択され得る。

【0079】

樹状細胞には、身体の様々な組織および器官に分布した、樹状形態を有する骨髄由来細胞の群、サイトカインを用いた *in vitro* 分化から生じる、身体の様々な器官および組織に分布した、樹状形態を有する細胞の群、または骨髄由来もしくは血液由来幹細胞

10

20

30

40

50

および等価な細胞からの同様の群が含まれる。具体的には、樹状細胞には、例えば、リンパ系樹状細胞（ $T h 2$ または免疫寛容を誘導する細胞を含む）、骨髄樹状細胞（未熟および成熟樹状細胞を含む、一般に使用される樹状細胞）、ランゲルハンス細胞（皮膚の抗原提示細胞として重要な樹状細胞）、指状嵌入細胞（リンパ節および脾臓T細胞領域に分布し、T細胞に対する抗原提示に機能を持つと考えられる）、および濾胞性樹状細胞（B細胞に対する抗原提示細胞として重要）が含まれる。樹状細胞の細胞表面は、特徴的なペール様突起を有する特異なものであり、細胞表面マーカー $C D 1 a^{+}$ 、 $C D 4^{+}$ 、 $C D 8 6^{+}$ 、または $H L A - D R^{+}$ の発現を特徴とする。成熟樹状細胞は一般に $C D 1 1 c^{+}$ であるが、樹状細胞の前駆体には、表現型 $C D 1 1 c^{-}$ 、 $I L - 3 R^{l o w}$ を有するもの、および $C D 1 1 c - I L - 3 R^{h i g h}$ であるものが含まれる。in vivoにおけるGM-CSFによる処理は、 $C D 1 1 b^{h i g h}$ 、 $C D 1 1 c^{h i g h}$ DCを優先的に拡大するが、Flt-3リガンドは、 $C D 1 1 c^{+} I L - 3 R^{l o w}$ DC、および $C D 1 1 c^{-} I L - 3 R^{h i g h}$ DC前駆体を拡大することが示されている。

10

【0080】

「寛容原性樹状細胞」とは、分化刺激に曝された未熟樹状細胞から誘導される樹状細胞を意味し、この分化刺激はサイトカイン、ホルモン、ビタミン、およびそれにより樹状細胞が免疫寛容誘導能を獲得する他の生物学的因子の組合せであり得る。寛容原性樹状細胞は、低いエフェクターT細胞活性化能と、制御性T細胞の高い誘導および活性化能を有する。寛容原性樹状細胞は、「炎症誘発シグナルの存在下でも保持される安定な表現型を有する未熟DC」として働く成熟抵抗性細胞と見ることができる。

20

【0081】

第1の工程において、寛容原性樹状細胞集団を得る方法は、樹状細胞前駆体集団を未熟樹状細胞集団の形成に十分な条件下でインキュベートすることを含んでなる。

【0082】

本明細書において用語「樹状細胞前駆体」は、適当なサイトカイン（具体的には、GM-CSF、GM-CSF、TNF-a、IL-4、IL-13、SCF（c-kitリガンド）、Flt-3リガンド、またはそれらの組合せ）の存在下で未熟樹状細胞に分化することができるいずれの細胞も意味し、好ましくは、4週間以内、より好ましくは20日以内、さらにより好ましくは18日以内、いっそうより好ましくは16日以内に未熟樹状細胞に分化することができる細胞である。樹状前駆細胞の例としては、限定されるものではないが、骨髄樹状前駆細胞、リンパ系樹状前駆細胞および形質細胞様樹状前駆細胞が含まれる。樹状前駆細胞の様々なサブセットにより発現される表現型的表面マーカーは当技術分野で周知であり、例えば、フローサイトメトリーにより、または免疫組織化学的技術を用いて、同定目的に使用可能である。

30

【0083】

好ましい実施態様では、樹状前駆細胞集団は、単球樹状前駆細胞集団である。本明細書において「単球樹状細胞前駆体」は、それらの表面にGM-CSF受容体を有する単球と、GM-CSFに反応性のあるその他の骨髄前駆細胞とを含んでなる。これらの細胞は、それらが属する任意の組織、特に、脾臓、骨髄、リンパ節および胸腺などのリンパ系組織から得ることができる。単球樹状細胞前駆体はまた、循環系から単離することもできる。末梢血は、容易に入手可能な単球樹状細胞前駆体の供給源である。臍帯血が単球樹状細胞前駆体のもう1つの供給源である。

40

【0084】

単球樹状細胞前駆体は末梢血単核細胞（PBMC）から得てもよく、このPBMCは、緩衝生理食塩水で1:1希釈した全血または白血球濃縮物（「パフィーコート」画分、MSKCC Blood Bank）から、Ficoll-Plus（内毒素フリー、#17-1440-03、Amersham Pharmacia Biotech AB、ウプサラ、スウェーデン）での標準的遠心分離により得ることができる。MoDC前駆体は、組織培養プラスチック接着型（#35-3003; Falcon、Becton-Dickinson Labware、フランクリンレイクス、NJ）PB

50

MCであり、完全RPMI 1640および1%正常ヒト血清(NHS)中、GM-CSF(1000 IU/ml)およびIL-4(500 IU/ml)の存在下(記載の通り2日ごとに補給)で培養することができる(Thurner B et al., 1999, J. Immunol. Meth.; 223:1-15 and Ratzinger G. et al., 2004, J. Immunol. 173:2780-2791)。一般に、単球樹状細胞前駆体は、CD13およびCD33などのマーカーの発現により同定することができる。骨髄樹状前駆体は、CD14またはCD1a経路を介して樹状細胞に分化することができる。従って、本発明の樹状前駆細胞は、CD14⁺CD1a⁻樹状前駆細胞またはCD14⁻CD1a⁺樹状前駆細胞であり得る。本発明の特定の実施態様では、骨髄樹状前駆細胞は、CD34⁺CD33⁺CD7⁻CD10⁻表現型を特徴とし得る。好ましい実施形態では、骨髄樹状前駆細胞はCD14⁺単球である。CD14⁺単球もGM-CSF受容体を発現し得る。

10

【0085】

本発明の方法のための出発材料として使用する樹状前駆細胞は、処置する対象に対して自己であり得る。他の実施形態では、本発明の方法のための出発材料として使用する樹状細胞は、異種の樹状細胞である。例えば、移植片対宿主病を処置する場合、出発材料として使用する樹状細胞は、ドナーから得た樹状細胞である。対象は、例えば、マウス、ラット、イヌ、ニワトリ、ウマ、ヤギ、ロバ、または霊長類であり得る。最も好ましくは、対象はヒトである。

【0086】

本明細書において「未熟樹状細胞集団の形成に十分な条件」という表現は、樹状前駆細胞の未熟前駆細胞への分化をもたらす条件を意味する。好適な条件としては、例えば、SCF(50 ng/ml)、GM-CSF(500 U/ml)、およびTNF-α(50 ng/ml)の存在下で約3日間培養した後に、SCF(50 ng/ml)、GM-CSF(500 U/ml)、IL-4(250 U/ml)、およびTNF-α(50 ng/ml)の存在下、より好ましくは、GM-CSF(20 ng/ml)およびIL-4(20 ng/ml)の存在下、またはGM-CSF(20 ng/ml)およびSCF(10 ng/ml)の存在下で培養することを含む。

20

【0087】

この処理は、未熟樹状細胞の生成をもたらす。「未熟樹状細胞」とは、成熟状態に比べて有意に低いT細胞活性化能を有する樹状細胞を意味する。具体的には、未熟樹状細胞は、LPS(1 μg/ml)を加えて2日間培養することにより成熟が誘導された樹状細胞の1/2未満、好ましくは1/4未満の抗原提示能を持ち得る。抗原提示能は、例えば、同種異系T細胞活性化能(混合リンパ球試験(同種異系T細胞と樹状細胞をT細胞:樹状細胞比1:10、または好ましくは比率を変えて共培養し、培養終了の8時間前に3H-チミジンを加え、T細胞の増殖能をT細胞のDNAへの3H-チミジンへの組み込み量に基づいて評価する)(Gene Therapy 7; 249-254 (2000)参照)を用いて定量することができる。あるいは、抗原提示能は、ペプチドを用いて特定の細胞傷害性T細胞(CTL)を誘導する能力を試験することによって評価することもでき、この場合、ある特定の抗原の既知のクラスI拘束ペプチドを樹状細胞に加え、これらの樹状細胞を、樹状細胞を採取したドナーと同じ健康ドナーの末梢血から得たT細胞と共培養する(3日目以降に、25 U/mlまたは好ましくは100 U/mlのIL-2を加える)。T細胞は好ましくは、21日の間に3回樹状細胞で刺激し、より好ましくは、14日の間に2回樹状細胞で刺激する。生じたエフェクター細胞を、51Cr標識標的細胞(ペプチド拘束クラスI陽性腫瘍細胞)とともに100:1~2.5:1(100:1、50:1、25:1、20:1、12.5:1、10:1、5:1、または2.5:1)の比率で、好ましくは10:1の比率で4時間、共培養し、標的細胞から放出された51Crを定量する(Arch Dermatol Res 292:325-332 (2000)参照)。さらに、未熟樹状細胞は好ましくは、抗原に対して食作用能を有し、より好ましくは、T細胞の活性化のための共刺激を誘導する受容体の発現が低い(例えば、上記のようにLPSにより誘導された成熟DCに比べて有意に低い)かまたは陰性である。

30

40

50

【 0 0 8 8 】

好ましい実施態様では、本方法の第 1 の工程は、

- (i) 鎖を欠く C 4 B P アイソフォーム、
- (i i) 本発明によるポリペプチド、
- (i i i) 本発明によるペプチド、
- (i v) 本発明によるポリヌクレオチド、および
- (v) 本発明によるベクター

からなる群から選択される材料の組成物の存在下で行う。

【 0 0 8 9 】

用語「 鎖を欠く C 4 B P アイソフォーム」、「本発明のポリペプチド」、「本発明によるペプチド」、「本発明によるポリヌクレオチド」および「本発明によるベクター」は、上記に詳細に記載されている。

10

【 0 0 9 0 】

鎖を欠く C 4 B P アイソフォームの存在下または前記分子をコードするポリヌクレオチドの存在下で行われる工程は、*in vivo* または *ex vivo* で行うことができる。一般に、これらの方法では、未熟樹状細胞を、鎖を欠く C 4 B P アイソフォームに、下端 0 . 0 1、0 . 0 5、0 . 1、0 . 5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、50、または 100 マイクログラム / m l の培地；および上端 0 . 0 5、0 . 1、0 . 5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、50、100、または 200 マイクログラム / m l の培地の範囲内で曝すことができる。最も好ましくは、DC は、1 ~ 10 μ g / m l の C 4 B P ₇₀ または ₆₀ アイソフォームの存在下で、最も好ましくは、2、5 および 10 μ g / m l で成熟させる。

20

【 0 0 9 1 】

第 2 の工程では、第 1 の工程に従って単離した未熟樹状細胞を、次に、前記未熟樹状細胞の寛容原性成熟樹状細胞への成熟に十分な条件下でインキュベートする。この方法により、寛容原性樹状細胞が富化された組成物が得られる。

【 0 0 9 2 】

成熟ヒト樹状細胞は、CD 4 0、CD 8 0、CD 8 6、および H L A クラス I I の発現に関して陽性の細胞である。未熟樹状細胞は、例えば、CD 8 0 および CD 8 6 からなる群から選択されるマーカーに基づいて成熟樹状細胞から識別することができる。未熟樹状細胞は、これらのマーカーに関して弱い陽性、好ましくは、陰性であるが、成熟樹状細胞は陽性である。

30

【 0 0 9 3 】

成熟 DC は抗原を取り込む能力を失い、これらの細胞は共刺激細胞表面分子の発現のアップレギュレーションを示し、様々なサイトカインを分泌する。具体的には、成熟 DC は、より高レベルの M H C クラス I および I I 抗原を発現し、一般に CD 8 0 ⁺、CD 8 3 ⁺、および CD 8 6 ⁺ として同定されている。M H C 発現が大きいほど DC 表面の抗原密度が高まるとともに、共刺激分子 CD 8 0 および CD 8 6 のアップレギュレーションが、T 細胞上の CD 2 8 など、共刺激分子の相手を介した T 細胞活性化シグナルを強化する。

40

【 0 0 9 4 】

本明細書において「前記未熟樹状細胞の寛容原性成熟樹状細胞への成熟に十分な条件」という表現は、未熟樹状細胞の寛容原性成熟樹状細胞への成熟を可能とする方法を意味する。成熟樹状細胞は、未熟樹状細胞を有効な量または濃度の樹状細胞成熟因子と接触させることにより作製する（すなわち、成熟させる）ことができる。樹状細胞成熟因子としては、例えば、B C G、I F N、L P S、T N F などを含み得る。B C G の有効量は一般に、組織培養培地 1 ミリリットル当たり約 1 0 ⁵ ~ 1 0 ⁷ c f u の範囲である。I F N の有効量は一般に、組織培養培地 1 ミリリットル当たり約 1 0 0 ~ 1 0 0 0 U の範囲である。カルメット・ゲラン菌 (*Bacillus Calmette-Guerin*) (B C G) は、ウシ結核菌 (*M. bovis*) の病原性株である。本明細書において、B C G は、B C G 全体ならびに細胞壁成分

50

、BCG由来のリポアラビドマンノース、および2型免疫応答の誘導に関連するその他のBCG成分を意味する。BCGは場合により、熱失活BCG、ホルマリン処理BCGなど、失活させてもよい。

【0095】

未熟DCは一般に、約1時間～約48時間、有効量のBCGおよびIFNと接触させる。未熟樹状細胞は、好適な成熟培養条件で培養および成熟させることができる。好適な組織培養培地としては、AIM-Vand #174;、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15（商標）などが含まれる。組織培養培地は、細胞の成熟を促進するためにアミノ酸、ビタミン、GM-CSFなどのサイトカイン、二価陽イオンなどを添加することができる。一般に、約500単位/mlのGM-CSFを使用する。

10

【0096】

好ましい実施形態では、第2の工程は、

- (i) 鎖を欠くC4BPアイソフォーム、
- (ii) 本発明によるポリペプチド、
- (iii) 本発明によるペプチド、
- (iv) 本発明によるポリヌクレオチド、および
- (v) 本発明によるベクター

からなる群から選択される材料の組成物の存在下で行う。

【0097】

樹状細胞の成熟は、樹状細胞に関して当技術分野で公知の方法によってモニタリングすることができる。細胞表面マーカーは、フローサイトメトリー、免疫組織化学などの当技術分野でよく知られているアッセイで検出することができる。これらの細胞はまた、サイトカイン産生に関してモニタリングすることもできる（例えば、ELISA、別の免疫アッセイによるか、またはオリゴヌクレオチドアレイの使用による）。本発明の成熟DCはまた、抗原取り込み能を失っており、これは当業者によく知られている取り込みアッセイにより分析することができる。

