(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6684215号
(P6684215)

(45)発行日　令和2年4月22日(2020.4.22)　(24)登録日　令和2年3月31日(2020.3.31)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 31/4745	(2006.01)	A61K	31/4745	
A61P 35/00	(2006.01)	A61P	35/00	
A61P 31/12	(2006.01)	A61P	31/12	
A61P 37/04	(2006.01)	A61P	37/04	
A61K 39/00	(2006.01)	A61K	39/00	H

請求項の数 59　(全 66 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-537301 (P2016-537301)
(86)(22)出願日　平成26年8月28日 (2014.8.28)
(65)公表番号　特表2016-529271 (P2016-529271A)
(43)公表日　平成28年9月23日 (2016.9.23)
(86)国際出願番号　PCT/EP2014/068313
(87)国際公開番号　WO2015/028574
(87)国際公開日　平成27年3月5日 (2015.3.5)
審査請求日　平成29年7月6日 (2017.7.6)
(31)優先権主張番号　1315292.1
(32)優先日　平成25年8月28日 (2013.8.28)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国 (GB)
(31)優先権主張番号　1406597.3
(32)優先日　平成26年4月11日 (2014.4.11)
(33)優先権主張国・地域又は機関
英国 (GB)

(73)特許権者　512038148
ピーシーアイ　バイオテック　エイエス
ノルウェー　０３７９　オスロ　ウラーン
ショッセン　６４
(74)代理人　110000040
特許業務法人池内アンドパートナーズ
(72)発明者　ホッグセット、アンダース
ノルウェー、エヌ－０６８１　オスロ、ロ
グネルドヴェイエン　５５
(72)発明者　ヨハンセン、パル
スイス、シーエイチ－８４００　ヴィンタ
ートゥール、アメルンヴェグ　５

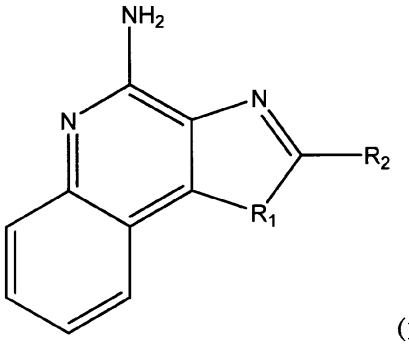
審査官　大西　隆史

最終頁に続く

(54)【発明の名称】予防接種用化合物および免疫化用化合物、ならびに予防接種方法および免疫化方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
細胞の表面に抗原分子または抗原分子の一部を発現させる、インビトロまたはエキソビボで行われる方法であって、
前記細胞を該抗原分子、光感作性薬剤、およびＴＬＲリガンドと接触させること、および、光感作性薬剤を活性化するのに有効な波長の光を該細胞に照射すること、を含み、
前記抗原分子は、該細胞のサイトゾルに放出され、その後、該抗原分子または該抗原分子の一部が細胞の表面に提示される、方法。
【請求項２】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ１リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記ＴＬＲ１リガンドは、トリアシルリポペプチドである、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ２リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項５】
前記ＴＬＲ２リガンドは、リポグリカンである、請求項４に記載の方法。
【請求項６】
前記リポグリカンは、リポ多糖である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記リポ多糖は、ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas Gingivalis）由来

である、請求項６に記載の方法。
【請求項８】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ３リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項９】
前記ＴＬＲ３リガンドは、二重鎖ＲＮＡ分子である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記二重鎖ＲＮＡ分子は、ポリ（Ｉ：Ｃ）である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ４リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項１２】
前記ＴＬＲ４リガンドは、リポ多糖（例えば大腸菌（E. coli）またはサルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota）由来）またはモノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬＡ）（例えばサルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota）由来）である、請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ５リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項１４】
前記ＴＬＲ５リガンドは、フラジェリンである、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ６リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項１６】
前記ＴＬＲ６リガンドは、ジアシルリポペプチドである、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ７リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項１８】
前記ＴＬＲ７リガンドは、化学式（１）のイミダゾキノリン化合物またはその薬学的に許容される塩である、請求項１７に記載の方法。
【化１】



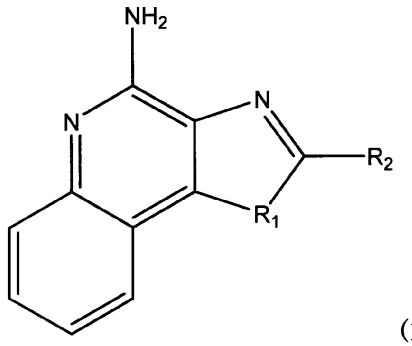
(1)

但し、R_1は、場合によってはヒドロキシル基などで置換されているアミノアルキル基であり、R_2は、場合によっては酸素族または窒素族が挿入されたアルキル基である。
【請求項１９】
前記化学式（１）において、
R_1は、$N-CH_2-C(CH_3)_2-R_3$であり、
R_2は、$-CH_2-X-CH_2CH_3$または水素原子であり、
R_3は、ＯＨまたは水素原子であり、
Ｘは、ＯまたはＮＨである、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記イミダゾキノリン化合物は、レシキモド、イミキモド、およびガーディキモド、またはこれらの薬学的に許容される塩から選択される、請求項１８又は１９に記載の方法。
【請求項２１】

前記ＴＬＲ７リガンドは、一本鎖ＲＮＡ分子である、請求項１７に記載の方法。
【請求項２２】
前記一本鎖ＲＮＡ分子は、長さが２０～２００ヌクレオチドである、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ８リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項２４】
前記ＴＬＲリガンドは、ｓｓＰｏｌｙＵである、請求項２１から２３のいずれかに記載の方法。
【請求項２５】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ９リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項２６】
前記ＴＬＲ９リガンドは、少なくとも１つのＣｐＧモチーフと該モチーフの３’側および５’側のそれぞれに隣接する少なくとも１つの塩基とを含む、６～５０塩基の一本鎖オリゴヌクレオチドであるＣｐＧオリゴヌクレオチドである、請求項２５に記載の方法。
【請求項２７】
前記ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、長さが８～１６塩基の回文配列を含む、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記ＣｐＧオリゴヌクレオチドの配列は、
５’－ｔｃｇｔｃｇｔｔｔｔｃｇｇｃｇｃｇｃｇｃｃｇ－３’または５’－ｔｃｃａｔｇａｃｇｔｔｃｃｔｇａｃｇｔｔ－３’
である、請求項２６に記載の方法。
【請求項２９】
前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ１１リガンド、ＴＬＲ１２リガンド、またはＴＬＲ１３リガンドである、請求項１に記載の方法。
【請求項３０】
前記抗原分子は、免疫応答を刺激することができる分子である、請求項１から２９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３１】
前記抗原分子は、ワクチン抗原またはワクチン成分である、請求項３０に記載の方法。
【請求項３２】
抗原分子または抗原分子の一部を細胞表面に提示する抗原提示によって免疫応答が刺激される、請求項３０又は３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記光感作性薬剤は、$TPCS_{2a}$、$AlPcS_{2a}$、$TPPS_{4}$、および$TPBS_{2a}$から選択される、請求項１から３２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３４】
前記抗原分子は、ペプチドである、請求項１から３３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３５】
前記ペプチドは、黒色腫ペプチドまたはヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）ペプチドである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記細胞は、抗原提示細胞である、請求項１から３５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３７】
前記抗原提示細胞は、樹状細胞である、請求項３６に記載の方法。
【請求項３８】
前記細胞は、前記抗原分子、前記光感作性薬剤、および前記ＴＬＲリガンドに、同時に、別々に、又は順次に接触する、請求項１から３７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項３９】

細胞表面に抗原分子または抗原分子の一部を発現する細胞またはその集団であって、
細胞は、請求項１から３８のいずれか１項に記載の方法によって得られる、細胞または細胞集団。
【請求項４０】
前記細胞が樹状細胞である、または、前記細胞集団が樹状細胞の集団である、請求項３９に記載の細胞または細胞集団。
【請求項４１】
請求項３９又は４０に記載の細胞または細胞集団、および１つ以上の薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含む、医薬組成物。
【請求項４２】
被験体の疾患、障害、または感染を治療または予防するために、被験体の免疫応答を刺激する薬物の調製のための、請求項３９または４０に記載の細胞集団、または請求項４１に記載の組成物の使用。
【請求項４３】
前記薬物は、予防接種および／または癌の治療または予防するためのものである、請求項４２に記載の使用。
【請求項４４】
前記刺激、前記治療、または前記予防は、前記被験体に前記薬物を投与することを含む、請求項４２又は４３に記載の使用。
【請求項４５】
被験体の疾患、障害、または感染を治療または予防するために前記被験体の免疫応答を刺激するための薬物の製造における、抗原分子、光感作性薬剤、およびＴＬＲリガンドの使用。
【請求項４６】
前記薬物は、予防接種および／または癌の治療または予防するためのものである、請求項４５に記載の使用。
【請求項４７】
前記癌は、黒色腫またはパピローマウィルスに関連する癌である、請求項４６に記載の使用。
【請求項４８】
前記免疫応答は、抗原分子、光感作性薬剤、及びＴＬＲリガンドを被検体に投与すること、及び、前記光感作性薬剤を活性化させるのに有効な波長の光を前記被検体に照射することによって刺激される、請求項４５から４７のいずれか１項に記載の使用。
【請求項４９】
前記抗原分子、前記光感作性薬剤、及び前記ＴＬＲリガンドは、前記被検体に対して、別々に、順次に、または同時に投与される、請求項４５から４８のいずれか１項に記載の使用。
【請求項５０】
前記薬物は、請求項１から３８のいずれか１項に記載の方法によって得られる、細胞表面に抗原分子または抗原分子の一部を発現する細胞集団を含む、前記被験体に投与するための、請求項４５から４９のいずれか１項に記載の使用。
【請求項５１】
前記細胞集団は、請求項１から３８のいずれか１項に記載の方法における、前記抗原分子、前記光感作性薬剤、および前記ＴＬＲリガンドを用いて得られる、請求項５０に記載の使用。
【請求項５２】
前記被験体は、哺乳類である、請求項４５から５１のいずれか１項に記載の使用。
【請求項５３】
前記哺乳類は、ネコ、イヌ、ウマ、ロバ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、マウス、ラット、ウサギ、モルモット又はヒトである、請求項５２に記載の使用。

【請求項５４】
被験体の疾患、障害、または感染を治療するまたは予防するために、被験体の免疫応答を刺激するのに同時に、別々に、または順次に用いられる、組み合わせ製剤として、抗原分子、光感作性薬剤、およびＴＬＲリガンド、を含む製品。
【請求項５５】
被験体の疾患、障害、または感染を治療するまたは予防するために、被験体の免疫応答を刺激するのに用いられるキットであって、
光感作性薬剤を含む第１の容器と、
抗原分子を含む第２の容器と、
ＴＬＲリガンドを含む第３の容器と、を含むキット。
【請求項５６】
ａ）前記抗原分子は、免疫応答を刺激することができる分子、および／またはペプチドである、
ｂ）前記光感作性薬剤は、$TPCS_{2a}$、$AlPcS_{2a}$、$TPPS_4$、および$TPBS_{2a}$から選択される、および／または、
ｃ）前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ１リガンド、ＴＬＲ２リガンド、ＴＬＲ３リガンド、ＴＬＲ４リガンド、ＴＬＲ５リガンド、ＴＬＲ６リガンド、ＴＬＲ７リガンド、ＴＬＲ８リガンド、ＴＬＲ９リガンド、ＴＬＲ１１リガンド、ＴＬＲ１２リガンド、又はＴＬＲ１３リガンドから選択される、
請求項４５～５５のいずれか１項に記載の使用、製品またはキット。
【請求項５７】
ａ）免疫応答を刺激することができる前記抗原分子は、ワクチン抗原またはワクチン成分であり、および/または、前記ペプチドは黒色腫ペプチドまたはヒトパピローマウイルス(ＨＰＶ)ペプチドである、および/または、
ｂ)前記ＴＬＲ１リガンドは、トリアシルリポペプチドである；前記ＴＬＲ２リガンドは、リポグリカンである；前記ＴＬＲ３リガンドは、二本鎖ＲＮＡ分子である；前記ＴＬＲ４リガンドは、リポ多糖（例えば大腸菌（E. coli）またはサルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota）由来）またはモノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬＡ）（例えばサルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota）由来）である；前記ＴＬＲ５リガンドは、フラジェリンである；前記ＴＬＲ６リガンドは、ジアシルリポペプチドである；前記ＴＬＲ７リガンドは、下記化学式(１)のイミダゾキノリン化合物またはその薬学的に許容される塩であり、R_1は場合によってはヒドロキシ基などで置換されているアミノアルキル基であり、R_2は場合によっては酸素族または窒素族が挿入されたアルキル基である；前記ＴＬＲ７リガンドは、一本鎖ＲＮＡ分子である；または、前記ＴＬＲ９リガンドは、少なくとも1つのＣｐＧモチーフと該モチーフの３'側および５'側のそれぞれに隣接する少なくとも1つの塩基を含む、６～５０塩基の一本鎖オリゴヌクレオチドであるＣｐＧオリゴヌクレオチドである、
請求項５６に記載の使用、製品またはキット。
【化２】