20

【0098】

用語「成熟樹状細胞」は、T細胞などに対して、未熟状態に比べて有意に強い抗原提示能を有する樹状細胞を意味する。具体的には、成熟樹状細胞は、LPS（1μg/ml）を加えて2日間培養することにより成熟が誘導された樹状細胞の抗原提示能の半分またはそれより強い、好ましくは同等またはそれより強い抗原提示能を持ち得る。さらに、成熟樹状細胞は好ましくは、抗原に対する食作用能が弱いまたは全くなく、より好ましくは、T細胞の活性化に対して共刺激を誘導する受容体の発現が陽性である。樹状細胞の活性化とは、未熟樹状細胞から成熟樹状細胞への移行を意味し、活性化された樹状細胞は成熟樹状細胞と移行過程の樹状細胞を包含し、この場合、共刺激シグナルを誘導するCD80およびCD86の発現が活性化刺激により高められる。

30

【0099】

寛容原性細胞集団は、細胞組成の約50%またはそれ以上、好ましくは細胞組成の約75%またはそれ以上を占めてよく、90%以上であってもよい。所望の細胞は、それらの表面表現型、免疫寛容誘導能などによって同定することができる。富化した細胞集団はすぐに使用してもよいし、または液体窒素温度で凍結させて長期間保存し、解凍して再使用することもできる。これらの細胞は通常、10%DMSO、50%FCS、40%RPMI 1640培地中で保存される。寛容原性樹状細胞が富化された細胞集団は、下記のように様々なスクリーニングアッセイおよび培養で使用することができる。

40

【0100】

DCは、場合により、DCマーカーに対する抗体を用いた蛍光標識細胞の選別によりさらに精製してもよい。DCはまた、DCに対する抗体を用いて単離してもよく、この場合、抗体は磁性ビーズに結合される。特定の実施態様では、CD32aおよびCD32bを同時発現するDCがFACSを用いて単離される。

【0101】

50

分離された細胞は、通常回収試験管の底に血清のクッションを備えた、細胞の生存を維持する任意の適当な培地中に回収することができる。様々な培地が市販されており、細胞の性質に応じて使用することができる。培養培地は液体であっても、例えば寒天、メチルセルロースなどを含有する半固体であってもよい。細胞集団は好都合には、通常、ウシ胎児血清（約5～10%）、L-グルタミン、チオール、特に、2-メルカプトエタノール、および抗生物質、例えば、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した、イスコブの改変dMEM、HBSS、dPBS、RPMI、イスコブ培地、DMEMまたはRPMI-1640などの適当な栄養培地に懸濁させることができる。

【0102】

場合により、形態観察および免疫化学的染色などの標準的技術を用いて樹状細胞の存在を確認することができる。例えば、樹状細胞の純度は、1以上の特徴的な細胞表面マーカーに対するフルオロクロム標識抗体を用いたフローサイトメトリーにより評価することができる。

10

【0103】

特定の実施態様では、本発明は、抗原特異的寛容原性樹状細胞を作出するための方法を提供する。抗原特異的寛容原性樹状細胞を生成するためには、樹状細胞に対して本発明の方法を施して樹状細胞の成熟を阻害し、その後または同時に、それらの樹状細胞を、免疫寛容が求められる1以上の抗原と接触させる。自己免疫疾患を処置するために抗原特異的寛容原性樹状細胞を使用する場合には、この1または複数の抗原は、自己免疫疾患の基礎にある免疫反応を引き起こす抗原である。特定の、より具体的な実施態様では、寛容原性樹状細胞（すなわち、成熟が本発明の方法により阻害された樹状細胞）を、複数の異なる抗原と接触させて抗原特異的寛容原性樹状細胞集団を作出する。他の実施形態において、例えば、移植片対宿主病を処置するために寛容原性樹状細胞を使用する場合には、寛容原性樹状細胞（すなわち、成熟が本発明の方法により阻害された樹状細胞）を移植片由来の組織（この場合、組織は抗体と複合体を形成しているかまたは抗体と結合している）と接触させて移植片の抗原に特異的な寛容原性樹状細胞の集団を作出する。

20

【0104】

特定の実施態様では、抗原特異的寛容原性樹状細胞は、(a)未熟樹状細胞を、鎖を欠くC4BPアイソフォーム、本発明によるポリペプチド、本発明によるペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、または本発明によるベクターと接触させること、および(b)前記細胞を抗原に曝すこと（この抗原は、免疫寛容が望まれる抗原、例えば、自己抗原である）によって生成することができる。特定の実施態様では、工程(a)および(b)は順次実施され、従って、まず工程(a)が実施された後に工程(b)が実施される。抗原をコードするRNAを細胞に導入することにより、本発明の抗原特異的寛容原性樹状細胞に、提示のための抗原を負荷することもできる（例えば米国特許第6,387,701号；同第6,670,186号；米国特許出願第10/362,715号参照）。本発明の方法はまた、付加的利点を得るための当技術分野で公知の他の方法（例えば、米国特許第5,831,068号；米国出願第11/246,387号参照）と組み合わせてもよい。

30

【0105】

いくつかの実施態様では、寛容原性樹状細胞は、制御性T細胞を作出するために使用される（例えば、米国特許出願第10/661,804号参照）。簡単に述べると、制御性T細胞はCD4+ T細胞および/またはCD8+ T細胞を含んでなる集団から作出することができる。これらのT細胞集団は対象から単離してもよいし、または培養してもよい。また、例えば、特定の細胞（例えば、CD4+ CD25+ T細胞またはCD4+ CD25- T細胞）の富化集団を含んでなるように細胞表面マーカーによって選別された集団など、T細胞の亜集団を使用してもよい。次に、T細胞を本発明の寛容原性樹状細胞とともに培養またはインキュベートする。制御性T細胞が*in vitro*で作出されれば、前記寛容原性樹状細胞は前記T細胞と同種異系または同系であり得る。いくつかの実施態様では、寛容原性DCに抗原を負荷する（例えば、抗原でパルスするか、または抗

40

50

原をコードするRNAでトランスフェクトする)。このような実施態様では、寛容原性DCはT細胞に抗原を提示し得る。制御性T細胞の作出の際には、T細胞を寛容原性DCに1回または2回以上曝し、かつ/または共に培養することができる。例えば、T細胞をDCとともに数日または数週間培養してもよく、この混合培養中のDCは、必要であれば補充してもよい。いくつかの実施態様では、培養は、治療量の制御性T細胞が得られるまで続ける。得られる結果を改善するために他の培養技術および/または添加物を使用してもよく、例えば、培養培地はIL-2などのサイトカインを含んでもよい。

【0106】

一般に、制御性T細胞はIL-10および/またはTGF- β を分泌し(例えば、Walsh et al., 2004, J. Clin. Invest. 114: 1398-1403参照)、これらのサイトカインの分泌を確認するためのアッセイは当技術分野で公知である。いくつかの実施態様では、制御性T細胞は、混合リンパ球反応を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、75%、90%、95%、または100%阻害する。混合リンパ球反応アッセイは当技術分野で周知である。本発明の制御性T細胞は、抗原特異的であり得る。CD4⁺CD25⁺制御性T細胞は一般に、CD4、CD25、およびFoxp3を含む特徴的な細胞表面マーカーを発現し、細胞表面マーカーのアッセイは当技術分野で周知である。

【0107】

鎖を欠くC4BPアイソフォームを用いて得られた本発明の寛容原性樹状細胞およびその治療的使用

別の態様において、本発明は、樹状細胞を、鎖を欠くC4BPアイソフォーム、C4BP鎖を含んでなるポリペプチド、本発明に定義されるペプチド、前記ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチド、または前記ポリペプチドを含んでなるベクターの存在下で分化させる、および/または成熟させることにより得られる本発明の寛容原性樹状細胞に関する。

【0108】

本発明による寛容原性樹状細胞は、以下の特徴のうちの1以上を示すことを特徴とする。

【0109】

- 前記細胞がHLA-DR⁺であること。用語「陽性」は、所与のマーカーに適用される場合、本発明の方法により作出された寛容原性DC上での特定の細胞表面マーカーの発現レベルが、適当な対照細胞(例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC)の場合と実質的に同じであることを示す。

【0110】

- 前記細胞がCD80⁻、CD83⁻、CD86⁻、CD1a⁻、CCR7⁻、IDO⁻および/またはB1C-1⁻であること。用語「陰性」は、所与のマーカーに適用される場合、本発明の方法により作出された寛容原性DC上での特定の細胞表面マーカーの発現レベルが、適当な対照細胞(例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC)上での同じ細胞表面マーカーの発現レベルに比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%低下しているか、または検出不能であることを示す。

【0111】

- 前記細胞がIL-12p70、TNF- α 、IFN- γ 、IL-8および/またはIL-6などの炎症性サイトカインを分泌しないか、または成熟樹状細胞に比べて低い量で分泌すること。用語「低い量で分泌する」とは、所与のサイトカインに適用される場合、本発明の方法により作出された寛容原性DC上での特定のサイトカインの分泌レベルが、適当な対照細胞(例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC)上での同じ細胞表面マーカーの分泌レベルに比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%低下しているか、または検出不能であることを示す。

【0112】

- 前記細胞が成熟樹状細胞に比べて、高い量のIL-10を分泌すること。用語「高い量を分泌する」とは、所与のサイトカインに適用される場合、本発明の方法により作出された寛容原性DC上での特定のサイトカインの分泌レベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC）上での同じ細胞表面マーカーの分泌レベルに比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加していることを示す。

【0113】

- 前記細胞が丸い形態を示すこと。本明細書において用語「丸い形態」とは、細胞の、細胞表面から突出している突起の数が、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC）上の突起の数に比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%低下しているか、または検出不能である形態を意味する。細胞の形態は、本発明の実施例4に記載のように、すなわち走査型電子顕微鏡により測定可能である。

10

【0114】

- 前記細胞が分化/成熟過程の後も生存を維持すること。本明細書において用語「生存」とは、成熟刺激による処理後にアポトーシスを受けるものが、50%未満、40%未満、30%未満、20%未満、10%未満、5%未満、4%未満、3%未満、2%未満、2%未満または1%未満である集団を意味する。アポトーシスは、アネキシンV/7-ADD染色、カスパーゼ-3活性化アッセイ、TUNELおよびDNA断片化アッセイ、ミトコンドリア膜電位の測定などの当技術分野で一般に公知のいずれの方法によって測定してもよい。

20

【0115】

- 前記細胞は成熟樹状細胞に比べて、CCL21に対する走化性挙動が低下したこと。本明細書において「走化性挙動が低下した」とは、本発明の方法により作出された細胞の、寛容原性DC上のCCL21に対する走化性のレベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC）上の同じサイトカインに対する走化性のレベルに比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%低下しているか、または検出不能であることを示す。CCL21に対する寛容原性樹状細胞の走化性挙動は、例えば本発明の実施例5に記載のように決定することができるか、かつ/または、

30

【0116】

- 前記細胞は成熟樹状細胞に比べて、同種異系T細胞増殖を阻害する能力が低下したこと。本明細書において用語「同種異系T細胞増殖を阻害する能力が低下した」とは、本発明の方法により作出された細胞と接触させた同種異系T細胞の増殖レベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC）と接触させた同種異系T細胞で見られる増殖レベルに比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%低下しているか、または検出不能であることを示す。寛容原性樹状細胞の同種異系T細胞増殖を阻害する能力は、例えば本発明の実施例6に記載のように実施することができる。

40

【0117】

- 前記細胞が未熟DCとは対照的に、炎症誘発シグナルの存在下で保持される安定な免疫調節表現型を示すこと。寛容原性樹状細胞の、安定な免疫調節表現型を示す能力は、例えば、本発明の実施例16に記載のように決定することができる。

【0118】

- 前記細胞が成熟樹状細胞に比べて、炎症誘発条件下でTh1分化を阻害する能力を示す

50

こと。本明細書において用語「Th1分化(differentiation)を阻害する」とは、本発明の方法により作出された細胞と接触させたT細胞により作出されるTh1細胞のレベルが、適当な対照細胞(例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC)と接触させたT細胞で見られるTh1分化のレベルと比較して10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%低下している、または検出不能であることを示す。寛容原性樹状細胞の、Th1分化を阻害する能力は、例えば、本発明の実施例17に記載のように、IFN- γ 産生を測定することにより決定することができる。

【0119】

前記細胞は成熟樹状細胞に比べて、高い制御性T細胞(Treg)生成能を示すこと。本明細書において用語「高い制御性T細胞生成能」とは、本発明の方法により作出された細胞と接触させたT細胞の制御性T細胞の生成レベルが、適当な対照細胞(例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC)と接触させたT細胞の生成レベルに比べて、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加していることを示す。寛容原性樹状細胞の、制御性T細胞(Treg)生成能は、例えば本発明の実施例17に記載のように決定することができる。好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞は、HLA-DR $^+$ 、CD80 $^-$ 、CD83 $^-$ 、CD86 $^-$ 、CD1a $^-$ 、CCR7 $^-$ 、IDO $^-$ および/またはB1c-1 $^-$ である。好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD40 $^+$ である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD40 $^-$ である。

【0120】

好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞は、上の特徴のうち1以上を示すことを特徴とする。

- ・CD1a $^-$
- ・CD86 $^-$
- ・IDO $^-$
- ・アポトーシス耐性

【0121】

好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a $^-$ である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a $^-$ およびCD86 $^-$ である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a $^-$ 、CD86 $^-$ およびIDO $^-$ である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a $^-$ 、CD86 $^-$ 、IDO $^-$ およびアポトーシス耐性である。好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a $^-$ およびIDO $^-$ である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a $^-$ およびアポトーシス耐性である。好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD86 $^-$ およびIDO $^-$ である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD86 $^-$ およびアポトーシス耐性である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はIDO $^-$ およびアポトーシス耐性である。

【0122】

別の実施態様では、本発明による寛容原性樹状細胞は、本発明者らの寛容原性C4BP(b $^-$)処理DCまたはH因子処理DCにより、ヒト記憶CD4 $^+$ T細胞のAg特異的免疫寛容(または低反応性)を誘導することができる。表3に、本発明による寛容原性細胞の特徴の概要を、未熟樹状細胞、成熟樹状細胞、および未熟樹状細胞をビタミンD3で処理することにより得られる寛容原性樹状細胞と比較して示す。

【0123】

10

20

30

40

【表 3】

		+ LPS 誘導					
		<i>iDCs</i>	<i>mDCs</i>	<i>C4BP (β) DCs</i>	<i>FH DCs</i>	<i>Vit D₃ DCs</i>	
表現型 (RNA/タンパク 質発現)	表面マーカー						
		HLA-DR	++	+++	+++	++	+
	CD40	++	+++	++	++	+	
	CD83	-	+++	+	+	+	
	CD86	+	+++	+	+	-	
	CD14	-	-	+	+	+	
	CD1a	++	++	+	+	-	
	CCR7	+	+++	++	++	++	
	サイトカイン						
	IL-12	-	+++	-	-	-(*)	20
	IL-6	-	+++	+	+	n.d.	
	IL-8	+	+++	++	++	n.d.	
	IL-10	-	++	+++	+	++ (*)	
	TNF-α	-	+++	+	+	n.d.	
	IFN-γ	-	+++	-	-	n.d.	
	転写 プロファイル						
	IDO	+	+++	-	-	+++ (**)	30
	BIC-1	+	+++	+	+	n.d.	
	SOD-2	++	+++	n.d.	+		
形態	樹状突起密度 および長さ	+	+++	+	+	n.d.	
生存率	処理後の アポトーシス	-	-	-	-	+	
機能 アッセイ	エンドサイトーシス (DQ-OVA)	+++	+	+	+	n.d.	30
	走化性 (CCL21)	n.d.	+++	-	-	n.d.	
	同種増殖 (T CD3')	+	+++	+	+	-	

表 3. C4BP (β-) 処理樹状細胞およびH因子処理樹状細胞の差示的形質。DCは、非処理の未熟DC；mDCは、非処理かつLPS誘導DC；C4BP (β-) DCは、C4BP (α7β0) 処理またはC4BP (α6β0) 処理かつLPS誘導DC；FH DCは、H因子処理かつLPS誘導DC；Vit D₃ DCは、Vit D₃処理かつLPS誘導DC。(一) 無視できる；(+) 低い；(++) 中程度；(+++) 高い；n. d. は、測定されず。(*) Naranjo-Gomez et al. (2011) J. Transl. Med. 9:89 から抽出したデータ。

(**) Heitger (2011) Curr. Med. Chem. 18: 2222-33 から抽出したデータ。

別の面において、本発明は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、97%、98%または99%の本発明の寛容原性樹状細胞を含んでなる細胞集団に関し、好ましくは、この細胞集団は少なくとも80%の本発明の寛容原性樹状細胞を含んでなる。さらに別の面では、本発明は、免疫疾患の予防および/または治療において使用するための、鎖を欠くC4BPアイソフォーム、本発明に定義されるC4BP鎖を含んでなるポリペプチド、本発明に定義されるペプチド、前記ポリペプチドのいずれかをコードするポ

10

20

30

40

50

リヌクレオチドまたは前記ポリペプチドを含んでなるベクターを用いて得られる寛容原性樹状細胞集団に関する。

【0124】

別の面において、本発明は、免疫疾患の予防および/または治療用薬剤の製造のための、鎖を欠くC4BPアイソフォーム、本発明に定義されるC4BP鎖を含んでなるポリペプチド、本発明に定義されるペプチド、前記ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドまたは前記ポリペプチドを含んでなるベクターを用いて得られる寛容原性細胞の使用に関する。

【0125】

別の面において、本発明は、必要とする対象における免疫疾患の予防および/または治療のための方法であって、前記対象に、鎖を欠くC4BPアイソフォーム、本発明に定義されるC4BP鎖を含んでなるポリペプチド、本発明に定義されるペプチド、前記ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドまたは前記ポリペプチドを含んでなるベクターを用いて得られる寛容原性細胞を投与することを含んでなる方法に関する。

10

【0126】

別の面において、本発明は、必要とする対象において制御性T細胞集団を増加させるための方法であって、前記対象に、鎖を欠くC4BPアイソフォーム、本発明に定義されるC4BP鎖を含んでなるポリペプチド、本発明に定義されるペプチド、前記ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドまたは前記ポリペプチドを含んでなるベクターを用いて得られる寛容原性樹状細胞集団を投与することを含んでなる方法に関する。

20

【0127】

別の面において、本発明は、制御性T細胞集団の増加において使用するための、鎖を欠くC4BPアイソフォーム、本発明に定義されるC4BP鎖を含んでなるポリペプチド、本発明に定義されるペプチド、前記ポリペプチドのいずれかをコードするポリヌクレオチドまたは前記ポリペプチドを含んでなるベクターを用いて得られる寛容原性樹状細胞集団に関する。

【0128】

免疫疾患の予防および/または治療は、制御性T細胞集団を増加させることによって達成される。

30

【0129】

本明細書において「制御性T細胞集団を増加させる」という表現は、本発明の寛容原性樹状細胞集団が、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC）で処置した対象に比べて制御性T細胞の数の増加をもたらすことを意味する。制御性T細胞集団は、対照細胞で処置した対象に比べて、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加される。本発明の寛容原性樹状細胞集団の、制御性T細胞集団を増加させる能力は、例えば、実施例17に記載のように決定することができる。

【0130】

40

本発明の治療方法

別の実施態様では、本発明のポリペプチド、ポリヌクレオチドおよびベクターを用いて免疫疾患を治療および/または予防するための方法が提供される。本発明による組成物で処置される免疫疾患には、限定されるものではないが、免疫炎症性疾患、敗血症、自己免疫疾患、移植拒絶、移植片対宿主病および過敏性疾患が含まれる。このような処置を必要とする対象はヒトであってもよいし、または免疫疾患の症状を発症した、もしくは免疫疾患を発症するリスクのある非ヒト霊長類またはその他の動物であってもよい（すなわち、獣医学的使用）。非ヒト霊長類およびその他の動物の例としては、限定されるものではないが、農用動物、ペット、および動物園動物（例えば、ウマ、ウシ、バッファロー、ラマ、ヤギ、ウサギ、ネコ、イヌ、チンパンジー、オランウータン、ゴリラ、サル、ゾウ、ク

50

マ、大型のネコ科など)が含まれる。

【0131】

「免疫炎症性疾患」、「敗血症」、「自己免疫疾患」および「移植拒絶」という表現は、上記に詳細に記載されており、本発明の治療方法に関しても同じ意味で使用される。

【0132】

本明細書において、患者(または対象)は、免疫疾患または障害に罹患したもしくは罹患している可能性があるか、または検出可能な疾患がないと見られる、ヒトを含むいずれの哺乳動物であってもよい。従って、この処置は既存の疾患を有する対象に行ってもよいし、または疾患もしくは病態を発症するリスクのある対象に予防的に行ってもよい。

【0133】

免疫疾患または障害を処置するための組成物の用量は、医学分野の当業者により理解されているパラメーターに従って決定され得る。従って、適当な用量は、患者(例えば、ヒト)の状態、すなわち、疾患の病期、健康状態、ならびに年齢、性別、および体重、および医学分野の当業者によく知られている他の因子に依存し得る。

【0134】

一態様において、本発明は、必要とする対象において寛容原性樹状細胞および/または制御性T細胞集団を増加させるための方法であって、前記対象に本発明によるポリペプチド、本発明によるペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、または本発明によるベクターを投与することを含んでなる方法に関する。

【0135】

さらに別の態様では、本発明は、寛容原性樹状細胞集団および/または制御性T細胞集団の増加において使用するための、本発明によるポリペプチド、本発明によるペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、または本発明によるベクターに関する。

【0136】

免疫疾患の予防および/または治療は、寛容原性樹状細胞集団および/または制御性T細胞集団の増加させることによって達成される。

【0137】

「寛容原性樹状細胞集団を増加させる」という表現は、本発明によるポリペプチド、本発明によるペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、または本発明によるベクターの投与が、非処置対象に比べて寛容原性樹状細胞の数の増加をもたらすことを意味すると理解される。寛容原性樹状細胞集団は、非処置対象に比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加される。本発明によるポリペプチド、本発明によるペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、または本発明によるベクターの、寛容原性樹状細胞集団を増加させる能力は、例えば実施例1~5に記載のよう決定することができる。

【0138】

本明細書において「制御性T細胞集団を増加させる」という表現は、本発明によるポリペプチド、本発明によるペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、または本発明によるベクターが、非処置対象に比べて制御性T細胞の数の増加をもたらすことを意味する。制御性T細胞集団は、非処置対象の10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加される。本発明によるポリペプチド、本発明によるペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、または本発明によるベクターの、制御性T細胞集団を増加させる能力は、例えば実施例17に記載のよう決定することができる。

【0139】

本発明の医薬組成物

本発明はまた、本発明によるポリペプチド、本発明によるポリヌクレオチド、本発明によるベクター、本発明による細胞、または本発明による寛容原性樹状細胞を含んでなる医薬組成物も提供する。

【0140】

10

20

30

40

50

組成物は、無菌水性または非水性の溶液、懸濁液またはエマルションであり、生理学的に許容可能または好適な担体を付加的に含んでなる、医薬組成物であり得る。薬学的に許容可能または好適な担体としては、賦形剤（すなわち、有効成分の活性を妨げない無毒な材料）および/または希釈剤を含み得る（または意味する）。このような組成物は、固体、液体または気体（エアゾール）の形態であり得る。あるいは、本明細書に記載の組成物は凍結乾燥品として処方してもよく、または当技術分野で公知の技術を用いて化合物をリポソーム内に封入してもよい。医薬組成物はまた他の成分を含んでもよく、これらの成分は生物学的に活性であっても不活性であってもよい。このような成分には、限定されるものではないが、バッファー（例えば、中性緩衝生理食塩水またはリン酸緩衝生理食塩水）、糖質（例えば、グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン）、マンニトール、タンパク質、ポリペプチドまたはアミノ酸（例えば、グリシン）、抗酸化剤、キレート剤（例えば、EDTAもしくはグルタチオン）、安定剤、色素、香味剤、ならびに沈殿防止剤および/または保存剤が含まれる。

10

【0141】

医薬組成物において使用するための当業者に公知のいずれの好適な賦形剤または担体も、本明細書に記載の組成物に使用することができる。治療的使用のための賦形剤は周知であり、例えば、Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Genaro ed. 1985)に記載されている。一般に、賦形剤のタイプは、投与様式に基づいて選択される。医薬組成物は、例えば、局所、経口、鼻腔、くも膜下腔内、直腸、膺、眼内、結膜下、舌下または非経口投与（皮下、静脈内、筋肉内、胸骨内、洞内、道内(intrameatal)または尿道内注射または注入を含む）を含む、いずれの適当な投与様式向けに処方してもよい。非経口投与としては、担体は好ましくは、水、生理食塩水、アルコール、脂肪、ワックスまたはバッファーを含んでなる。経口投与としては、上記の賦形剤のいずれか、またはマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルク、セルロース、カオリン、グリセリン、デキストリンデンプン、アルギン酸ナトリウム、カルボキシメチルセルロース、エチルセルロース、グルコース、スクロースおよび/もしくは炭酸マグネシウムなどの固体賦形剤もしくは担体を使用可能である。

20

【0142】

医薬組成物（例えば、経口投与または注射送達用）は液体の形態であってもよい。液体医薬組成物は、例えば、下記のうちの1以上を含み得る：無菌希釈剤、例えば、注射水、食塩水、好ましくは、生理食塩水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウム液、溶媒または懸濁媒として働き得る硬化油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の溶媒；抗菌剤；抗酸化剤；キレート剤；バッファー、ならびに張力の調整のための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロース。非経口製剤は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジまたは多用量バイアル内に密封することができる。生理食塩水の使用が好ましく、注射用医薬組成物は好ましくは無菌である。

30

【0143】

ポリペプチド、ペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター細胞および寛容原性樹状細胞を含む本明細書に記載の薬剤は、持続放出または緩徐放出用に処方してもよい。このような組成物は一般に、周知の技術を用いて調製し、例えば、経口、直腸または皮下埋め込みによるか、または所望の標的部位への埋め込みによって投与することができる。持続放出処方物は担体マトリックス中に分散された、および/または速度制御膜に囲まれたリザーバー内に含まれた薬剤を含有し得る。このような処方物内で使用するための賦形剤は生体適合性であり、また生分解性でもあり得、この処方物は比較的一定レベルの有効成分放出を提供することが好ましい。持続放出処方物内に含有される有効化合物の量は、埋め込み部位、放出の速度および期待持続時間、ならびに治療または予防される病態の性質に依存する。

40

【0144】

50

医薬組成物は、医学分野の当業者により決定されるような、治療（または予防）される疾患に適当な様式で投与することができる。適当な用量ならびに好適な持続期間および投与頻度は、患者の状態、患者の疾患のタイプおよび重篤度、特定の形態の有効成分、ならびに投与方法などの要因によって決定される。一般に、適当な用量および処置計画は、治療利益および/または予防利益（例えば、完全緩解または部分緩解の高頻度化、または無病生存期間および/または全生存期間の延長、または症状の重篤度の軽減などの臨床転帰の改善）を提供するのに十分な量の組成物を提供する。予防的使用としては、用量は、免疫疾患または障害に関連する疾患の予防、発症遅延、または重篤度の軽減に十分なものとすべきである。

【0145】

最適な用量は一般に、試験モデルおよび/または臨床試験を用いて決定することができる。最適用量は、患者の体格、体重または血液量に依存し得る。一般に、一用量中に存在するか、または一用量中に存在するDNAにより *in situ* で産生されるポリペプチドの量は、約 $0.01 \mu\text{g}$ ~ 約 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 宿主の範囲である。有効な療法を提供するのに十分な最少用量を使用することが通常好ましい。患者には一般に、治療または予防される病態に好適なアッセイを用いて治療または予防有効性のモニタリングを行うことができ、このようなアッセイは当業者によく知られている。液体形態で投与する場合、好適な用量は患者の大きさによって異なるが、一般に、 $10 \sim 60 \text{ kg}$ の対象で約 1 ml ~ 約 500 ml (約 $0.01 \mu\text{g}$ ~ 約 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ を含んでなる) の範囲である。

【0146】

アプタマーを含む核酸分子である薬剤を含んでなる医薬組成物では、その核酸分子は、核酸、ならびに細菌、ウイルスおよび哺乳動物発現系を含む当業者に公知の様々な送達系（例えば、本明細書に提供される組換え発現構築物を含む）のいずれかの中に存在してよい。このような発現系にDNAを組み込むための技術は当業者に周知である。DNAはまた、例えば、Ulmer et al., Science 259:1745-49, 1993に記載され、Cohen, Science 259:1691-1692, 1993により概説されているように、「裸」であってもよい。裸のDNAの取り込みは、DNAを生分解性ビーズにコーティングすることによって増加させることができ、これは細胞に効果的に輸送される。