(1)

【請求項５８】

前記リポグリカンがリポ多糖類である；前記二本鎖ＲＮＡ分子はポリ(Ｉ:Ｃ)である；前記化学式（１）の化合物またはその薬学的に許容される塩において、R_1はN-CH_2-$C(CH_3)_2$-R_3であり、R_2は－CH_2－Ｘ－CH_2CH_3または水素原子であり、R_3はＯＨまたは水素原子であり、ＸはＯまたはＮＨである;前記イミダゾキノリン化合物は、レシキモド、イミキモド、およびガーディキモド、またはこれらの薬学的に許容される塩から選択される；前記一本鎖ＲＮＡ分子は、長さが２０～２００ヌクレオチドである、および/またはｓｓＰｏｌｙＵである；または、前記ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、長さが８～１６塩基の回文配列を含む、請求項５７に記載の使用、製品またはキット。

【請求項５９】

前記リポ多糖がPorphyromonas gingivalia由来である、または、前記ＣｐＧオリゴヌクレオチドが下記配列を有する、請求項５８に記載の使用、製品またはキット。

５'－ｔｃｇｔｃｇｔｔｔｔｃｇｃｇｇｃｇｃｃｇ－３'または５'－ｔｃｃａｔｇａｃｇｔｔｃｃｔｇａｃｇｔｔ－３

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、光感作性薬剤、ワクチン成分などの抗原分子、および光化学的内在化（ＰＣＩ）媒介性予防接種の効果を促進する薬剤であって、本明細書で定義されるＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）に対するリガンドである薬剤を用い、該光感作性薬剤を活性化するのに有効な波長の光を照射する、予防接種方法または免疫化方法に関する。本発明は、また、このような方法に有用なワクチン組成物などの抗原組成物に関する。本発明は、また、例えば予防接種のために、免疫応答を起こすのに用いられ得る抗原提示細胞を産生する方法であって、上述したものと同じ組成物を用いてワクチン成分などの抗原分子を細胞に導入し抗原提示を達成する方法、およびこのような方法に有用な抗原組成物を提供する。本発明は、また、このような方法によってインビトロで産生された細胞の使用であって、例えば予防接種を達成するために、インビボで患者に投与して免疫応答を誘起させる細胞の使用を提供する。抗原分子を細胞内に内在化する方法も提供される。

【背景技術】

【０００２】

予防接種は、免疫系を刺激して病原体に対する適応免疫の獲得を促進するために、抗原分子を投与することを含む。ワクチンは、感染による罹患状態を予防または改善することができる。予防接種は、感染症を予防する最も有効な方法であり、予防接種による免疫の普及が、天然痘の世界的な根絶ならびにポリオ、はしか、および破傷風などの疾患を世界の多くの地域で制限することに大いに貢献している。

【０００３】

ワクチンの作用剤は、原因となる病原体の完全だが不活化された（感染しない）または弱められた（感染性が減じられた）形態であってもよく、免疫性であることが見出されている病原体の精製成分（例えば、ウイルスの外被タンパク質など）であってもよい。毒素による疾患に対する免疫化のために、例えば毒性作用は除くが免疫原性作用は保持するようにした破傷風のテタノスパスミン毒素の改変体などの、トキソイドが生産される。

【０００４】

ワクチンは、たいてい、エンドサイトーシスにより抗原提示細胞によって取り込まれ、ＭＨＣクラスＩＩ経路を介した抗原の切断および提示のために、エンドソームを介してリソソームに輸送されるので、予防接種によって、主にＣＤ４　Ｔヘルパー細胞およびＢ細胞が活性化される。癌などの障害または疾患、さらには細胞内感染と闘うためには、細胞傷害性ＣＤ８　Ｔ細胞応答を刺激することが重要である。しかしながら、サイトゾルおよび抗原提示のＭＨＣクラスＩ経路に抗原を送達することが困難であるために、通常、細胞傷害性ＣＤ８　Ｔ細胞は誘導されない。光化学的内在化（ＰＣＩ）は、サイトゾルへの分子の送達を改善するため、ＰＣＩを採用する予防接種方法が知られている。ＰＣＩは、光感作性薬剤を、該薬剤を活性化する照射工程と組み合わせて用いる技術であり、細胞に同

時投与された分子を該細胞のサイトゾルへ放出させることが知られている。この技術により、細胞によってエンドソームなどの細胞小器官に取り込まれた分子が、照射後に、これら細胞小器官からサイトゾルへ放出される。ＰＣＩは、広範な細胞の破壊または細胞死を招かない様式で、本来膜不透過性（または、難透過性）の分子を細胞のサイトゾルに導入する機構を提供する。

【０００５】

光化学的内在化（ＰＣＩ）の基本的方法は、国際公開第９６／０７４３２号（特許文献１）および国際公開第００／５４８０２号（特許文献２）に記述されており、これらは参照により本明細書に援用される。このような方法においては、内在化される分子（本発明においては、抗原分子）および光感作性薬剤を、細胞と接触させる。光感作性薬剤および内在化される分子は、細胞内の細胞膜結合性サブコンパートメントに取り込まれる、すなわち、細胞内小胞（例えば、リソソームまたはエンドソーム）にエンドサイトーシスされる。細胞を適切な波長の光に曝露すると、細胞内小胞の膜を破壊する反応性種を直接的または間接的に生成する光感作性薬剤が活性化される。これによって、内在化された分子がサイトゾルに放出される。

【０００６】

このような方法においては、たいていの細胞は、機能性または生存率に有害な影響を受けないということが見出された。このように、「光化学的内在化（photochemical internalisation）」と名付けられたこのような方法の有用性が、治療薬を含む様々な異なる分子の、サイトゾル、すなわち細胞の内部への輸送に対して提案された。

【０００７】

国際公開第００／５４８０２号（特許文献２）では、このような一般的な方法を利用して、細胞表面に輸送分子を提示または発現している。このように、細胞のサイトゾルへ分子が輸送され放出された後、その分子（または分子の一部）は、細胞の表面へ輸送され、そこで細胞の外側、すなわち細胞表面に提示されてもよい。このような方法は、予防接種の分野において特に有用であり、免疫応答を誘導、促進、または増強させるために、抗原または免疫原などのワクチン成分が細胞に導入され、細胞の表面で提示されてもよい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００８】

【特許文献１】国際公開第９６／０７４３２号

【特許文献２】国際公開第００／５４８０２号

【発明の概要】

【０００９】

予防接種は、いくつかの注目すべき成功をおさめてきているが、改善された別の予防接種方法がいまだ必要とされている。本発明は、この必要性に応えるものである。

【００１０】

驚くべきことに、本発明者らは、光感作性薬剤、ワクチン成分などの抗原分子、および本明細書で定義されるＴＬＲリガンドを用い、該光感作性薬剤を活性化するのに有効な波長の光を照射する方法によって、有利に予防接種が改善される、または免疫応答が改善されることを見出した。

【００１１】

下記実施例においてより詳細に述べるように、本発明の方法によって、抗原特異的Ｔ細胞の産生量が増加するなど、予防接種が改善される、または免疫応答が改善されることが実証された。例えば、図１は、抗原、ＴＬＲリガンド（ＣｐＧオリゴヌクレオチドまたはイミダゾキノリンのいずれか）、および光増感剤を用い、該光増感剤を活性化するのに有効な波長の光を照射する、マウスのインビボ予防接種によって、抗原および光増感剤／光照射による処理のみの場合と比較して、該マウスの血液および脾臓における抗原特異的Ｔ細胞の割合が有意に増加したことを示している。インビボにおいて、ポリ（ＩＣ）、イミキモド、およびＭＰＬＡなど、他の様々なＴＬＲリガンドを用いる本発明の実施例におい

て、相乗効果も実証されている。このように、本発明者らは、本発明の方法において様々なＴＬＲリガンドを用いることで、インビボにおいて免疫応答の相乗的な改善を達成できることを実証した。

【００１２】

理論に拘束されることを望むものではないが、本発明の方法によって、ＭＨＣクラスＩ分子に対する抗原提示が増大して、ＣＤ８＋ Ｔ細胞応答が増大し、これによって予防接種方法が改善されると考えられる。後述するように、本発明の実施例には、ＭＨＣクラスＩ提示を評価するために用いられるＯＴ－１細胞のモデル系を利用するものもある（例えば、Ｄｅｌａｍａｒｒｅら、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９８：１１１～１２２、２００３を参照）。このモデル系においては、抗原エピトープＳＩＩＮＦＥＫＬのＭＨＣクラスＩ提示によってＯＴ－１ Ｔ細胞が活性化され、抗原特異的Ｔ細胞の増殖、あるいはＩＦＮγまたはＩＬ－２の産生量の増大における増加量として、この活性化を測定することができる。本発明の方法の結果は、抗原特異的Ｔ細胞数の増加、およびＴ細胞によるＩＬ－２およびＩＦＮγ産生量の増加を示し、これは抗原提示の増大または改善と相関している。

【００１３】

このように、本発明は、第一の態様において、細胞の表面に抗原分子または抗原分子の一部を発現させる方法であって、前記細胞を前記抗原分子、光感作性薬剤、およびＴＬＲリガンドと接触させること、および光感作性薬剤を活性化するのに有効な波長の光を前記細胞に照射すること、を含み、前記抗原分子は、前記細胞のサイトゾルに放出され、その後、前記抗原分子または前記抗原分子の一部が、細胞の表面に提示される、方法を提供する。

【００１４】

好ましくは、本方法（および続いて述べる方法）は、該方法において、上述した３つの有効成分（薬剤）のみを用い、該薬剤は、本方法の効能に影響を及ぼす（すなわち、ＰＣＩ予防接種／抗原提示／免疫応答刺激を増強するのに能動的な役割を果たす）ように、本方法において適切なレベル（例えば、以下で述べる最小レベル）で存在する。このように、好ましくは、薬剤は、他の有効成分を含まないバッファー中に存在する。

【００１５】

このような方法においては、上記抗原分子、上記光感作性薬剤、および場合によっては本明細書で定義される上記ＴＬＲリガンドは、それぞれ細胞内小胞に取り込まれ、細胞に照射を行うと、細胞内小胞の膜が破壊されて、抗原分子が細胞のサイトゾルに放出される。

【００１６】

種々の薬剤は、同一の細胞内小胞に取り込まれてもよいし、互いに関連する異なる細胞内小胞に取り込まれてもよい。光増感剤によって産生される活性種は、それらが包含されている小胞を越えて広がり得ること、および／または小胞は合体し得、そのため、破壊された小胞との合体によって小胞の内容物が放出されることが見出されている。本明細書で言及される「取り込まれる」とは、取り込まれた分子が小胞内に完全に包含されていることを意味する。細胞内小胞は、膜によって区切られており、例えばエンドソームまたはリソソームなどの、エンドサイトーシス後に生じる小胞であればどのようなものでもよい。

【００１７】

本明細書で用いられる「破壊された」区画とは、その区画の膜の完全性が、永久にまたは一時的に、その区画に包含されている抗原分子を放出できるほど十分に壊されていることを意味する。

【００１８】

本明細書で言及される「光感作性薬剤」は、該薬剤が適切な波長および強度の照射で活性化して活性種を生成する際に、吸収した光エネルギーを化学反応へ転換することができる化合物である。このプロセスにおける高反応性最終生成物は、細胞毒性および血管毒性を生じ得る。好都合には、このような光感作性薬剤は、細胞内区画、特にエンドソーム