【0147】

核酸分子は、当技術分野で記載されているいくつかの方法のいずれか1つに従って細胞に送達することができる（例えば、Akhtar et al., Trends Cell Bio. 2:139 (1992); Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995, Maurer et al., Mol. Membr. Biol. 16:129-40 (1999); Hofland and Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-92 (1999); Lee et al., ACS Symp. Ser. 752:184-92 (2000); 米国特許第6,395,713号; 国際特許出願公開第WO94/02595号); Selbo et al., Int. J. Cancer 87:853-59 (2000); Selbo et al., Tumour Biol. 23:103-12 (2002); 米国特許出願公開第2001/0007666号および同第2003/077829号参照)。当業者に公知のこのような送達方法には、限定されるものではないが、リボソームへの封入、イオン泳動によるもの、またはその他のビヒクル、例えば、生分解性ポリマー; ヒドロゲル; シクロデキストリン（例えば、Gonzalez et al., Bioconjug. Chem. 10: 1068-74 (1999); Wang et al., 国際出願公開第WO03/47518号および同第WO03/46185号参照); ポリ(乳酸-c-o-グリコール酸)酸(PLGA)およびPLCAミクロスフェア(ペプチドおよびポリペプチドおよびその他の物質の送達にも有用)（例えば、米国特許第6,447,796号; 米国特許出願公開第2002/130430号参照); 生分解性ナノカプセル; および生体接着剤ミクロスフェアなどへの組み込みによるもの、またはタンパク質性ベクター（国際出願公開第WO00/53722号）によるものが含まれる。別の実施態様では、免疫細胞における免疫応答の変更（抑制または増強）、および免疫疾患または障害の治療に使用するための核酸分子は、ポリエチレンイミンおよびその誘導体、例えば、ポリエチレンイミン-ポリエチレングリコール-N-アセチルガラクトサミン(PEI-PEG-GAL)またはポリエチレンイミン-ポ

10

20

30

40

50

リエチレングリコール - トリ - N - アセチルガラクトサミン (P E I - P E G - t r i G A L) 誘導体とともに処方または複合体化することもできる (例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 0 7 7 8 2 9 号も参照) 。

【 0 1 4 8 】

本発明の医薬組成物 / 薬剤は、上記のように、例えば、有効成分、例えば、他の免疫調節抗体 (例えば、抗 I C O S 、 抗 C D 1 5 4 、 抗 C D 1 3 4 L) または組換えタンパク質 (例えば、限定されるものではないが、 r C T L A - 4 (C D 1 5 2) 、 r O X 4 0 (C D 1 3 4)) 、 または抗炎症性もしくは免疫調節化合物 (例えば、限定されるものではないが、シクロスポリン A 、 F T Y 7 2 0 、 R A D 、 ラパマイシン、 F K 5 0 6 、 1 5 - デオキシスペルグアリン、ステロイド) をさらに含んでなってもよい。

10

【 0 1 4 9 】

H 因子の治療的使用

本発明者らはまた、H 因子が樹状細胞の活性化を阻害することができ、かつ、寛容原性細胞に独特な特徴の獲得を促進することができることを見出した。本発明の実施例 9 ~ 1 5 に示されるように、H 因子は、ヒト M o - D C の活性化マーカーおよび L P S 成熟ヒト M o - D C による炎症性サイトカインの放出をダウンレギュレートすることができる。さらに、H 因子は、樹状細胞への曝露にตอบสนองして、ヒト M o - D C の形態を改変し、未熟 D C のエンドサイトーシス能を低下させ、ヒト M o - D C の走化性および同種異系 T 細胞の増殖を低下させる。

【 0 1 5 0 】

加えて、本発明の筆者らは、H 因子が、低下した T 細胞刺激能と、炎症状態下で T h 1 分化を妨げるだけでなく制御性 T 細胞生成能も有する寛容原性樹状細胞を生成することを見出した。

20

【 0 1 5 1 】

よって、別の面において、本発明は、免疫疾患の予防および / または治療において使用するための、

(i) H 因子またはその機能的に等価な変異体、

(i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および

(i i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター

30

からなる群から選択される材料の組成物に関する。

【 0 1 5 2 】

よって、別の面において、本発明は、免疫疾患の予防および / または治療用薬剤の製造のための、

(i) H 因子またはその機能的に等価な変異体、

(i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および

(i i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター

40

からなる群から選択される材料の組成物に関する。

【 0 1 5 3 】

別の面において、本発明は、必要とする対象における免疫疾患の予防および / または治療のための方法であって、前記対象に、

(i) H 因子またはその機能的に等価な変異体、

(i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および

(i i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター

の群から選択される材料の組成物を投与することを含んでなる方法に関する。

50

【 0 1 5 4 】

別の面において、本発明は、必要とする対象において寛容原性樹状細胞および/または制御性T細胞集団を増加させるための方法であって、前記対象に、

(i) H 因子またはその機能的に等価な変異体、

(i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および

(i i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター

の群から選択される材料の組成物を投与することを含んでなる方法に関する。

【 0 1 5 5 】

別の態様において、本発明は、寛容原性樹状細胞および/または制御性T細胞集団の増加において使用するための、

(i) H 因子またはその機能的に等価な変異体、

(i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および

(i i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター

の群から選択される材料の組成物に関する。

【 0 1 5 6 】

本明細書において用語「H因子」は、ヒト血漿中に約550 μg/mlの濃度で見られる155 kDaの糖タンパク質であり、ヘッド-テールで配置された20のCCPを含んでなり、そのうち4つのN末端CCPは補体調節活性を含み、C末端の2つのCCPは表面結合と標的認識を仲介する。H因子は、因子Iを介したC3b切断のための補因子活性と代替経路C3コンベルターゼC3bBbに対する減衰加速化活性の両方を有することで自己細胞上で補体の活性化を調節する。H因子は、宿主細胞上には存在するが病原体の細胞表面には存在しないグリコサミノグリカンと結合することから、自己細胞を補体の活性化からは保護するが、細菌/ウイルスからは保護しない。本発明に従って使用するための好適なH因子ポリペプチドには、限定されるものではないが、

- ヒトH因子 (Swiss Prot データベース (2011年5月31日公開) に受託番号 P 0 8 6 0 3 として提供されているポリペプチドのアミノ酸 1 9 ~ 1 2 3 1 に相当する)、

- ウシH因子 (Swiss Prot データベース (2011年5月31日公開) に受託番号 Q 2 8 0 8 5 として提供されているポリペプチドのアミノ酸 1 9 ~ 1 2 3 6 に相当する)、

- ラットH因子 (Swiss Prot データベース (2011年5月31日公開) に受託番号 Q 9 1 Y B 6 として提供されているポリペプチドのアミノ酸 1 9 ~ 1 2 3 6 に相当する)、

- マウスH因子 (Swiss Prot データベース (2011年5月3日公開) に受託番号 P 0 6 9 0 9 として提供されているポリペプチドのアミノ酸 1 9 ~ 1 2 3 4 に相当する)、

- ヒト補体H因子関連タンパク質1 (Swiss Prot データベース (2011年2月8日公開) に受託番号 Q 0 3 5 9 1 として提供されているポリペプチドのアミノ酸 1 9 ~ 3 3 0 に相当する)、

- ヒト補体H因子関連タンパク質2 (Swiss Prot データベース (2011年4月5日公開) に受託番号 P 3 6 9 8 0 として提供されているポリペプチドのアミノ酸 1 9 ~ 2 7 0 に相当する)、

- ヒト補体H因子関連タンパク質3 (Swiss Prot データベース (2011年5月31日公開) に受託番号 Q 0 2 9 8 5 として提供されているポリペプチドのアミノ酸 1 9 ~ 3 3 0 に相当する)、

- ヒト補体H因子関連タンパク質4 (Swiss Prot データベース (2011年5月

10

20

30

40

50

3日公開)に受託番号Q92496として提供されているポリペプチドのアミノ酸19~270に相当する)、および

- ヒト補体H因子関連タンパク質5 (SwissProtデータベース(2011年4月5日公開)に受託番号Q9BXR6として提供されているポリペプチドのアミノ酸19~569に相当する)

が含まれる。

【0157】

H因子に関して用語「機能的に等価な変異体」は、上記で定義されるH因子ポリペプチドの1以上のアミノ酸の挿入、欠失または置換から生じ、H因子の、樹状細胞増殖を阻害する能力を実質的に保持するポリペプチドを意味する。本発明による使用に好適なH因子変異体には、限定されるものではないが、上記で定義される天然型H因子と少なくとも99%、少なくとも98%、少なくとも97%、少なくとも96%、少なくとも95%、少なくとも94%、少なくとも93%、少なくとも92%、少なくとも91%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%、少なくとも55%、少なくとも50%の同一性を有するポリペプチドが含まれる。あるポリペプチドがH因子の機能的に等価な変異体かどうかを決定するための方法には、限定されるものではないが、

- 変異体の、CD83、CD86、CD80、CD40、CD1a、CCR7、IDO、BIC-1および/またはSOD2などのDC活性化マーカーの発現をダウンレギュレートする能力の決定、

- 変異体の、LPS用いた刺激に应答した樹状細胞による炎症性サイトカインの放出を阻害する能力の決定、

- 変異体ポリペプチドの、LPS刺激に应答した未熟樹状細胞の樹状細胞形態の獲得を阻害する能力の決定、

- 変異体の、未熟樹状細胞のエンドサイトーシスを低下させる能力の決定、

- 変異体ポリペプチドの、走化性シグナル(例えば、CCL21)に対する樹状細胞の走化性を低下させる能力の決定、および/または

- 変異体ポリペプチドの、樹状細胞による刺激に应答した同種異系T細胞の増殖を低下させる能力の決定

に基づく、本発明の実施例9~15に記載される方法が含まれる。

【0158】

よって、ポリペプチドは、前述のようにH因子の活性の少なくとも100%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも65%、少なくとも60%または少なくとも50%を示す場合にH因子と機能的に等価と見なされる。

【0159】

別の実施態様では、H因子の機能的に等価な変異体は、H因子ドメインを含んでなる第1の領域と、H因子の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる第2の領域とを含んでなる融合タンパク質である。本発明の融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、(a)H因子を含んでなる領域、および(b)H因子の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる領域を含んでなり得る。あるいは、本発明の融合タンパク質は、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に、(a)H因子の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる領域、および(b)H因子を含んでなる領域を含んでなり得る。

【0160】

本発明による融合タンパク質を形成するために使用可能な好適なポリペプチドには、限定されるものではないが、免疫グロブリンFc領域、アルブミン、フェリチンまたはトランスフェリンが含まれる。

【0161】

好ましい実施態様では、H因子の一部を形成しないポリペプチドを含んでなる領域は、免疫グロブリンFc領域である。

【0162】

本明細書において、用語「免疫グロブリンFc領域」は、免疫グロブリン鎖定常領域、好ましくは、免疫グロブリン重鎖定常領域のカルボキシル末端部分、またはその一部を意味すると理解される。例えば、免疫グロブリンFc領域は、1) CH1ドメイン、CH2ドメイン、およびCH3ドメイン、2) CH1ドメインおよびCH2ドメイン、3) CH1ドメインおよびCH3ドメイン、4) CH2ドメインおよびCH3ドメイン、または5) 2以上のCHドメインの組合せと免疫グロブリンヒンジ領域とを含んでなり得る。本発明の融合タンパク質の免疫グロブリンFc領域は、好ましくは、IgG、IgM、IgA、IgD、IgE、さらに好ましくは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、sIgA、より好ましくは、IgG2またはIgG4、最も好ましくは、IgG2から選択されるアイソタイプの免疫グロブリンのFcまたはFcの一部を含んでなる、またはからなる。

10

【0163】

本発明はまた、H因子またはその変異体をコードするポリヌクレオチド、ならびに前記ポリヌクレオチドを含んでなるベクターの治療的使用を提供する。用語「ポリヌクレオチド」および「ベクター」は上記に詳細に定義されており、本発明に関しては同じ意味で使用される。

【0164】

「免疫疾患」という表現は上記に詳細に記載されており、H因子の使用を含む治療的方法に関しては同じ意味で使用される。好ましい実施態様では、免疫疾患は、免疫炎症性疾患、敗血症、自己免疫疾患および移植拒絶からなる群から選択される。「免疫炎症性疾患」、「敗血症」、「自己免疫疾患」および「移植拒絶」という表現は上記に詳細に記載されており、本発明では同じ意味で使用される。

20

【0165】

別の好ましい実施態様では、免疫疾患は自己免疫疾患ではなく、好ましくは、敗血症、移植拒絶、移植片対宿主病および過敏性疾患から選択される。

【0166】

免疫疾患の予防および/または治療は、寛容原性樹状細胞および/または制御性T細胞集団の増加させることにより達成される。

【0167】

「寛容原性樹状細胞集団を増加させる」という表現は、本発明の組成物の投与が、非処置対象に比べて寛容原性樹状細胞の数の増加をもたらすことを意味すると理解される。寛容原性樹状細胞集団は、非処置対象に比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加される。本発明の組成物の、寛容原性樹状細胞集団を増加させる能力は、例えば実施例9~14に記載のように決定することができる。

30

【0168】

本明細書において「制御性T細胞集団を増加させる」とは、本発明の組成物が、非処置対象に比べて制御性T細胞の数の増加をもたらすことを意味する。制御性T細胞集団は、非処置対象に比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加される。本発明の組成物の、制御性T細胞集団を増加させる能力は、例えば実施例17に記載のように決定することができる。

40

【0169】

H因子を用いて寛容原性樹状細胞集団を生成するための方法

本発明の筆者らは、H因子またはその機能的に等価な変異体、H因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、または前記ポリヌクレオチドを含んでなるベクターは、樹状細胞前駆体の寛容原性樹状細胞への成熟を促進することができることを見出した。よって、別の面において、本発明は、寛容原性樹状細胞集団の生成方法であって、

50

(i) 樹状前駆細胞集団を未熟樹状細胞集団の形成に十分な条件下でインキュベートする工程、および

(i i) 工程 (i) で得られた未熟樹状細胞集団を成熟樹状細胞の形成に十分な条件下でインキュベートする工程

を含んでなり、工程 (i) および / または (i i) が、

(i) H 因子またはその機能的に等価な変異体、

(i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、および

(i i i) H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター

からなる群から選択される材料の組成物の存在下で行われる方法に関する。

【 0 1 7 0 】

「寛容原性樹状細胞」、「樹状前駆細胞」、「未熟樹状細胞集団の形成に十分な条件」、「未熟樹状細胞」、「成熟樹状細胞の形成に十分な条件」という表現は上記に詳細に記載されており、本発明に関しては同じ意味で使用される。

【 0 1 7 1 】

鎖を欠く C 4 B P アイソフォームを用いて寛容原性樹状細胞集団を得るための方法に関して上記で説明したように、H 因子、その機能的に等価な変異体、H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド、H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクターは、分化段階（すなわち、樹状前駆細胞が未熟樹状細胞に分化する間）、成熟過程（すなわち、未熟樹状細胞が樹状細胞に成熟する間）、または両方の段階の細胞と接触させることができる。

【 0 1 7 2 】

H 因子または H 因子をコードするポリヌクレオチドの存在下で行われるこの工程は、i n v i v o または e x v i v o で行うことができる。一般に、これらの方法では、未熟樹状細胞を H 因子に、下端 0 . 0 1、0 . 0 5、0 . 1、0 . 5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 2、1 5、2 0、5 0、または 1 0 0 マイクログラム / m l の培地；および上端 0 . 0 5、0 . 1、0 . 5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 2、1 5、2 0、5 0、1 0 0、または 2 0 0 マイクログラム / m l の培地の範囲内で曝すことができる。最も好ましくは、DC は、1 ~ 1 0 μ g / m l の H 因子の存在下で、最も好ましくは、2、5 および 1 0 μ g / m l で成熟させる。