たはリソソームに局在するものであってもよい。

【００１９】

光増感剤は、様々な機構により、直接的または間接的に、その効果を発揮してもよい。このように、例えば、ある光増感剤は、光によって活性化された際に直接的な毒性を有し、他の光増感剤は、細胞材料ならびに脂質、タンパク質、および核酸などの生体分子にとって極めて有害な、一重項酸素または他の活性酸素種のような酸化剤などの毒性種を生成する。

【００２０】

このような光感作性薬剤として、様々なものが当該技術分野において知られており、参照により本明細書に援用される国際公開第９６／０７４３２号を含む文献で述べられている。本発明の方法において、このような薬剤を用いてもよい。ポルフィリン、フタロシアニン、プルプリン、クロリン、ベンゾポルフィリン、リソソーム作用性弱塩基、ナフタロシアニン、カチオン系染料、およびテトラサイクリン、またはこれらの誘導体を含む、多くの光感作性薬剤が知られている（Ｂｅｒｇら、（１９９７）、Ｊ．Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ａｎｄ Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌｏｇｙ、６５、４０３～４０９）。他の光感作性薬剤として、テキサフィリン、フェオホルビド、ポルフィセン、バクテリオクロリン、ケトクロリン、ヘマトポルフィリン誘導体、および５－アミノレブリン酸およびその誘導体によって誘導される内因性光増感剤、フォトフリン、光増感剤の二量体またはその他の抱合体などが挙げられる。

【００２１】

ポルフィリンは、最も広く研究されている光感作性薬剤である。その分子構造は、メチン架橋を介して連結されたピロール環を４つ含む。ポルフィリンは、金属錯体を形成可能であることが多い、天然化合物である。例えば、酸素輸送タンパク質であるヘモグロビンの場合、ヘムＢのポルフィリン中心に鉄原子が導入される。

【００２２】

クロリンは、中心が４つのメチン結合によって連結した３つのピロールと１つのピロリンからなる、大きな芳香族複素環である。したがって、クロリンは、ポルフィリンとは異なり、おおむね芳香族性であるが、環の外周全体でみると芳香族性をもたない。

【００２３】

当業者は、どの光増感剤が本発明での使用に適しているかを理解するであろう。特に、細胞のエンドソームまたはリソソームに位置する光感作性薬剤が好ましい。このように、光感作性薬剤は、好ましくはリソソームまたはエンドソームの内部区画に取り込まれる薬剤である。好ましくは、光感作性薬剤は、エンドサイトーシスによって細胞内区画に取り込まれる。好ましい光増感剤は、ジスルホン化アルミニウムフタロシアニンおよびテトラスルホン化アルミニウムフタロシアニン（例えば、ＡｌＰｃＳ$_{2a}$）、スルホン化テトラフェニルポルフィン（ＴＰＰＳ$_{n}$）、スルホン化テトラフェニルバクテリオクロリン（例えば、ＴＰＢＳ$_{2a}$）、ナイルブルー、クロリンｅ$_{6}$誘導体、ウロポルフィリンＩ、フィロエリスリン、ヘマトポルフィリン、およびメチレンブルーである。本発明での使用に適したさらなる光増感剤は、参照として本明細書に援用される国際公開第０３／０２０３０９号において述べられ、すなわち、スルホン化メソ－テトラフェニルクロリンであり、好ましくはＴＰＣＳ$_{2a}$である。好ましい光感作性薬剤は、両親媒性のフタロシアニン、ポルフィリン、クロリン、および／またはバクテリオクロリンなどの両親媒性光増感剤（例えば、ジスルホン化光増感剤）であり、特に、ＴＰＰＳ$_{2a}$（ジスルホン酸テトラフェニルポルフィン）、ＡｌＰｃＳ$_{2a}$（ジスルホン酸アルミニウムフタロシアニン）、ＴＰＣＳ$_{2a}$（ジスルホン酸テトラフェニルクロリン）、およびＴＰＢＳ$_{2a}$（ジスルホン酸テトラフェニルバクテリオクロリン）、またはこれらの薬学的に許容される塩が挙げられる。また、例えば、ＴＰＰＳ$_{4}$（テトラスルホン酸メソ－テトラフェニルポルフィン）などの親水性光感作性薬剤も好ましい。特に好ましい光感作性薬剤は、スルホン化アルミニウムフタロシアニン、スルホン化テトラフェニルポルフィン、スルホン化テトラフェニルクロリン、およびスルホン化テトラフェニルバクテリオクロリンであり、好ましくはＴＰＣＳ$_{2a}$、ＡｌＰｃ

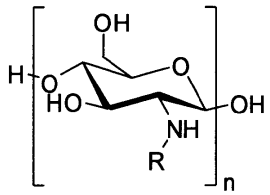
S_{2a}、$TPPS_4$、および$TPBS_{2a}$である。本発明の特に好ましい実施形態において、光感作性薬剤は、クロリン$TPCS_{2a}$（例えば、アンフィネックス（Amphinex）（登録商標）などのジスルホン化テトラフェニルクロリン）である。

【００２４】

光増感剤を担体に結合させて、光感作性薬剤を提供してもよい。このように、本発明の本実施形態の好ましい態様において、光感作性薬剤は、光増感剤と式（Ｉ）で定義されるキトサンとの抱合体である。

【００２５】

【化１】



(I)

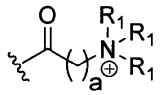
但し、ｎは３以上の整数である。；

Ｒは、前記化合物においてｎ回出現する。

【００２６】

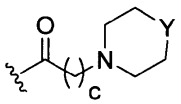
前記全Ｒｎ基の０．１％～９９．９％（好ましくは０．５％～９９．５％）において、各Ｒは、

【化２】



但し、各R_1は、同一であっても異なっていてもよいが、Ｈ、CH_3、および－$(CH_2)_b$－CH_3から選択され、ａは１、２、３、４、または５であり、ｂは０、１、２、３、４、または５であって（対イオンは、例えば、Cl^-であってもよい）、好ましくは、R_1はCH_3でありｂは１である。；および

【化３】



但し、ＹはＯ、Ｓ、SO_2、－NCH_3、または－$N(CH_2)_dCH_3$であり、ｃは１、２、３、４、または５であり、ｄは１、２、３、４、または５であって、好ましくは、ＹはNCH_3でありｃは１である。；

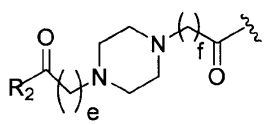
から選択されるＡ基である。

各Ｒ基は同一であっても異なっていてもよい。

【００２７】

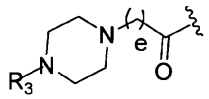
前記全Ｒｎ基の０．１％～９９．９％（好ましくは０．５％～９９．５％）において、各Ｒは、

【化４】



および

【化５】

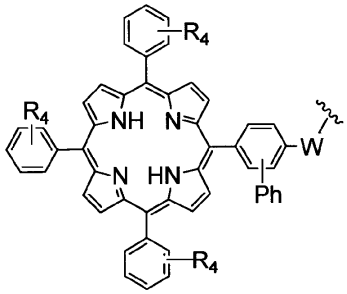


から選択されるＢ基である。

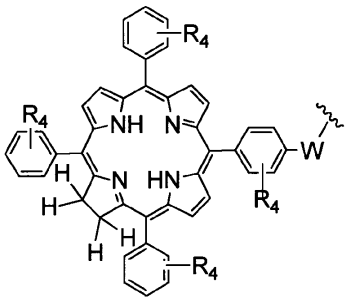
但し、ｅは０、１、２、３、４、または５であり、ｆは１、２、３、４、または５であって、好ましくはｅおよびｆは１である。

R_2は、

【化６】

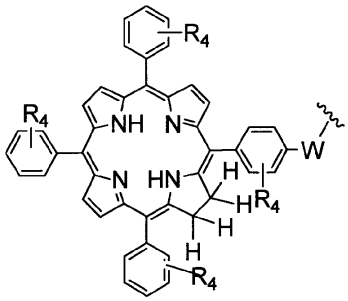


【化７】



および

【化８】

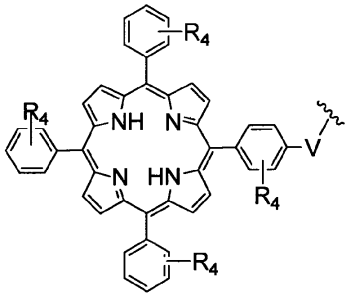


から選択される基である。

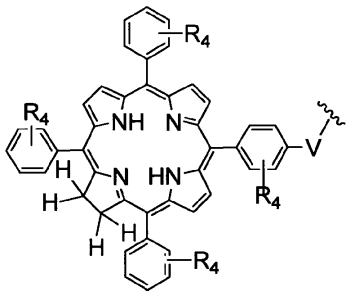
ＷはＯ、Ｓ、ＮＨ、またはＮ（CH_3）から選択される基であり、好ましくはＮＨである。

R_3は、

【化９】

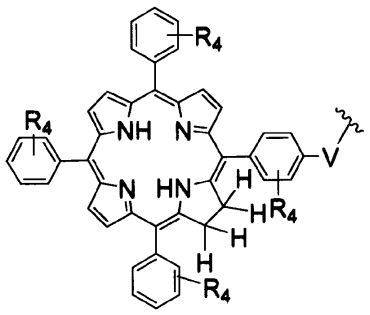


【化１０】



および

【化１１】



から選択される基である。

ＶはＣＯ、SO_2、ＰＯ、PO_2H、またはCH_2から選択される基であって、好ましくはＣＯである。

R_4は、同一であっても異なっていてもよいが、Ｈ、－ＯＨ、－OCH_3、－CH_3、－$COCH_3$、Ｃ（CH_3）$_4$、－NH_2、－$NHCH_3$、－Ｎ（CH_3）$_2$、および－$NCOCH_3$から選択される基（ｏ位、ｍ位、またはｐ位が置換されている）であって、好ましくはＨである。

各Ｒ基は同一であっても異なっていてもよい。

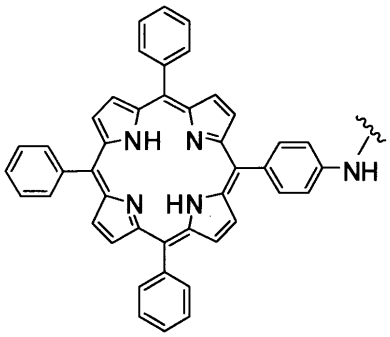
【００２８】

キトサンポリマーは、構成単位を少なくとも３つ有する（ｎ＝３）。しかしながら、好ましくは、ｎは、少なくとも１０、２０、５０、１００、５００、１０００であり、例えば１０～１００または１０～５０である。

【００２９】

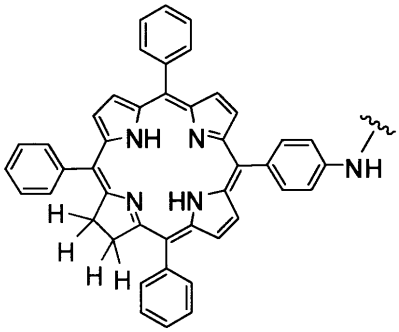
R_2は、好ましい実施形態において、

【化１２】



TPPa

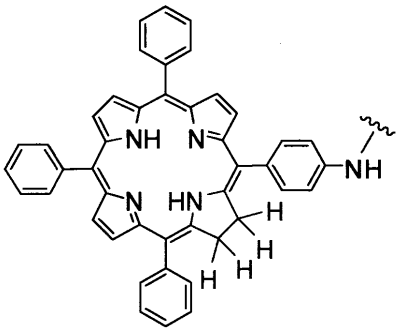
【化１３】



$TPCa_1$

および

【化１４】



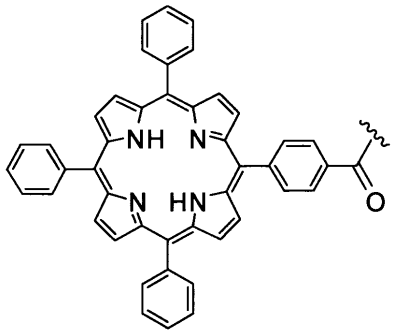
$TPCa_2$

から選択される。

【００３０】

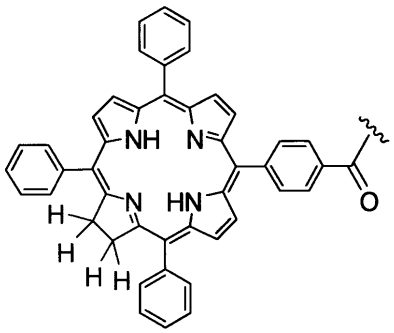
R_3は、さらに好ましい実施形態において、

【化１５】



TPPc

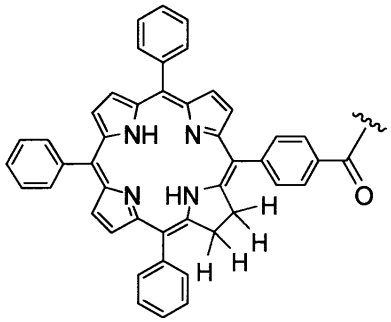
【化１６】



$TPCc_1$

および

【化１７】



$TPCc_2$

から選択される。

【００３１】

R_2またはR_3は、好ましくは、TPP_a、TPC_{a1}、またはTPC_{c1}である。

【００３２】

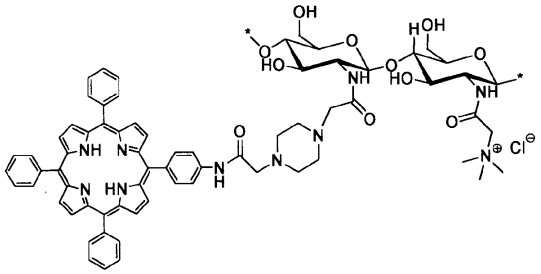
Ａ基は、全Ｒｎ基の７０～９５％であってもよく、Ｂ基は、全Ｒｎ基の５～３０％であってもよい。