【 0 1 7 3 】

好ましい実施態様では、樹状細胞前駆体集団は単球集団である。

【 0 1 7 4 】

用語「H 因子」、「H 因子の機能的に等価な変異体」、「H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチド」、「H 因子またはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクター」、「樹状細胞」、「寛容原性樹状細胞」は、上記に詳細に記載されている。

【 0 1 7 5 】

H 因子を用いて得られる本発明の寛容原性樹状細胞およびその治療的使用

別の面において、本発明は、H 因子もしくはその機能的に等価な変異体、または H 因子もしくはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを用いて得られる寛容原性細胞集団に関する。

【 0 1 7 6 】

別の面において、本発明は、H 因子またはその機能的に等価な変異体、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、または前記ポリペプチドを含んでなるベクターの存在下で樹状細胞を分化および / または成熟させることにより得られる本発明の寛容原性樹状細胞に関する。

【 0 1 7 7 】

本発明による寛容原性樹状細胞は、以下の特徴のうち 1 以上を示すことを特徴とする。

10

20

30

40

50

【0178】

- H L A - D R ⁺ および / または C D 1 4 ⁺ であること。用語「陽性」は、所与のマーカ-に適用される場合、本発明の方法により作出された寛容原性 D C 上での特定の細胞表面マーカ-の発現のレベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性 D C、または *i n v i t r o* 成熟により得られた成熟免疫刺激性 D C）の場合と実質的に同じであることを示す。

【0179】

- C D 8 0 ⁻、C D 8 3 ⁻、C D 8 6 ⁻、C D 1 a ⁻、C D 4 0 ⁻、C C R 7 ⁻、I D O ⁻ B I C - 1 ⁻ および / または S O D 2 ⁻ であること。用語「陰性」は、所与のマーカ-に適用される場合、本発明の方法により作出された寛容原性 D C 上での特定の細胞表面マーカ-の発現レベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性 D C、または *i n v i t r o* 成熟により得られた成熟免疫刺激性 D C）上での同じ細胞表面マーカ-の発現レベルに比べて 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % 低下しているか、または検出不能であることを示す。

10

【0180】

- I L - 1 2 p 7 0、I L - 1 0、I L - 8、I L - 6、T N F - α および / または I F N - γ などの炎症性サイトカインを分泌しないか、または成熟樹状細胞に比べて減少した量で分泌すること。用語「減少した量で分泌する」とは、所与のサイトカインに適用される場合、本発明の方法により作出された寛容原性 D C 上での特定のサイトカインの分泌レベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性 D C、または *i n v i t r o* 成熟により得られた成熟免疫刺激性 D C）上での同じ細胞表面マーカ-の分泌レベルに比べて 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % 低下しているか、または検出不能であることを示す。

20

【0181】

- 丸い形態を示すこと。本明細書において用語「丸い形態」とは、細胞の、細胞表面から突出している突起の数が、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性 D C、または *i n v i t r o* 成熟により得られた成熟免疫刺激性 D C）上の突起の数に比べて 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % 低下しているか、または検出不能である形態を意味する。細胞の形態は、本発明の実施例 4 に記載のように、すなわち走査型電子顕微鏡により決定可能である。

30

【0182】

- 未熟の場合、低いエンドサイトーシス能を示すこと。本明細書において用語「低いエンドサイトーシス能」とは、未熟寛容原性 D C のエンドサイトーシス活性が、適当な対照細胞（例えば、天然未熟免疫刺激性 D C）でのエンドサイトーシスレベルに比べて 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、もしくは 1 0 0 % 低下しているか、または検出不能であることを示す。エンドサイトーシス能は、例えば本発明の実施例 1 3 に記載のように決定することができる。

40

【0183】

- 細胞が分化 / 成熟過程の後も生存を維持する、すなわち、細胞がアポトーシスを受けないこと。本明細書において用語「生存」とは、成熟刺激（例えば、L P S）による処理後にアポトーシスを受ける細胞が、5 0 % 未満、4 0 % 未満、3 0 % 未満、2 0 % 未満、1 0 % 未満、5 % 未満、4 % 未満、3 % 未満、2 % 未満または 1 % 未満である集団を意味する。アポトーシスは、アネキシン V / 7 - A D D 染色、カスパーゼ - 3 活性化アッセイ、T U N E L および D N A 断片化アッセイ、ミトコンドリア膜電位の測定などの当技術分野で一般に公知のいずれの方法によって測定してもよい。

【0184】

50

- 成熟樹状細胞に比べて、CCL21に対する走化性挙動が低下したこと。本明細書において「走化性挙動が低下した」とは、本発明の方法により作出された細胞の、寛容原性DC上のCCL21に対する走化性のレベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC）上の同じサイトカインに対する走化性のレベルに比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%低下しているか、または検出不能であることを示す。CCL21に対する寛容原性樹状細胞の走化性挙動は、例えば本発明の実施例5に記載のように決定することができる。

【0185】

- 成熟樹状細胞に比べて、同種異系T細胞増殖を阻害する能力が低下したこと。本明細書において用語「同種異系T細胞増殖を阻害する能力が低下した」とは、本発明の方法により作出された細胞と接触させた同種異系T細胞の増殖レベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC）と接触させた同種異系T細胞で見られる増殖レベルに比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%低下しているか、または検出不能であることを示す。寛容原性樹状細胞の同種異系T細胞増殖を阻害する能力は、例えば本発明の実施例6に記載のように実施することができる。

10

【0186】

- 未熟DCとは対照的に、炎症誘発シグナルの存在下で保持される安定な免疫調節表現型を示すこと。寛容原性樹状細胞の、安定な免疫調節表現型を示す能力は、例えば、本発明の実施例16に記載のように決定することができる。

20

【0187】

- 成熟樹状細胞に比べて、炎症誘発条件下でTh1分化を阻害する能力を示すこと。本明細書において用語「Th1分化を阻害する」とは、本発明の方法により作出された細胞と接触させたT細胞により作出されるTh1細胞のレベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC）と接触させたT細胞で見られるTh1分化のレベルと比較して10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%低下している、または検出不能であることを示す。寛容原性樹状細胞の、Th1分化を阻害する能力は、例えば、本発明の実施例17に記載のように、IFN- γ 産生を測定することにより決定することができる。

30

【0188】

成熟樹状細胞に比べて、高い制御性T細胞（Treg）生成能を示すこと。本明細書において用語「高い制御性T細胞生成能」とは、本発明の方法により作出された細胞と接触させたT細胞の制御性T細胞の生成レベルが、適当な対照細胞（例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC）と接触させたT細胞の生成レベルに比べて、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加していることを示す。寛容原性樹状細胞の制御性T細胞（Treg）生成能は、例えば本発明の実施例17に記載のように決定することができる。好ましい実施形態では、本発明による寛容原性細胞は、HLA-DR⁺、CD14⁺、CD80⁻、CD83⁻、CD86⁻、CD1a⁻、CD40⁻、CCR7⁻、IDO⁻、BIC-1⁻および/またはSOD2⁻である。

40

【0189】

好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a⁻である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a⁻およびCD86⁻である。別の好ましい実施形態では、本発明による寛容原性細胞はCD1a⁻、CD86⁻およびIDO⁻である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a⁻、CD86⁻、IDO⁻およびアポトーシス耐性である。好ましい実施態様では、本発明による寛

50

容原性細胞はCD1a⁻およびIDO⁻である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD1a⁻およびアポトーシス耐性である。好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD86⁻およびIDO⁻である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はCD86⁻およびアポトーシス耐性である。別の好ましい実施態様では、本発明による寛容原性細胞はIDO⁻およびアポトーシス耐性である。

【0190】

別の実施態様では、本発明による寛容原性樹状細胞は、本発明者らの寛容原性C4BP(b⁻)処理DCまたはH因子処理DCにより、ヒトメモリーCD4⁺T細胞のAg特異的免疫寛容(または低反応性)を誘導することができる。

【0191】

本発明による寛容原性細胞の特徴は表3に提供されている。

【0192】

別の面において、本発明は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、97%、98%または99%の本発明の寛容原性樹状細胞を含んでなる細胞集団に関し、好ましくは、この細胞集団は少なくとも80%の本発明の寛容原性樹状細胞を含んでなる。

【0193】

さらに別の面では、本発明は、免疫疾患の予防および/または治療において使用するための、H因子もしくはその機能的に等価な変異体、またはH因子もしくはその機能的に等価な変異体をコードするポリヌクレオチドを用いて得られる寛容原性細胞集団に関する。

【0194】

別の面において、本発明は、免疫疾患の予防および/または治療用薬剤の製造のための、H因子またはH因子をコードするポリヌクレオチドを用いて得られる寛容原性細胞の使用に関する。

【0195】

別の態様において、本発明は、必要とする対象における免疫疾患の予防および/または治療のための方法であって、前記対象に、H因子またはH因子をコードするポリヌクレオチドを用いて得られる寛容原性細胞を投与することを含んでなる方法に関する。

【0196】

別の態様において、本発明は、必要とする対象において制御性T細胞集団を増加させるための方法であって、前記対象に、H因子またはH因子をコードするポリヌクレオチドを用いて得られる寛容原性樹状細胞集団を投与することを含んでなる方法に関する。

【0197】

「免疫疾患」という表現は、上記に詳細に記載されており、H因子の使用を含む治療的方法に関しても同じ意味で使用される。好ましい実施態様では、免疫疾患は、免疫炎症性疾患、敗血症、自己免疫疾患および移植拒絶からなる群から選択される。「免疫炎症性疾患」、「敗血症」、「自己免疫疾患」および「移植拒絶」という表現は、上記に詳細に記載されており、本発明の治療方法に関しても同じ意味で使用される。

【0198】

本明細書において「制御性T細胞集団を増加させる」という表現は、本発明の寛容原性樹状細胞集団が、適当な対照細胞(例えば、天然成熟免疫刺激性DC、または*in vitro*成熟により得られた成熟免疫刺激性DC)で処置された対象に比べて制御性T細胞の数の増加をもたらすことを意味する。制御性T細胞集団は、対照細胞で処置した対象非処置対象に比べて10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%増加される。本発明の寛容原性樹状細胞集団の、制御性T細胞集団を増加させる能力は、例えば実施例17に記載のように決定することができる。

【0199】

本発明を以下の実施例により詳しく説明するが、これらの実施例は単に例示であって、本発明の範囲を限定するものではないとみなされるべきである。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0200】

材料および方法培養培地およびタンパク質

RPMI 1640に、100 μg/mlのストレプトマイシン、100 IU/mlのペニシリンおよび2 mM L-グルタミン(総てInvitrogen、カールズバッド、CAから)+/-10%熱失活ウシ胎児血清(Linus、カルテック、スペイン)を添加した。

【0201】

本発明者らは、本研究を通して、3つのC4BPアイソフォームを用いた。C4BP₇₁(プロテインSとの複合体)とC4BP₇₀は、プールされたヒト血漿から以前(Dahlback, B. et al., Biochem J. 1983. 209: 847-856)に記載されたように精製した。重合組換え全長C4BP₆₀と個々の鎖CCPを欠く(CCP1~8)突然変異体の両方を真核細胞で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した(Blom, A. M., L. et al., 2001, J Biol Chem. 276: 27136-27144)。

10

【0202】

C4BP鎖CCP6由来ペプチドPS6-01、PS6-02、PS6-03、およびPS6-04はCaslo Laboratory Aps(デンマーク)から合成した。

【0203】

ヒト血清から精製した因子は商業的に入手した(10-15-1106、Biopur AG、スイス)。

20

【0204】

細胞培養

末梢血単核細胞(PBMC)は、Blood and Tissue Bank(バルセロナ、スペイン)の健常ドナーに属するパフィーコート調製物から、フィコール-パーク(Ficoll-Paque)(商標)密度勾配遠心分離(GE Healthcare Bio-Sciences AB; ウプサラ、スウェーデン)の後に得た。単球を次の2つの異なる方法により精製した。1)細胞を60 mm培養プレート(Corning、スペイン)にて血清不含RPMI中、 1×10^6 細胞/mlで播種し、37、5%CO₂中で2時間接着させた。非接着細胞をPBSで洗浄することにより除去した。抗CD14染色単離物のフローサイトメトリーにより示されるように、最終的な集団は80%を超える単球を含んでいた。2)細胞を、モノクローナルマウス抗ヒトCD14抗体(MACS、Miltenyi Biotec、オーバーン、CAまたはEasySep(登録商標)Positive Selection Cocktail、StemCell Technologies、グレノーブル、フランス)を結合させたコロイド状超常磁性マイクロビーズを用いて精製した。CD14⁺細胞の純度は、CD14染色およびフローサイトメトリー分析(>90%CD14⁺細胞)により試験した。単球由来DC(Mo-DC)は、培養0日目および3日目に単球培養に完全RPMI 1640培地+GM-CSF(800 UI/ml)およびIL-4(500 UI/ml)(両方ともGentaur、カンペンハウト、ベルギー)を添加することにより生成した。DC成熟のため、5日目にiDCを、5 μg/ml LPS(大腸菌(Escherichia coli)055.B5、Sigma L2880、コペンハーゲン、デンマーク)で48時間さらに刺激した。

30

40

【0205】

CD3⁺T細胞は、EasySep Human T cell Enrichment Kit(StemCell Technologies、グレノーブル、フランス)を用いた陰性選択(negative selection)によりPBMCから単離した。FACSscan(Becton-Dickinson、バーゼル、スイス)を用いたCD3染色により評価したところ、CD3⁺T細胞は90%を超える純度であった。

【0206】

50

抗体およびフローサイトメトリー

以下のモノクローナル抗体：FITC結合抗HLA-DR (Immu-357)、FITC結合抗CD83 (HB15a)、FITC結合抗CD14 (RMO52)、PE結合抗CD40 (MAB89)、PE結合抗CD1a (BL6)、PE結合抗CD80 (MAB104)、PE結合抗CD86 (HA5.2B7) (総てBeckman-Coulterから)、Alexa Fluor 488結合抗CCR7 (TG8/CCR7、Biolegend、サンディエゴ、CA)、および同じ商業供給者からの個々のアイソタイプ対照を用いて細胞表面表現型を分析した。PBSで洗浄した後、続いて細胞を100 μ lのFACSバッファー(1%BSAおよび0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBS)中、3 μ l MoAb / 10⁵細胞で、室温にて20分間染色した。染色細胞を、FACS caliber (Becton Dickinson)を用いて分析した。前方散乱(FSC)および側方散乱(SSC)パラメーターに従ってMo-DCのゲートを設定した。Cell Quest Proソフトウェア(Becton Dickinson)を用い、結果を解析した。

10

【0207】

C4BPおよびH因子処理

異なるC4BPアイソフォーム(7₁、7₀および6₀)とH因子の両方を、Mo-DC分化、成熟またはその両方を通して、2、5および10 μ g/mlで加えた。すなわち、分化アッセイでは、0日目にタンパク質を加え、3日目に補充した。成熟アッセイでは、5日目にタンパク質を単独またはLPSと組み合わせて加えた。最後に、分化+成熟アッセイでは、0日目、3日目および5日目にタンパク質を加えた(最後の時点でLPSと組み合わせた)。