【００３３】

最も好ましい実施形態において、光増感剤およびキトサンの抱合体は、

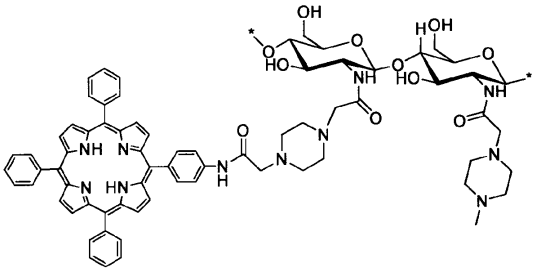
【化１８】

１７：　Ｂ:２５%、Ａ:７５%



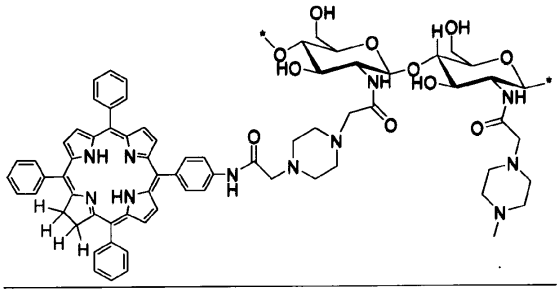
【化１９】

１９：　Ｂ:２５%、Ａ:７５%



【化２０】

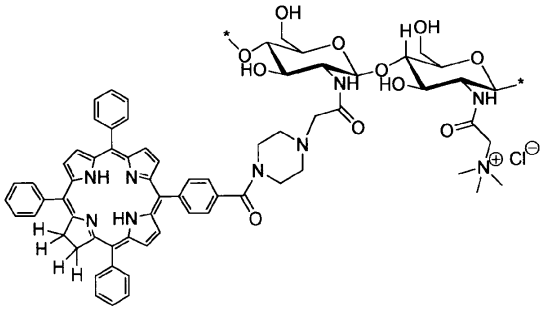
３３：　Ｂ:１０%、Ａ:９０%



および

【化２１】

３７： B:１０%、A:９０%



から選択される（図４のスキーム１～５Ｂにおける番号を参照）。

【００３４】

上記の構造において、与えられているＡ／Ｂ%の値は、Ａ基またはＢ基であるＲｎ基の割合を示す。アスタリスクは、キトサンポリマーの残部を表す。

【００３５】

これらの化合物は、当該技術分野において標準的な手順を利用する、当業者によく知られているであろう合成法によって合成されてもよい。例として、後述する好ましい抱合体である１７番、１９番、３３番、および３７番の合成を図４の反応スキーム１～５Ｂに示す（図４の説明文も参照）。

【００３６】

本明細書で言及される「抗原」分子は、適切に免疫系または免疫細胞に提示された際に、それ自身、またはその一部が免疫応答を刺激することができる分子である。したがって、有利には、抗原分子は、ポリペプチド包含体などのワクチン抗原またはワクチン成分とされる。

【００３７】

当該技術分野において、このような抗原または抗原ワクチン成分が多く知られており、あらゆる種類の細菌性抗原またはウイルス抗原、あるいは、実際には、原生動物または高等生物を含むあらゆる病原種の抗原または抗原成分が含まれる。従来は、ワクチンの抗原成分は、生物全体（生物は生きているか、死んでいるか、あるいは弱毒化されている）を含む、すなわち全細胞ワクチンであったが、それに加えて、サブユニットワクチン、すなわちタンパク質またはペプチド、さらには炭水化物などの生物の特定の抗原成分に基づくワクチンが広く研究され、文献にて報告されてきている。本発明の抗原分子としては、どのような「サブユニット」系ワクチン成分を用いてもよい。

【００３８】

しかしながら、本発明は、ペプチドワクチンの分野において特に有用である。このように、本発明にかかる好ましい抗原分子は、ペプチドである（本明細書において、ペプチドとは、短鎖ペプチドおよび長鎖ペプチドの両方、すなわちペプチド、オリゴペプチド、またはポリペプチド、およびタンパク質分子またはその断片も含むものであると定義され、例えば、１５～７５または８～２５アミノ酸のような１０～２５０アミノ酸からなるペプチドなどの５～５００アミノ酸からなるペプチドである）。

【００３９】

例えば、ＡＩＤＳ／ＨＩＶ感染、またはインフルエンザ、イヌパルボウイルス、ウシ白血病ウイルス、肝炎などのウイルス性疾患およびウイルス感染の治療において、膨大な数のペプチドワクチンの候補が文献にて提案されている（例えば、Ｐｈａｎｕｐｈａｋら、Ａｓｉａｎ Ｐａｃ．Ｊ．Ａｌｌｅｒｇｙ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．、１９９７、１５（１）、４１～８；Ｎａｒｕｓｅ、北海道医学雑誌、１９９４、６９（４）、８１１～２０；Ｃａｓａｌら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、１９９５、６９（１１）、７２７４～７；Ｂｅｌｙａ

ｋｏｖら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９９８、９５（４）、１７０９～１４；Ｎａｒｕｓｅら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９９４、９１（２０）、９５８８～９２；Ｋａｂｅｙａら、Ｖａｃｃｉｎｅ、１９９６、１４（１２）、１１１８～２２；Ｉｔｏｈら、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、１９８６、８３（２３）、９１７４～８を参照）。同様に、細菌ペプチドを用いてもよく、また実際は、他の生物または種由来のペプチド抗原を用いてもよい。

【００４０】

病原生物由来の抗原に加えて、癌または多発性硬化症などの疾患に対するワクチンとして、ペプチドを用いることが提案されている。例えば、変異型癌遺伝子ペプチドは、細胞傷害性Ｔリンパ球を刺激する際に抗原として作用する癌ワクチンとして大いに有望である（Ｓｃｈｉｒｒｍａｃｈｅｒ、Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ ａｎｄ Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ、１９９５、１２１、４４３～４５１；Ｃｕｒｔｉｓ、Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ａｎｄ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｓｐｏｎｓｅ Ｍｏｄｉｆｉｅｒｓ、１９９７、１７、３１６～３２７）。また、合成ペプチドワクチンも、転移性黒色腫の治療において検討されている（Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇら、Ｎａｔ．Ｍｅｄ．、１９９８、４（３）、３２１～７）。多発性硬化症治療用のＴ細胞受容体ペプチドワクチンについては、Ｗｉｌｓｏｎら、Ｊ．Ｎｅｕｒｏｉｍｍｕｎｏｌ．、１９９７、７６（１～２）、１５～２８で述べられている。本発明の抗原分子としては、どのようなペプチドワクチン成分を用いてもよく、また実際は、文献にてペプチドワクチンとして述べられている、または提案されているいずれのペプチドを用いてもよい。このように、ペプチドは、合成してもよく、生物から単離あるいは抽出してもよい。

【００４１】

本発明の好ましい実施形態において、抗原は黒色腫抗原である。「黒色腫抗原」は、１つ以上の異なる抗原を含み得る。

【００４２】

例えば、一態様において、黒色腫抗原は、黒色腫タンパク質または黒色腫ペプチドであり、例えば抗原性ペプチドまたはＴ細胞のエピトープであり、例えばｇｐ１００、メラン－Ａ、チロシナーゼ、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、およびチロシナーゼ関連タンパク質－２（ＴＲＰ－２）、またはこれらのペプチドエピトープから選択される１つ以上である。これらの黒色腫抗原およびさらに適切な黒色腫抗原の詳細が、Ｒｅｎｋｖｉｓｔら、Ｃａｎｃｅｒ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒ．、５０：３～１５、２００１（およびその参考文献）およびＨｏｄｉ、Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ．Ｒｅｓ．、１２：６７３～６７８、２００６に開示されており、これらは参照により本明細書に援用される。特に、ｇｐ１００、メラン－２、チロシナーゼ、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、およびＴＲＰ－２、またはこれらのペプチドエピトープについては、上記Ｒｅｎｋｖｉｓｔらの文献に述べられている通りである。このように、本発明は、ｇｐ１００、メラン－２、チロシナーゼ、ＭＡＧＥ－１、ＭＡＧＥ－３、またはＴＲＰ－２の使用、あるいは上記Ｒｅｎｋｖｉｓｔらの文献に開示されているペプチドエピトープを含む、またはそのペプチドエピトープからなる抗原の使用、あるいは当該技術分野において公知の標準的な比較技術を用いた配列同一性が、それらの配列に対して少なくとも９５％（関連する比較窓にわたって）である配列の使用に及ぶものである。好ましい実施形態において、抗原は、ＴＲＰ－２および／またはｇｐ１００であり、好ましくはＴＲＰ－２である。

【００４３】

例えば、少なくとも２００アミノ酸までのペプチド抗原は、ユナイテッド・バイオシステムズ社（United BioSystems Inc）（旧ユナイテッド・ペプチド社（United Peptide Corp）、ハーンドン、ＶＡ、ＵＳＡ）などのペプチドを受注合成する会社から入手されてもよい。

【００４４】

別の好ましい実施形態において、抗原分子は、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）から抽出される。パピローマウイルスゲノムは、宿主細胞への一次感染直後に発現される読み

枠（ＯＲＦ）を６つ（Ｅ１、Ｅ２、Ｅ４、Ｅ５、Ｅ６、およびＥ７）コードする初期領域（Ｅ）と、主要カプシドタンパク質Ｌ１および副カプシドタンパク質Ｌ２をコードする後期領域（Ｌ）とに分割される。ウイルスのＯＲＦは、全て一本のＤＮＡ鎖にコードされている。

【００４５】

好ましい実施形態において、抗原分子は、タンパク質またはペプチド、あるいはこれらの断片、すなわち、好ましくは本明細書で言及される初期タンパク質または後期タンパク質のうち１つのタンパク質またはその一部であるヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）由来の抗原（例えば、該ウイルスから抽出された）を含む。このように、ＨＰＶ抗原は、１つ以上の公知の抗原性ペプチドまたはＴ細胞エピトープであり、例えば任意の種類のＨＰＶ由来の、任意の公知の抗原から選択される１つ以上の抗原である。ＨＰＶの種類および抗原についての詳細は、Ｍａら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｃａｎｃｅｒ Ｔｈｅｒａｐｙ Ｒｅｖｉｅｗｓ、６：８１～１０３、２０１０で見ることができる。

【００４６】

例えば、抗原性ペプチドは、ＨＰＶ－１６型ＨＰＶおよび／またはＨＰＶ－１８型ＨＰＶ、あるいは３１型ＨＰＶまたは４５型ＨＰＶから抽出されてもよい。例えば、抗原は、Ｅ１タンパク質、Ｅ２タンパク質、Ｅ４タンパク質、Ｅ５タンパク質、Ｅ６タンパク質、およびＥ７タンパク質のいずれか、またはＬ１タンパク質およびＬ２タンパク質のいずれかに由来するものであってもよい。抗原性ペプチドは、ＨＰＶ－１６およびＨＰＶ－１８のＥ２タンパク質、Ｅ６タンパク質、およびＥ７タンパク質のうち１つ以上のタンパク質に由来するものであってもよい。好ましい実施形態において、抗原分子は、ＨＰＶ－１６のＥ７配列、ＧＱＡＥＰＤＲＡＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫＣＤＳＴＬＲＬＣＶＱＳＴＨＶＤＩＲ（ＣＤ８エピトープを太字で示す）を包含する。このように、ＨＰＶ抗原は、３５アミノ酸のペプチドであってもよい。あるいは、抗原分子は、ＣＤ８エピトープであるＲＡＨＹＮＩＶＴＦのみ、すなわち、より短いペプチドであってもよい。

【００４７】

ＨＰＶペプチド抗原は、ユナイテッド・バイオシステムズ社（United BioSystems Inc）（旧ユナイテッド・ペプチド社（United Peptide Corp）、ハーンドン、ＶＡ、ＵＳＡ）などのペプチドを受注合成する会社から入手されてもよい。

【００４８】

抗原分子は、光化学的内在化プロセスによって一旦細胞のサイトゾルに放出されると、細胞の抗原処理機構によって処理されてもよい。このように、細胞の表面に発現または提示された抗原分子は、内在化された（エンドサイトーシスされた）抗原分子の一部または断片であってもよい。提示または発現された抗原分子の「一部」は、好ましくは、細胞内部の抗原処理機構によって生成された一部を含む。しかしながら、一部は、適切な抗原設計（例えば、ｐＨ感受性結合）によって達成されてもよい他の手段、または他の細胞処理手段によって生成されてもよい。好都合には、このような一部は、例えば、ペプチドの大きさが、１０アミノ酸または２０アミノ酸よりも大きいなど、５アミノ酸よりも大きい場合に、免疫応答を起こすのに十分な大きさを有する。

【００４９】

本発明にかかるＰＣＩ媒介性予防接種を増強する薬剤は、Ｔｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）に対するリガンドである。Ｔｏｌｌ様受容体は、先天性免疫および消化系において重要な役割を果たすタンパク質の一群である。ＴＬＲおよびインターロイキン－１受容体は、インターロイキン－１受容体／Ｔｏｌｌ様受容体スーパーファミリーと名付けられた受容体スーパーファミリーを形成する。このファミリーのメンバーは、全て、Ｔｏｌｌ－ＩＬ－１受容体ドメイン（ＴＩＲ）を有する。インターロイキン－１受容体（ＩＬ－１Ｒ）ファミリーのメンバーは、細胞外免疫グロブリン様ドメインおよび細胞内Ｔｏｌｌ／インターロイキン－１Ｒ（ＴＩＲ）ドメインによって特徴付けられる。サブグループ２ ＴＩＲドメインを有する受容体は、ＴＬＲであると考えられる。

【００５０】

ＴＬＲは、通常は、マクロファージおよび樹状細胞などのセンチネル細胞で発現される、単量体膜貫通型非触媒性受容体であり、構造が保存されている微生物由来の分子を認識する。これら微生物が、皮膚または腸管粘膜などの物的障壁を一旦突破すると、ＴＬＲがこれらを認識し、免疫細胞応答を活性化する。これら受容体は、病原体関連分子などの、病原体の機能に不可欠であり、突然変異によって変化し難いと考えられる分子を認識する。そのような分子は、細菌の細胞表面のリポ多糖（ＬＰＳ）、リポタンパク質、リポペプチド、およびリポアラビノマンナン；細菌の鞭毛由来のフラジェリンなどのタンパク質；ウイルスの二重鎖ＲＮＡ；または細菌ＤＮＡおよびウイルスＤＮＡの非メチル化ＣｐＧアイランドを含んでいてもよく、また、真核生物のＤＮＡのプロモーターに見られるＣｐＧアイランド、さらには別のＲＮＡ分子およびＤＮＡ分子を含んでいてもよい。たいていのＴＬＲに対し、遺伝子ターゲティングによって、これまでにリガンド認識特異性が確認されている。

【００５１】

たいていの哺乳動物種は、１０種～１５種のＴｏｌｌ様受容体を有すると推定されている。ヒトおよびマウスを合わせて、１３のＴＬＲ（単にＴＬＲ１～ＴＬＲ１３と名付けられている）が同定されている（マウスでは１３種、ヒトでは１０種）。

【００５２】

ＴＬＲ受容体に対するリガンドは、全て本発明に包含される。「リガンド」なる語は、生体分子と複合体を形成し、生物学的目的をはたす物質を意味することが意図される。ＴＬＲリガンドとの関連において、リガンドは、シグナル誘因分子であり、標的ＴＬＲ上のある部位に結合する。リガンドが、その同種受容体に結合する際に、受容体の化学構造を変えてもよい。受容体タンパク質の立体構造は、その機能状態を決定する。

【００５３】

このように、本発明にかかるＴＬＲリガンドは、少なくとも１つ、すなわち１つ以上のＴｏｌｌ様受容体（ＴＬＲ）に結合し、ＴＬＲの活性化、例えばＴＬＲ媒介性細胞シグナル伝達の活性化をもたらす分子である。

【００５４】

ＴＬＲシグナル伝達は、ＭｙＤ８８－依存性経路およびＴＲＩＦ－依存性経路の２つの異なるシグナル伝達経路に分割される。本発明にかかるＴＬＲリガンドは、これら２つの経路のうちの１つまたは両方を活性化する。このように、本発明にかかるリガンドは、１つ以上のＴＬＲに結合し、ＴＬＲの活性化、例えばリガンドが結合した際の受容体の構造変化を介したＴＬＲシグナル伝達の活性化をもたらす分子である。

【００５５】

ＴＬＲ受容体が二量化すると、ＭｙＤ８８依存性応答が起こり、この応答は、ＴＬＲ３を除く全てのＴＬＲに利用される。その一次作用は、NF_KBおよびマイトジェン活性化タンパク質キナーゼの活性化である。受容体で起こるリガンドの結合および構造変化によって、ＴＩＲファミリーのメンバーであるアダプタータンパク質ＭｙＤ８８がリクルートされる。次いで、ＭｙＤ８８が、ＩＲＡＫ４、ＩＲＡＫＩ、およびＩＲＡＫ２をリクルートする。次いで、ＩＲＡＫキナーゼが、タンパク質ＴＲＡＦ６をリン酸化して活性化し、ひいてはＩＫＫβへの結合を容易にするために、ＴＲＡＦ６がタンパク質ＴＡＫ１およびそれ自身をポリユビキチン化する。ＴＡＫ１は、結合するとＩＫＫβをリン酸化し、次いでＩＫＫβがI_KBをリン酸化して分解させ、またNF_KBを細胞核へ拡散させ、炎症性サイトカインの転写およびその後の誘導を活性化する。

【００５６】

もう一方の経路は、ＴＲＩＦ依存性経路であり、ＴＬＲ３およびＴＬＲ４の両方に用いられる。ＴＬＲ３については、ｄｓＲＮＡ（または類似のもの－以下参照）が受容体の活性化をもたらし、アダプターであるＴＲＩＦをリクルートする。ＴＲＩＦは、キナーゼであるＴＢＫ１およびＲＩＰ１を活性化し、これによってシグナル伝達経路に分岐を設ける。ＴＲＩＦ／ＴＢＫ１シグナル伝達複合体は、ＩＲＦ３をリン酸化して核内に移行させ、インターフェロンＩ型を産生させる。一方、ＲＩＰ１の活性化によって、ＭｙＤ８８依存

性経路と同様に、ＴＡＫ１がポリユビキチン化および活性化を受け、ＮＦ$_{K}$Ｂが転写される。

【００５７】

ＴＬＲシグナル伝達の活性化を調べる標準的な方法は、当該技術分野において知られており、例えば、適切なシグナル伝達タンパク質のリン酸化状態を調べる。あるいは、例えば、特定のＴＬＲをコードする遺伝子を遺伝学的に欠失させてリガンドの効果が維持されるかどうかを調べるなど、当該技術分野において周知の方法によって、リガンドがＴＬＲを通して作用しているかどうかを調べてもよい。この方法は、市販のトランスジェニックノックアウトマウス（ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、およびＴＬＲ４のノックアウトはジャクソン・ラボラトリー社（The Jackson Laboratory）から、ＴＬＲ１、ＴＬＲ２、ＴＬＲ３、ＴＬＲ４、ＴＬＲ５、ＴＬＲ６、ＴＬＲ７、およびＴＬＲ９のノックアウトはオリエンタル・バイオサービス社（OrientalBioService Inc）から入手可能）において、インビトロおよびインビボの両方で用いることができる。さらに、ＮＦ－κＢ／ＡＰ１の活性化を分析することでＴＬＲの刺激を調べるように設計された、ＨＥＫ－Ｂｌｕｅ（商標）細胞（インビボジェン社（Invivogen）、サンディエゴ、ＣＡ、ＵＳＡ）が利用できる。このような細胞は、ＴＬＲ２～ＴＬＲ９およびＴＬＲ１３に対して利用できる。また、推定上のリガンドの作用が、ＴＬＲの拮抗作用によって阻害されるかどうかを調べるために、例えばインビボジェン社（Invivogen）から入手可能なＴＬＲアンタゴニストを用いることもできる。このように、ある分子がＴＬＲリガンドであるかどうか、例えばある特定のＴＬＲリガンドであるかどうかを調べる方法は、当該技術分野においてよく知られている。

【００５８】

ＴＬＲの構造は、ロイシンリッチリピート（ＬＲＲ）外部ドメイン、らせん状膜貫通ドメイン、および細胞内Ｔｏｌｌ／ＩＬ－１受容体相同（ＴＩＲ）シグナル伝達ドメインからなる。外部ドメインは、様々な数のＬＲＲを含み、馬蹄形に曲げられたソレノイドに似ている。両端には、馬蹄の疎水性コアを覆う末端ＬＲＲが存在する。この外部ドメインは、高度に可変的である。このドメインは、リポ多糖、リポペプチド、シトシン－リン酸－グアニン（ＣｐＧ）ＤＮＡ、フラジェリン、イミダゾキノリン、およびｄｓ／ｓｓＲＮＡを含む様々な病原体関連モチーフの認識に、直接関わっている。受容体が活性化すると、受容体とアダプターＴＩＲドメインとの間に、ＴＩＲシグナル伝達複合体が形成される。

【００５９】

受容体ＴＬＲ７、ＴＬＲ８、およびＴＬＲ９は、他のＴＬＲよりもアミノ酸配列が長いファミリーである。これらは、細胞内に局在し、非自己核酸に反応してシグナルを送る。これらは、また、ＬＲＲ１４とＬＲＲ１５との間に不規則な部位を含む。

【００６０】

ＴＬＲ受容体の配列は知られており、本明細書で述べるリガンドのこれら受容体への結合は、例えば上述したように評価されてもよい。例として、公知のＴＬＲアミノ酸配列を下記表１に示す。

【００６１】

【表１】

表１

ＴＬＲ	ＮＣＢＩ参照配列	ユニプロットＫＢ／スイスプロット参照
Ｔｏｌｌ様受容体１前駆体（ヒト）	ＮＰ＿００３２５４．２	Ｑ１５３９９
Ｔｏｌｌ様受容体２前駆体（ヒト）	ＮＰ＿００３２５５．２	Ｏ６０６０３
Ｔｏｌｌ様受容体３前駆体（ヒト）	ＮＰ＿００３２５６．１	Ｏ１５４５５
Ｔｏｌｌ様受容体４アイソフォームＣ（ヒト）	ＮＰ＿００３２５７．１	Ｏ００２０６
Ｔｏｌｌ様受容体５前駆体（ヒト）	ＮＰ＿００３２５９．２	Ｏ６０６０２
Ｔｏｌｌ様受容体６前駆体（ヒト）	ＮＰ＿００６０５９．２	Ｑ９Ｙ２Ｃ９
Ｔｏｌｌ様受容体７前駆体（ヒト）	ＮＰ＿０５７６４６．１	Ｑ９ＮＹＫ１
Ｔｏｌｌ様受容体８前駆体（ヒト）	ＮＰ＿６１９５４２．１	Ｑ９ＮＲ９７
Ｔｏｌｌ様受容体９前駆体（ヒト）	ＮＰ＿０５９１３８．１	Ｑ９ＮＲ９６
Ｔｏｌｌ様受容体１０アイソフォームａ（ヒト）	ＮＰ＿００１０１７３８８．１	Ｑ９ＢＸＲ５
Ｔｏｌｌ様受容体１１（マウス）		Ｑ６Ｒ５Ｐ０
Ｔｏｌｌ様受容体１２（マウス）		Ｑ６ＱＮＵ９
Ｔｏｌｌ様受容体（マウス）		Ｑ６Ｒ５Ｎ８