20

【0208】

走査型電子顕微鏡(SEM)

単球をスライドガラスに播種し、ポリ-L-リシン(25 μ g/ml)またはフィブロネクチン(42 μ g/ml)のいずれかで覆い、800 U/ml GM-CSF、500 U/ml IL-4、およびC4BPアイソフォーム7₁、7₀、またはH因子(10 μ g/ml)を添加した完全RPMI培地中で5日間培養し、さらに、同じ培地中で48時間LPSで刺激した。得られたDCをカコジル酸バッファー中、1%パラホルムアルデヒドおよび1.25%グルタルアルデヒドで2時間固定した。最後に、これらの細胞を1%OsO₄中で後固定し、一連の段階的エタノール、次いでアセトンで脱水した。脱水後、細胞を臨界点乾燥機で乾燥させ、金でコーティングした後、走査型電子顕微鏡(Zeiss DSM940A)により観察した。

30

混合白血球反応

CD3⁺T細胞(10⁵/ウェル)とC4BP処理(7₁および7₀)、またはH因子処理、かつLPS活性化Mo-DCを96ウェル丸底プレートに様々なDC:T細胞比(1:40、1:80および1:160)で播種し、100 μ g/mlのストレプトマイシン、100 IU/mlのペニシリンおよび2 mM L-グルタミン(総てInvitrogenから)+2%ヒトAB血清を添加したX-VIVO 15培地(BioWittaker、ウォーカーズビル、MD)中で培養した。5日間のインキュベーション後にアロ特異的増殖を測定した。4日目に、これらの共培養物に5000 radで5分の照射を行った後、[³H]-チミジン(1 μ Ci/ウェル、Perkin Elmer、ピストン、MA)を加え、その後、さらに16時間インキュベートした。次いで、標識細胞をFiltermate Harvester(Packard、メリデン、CT)でガラス繊維フィルターに回収し、T細胞増殖速度を、TopCount NXTカウンター(Packard)で測定した[³H]-チミジン取り込みにより求めた。結果を、4反復の培養ウェルでのチミジン取り込みの平均cpm \pm SDで報告する。

40

【0209】

定量的RT-PCR

Mo-DC(10⁶/条件)を7日目に回収し、RNeasy RNA単離キット(Q

50

Qiagen)を用いてmRNAを抽出し、RNアーゼ不含DNアーゼI(Ambion、オースティン、TX)とともに製造者のプロトコールに従ってインキュベートした。二工程リアルタイムRT-PCR技術を用いて、ヒトCCR7、BIC-1、IDOおよびSOD2の相対的mRNAレベルを決定した。逆転写反応は、OmniScript RTキット(Qiagen)を用い、500ngの全RNAで行った。mRNAレベルの定量は、LightCycler技術(Roche Molecular Biochemicals、インディアナポリス、IN)を用いたリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行った。以下のプライマー:

CCR7-f(5'-TGGGCATCTGGATACTAGC-3')(配列番号6);CCR7-r(5'-AAGAAAGGGTTGACGCAGC-3')(配列番号7);IDO-f(5'-GGTCATGGAGATGTCCGTA-3')(配列番号8);IDO-r(5'-ACCAATAGAGAGACCAGGAAGAA-3')(配列番号9);BIC-1-f(5'-AACCTACCAGAGACCTTACC-3')(配列番号10);BIC-1-r(5'-ATGCTTCTTTGTCATCCTCC-3')(配列番号11);SOD2-f(5'-GACAAACCTCAGCCCTAAC-3')(配列番号12);SOD2-r(5'-ACACATCAATCCCCAGCAGT-3')(配列番号13)を用いて、それぞれ435bp、227bp、296bp、および248bpの産物を得た。これらの遺伝子特異的プライマー対は、Oligo 4.0およびPrimer 3ソフトウェアパッケージ(MBI、Cascade、CO)を用いて設計し、プライマーダイマーの形成を防ぐように選択した。

【0210】

総てのサンプルは、下記のプライマーセットを用いて、構成的に発現するヒトシクロフィリン遺伝子に関して正規化した。

CypA-f(5'-CTCCTTTGAGCTGTTTGCAG-3')(配列番号14)およびCypA-r(5'-CACCACATGCTTGCCATCC-3')(配列番号15)(Pluvinet R. et al., 2004, Blood. 104: 3642-3646)。プライマーは総て、Bonsai Technologies(コペンハーゲン、デンマーク)から購入した。

【0211】

PCR増幅は、2μlの調製済み反応ミックス、10×DNA Master SYBR Green I(Roche Molecular Biochemicals); MgCl₂(CCR7の場合には3mM; BIC-1およびSOD2の場合には4mM; そしてIDOの場合には5mM); 0.15μMの各プライマー; 5%ジメチルスルホキシド(DMSO); および鋳型としての75ng cDNAを含有する20μl容量で行った。増幅プログラムは、95°Cで10分間の初期変性、次いで、95°Cで1秒; 58°C(CCR7およびSOD2)/60°C(BIC-1およびIDO)で5秒; 72°Cで10秒の45サイクルを用いた。このアッセイの再現性が確認され、これら4つの遺伝子の発現は選択した細胞濃度では直線範囲にあることが示された。

【0212】

走化性アッセイ

C4BPアイソフォーム7-1、7-0、またはH因子の存在下で分化および成熟した(LPS、48時間)Mo-DCを、トランスウェルアッセイを用い、CCL21ケモカインへと向かう移動に関して調べた。簡単に述べると、トランスウェルプレート(孔径8.0μmのポリカーボネートフィルター; Costar、コーニング、NY)の下方のチャンバーを、CCL21(200ng/ml)を含むまたは含まない400μlの完全RPMIで満たした。100μlの完全RPMI中、合計1×10⁵個のDCを上方のチャンバーに加え、細胞を37°Cで2時間インキュベートした。下方のチャンバーへ移動した細胞を回収し、Cell Questソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて2分の一定時間の現象を取得するFACS Caliburフローサイトメーターでカウントを行った。総ての刺激条件の移動アッセイを2反復のウェルで実施した。値は非処理mDC(100%)に対する移動細胞のパーセンテージとして示す。

【0213】

DCサイトカイン分泌

Th1/Th2 Flow cytometry Multiplexキット(Bende

10

20

30

40

50

r - M e d s y s t e m s、ウィーン、オーストリア) を製造者の説明書に従って用い、C 4 B P アイソフォーム 7 1 および 7 0 で処理したDC上清から、I L - 1 2 p 7 0、T N F - 、I F N - 、I L - 1 0、I L - 6 および I L - 8 の濃度を測定した。

【0214】

エンドサイトーシス活性

i DCの食作用活性を測定するために、2 x 10⁵ 細胞/mlを100 μlのPBSに再懸濁させ、4 μlのBODIPY FL結合DQ-オボアルブミン(1mg/ml、DQ-OVA、Molecular Probes、ライデン、オランダ)とともに37 または0 で15分間インキュベートした。1mlの冷FACSバッファーを加えること

10

【0215】

アポトーシスの測定

蛍光色素アネキシンV(アネキシンV-PEアポトーシス検出キットI、BD Pharmingen、サンディエゴ、CA)と7-アミノ-アクチノマイシンD(7-ADD)(BD Pharmingen)を用いた二重染色およびフローサイトメトリー分析を用いて、C4BP₇₁-、C4BP₇₀-、recC4BP₆₀-、またはH因子処理および非処理Mo-DC生存/アポトーシス状態を評価した。

20

【0216】

細胞内サイトカイン染色

健常ドナーから単離した単核細胞を96ウェル丸底プレート(Nunc)に1 x 10⁵ 細胞/ウェルの密度で播種し、同種異系DC(5 x 10³ DC/ウェル)で6日間刺激した。その後、全細胞を10 μg/mlプレフェルジンA(Sigma)の存在下、50 ng/mlホルボール12-ミリステート13-アセテート(PMA、Sigma)+500 ng/mlイオノマイシン(Sigma)で5時間刺激した。刺激後、細胞をPBSで洗浄し、固定し、IntraStainキット(Dako)を用いて透過処理を施し、抗ヒトIFN-γ APC mAb(eBioscience)とともに室温で28分間インキュベートした。細胞を洗浄し、FACSDivaソフトウエア(Becton-D

30

【0217】

CD4⁺ CD127^{low/negative} CD25^{high}かつFoxp3⁺ T細胞の判定

CD3⁺ Tリンパ球は、単核細胞からEasySep(登録商標) Human T Cell Enrichment Kit(StemCell Technologies)を製造者の説明書に従って用いた陰性選択(negative selection)により精製した。純度は、総ての実験で95%を超えた。富化されたT細胞を96ウェル丸底プレートに播種した(10⁵ 細胞/ウェル)。5日間の共培養(1DC:40T)の後、本発明者らはフローサイトメトリーを用い、CD4⁺、CD127^{low/negative}、CD25^{high}かつ細胞内Foxp3⁺として定義されるTregsのパーセンテージを決定した(Human Regulatory T Cell Staining Kit; eBioscience、サンディエゴ、CA、USA)。染色細胞を、FACSCanto II(Becton Dickinson)を用いて分析し、結果を、FlowJoソフトウエア(Tree Star, Inc、OR、USA)を用いて分析した。

40

【0218】

統計分析

結果を平均 +/- SDとして表す。参照条件(通常、mDCsまたはiDC)に対する種々の試験条件下のMo-DC変量を独立スチューデントのt検定を用いて比較し、p <

50

0.05を有意とみなした。

【0219】

実施例 1

鎖を欠くC4BPアイソフォームはヒトMo-DCの活性化表現型をダウンレギュレートする

本発明者らは、まず、主要な天然C4BPアイソフォーム 7-1および 7-0と、組換えC4BP 6-0が、CD14、HLA-DR、CD40、CD80、CD83、CD86、およびCD1aを含む種々の単球およびDC表面マーカーの発現に影響を及ぼすかどうかを評価した。独立した8実験からのデータを、独立スチューデントのt検定を用いて分析した(図1)。興味深いことに、7日間の分化および成熟過程中、Mo-DCとC4BPとの共インキュベーションにより、異なるC4BPアイソフォーム間の有意な表現型の違いが明らかになった。よって、主要なC4BP 7-1アイソフォームはLPS成熟DC上での上記マーカーのいずれの発現にも影響を及ぼさず、C4BP 7-0アイソフォーム(7-0および組換え6-0)は、CD83、CD86、CD80およびCD1aを有意に用量依存的にダウンレギュレートした。逆に、Mo-DC上でのHLA-DRおよびCD40発現はC4BP 7-0アイソフォーム処理により変化しなかった。これらのデータを考え合わせると、様々な細胞表面マーカーの発現パターンによって判断して、C4BP 7-0アイソフォームが炎症誘発性MoDCの分化/成熟を改変する能力を有することが明らかである。さらに、種々のC4BPアイソフォームで処理したMo-DCは、アネキシンV/7-ADD染色により評価したところ、分化/成熟過程を通して高い生存率を維持しており、LPSを介したDC成熟の48時間後に明示されたアポトーシス細胞は10%未満であった(図2)。

【0220】

実施例 2

鎖を欠くC4BPアイソフォームに曝されたヒトMo-DCはCCR7およびDC成熟マーカーIDOおよびBIC-1の発現が低い

成熟中のDCの分子サインを適合させる重要な転写物[Jin et al., 2010, J Transl Med. 8: 4]に対するC4BPアイソフォームの影響をさらに評価するために、DC移動に関与するケモカイン受容体CCR7の発現、トリプトファン代謝に関与する免疫調節酵素IDO、および免疫機能に関与する重要なmiRNAであるmiR-155をコードするBIC-1遺伝子を、RT-qPCRにより分析した。これらの分子バイオマーカーは総て、LPSを介したMo-DC成熟時にアップレギュレートされることが判明した。しかしながら、C4BP 7-0およびC4BP 6-0(C4BP 7-1は除く)で前処理したMo-DCは、上記の転写プロファイルを有意にダウンレギュレートし、CCR7、IDOおよびBIC-1転写物レベルを未熟DCからの転写物レベルと同等にした(図3A)。さらに、C4BP 7-0アイソフォーム処理は、Mo-DC上の表面受容体CCR7の一貫したダウンレギュレーションを誘導した(図3B)。

【0221】

実施例 3

鎖を欠くC4BPアイソフォームはLPS成熟ヒトMo-DCによる炎症性サイトカインの放出を阻害する

本発明者らは、次に、Mo-DC表現型に対する種々のC4BPアイソフォームの効果が、それらのサイトカイン(IL-12p70、IL-10、IL-8、IL-6、TNF- α 、およびIFN- γ)放出の変化を伴うかどうかを評価した(図4)。非処理iDCに比べ、iDCをLPSで成熟させた場合には、これらの各サイトカインの分泌がアップレギュレートされた。Mo-DCをC4BP 7-1で前処理すると、成熟時の非処理Mo-DCと同等のサイトカインレベルが分泌された。これに対して、C4BP 7-0アイソフォームのいずれかで前処理すると、IL-12p70、TNF- α およびIFN- γ の放出は妨げられ、IL-8およびIL-6の放出は低下し、IL-10の産生は高まった。よって、LPSを介したMo-DC刺激時の炎症誘発性サイトカイン産生は、C

10

20

30

40

50

4 B P アイソフォーム処理 DC では有意に低減された。

【0222】

実施例 4

鎖を欠く C4BP アイソフォームはヒト Mo-DC の形態を改変する

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、Mo-DC の詳細な表面形態を評価した (図 5)。LPS 曝露前の非処理 iDC は本質的に丸い形態であったが、48 時間の LPS 成熟の後には樹状形態が顕著となり、細胞表面から突出している多くの長い突起を有していた。この場合にも、C4BP アイソフォーム 7-1 処理 Mo-DC は、LPS 刺激時の非処理 Mo-DC と類似の外観を持っていた。逆に、C4BP アイソフォーム 7-0 (図 5) および C4BP アイソフォーム 6-0 (示されていない) での Mo-DC 処理は両方とも、LPS 誘導時の結果としての「ヤマアラシ様」の DC 形態を逆戻りさせた。

10

【0223】

実施例 5

鎖を欠く C4BP アイソフォームはヒト Mo-DC の走化性を変化させる

成熟シグナルは、リンパ節指向性ケモカインへの移動などの明瞭な Mo-DC 機能の発現を決定付ける。従前に示されるように、C4BP アイソフォーム処理は、ケモカイン受容体 CCR7 をダウンレギュレートした。表面 CCR7 発現の低下は、次に、ケモカイン CCL21 へと向かう LPS 成熟 Mo-DC の移動を停止させた (図 6)。これに対して、非処理 Mo-DC および C4BP アイソフォーム 7-1 処理 Mo-DC の LPS 成熟は両方とも CCL21 に応答して最大の移動を誘導した。