【００６２】

ＴＬＲ１は、そのリガンドが、例えば細菌由来であるリポタンパク質および複数のトリアシルリポペプチドを含む細胞表面受容体である。ＴＬＲ１は、単独ではリガンドを認識せず、むしろＴＬＲ２との複合体で働く。このように、リガンドは、ＴＬＲ１とＴＬＲ２との複合体を認識する。ＴＬＲ１は、ＴＬＲ２と結合して（ヘテロダイマーとして）ペプチドグリカンおよび（トリアシル）リポタンパク質を認識する。

【００６３】

リポタンパク質／リポペプチドは、タンパク質／ペプチドに結合した脂質からなる分子である。細菌が、このような分子を発現する。トリアシルリポタンパク質／トリアシルリポペプチドはアシル基を３つ含む。好ましくは、本発明によって用いられるＴＬＲ１リガンドは、トリアシルリポペプチドである。

【００６４】

ＴＬＲ１リガンドは、インビボジェン社（Invivogen）およびエンゾ・ライフ・サイエンス社（Enzo Life Sciences）（ファーミングデール、ＮＹ、ＵＳＡ）から購入することができる。例えば、Ｐａｍ３ＣＳＫ４（インビボジェン社（Invivogen））は、アシル化された細菌のリポペプチド（ＬＰ）のアミノ末端を模した合成トリアシル化リポペプチド（ＬＰ）である。

【００６５】

あるいは、ＴＬＲ２と複合体を形成したＴＬＲ１の選択的アゴニストであるＰａｍ３Ｃｙｓ－Ｓｅｒ－(Ｌｙｓ)４三塩酸塩（エンゾ・ライフ・サイエンス社（Enzo Life Sciences））を用いてもよい。

【００６６】

ＴＬＲ２は、グラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の両方、さらにはマイコプラズマや酵母など、幅広い種の集団を代表する多数の微生物分子によって刺激される細胞表面受容体である。ＴＬＲ２は、ペプチドグリカン、リポテイコ酸、およびリポタンパク質などの

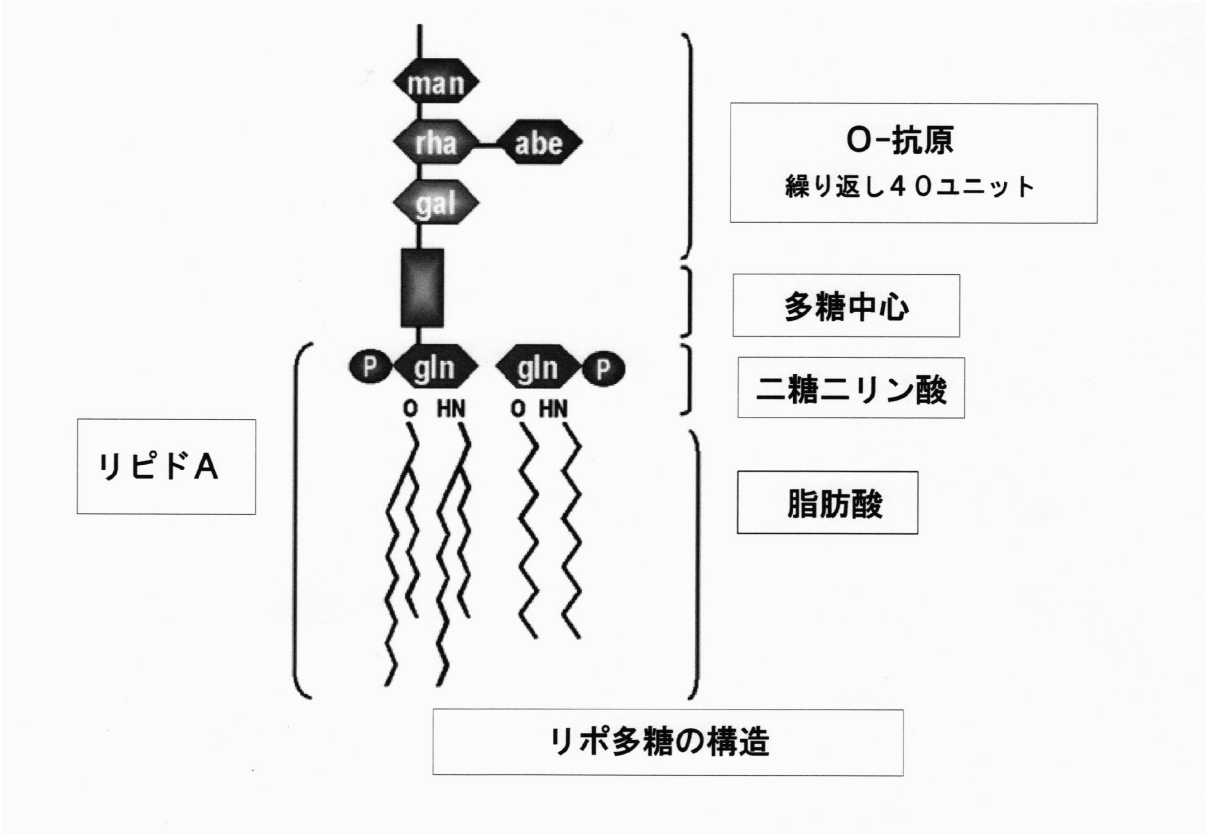
グラム陽性細菌の細胞壁成分、マイコバクテリアのリポアラビノマンナン、ならびに酵母細胞壁のザイモサンを認識する。

【００６７】

好ましいＴＬＲ２リガンドは、スメグマ菌（Mycobacterium smegmatis）のリポアラビノマンナンおよびリポマンナンなどのリポグリカンである。特に好ましいリポグリカンは、ＴＬＲ２に特異的なリポ多糖（ＬＰＳ）である。これらの分子は、共有結合によって結びついた脂質および多糖を有し、グラム陰性細菌の外部構成要素に見出され、内毒素として働く。好ましい特徴において、ＬＰＳは、ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas Gingivalis）由来である。ＬＰＳは、リピド（Lipid）Ａと呼ばれる特定の炭化水素の脂質部によって細菌の外膜に固定されている多糖領域からなる。リピドＡは、内毒素としても知られ、ＬＰＳの免疫賦活活性を司る。

【００６８】

【化２２】



【００６９】

リピドＡの最も活性のある形態は、脂肪族アシル基を６つ含み、大腸菌（Escherichia coli）およびサルモネラ属（Salmonella）の種などの病原細菌で見出される。

【００７０】

他の好ましいＴＬＲ２リガンドは、例えば枯草菌（Bacillus subtilis）および黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）などの異なる細菌種由来のリポテイコ酸；例えば枯草菌（Bacillus subtilis）、大腸菌（E. coli）株（０１１１：Ｂ４またはＫ１２など）、黄色ブドウ球菌（Staphylococcus aureus）、およびその他の細菌由来のペプチドグリカン；合成ジアシル化リポタンパク質または合成トリアシル化リポタンパク質などの合成リポタンパク質、ならびにβ－１，３－グリコシド結合によって結合されたグルコースの繰り返しユニットを有するグルカンであるザイモサン（例えば、出芽酵母（Saccharomyces cerevisiae）由来）である。ＴＬＲ２リガンドは、インビボジェン社（Invivogen）から市販されている。

【００７１】

ＴＬＲ３は、細胞区画に見出される。本発明にかかる好ましいリガンドは、ポリアデニ

ル酸－ポリウリジル酸（ポリ（Ａ：Ｕ））またはポリイノシン酸－ポリシチジン酸（ポリ（Ｉ：Ｃ））などの、ウイルスｄｓＲＮＡを模した二重鎖ＲＮＡ分子である。ポリ（Ｉ：Ｃ）が特に好ましい。

【００７２】

二重鎖ＲＮＡ（ｄｓＲＮＡ）は、２本の相補鎖を有するＲＮＡであり、全ての細胞で見られるＤＮＡに類似している。ｄｓＲＮＡは、あるウイルス（二重鎖ＲＮＡウイルス）の遺伝物質を形成する。ウイルスＲＮＡまたはｓｉＲＮＡなどの二重鎖ＲＮＡは、真核生物におけるＲＮＡ干渉、さらには脊椎動物においてインターフェロン応答を引き起こし得る。

【００７３】

好ましい特徴において、リガンドはポリ（Ｉ：Ｃ）である。ポリＩ：Ｃは、一方の鎖がイノシン酸ポリマーであり、もう一方の鎖がシチジン酸ポリマーである、ミスマッチ二重鎖ＲＮＡである。このような分子は、周知の技術によって生成されてもよい。様々な商業的供給源が存在し、例えば、以下に示すものがインビボジェン社（Invivogen）から購入され、好ましい実施形態を形成してもよい：

－ポリ（Ｉ：Ｃ）（ＨＭＷ）：高分子量、平均サイズは１．５～８　ｋｂ；および

－ポリ（Ｉ：Ｃ）（ＬＭＷ）：低分子量、平均サイズは０．２～１　ｋｂ。

【００７４】

高分子量の形態および低分子量の形態の両方が、本発明によって用いられるのに好ましい形態である。

【００７５】

ＴＬＲ４も細胞表面に見出され、そのリガンドは数種類あり、中でもリポ多糖（ＬＰＳ）、いくつかの熱ショックタンパク質、フィブリノゲン、ヘパリン硫酸塩断片、ヒアルロン酸断片、ニッケル、および様々なオピオイド薬を含む。好ましい態様において、リガンドはＬＰＳである。ＬＰＳは、大腸菌（E. coli）０１１１：Ｂ４または大腸菌（E. coli）Ｋ１２、あるいはサルモネラ菌などの様々な細菌種由来（フェノール－水混合物で抽出）であってもよく、好ましい特徴において、ＬＰＳは、大腸菌（E. coli）由来、またはサルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota）の、例えばＲ５９５株由来である。別の好ましい態様において、ＴＬＲ４リガンドは、モノホスホリルリピドＡ（ＭＰＬＡ）であり、これは、細菌（例えばサルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota）Ｒ５９５）から単離されたものであっても、合成されたものであってもよい。通常、ＴＬＲ４リガンドは、インビボジェン社（Invivogen）などから市販されている。

【００７６】

ＴＬＲ５は、枯草菌（Bacillus subtilis）、緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）、ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）などのグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌の両方に由来するフラジェリンをリガンドとして結合する。フラジェリンは、自身を中空の筒状に配置して細菌鞭毛の線条組織を形成する球状タンパク質である。その質量は、約３０，０００～６０，０００ダルトンである。フラジェリンは、細菌鞭毛の主要な置換基であり、鞭毛のある細菌のほぼ全てにおいて大量に存在する。このように、好ましいＴＬＲ５リガンドはフラジェリンであり、好ましくは上述の細菌由来のフラジェリンである。ＴＬＲ５リガンドは、インビボジェン社（Invivogen）などから市販されている。

【００７７】

ＴＬＲ６は、複数のジアシルリポペプチドに結合する。前述の通り、リポペプチドは、細菌中に見出され、ペプチドに結合した脂質を含む。ジアシルリポペプチドは、アシル基を２つ有し、本発明で用いられる好ましいＴＬＲ６リガンドを形成する。ＴＬＲ６リガンドは、インビボジェン社（Invivogen）から市販されている。例えば、ＦＳＬ－１（Ｐａｍ２ＣＧＤＰＫＨＰＫＳＦ）は、マイコプラズマ・サリバリウム（Mycoplasma salivarium）由来の合成リポタンパク質であり、Ｍ．ファーメンタンス（M. fermentans）由来のリポペプチド（ＬＰ）であるＭＡＬＰ－２に類似している。ＦＳＬ－１などのマイコプラズマのＬＰは、ジアシル化システイン残基を含み、細菌のＬＰは、トリアシル化システイン

残基を含む。ＦＳＬ－１は、ＴＬＲ２と結合したＴＬＲ６によって認識され、細菌のＬＰは、上述したように、ＴＬＲ２およびＴＬＲ１の組み合わせによって認識される。

【００７８】

ＴＬＲ７リガンドは、小型の合成化合物であるイミダゾキノリン、アデニン類似体およびグアノシン類似体などの塩基類似体（例えばロキソリビン）、およびブロピリミンを含み、また一本鎖ＲＮＡも含む。

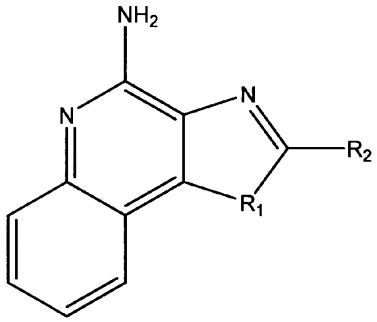
【００７９】

イミダゾキノリン化合物は、二重環式有機分子であり、好ましくは、R_1およびR_2位の基は変更されてもよい下記に示す分子である。

【００８０】

好ましくは、イミダゾキノリン化合物は、式（１）で表される化合物またはその薬学的に許容される塩である。

【化２３】



(1)

但し、R_1は、場合によってはヒドロキシル基などで置換されていてもよいアミノアルキル基であり、R_2は、場合によっては酸素族または窒素族が挿入されたアルキル基である。；

好ましくは、R_1は、Ｎ－CH_2－Ｃ（CH_3）$_2$－R_3であり、
R_2は、－CH_2－Ｘ－CH_2CH_3または水素原子であり、
R_3は、ＯＨまたは水素原子、Ｘは、ＯまたはＮＨである。

上記化学式において、アルキル基は、C_1－C_{10}基であってもよい。

【００８１】

これら化合物の例は、当該技術分野において知られており、例えば、レシキモド（すなわち、Ｒ８４８）（１－［４－アミノ－２－（エトキシメチル）イミダゾ［４，５－ｃ］キノリン－１－イル］－２－メチルプロパン－２－オル）、イミキモド（３－（２－メチルプロピル）－３，５，８－トリアザトリシクロ［７．４．９．$0^{2,6}$］トリデカ－１（９），２（６），４，７，１０，１２－ヘキサエン－７－アミン）、およびガーディキモド（R_1は、Ｎ－CH_2－Ｃ（CH_3）$_2$ＯＨであり、R_2は、－CH_2－ＮＨ－CH_2CH_3である；１－［４－アミノ－２－（エチルアミノメチル）イミダゾ［４，５－ｃ］キノリン－１－イル］－２－メチルプロパン－２－オル）（これらは全てインビボジェン社（InvivoGen）（サンディエゴ、ＣＡ、ＵＳＡ）から入手可能）などが挙げられる。好ましい実施形態において、化合物は、レシキモドおよびイミキモドから選択される。

【００８２】

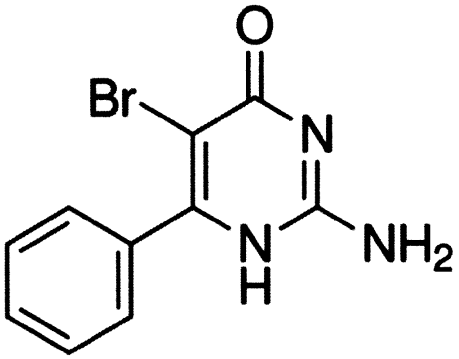
これらの化合物の薬学的に許容される塩も、本発明に包含される。適切な塩としては、例えば、酢酸塩、臭化物、塩化物、クエン酸塩、塩酸塩、マレイン酸塩、メタンスルホン酸塩、硝酸塩、リン酸塩、硫酸塩、酒石酸塩、オレイン酸塩、ステアリン酸塩、トルエンスルホン酸塩、カルシウム塩、メグルミン塩、カリウム塩、およびナトリウム塩などが挙げられる。

【００８３】

ロキソリビンは、N^7位およびC^8位を誘導体化したグアノシン類似体である。このヌクレオシドは、免疫系に対する大変強力な刺激物質である。ブロピリミンは、抗癌性および

抗ウイルス性を有する実験薬であり、以下に示す構造を有する。

【化２４】



【００８４】

ｓｓＰｏｌｙＵなどの一本鎖ＲＮＡは、好ましいＴＬＲ７リガンドであり、好ましくは、該一本鎖分子は、長さが２０～２００ヌクレオチドである。合成によって、このような分子を容易に生成することができる。

【００８５】

ＴＬＲ８リガンドは、一般的に、小さい合成化合物または一本鎖ＲＮＡである。好ましくは、該ＴＬＲ８リガンドは、上述したようなｓｓＰｏｌｙＵ分子である。

【００８６】

ＴＬＲ９リガンドは、非メチル化ＣｐＧオリゴデオキシヌクレオチドＤＮＡを含む。「ＣｐＧ」オリゴヌクレオチド（すなわち、ＣｐＧ ＯＤＮ）は、このようなリガンドの一例であり、シトシン三リン酸デオキシヌクレオチド（「Ｃ」）をグアニン三リン酸デオキシヌクレオチド（「Ｇ」）に結合して得られる短い一本鎖合成ＤＮＡ分子である。「ｐ」は、連続したヌクレオチド間のリン酸ジエステル結合を示しているが、ＯＤＮの中には、その代わりとして、修飾されたチオリン酸エステル（ＰＳ）骨格を有するものもある。本明細書で言及されるＣｐＧヌクレオチドは、ＣｐＧモチーフと記される。ＣｐＧモチーフは、メチル化されていない。ＣｐＧモチーフを含む配列は、微生物ゲノムには豊富だが脊椎動物ゲノムではまれであることから、病原体関連分子パターン（ＰＡＭＰ）と考えられている。ＣｐＧ ＰＡＭＰは、パターン認識受容体（ＰＲＲ）であるＴｏｌｌ様受容体９（ＴＬＲ９）によって認識される。ＴＬＲ９は、微生物ＤＮＡと哺乳類ＤＮＡとを区別する、特定の非メチル化ＣｐＧオリゴヌクレオチド（ＯＤＮ）配列を認識する。

【００８７】

刺激性ＯＤＮは、主に、Ａ型、Ｂ型、およびＣ型の３種類について述べられてきている。Ａ型ＣｐＧ ＯＤＮは、リン酸ジエステル／チオリン酸エステルの混合骨格から構成されており、回文配列の一部として、１つ以上のＣｐＧモチーフを含んでいる。Ａ型ＣｐＧ ＯＤＮは、３’末端および５’末端にポリＧテールを有する（コンカテマーの形成を容易にする構造モチーフである）。Ａ型ＣｐＧ ＯＤＮは、典型的には、ヌクレアーゼによる分解に抵抗し、ＯＤＮの安定性を増す７～１０個のチオリン酸エステル修飾された塩基を、一方の末端、または両末端に含んでいる。例えば、内部回文配列は、長さが８～１６（好ましくは１０、１２、または１４）塩基対であり、塩基の順番が異なっているものであり得るが、「：」で示された回文中心から等距離にあるＰｕ塩基、Ｐｙ塩基が相補的になっているパターン、５’－Ｐｕ Ｐｕ ＣＧ Ｐｕ：Ｐｙ ＣＧ Ｐｙ Ｐｙ－３’が好ましい。ＤＮＡ鎖のどちらかの末端に見出されるポリＧテールは、長さが異なり得る。

【００８８】

Ｂ型ＣｐＧ ＯＤＮは、ＣｐＧモチーフを含む６ ｍｅｒの共通配列を１つ以上有していてもよい。ヒトの共通配列は、５’－Ｐｕ Ｐｙ Ｃ Ｇ Ｐｙ Ｐｕ－３’配列を含んでいてもよい（マウスの配列は異なっている場合がある）。Ｂ型ＣｐＧ ＯＤＮは、完全にチオリン酸エステル化（ＰＳ修飾された）骨格を有し、一般的に、長さが１８～２８（例えば１８～２２）ヌクレオチドである。Ｂ型ＣｐＧ ＯＤＮの一例は、配列が５’－ｔｃｃ

ａｔｇａｃｇｔｔｃｃｔｇａｃｇｔｔ－３’である、ＯＤＮ１８２６である。
【００８９】
Ｃ型ＣｐＧ ＯＤＮは、Ａ型およびＢ型の特徴を併せ持つ。Ｃ型ＣｐＧ ＯＤＮは、全てチオリン酸エステルヌクレオチドからなり、ＣｐＧモチーフを１つ以上含む回文配列を含んでいる。Ｃ型ＣｐＧ ＯＤＮの一例は、配列が５’－ｔｃｇｔｃｇｔｔｔｔｃｇｇｃｇｃ：ｇｃｇｃｃｇ－３’（下線部が回文）であるＯＤＮ２３９５である。
【００９０】
その他に、回文配列を２つ含み、高次構造の形成を可能にするＰ型ＣｐＧ ＯＤＮを用いてもよい。
【００９１】
当該技術分野において知られている、標準的なオリゴヌクレオチド合成法によって、ＣｐＧオリゴヌクレオチドを合成することができる。
【００９２】
このように、本発明のＣｐＧオリゴヌクレオチドは、少なくとも１つのＣｐＧモチーフ、ならびに該モチーフの３’側および５’側のそれぞれに隣接する少なくとも１つの塩基を含む、６～５０塩基、好ましくは１８～２７塩基、好ましくは２０～２５塩基の一本鎖オリゴヌクレオチドにまで及び、該ＣｐＧモチーフは、シトシンの後にリン酸結合またはチオリン酸エステル結合によって結びついたグアニンが続くものであり、シトシンのピリミジン環はメチル化されていない。一実施形態において、１つ以上のモチーフが配列上隣接しており、これは、１つ以上のモチーフとともに回文配列を与える。本明細書で言及される「回文配列」は、例えば、ｃｇｇｃｇｃ：ｇｃｇｃｃｇ（回文中心を「：」で示す）のような、配列がヘアピンを形成するように、相補配列に逆向きに結合された順方向配列を提供する。ＣｐＧモチーフは、配列中心を形成してもよいし、回文配列の他の箇所にあってもよい。好ましくは、回文配列（順方向配列および逆方向配列の両方を含む）は、長さが８～１６塩基、好ましくは１０～１２塩基または１０～１４塩基である。
【００９３】
さらに好ましい態様において、ＣｐＧオリゴヌクレオチド配列は、「：」で示された回文中心から等距離にあるＰｕ塩基、Ｐｙ塩基が相補的になっている回文配列
５’－Ｐｕ Ｐｕ ＣＧ Ｐｕ：Ｐｙ ＣＧ Ｐｙ Ｐｙ－３’
および／または、１つ以上の共通配列５’－Ｐｕ Ｐｙ ＣＧ Ｐｙ Ｐｕ－３’を含む。場合によっては、ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、３’末端または５’末端に長さが３～８塩基のポリＧテールを含んでいてもよい。
【００９４】
本発明の好ましい実施形態において、ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、１０～１４塩基の回文配列およびチオリン酸エステル骨格を有する、１８～２７塩基のＣ型ＣＰＧ ＯＤＮである。特に好ましくは、配列が
５’－ｔｃｇｔｃｇｔｔｔｔｃｇｇｃｇｃ:ｇｃｇｃｃｇ－３’（下線部が回文）
である、ＯＤＮ２３９５である。
【００９５】
本発明の別の好ましい実施形態において、ＣｐＧオリゴヌクレオチドは、チオリン酸エステル骨格を有する、１８～２２塩基のＢ型ＣＰＧ ＯＤＮである。特に好ましくは、配列が
５’－ｔｃｃａｔｇａｃｇｔｔｃｃｔｇａｃｇｔｔ－３’
である、ＯＤＮ１８２６である。
【００９６】
ＴＬＲ１１リガンドおよびＴＬＲ１２リガンドは、アクチン細胞骨格の動的な代謝回転および再構築に関わるアクチン結合タンパク質である、プロフィリンを含む。このように、好ましいＴＬＲ１１／１２リガンドは、トキソプラズマ症という疾患の原因となる偏性細胞内寄生性原生動物である、トキソプラズマ（Toxoplasma gondii）由来のプロフィリンである。プロフィリンは、例えば、エンゾ・ライフ・サイエンス社（Enzo Life Scienc

es）から購入することができる。

【００９７】

ＴＬＲ１３リガンドは、細菌のリボソームＲＮＡ配列「ＣＧＧＡＡＡＧＡＣＣ」を含み、このヌクレオチド配列を含む核酸およびこのリガンドは、本発明の好ましい態様を形成する。５’－ＧＧＡＣＧＧＡＡＡＧＡＣＣＣＣＧＵＧＧ－３’の配列を有するオリゴヌクレオチドは、ＴＬＲ１３リガンドであり、例えばインビボジェン社（Invivogen）から購入することができる。