20

【0224】

実施例 6

鎖を欠く C4BP アイソフォームに曝されたヒト Mo-DC は同種異系 T 細胞の増殖を阻害する

C4BP アイソフォームが表現型成熟および Mo-DC により放出される炎症性サイトカインの量に対して影響を及ぼすことが判明したので、本発明者らは、次に、主要な C4BP アイソフォームに曝された Mo-DC の免疫刺激能を調べた。Mo-DC を C4BP アイソフォーム 7-1 アイソフォームとともにプレインキュベートし、かつ、LPS で成熟させた場合には、非処理の LPS 成熟 Mo-DC を用いて得られたものと同様の、同種異系 T 細胞の最大増殖が見られた。これに対して、C4BP アイソフォーム 7-0 とともにプレインキュベートした成熟 Mo-DC が誘導した T 細胞増殖は有意に低く、iDC を用いた場合に見られたレベルに近かった (図 7)。同様の結果がナイーブ T 細胞を用いた場合にも見られた (データは示されていない)。

30

【0225】

実施例 7

C4BPA の CCP6 ドメインはヒト Mo-DC に対する C4BP 「寛容原性」活性に必要である

本発明者らは、次に、C4BP アイソフォームの、Mo-DC に対するそれらの免疫調節活性または「寛容原」活性の構造要件をさらに同定することにねらいを定めた。よって、個々の CCP ドメインを欠く組換え C4BP アイソフォーム (6-0) を、Mo-DC の活性化表現型をダウンレギュレートする能力に関して試験した。図 8 に示されるように、個々の欠失突然変異体は、CCP6 の 1 つを除いて総てが、LPS 誘導時の CD83 成熟マーカーのアップレギュレーションを有意に妨げることができた。逆に、C4BP アイソフォーム CCP6 処理 Mo-DC は、LPS 誘導時の非処理または C4BP アイソフォーム 7-1 処理 Mo-DC と同様の挙動を見せ、CD83 発現をアップレギュレートし (図 8)、また、分子バイオマーカー (IDO) のアップレギュレーション、炎症誘発性サイトカイン分泌、または表面形態の変化などの他の典型的な成熟形質の誘導も妨げなかった (データは示されていない)。よって、C4BP アイソフォーム 鎖 CCP6 ドメインは、DC における C4BP アイソフォームの免疫調節剤活性に必要である。

40

【0226】

50

実施例 8CCP6に基づくペプチドPS6-04はヒトMo-DCの成熟表現型を妨げる

本発明者らは、N末端でアセチル化されC末端でアミド化され、Cysアミノ酸がSerで置換された全CCP6ドメイン配列を包含する4つの合成ペプチド(PS6-01、PS6-02、PS6-03、およびPS6-04)を作成し、それらがLPS刺激Mo-DCに対するC4BP - アイソフォームの免疫調節活性または「寛容原」活性を模倣するかを試験した(図9)。これらのペプチドのうちPS6-02およびPS6-03の2つは、LPS成熟Mo-DC時のCD83のアップレギュレーションを妨げると思われた。PS6-02は、DCに対して毒性であった。よって、短い14マーのペプチドPS6-04は100 μMで、Mo-DCに対し、そのC4BP - 6-0対応物に匹敵する効果を誘導した。

【0227】

実施例 9H因子はヒトMo-DCの活性化表現型をダウンレギュレートする

本発明者らは、まず、ヒト血漿から精製したH因子が、CD14、HLA-DR、CD40、CD80、CD83、CD86、およびCD1aを含む種々の単球およびDC表面マーカーの発現に影響を及ぼすかどうかを評価した。独立した5実験のデータを、独立スチューデントのt検定を用いて分析した(図10)。興味深いことに、それらの分化および成熟過程を通してMo-DCとH因子との共インキュベーションを行うことにより、非処理Mo-DCに対する有意な表現型の違いが明らかになった。よって、H因子は、CD83、CD86、CD80、CD40およびCD1aを有意に用量依存的にダウンレギュレートした。逆に、HLA-DRおよびCD14の発現は若干の増強を受けた。これらのデータを考え合わせると、様々な細胞表面マーカーの発現パターンによって判断して、H因子は炎症誘発性Mo-DC分化/成熟を改変する能力を有することが明らかである。さらに、H因子で処理したMo-DCは、アネキシンV/7-AAD染色により評価したところ、分化/成熟過程を通して高い生存率を維持しており、LPSを介したDC成熟の48時間後に明示されたアポトーシス細胞は10%未満であった(図11)。

【0228】

実施例 10H因子に曝されたヒトMo-DCはCCR7およびDC成熟マーカーIDO、BIC-1およびSOD2の発現が低い

成熟中のDCの分子サインを適合させる重要な転写物(Jin et al., 2010, J Transl Med. 8: 4)に対するH因子の影響をさらに評価するために、DC移動に關与するケモカイン受容体CCR7の発現、トリプトファン代謝に關与する免疫調節酵素IDO、免疫機能に關与する重要なmiRNAであるmiR-155をコードするBIC-1遺伝子、および抗酸化酵素SOD2を、RT-qPCRにより分析した。これらの分子バイオマーカーは総て、LPSを介したMo-DC成熟時にアップレギュレートされることが判明した。しかしながら、H因子で前処理したMo-DCは、上記の転写プロフィールを有意にダウンレギュレートし、CCR7、IDOおよびBIC-1およびSOD2転写物レベルを未熟DCからの転写物レベルを下回るまでにした(図12A)。さらに、H因子処理は、Mo-DC上の表面受容体CCR7の一貫したダウンレギュレーションを誘導した(図12B)。

【0229】

実施例 11H因子はLPS成熟ヒトMo-DCによる炎症性サイトカインの放出を阻害する

本発明者らは、次に、H因子の効果が、それらのサイトカイン(IL-12p70、IL-10、IL-8、IL-6、TNF-、およびIFN-)放出の変化を伴うかどうかを評価した(図13)。非処理iDCに比べ、iDCをLPSで成熟させた場合には、これらの各サイトカインの分泌がアップレギュレートされた。H因子で前処理すると、上述の総ての炎症性サイトカインの放出が妨げられ、そのレベルは非処理iDCからのレ

10

20

30

40

50

ベル付近に維持された。よって、LPSを介したMo-DC刺激時の炎症誘発性サイトカイン産生は、H因子処理DCでは有意に低減された。

【0230】

実施例12

H因子はヒトMo-DCの形態を改変する

走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて、Mo-DCの詳細な表面形態を評価した(図14)。LPS曝露前の非処理iDCは本質的に丸い形態であったが、48時間のLPS成熟の後には樹状形態が顕著となり、細胞表面から突出している多くの長い突起を有していた。この場合にも、Mo-DCのH因子による処理(図14)は、LPS刺激時の結果としての「ヤマアラシ様」のDC形態を逆戻りさせた。

10

【0231】

実施例13

H因子はiDCのエンドサイトーシス能を低下させる

本発明者らは、次に、H因子が未熟Mo-DCのエンドサイトーシス活性に影響を及ぼすかどうかを調べた。Mo-DCを蛍光DQ-OVAとともに37℃でインキュベートして特異的取り込みを測定し、4℃で非特異的結合を定量した。H因子はiDCのエンドサイトーシス能を有意に低下させた(図15)。特に、H因子はiDCの食作用を、mDCに見られる食作用のレベルにまで低下させた(データは示されていない)。4℃では、未熟Mo-DCによるDQ-OVAの取り込みは見られなかった。これらのデータは、H因子がiDCのエンドサイトーシス能を低下させることを示す。

20

【0232】

実施例14

H因子はヒトMo-DCの走化性を変化させる

成熟シグナルは、リンパ節指向性ケモカインへの移動などの明瞭なMo-DC機能の発現を決定付ける。従前に示されるように、H因子処理は、ケモカイン受容体CCR7をダウンレギュレートした。表面CCR7発現の低下は、次に、ケモカインCCL21へと向かうLPS成熟Mo-DCの移動を停止させた(図16)。これに対して、非処理Mo-DCのLPS成熟はCCL21に応答して最大の移動を誘導した。

【0233】

実施例15

H因子に曝されたヒトMo-DCは同種異系T細胞増殖を阻害する

H因子が活性化表現型およびMo-DCにより放出される炎症性サイトカインの量に対して影響を及ぼすことが判明したので、本発明者らは、次に、H因子に曝されたMo-DCの免疫刺激能を調べた。非処理のLPS成熟Mo-DCを混合白血球反応で使用した場合、同種異系T細胞の最大増殖が見られた。これに対して、H因子とともにプレインキュベートしたMo-DCが誘導したT細胞増殖は有意に低く、iDCを用いた場合に見られたレベルに近かった(図17)。同様の結果がナイーブT細胞を用いた場合にも見られた(データは示されていない)。

30

【0234】

実施例16

C4BP(-)およびFHはDCに安定な表現型を誘導する

臨床現場におけるそれらの使用の可能性のため、本発明者らは、C4BP(-)またはFH処理かつLPS成熟DCの潜在的活性化がこれらの寛容原性DCの表現型を改変するかどうかを検討することにねらいを定めた。従って、非処理DCおよびC4BP(-)またはFH処理DCの両方を前述のようにLPSで成熟させた後、免疫調節剤(C4BP(-)またはFH)を用いずに、TNF- α +IFN- γ を用いて24時間再刺激した。TNF- α +IFN- γ を用いた再刺激は、DC生存率(示されていない)においてもCD83およびCD86マーカーに関するDC表現型(図18)においても、有意な変化は誘導しなかった。これらの寛容原性C4BP(-)またはFH処理DCは二次刺激には表現型的に不応であり、それらの安定な非炎症誘導性プロフィールが確認された。

40

50

【0235】

実施例17

C4BP (-) またはFH処理かつLPS成熟DCはCD4 + Th1分極を妨げるとともに同種異系T細胞にTreg表現型を誘導する

C4BP (-) およびFH処理およびLPS成熟DCが同種異系T細胞の増殖を阻害するできたことを確認した後、本発明者らは、これらの応答T細胞により分泌されたサイトカインに関して洞察を得ることを考え、CFSE^{low}アロ増殖性Tリンパ球をPMA + イオノマイシンで再刺激し、IFN- γ 産生を細胞内染色により測定した。これらの結果により、LPS成熟した非処理DCのIFN- γ 産生の約50 ~ 60%という有意な低下が確認された(図19)。

10

【0236】

最後に、CD4 + CD127^{low}CD25^{high}およびFoxp3+として定義されるTreg細胞の存在を、これらの培養条件で評価した。6日間の刺激を1回行った後、本発明者らは図20に示されるように、CD4 + Foxp3+およびCD25^{high}, CD127^{low}/negative細胞の誘導を分析した。C4BP (-) 処理およびLPS成熟DCで刺激したT細胞ならびにFH処理およびLPS成熟DCで刺激したT細胞は両方とも、CD4 + Foxp3+およびCD25^{high}, CD127^{low}/negative細胞のパーセンテージに有意な増加を示し、この増加は非処理の未熟DCで得られたものと類似していた。

20

【0237】

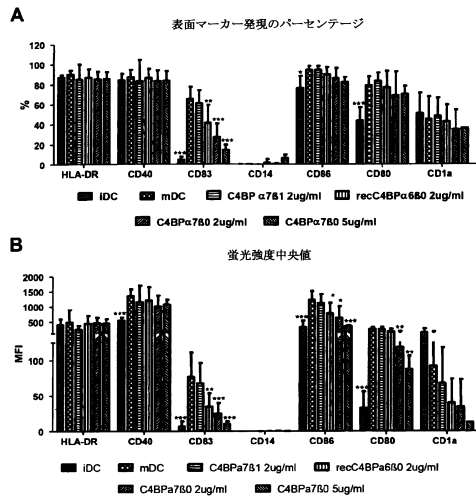
実施例18

養子導入されたC4BP (-) 処理またはH因子処理DCはin vivoにおいて同種免疫を抑制する

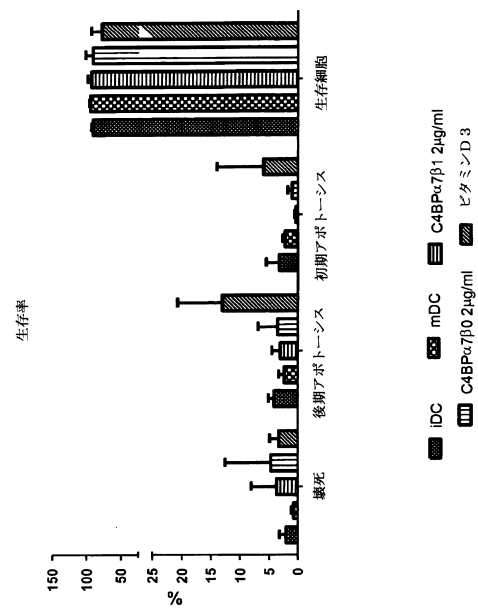
本発明者らは、ヒト異種移植片対宿主病(xeno-GvHD)モデル(King et al.(2009) Clin. Exp. Immunol. 157: 104-118)において、C4BP (-) 処理またはH因子処理された単球由来DCのin vivo寛容原性または調節能を評価した。ヒト末梢血単核細胞(PBMC; 10×10^6 / マウス)の静脈注射は、NSG免疫欠陥マウス(The Jackson Laboratory)(8 ~ 12週齢)にxeno-GvHDを誘発した(生存期間中央値30 ~ 40日)。C4BP (-) 処理またはH因子処理した単球由来DC(5×10^5 / マウス)とPBMCとの同時導入(予防試験)または後の注入(PBMC注射の25日後、またはPBMC注射動物に、例えば体重減少、姿勢の屈曲、体毛損失、運動低下などの最初の病徴が現れた際)(治療試験)は、PBMC単独を注射した動物よりも生存期間を有意に延長したが、非処理DCまたはC4BP (+) 処理DCの導入によっては有意な保護は付与されなかった。

30

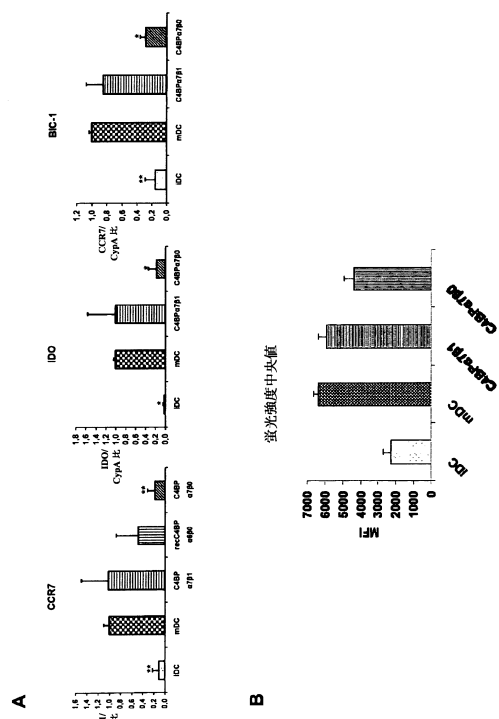
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】

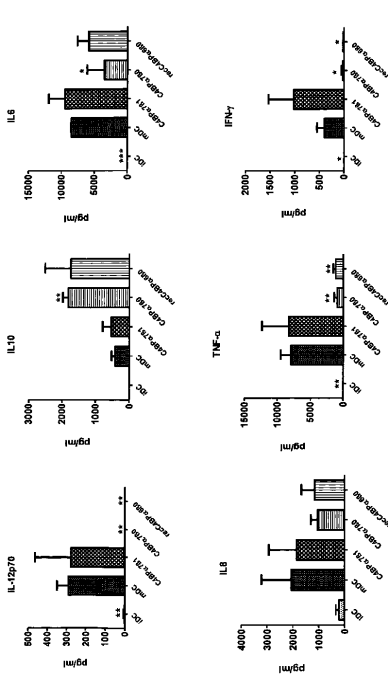
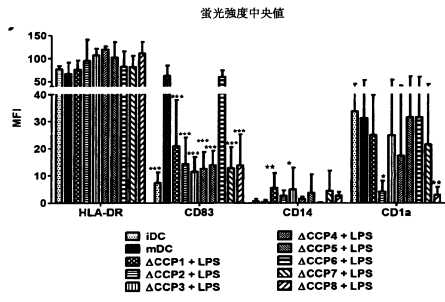
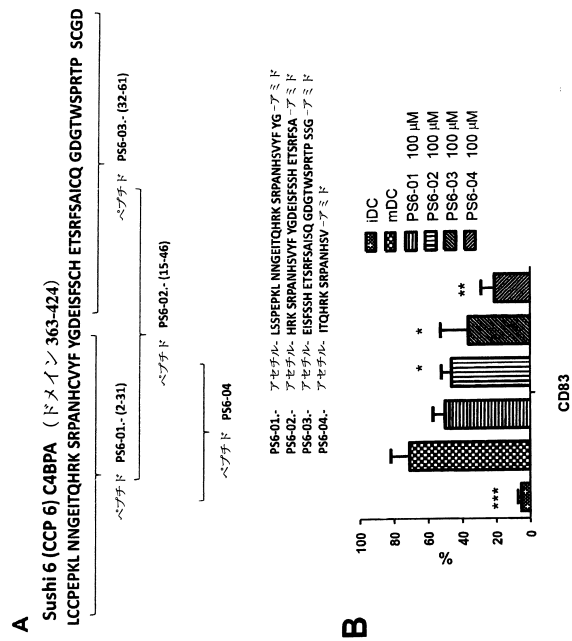


FIG. 4

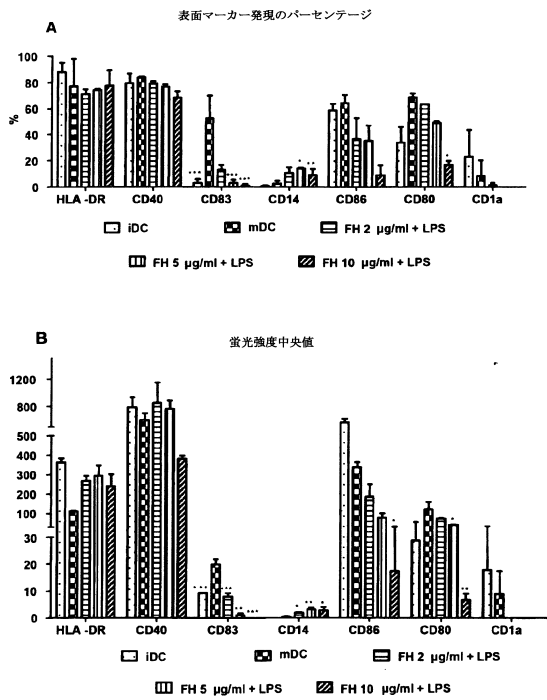
【 図 8 C 】



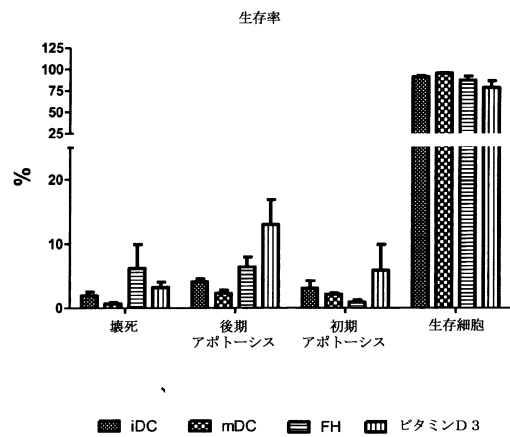
【 図 9 】



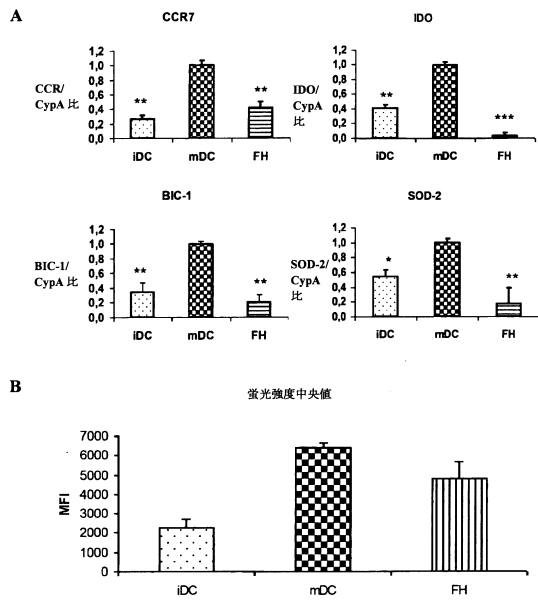
【 図 10 】



【 図 11 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】

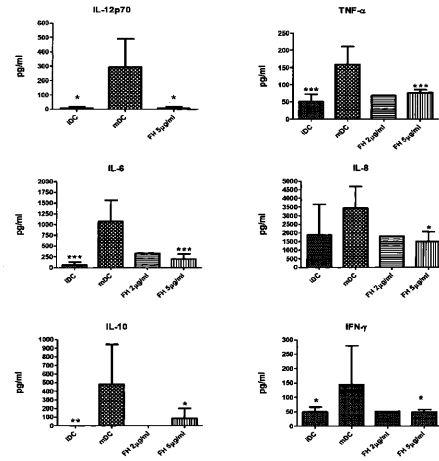


FIG. 13

【 図 1 4 】

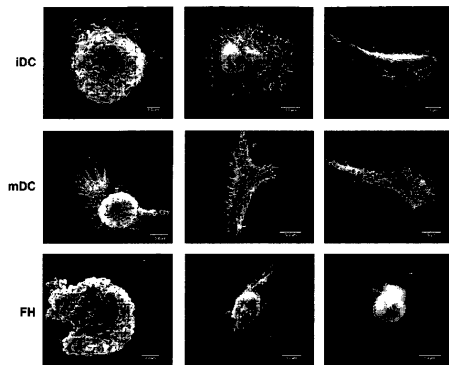
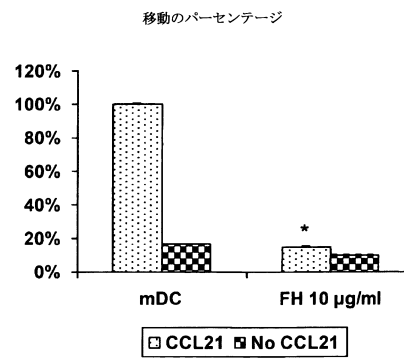
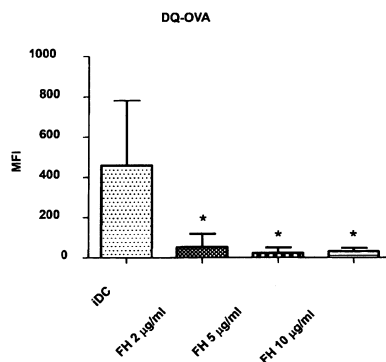


FIG. 14

【 図 1 6 】



【 図 1 5 】



【 17 】

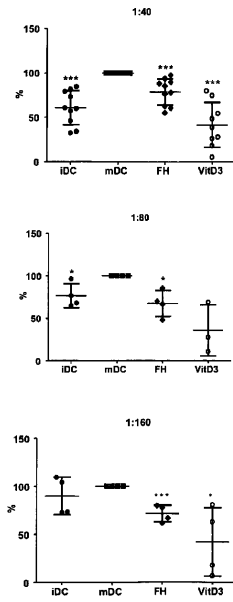
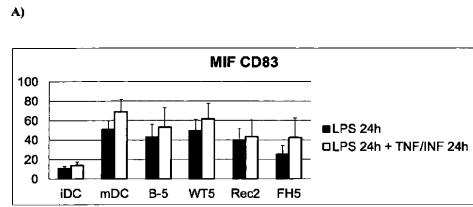
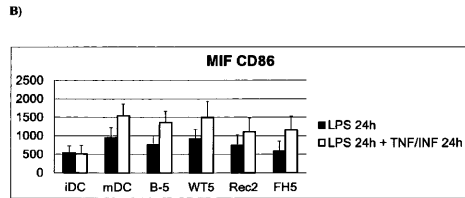


FIG. 17

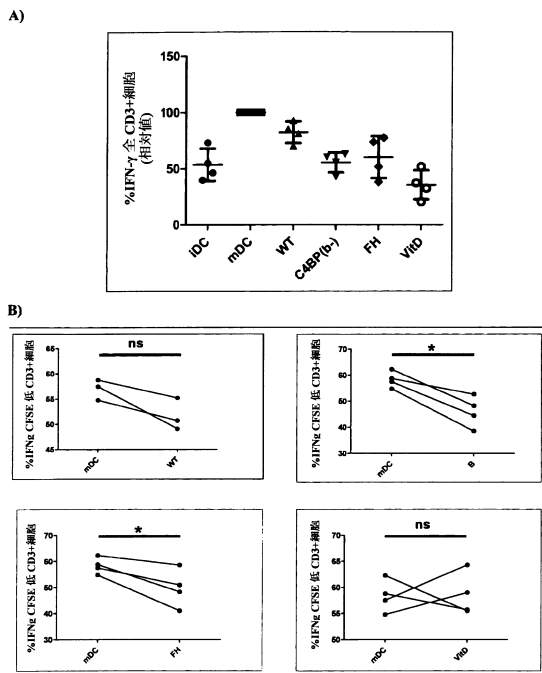
【 18 A) 】



【 18 B) 】



【 19 】



【 20 - 1 】

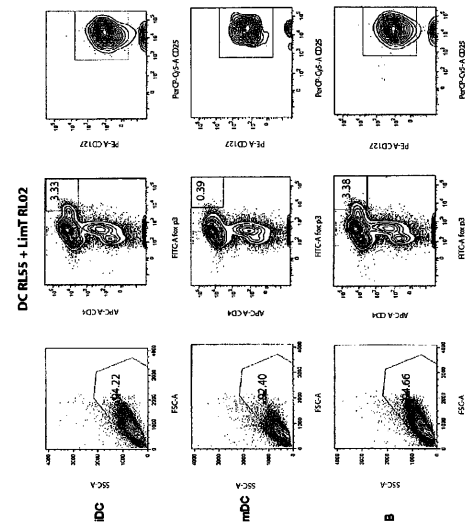


FIG. 20

【 20 - 2 】

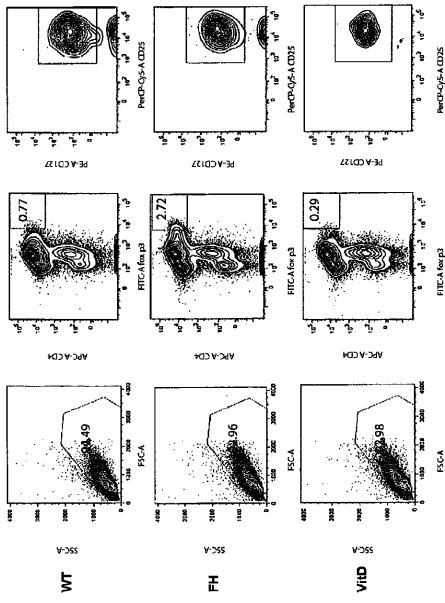


FIG. 20 (cont.)

【 配列表 】

0006290078000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P	37/08	
C 0 7 K 14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	Z N A

(73)特許権者 514012753

インスティトゥト、ディンベスティガシオ、ピオメディカ、デ、ベイビッジエ(イディベル)
 INSTITUT D'INVESTIGACIO BIOMEDICA DE BELLVIT
 GE (IDIBELL)
 スペイン国 エ - 0 8 9 0 8 バルセロナ、オスピタレト、デ、リョブレガット、199、グラン
 、ピア、デ、ルオスタピレト、オスピタル、デュラン、イ、レイナルス、テルセラ、プランタ
 Hospital Duran i Reynals, 3a planta, Gran Via
 de l'Hospitalet, 199, E-08908 Hospitalet de Ll
 obregat, Barcelona, Spain

(74)代理人 100091982

弁理士 永井 浩之

(74)代理人 100091487

弁理士 中村 行孝

(74)代理人 100082991

弁理士 佐藤 泰和

(74)代理人 100105153

弁理士 朝倉 悟

(74)代理人 100120617

弁理士 浅野 真理

(74)代理人 100126099

弁理士 反町 洋

(74)代理人 100188651

弁理士 遠藤 広介

(72)発明者 ホセ、エメ、アラン、ペリヤモン

スペイン国バルセロナ、オスピタレト、デ、リョブレガット、199、グラン、ピア、デ、ルオス
 ピタレト、オスピタル、デュラン、イ、レイナルス、テルセラ、プランタ、フンダシオ、インス
 ティトゥト、ディンベスティガシオ、ピオメディカ、デ、ベイビッジエ(イディベル)

(72)発明者 ルト、オリバー、ミロ

スペイン国バルセロナ、オスピタレト、デ、リョブレガット、199、グラン、ピア、デ、ルオス
 ピタレト、オスピタル、デュラン、イ、レイナルス、テルセラ、プランタ、フンダシオ、インス
 ティトゥト、ディンベスティガシオ、ピオメディカ、デ、ベイビッジエ(イディベル)

審査官 小森 潔

(56)参考文献 特開昭62-201822(JP,A)

Biochemical Journal, 1995年, Vol. 308, No. 3, p795
 - 800

Annals of the Rheumatic Diseases, 2009年, Vol.
 68, No. 1, p136-142

Arthritis & Rheumatism, 2010年, Vol. 62, No. 1, p5
 3-63

Immunity, 2003年, Vol. 18, No. 3, p367-379

Blood, 2003年, Vol. 101, No. 9, p3581 - 3589
Blood, 2007年, Vol. 110, No. 10, p3793 - 3803
実験医学, 2008年, Vol. 26, No. 20, p3211 - 3217

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 38/17

C12N 5/0784

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)