【００９８】

このように、好ましくは、前記ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ２リガンド、ＴＬＲ３リガンド、ＴＬＲ４リガンド、ＴＬＲ７リガンド、ＴＬＲ８リガンド、またはＴＬＲ９リガンドであり、好ましくは上述したようなリガンドである。好ましい実施形態において、ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ３リガンドであり、好ましくは、上述したようなＴＬＲ３リガンドである。別の好ましい実施形態において、ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ４リガンドであり、好ましくは、上述したようなＴＬＲ４リガンドである。また、さらに別の好ましい実施形態において、ＴＬＲリガンドは、ＴＬＲ７リガンド～ＴＬＲ９リガンド、すなわち、ＴＬＲ７リガンド、ＴＬＲ８リガンド、またはＴＬＲ９リガンドであり、好ましくは上述したようなものである。

【００９９】

本明細書で用いられる「発現する」または「提示する」は、抗原分子の少なくとも一部が細胞の周囲の環境に露出し、接触可能なように、好ましくは、提示された細胞またはその一部に対して免疫応答を起こしてもよいように、抗原分子またはその一部が細胞表面に存在することをいう。「表面」での発現は、発現対象分子が細胞膜および／または細胞膜中に存在または存在させた成分と接触している状態で達成され得る。

【０１００】

本明細書で用いられる「細胞」なる語は、全ての真核細胞（昆虫細胞および真菌細胞を含む）を含んでいる。このように、代表的な「細胞」は、全ての種類の哺乳動物細胞および非哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、真菌細胞、および原生動物を含む。しかしながら、好ましくは、細胞は、例えばネコ、イヌ、ウマ、ロバ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、マウス、ラット、ウサギ、モルモットなどの哺乳動物細胞であるが、最も好ましいのはヒト由来の細胞である。本発明の方法、使用などに供される細胞は、そのサイトゾルに投与または輸送される分子を、表面に発現または提示することができるのであれば、どのような細胞でもよい。

【０１０１】

細胞は、好都合には、免疫細胞、すなわち免疫応答に関わる細胞である。しかしながら、他の細胞も、免疫系に対して抗原を提示する場合があり、このような細胞も、本発明の範囲内である。このように、本発明にかかる細胞は、有利には、以下に述べるような抗原提示細胞である。抗原提示細胞は、本明細書で定義される免疫応答のどのような態様または「アーム」に関わっていてもよい。

【０１０２】

細胞傷害性細胞の刺激には、抗原提示細胞による特定の様式、例えばＭＨＣクラスＩ提示などによって刺激される細胞に対して、抗原が提示されることが必要である（例えば、ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞の活性化にはＭＨＣ－Ｉ抗原提示が必要である）。抗体産生細胞が、抗原提示細胞による抗原提示によって刺激されてもよい。

【０１０３】

抗原は、エンドサイトーシスによって抗原提示細胞に取り込まれ、エンドサイトーシス小胞内でペプチドまで分解される。これらのペプチドは、エンドソーム中においてＭＨＣクラスＩＩ分子に結合して細胞表面に輸送され、そこで、ペプチド－ＭＨＣクラスＩＩ複合体が、ＣＤ４＋ Ｔヘルパー細胞によって認識され、免疫応答を誘導してもよい。あるいは、サイトゾルのタンパク質が、例えばプロテアソームによって分解されてＴＡＰ（抗原提示に関するトランスポーター）によって小胞体内へ輸送され、そこで、ペプチドがＭ

ＨＣクラスＩ分子に結合して細胞表面に輸送されてもよい（ＹｅｗｄｅｌｌおよびＢｅｎｎｉｎｋ、１９９２、Ａｄｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．５２：１～１２３）。ペプチドが外部抗原由来である場合、ペプチド－ＭＨＣクラスＩ複合体は、ＣＤ８＋細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）によって認識される。ＣＴＬは、ペプチド－ＭＨＣ（ＨＬＡ）クラスＩ複合体に結合し、それによって活性化され、増殖を開始し、ＣＴＬのクローンを形成する。標的細胞、および細胞表面に同じペプチド－ＭＨＣクラスＩ複合体を有する他の標的細胞は、ＣＴＬクローンによって殺されてもよい。十分量の抗原をサイトゾルに導入することができた場合に、外部抗原に対する免疫が確立され得る（上記ＹｅｗｄｅｌｌおよびＢｅｎｎｉｎｋ、１９９２；Ｒｏｃｋ、１９９６、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ １７：１３１～１３７）。これが、とりわけ癌ワクチン開発の基礎となっている。実用上最大の問題の１つは、サイトゾルに十分量の抗原（または抗原の一部）を導入することである。この問題は、本発明によって解決され得る。

【０１０４】

上記したように、抗原分子は、光科学的内在化プロセスによって一旦細胞のサイトゾルに放出されると、細胞の抗原処理機構によって処理され、適切な様式、例えばクラスＩＭＨＣによって、細胞表面に提示され得る。この処理は、抗原の分解、例えばタンパク質抗原またはポリペプチド抗原のペプチドへの分解を含んでもよく、ペプチドはその後、提示のためのＭＨＣ分子と複合体を形成する。このように、本発明にかかる細胞の表面に発現または提示される抗原分子は、内在化（エンドサイトーシス）された抗原分子の一部または断片であってもよい。

【０１０５】

例えばリンパ球（Ｔ細胞およびＢ細胞の両方）、樹状細胞、マクロファージなどを含む、種類の異なる様々な細胞が、その表面に抗原を提示することができる。他には、例えば黒色腫細胞などの癌細胞がある。これらの細胞を、本明細書において、「抗原提示細胞」という。当該技術分野において、主として免疫系のエフェクター細胞への抗原提示に関わる免疫系の細胞である「プロフェッショナル抗原提示細胞」が知られていて、文献にも記載されており、この細胞は、Ｂリンパ球、樹状細胞、およびマクロファージを含む。好ましくは、細胞は、プロフェッショナル抗原提示細胞である。

【０１０６】

抗原提示細胞による、細胞傷害性Ｔ細胞（ＣＴＬ）に対する抗原提示には、抗原分子が抗原提示細胞のサイトゾルに入ることが必要である（Ｇｅｒｍａｉｎ、Ｃｅｌｌ、１９９４、７６、２８７～２９９）。

【０１０７】

例えば、インビトロまたはエキソビボの方法に関わる、あるいはインビボの方法に関わる本発明の実施形態において、細胞は樹状細胞である。樹状細胞は、哺乳類の免疫系の一部を形成する免疫細胞である。その主な機能は、抗原性物質を処理し、表面において、免疫系の他の細胞に対して提示することである。樹状細胞は、一旦活性化されると、リンパ節に移動し、そこで、Ｔ細胞およびＢ細胞と相互作用して適応免疫を引き起こす。

【０１０８】

樹状細胞は、造血性骨髄始原細胞由来である。これら始原細胞は、初めは、高い細胞障害活性および低いＴ細胞活性化能が特徴の未成熟樹状細胞に変化する。一旦、提示可能な抗原と接触すると、成熟樹状細胞へと活性化し、リンパ節への移動を開始する。未成熟樹状細胞は、病原体を貪食してそのタンパク質を小片へと分解し、成熟化すると、ＭＨＣ分子を用いてその断片を細胞表面に提示する。

【０１０９】

樹状細胞は、樹状細胞の適切な供給源であればどのような由来であってもよく、例えば、皮膚、鼻の内層、肺、胃、および腸または血液由来であってもよい。本発明の特に好ましい実施形態において、樹状細胞は骨髄由来である。

【０１１０】

樹状細胞は、天然源から単離されて本発明のインビトロの方法で用いられてもよいし、

インビトロで産生されてもよい。樹状細胞は、単球、すなわち、体内を循環し、適切なシグナルに応じて、樹状細胞またはマクロファージに分化することができる白血球から生じる。単球は、ひいては、骨髄の幹細胞から形成される。単球由来の樹状細胞は、インビトロにおいて、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）から産生させることができる。組織培養フラスコにＰＢＭＣを平板培養することで、単球が付着する。これら単球をインターロイキン４（ＩＬ－４）および顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（ＧＭ－ＣＳＦ）で処理することにより、約１週間で未成熟樹状細胞（ｉＤＣ）へ分化する。続いて、腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）で処理することにより、ｉＤＣは成熟樹状細胞へとさらに分化する。

【０１１１】

本明細書で用いられる「接触する」は、細胞への内在化に適切な条件下、例えば、２５～３９℃の適切な栄養培地中で好ましくは３７℃、またはインビボにおいて体温、すなわち３６～３８℃という条件下で、細胞ならびに光感作性薬剤、および／または抗原分子、および／または本明細書で定義されるＴＬＲリガンドをお互いに物理的に接触させることをいう。

【０１１２】

細胞は、光感作性薬剤、および抗原分子、および本明細書で定義されるＴＬＲリガンドと、順次または同時に接触させてよい。好ましくは、また好都合には、これらの成分は、細胞に同時に接触させる。光感作性薬剤および抗原分子（および場合によってはＴＬＲリガンド）は、細胞によって、同じ細胞内区画に取り込まれてもよいし、異なる細胞内区画に取り込まれてもよい（例えば、共転移してもよい）。

【０１１３】

次に、細胞を適切な波長の光に露光させて光感作性化合物を活性化し、その結果、細胞内区画の膜を破壊する。

【０１１４】

国際公開第０２／４４３９６号（参照により本明細書に援用される）には、例えば、内在化される分子（この場合は抗原分子）が細胞と接触する前に、光感作性薬剤が細胞と接触し照射によって活性化するように、工程を順序立てた方法が記載されている。この方法は、内在化される分子は、照射時に、光感作性薬剤と同じ細胞サブコンパートメントに存在する必要はないということを利用している。

【０１１５】

このように、一実施形態において、上記光感作性薬剤および／または上記抗原分子および／または本明細書で定義されるＴＬＲリガンドは、一緒に、または相互に独立して、細胞に与えられる。次いで、少なくとも光感作性薬剤および抗原分子が同じ細胞内区画に現れた時に、照射を行う。これを、「後照射」法という。

【０１１６】

別の実施形態において、上記方法は、上記細胞をまず光感作性薬剤に接触させ、次いで抗原分子および／または本明細書で定義されるＴＬＲリガンドと接触させることで行うことができ、照射は、光感作性薬剤が細胞内区画に取り込まれた後、抗原分子（および場合によってはＴＬＲリガンド）が細胞によって該光感作性薬剤を含む細胞内区画に取り込まれる前（例えば、露光時に異なる細胞内区画に存在していてもよい）、好ましくは細胞によっていずれかの細胞内区画に取り込まれる前、例えばいずれかの細胞による取り込みの前に行われる。このように、例えば、光感作性薬剤を投与した後に照射を行い、その後残りの薬剤を投与してもよい。これが、いわゆる「前照射」法である。

【０１１７】

本明細書で用いられる「内在化」は、細胞内、例えばサイトゾルへの分子の送達をいう。この場合、「内在化」は、細胞内区画／膜結合区画から、細胞のサイトゾルへ分子を放出する工程を含んでいてもよい。

【０１１８】

本明細書で用いられる「細胞による取り込み」または「転移」は、細胞膜外にある分子が、例えば小胞体、ゴルジ体、リソソーム、エンドソームなどの細胞内の膜制限区画への

、またはこれら細胞内の膜制限区画に結合する、エンドサイトーシスまたは他の適切な取り込み機構によって、周辺の細胞膜よりも内側に見出されるように細胞に取り込まれる内在化の工程をいう。

【０１１９】

細胞を、各種薬剤に接触させる工程は、都合のよい方法で行われても、所望の方法で行われてもよい。このように、接触工程がインビトロで行われる場合、好都合には、細胞は、例えば適切な細胞培養培地などの水性媒体中に維持されてもよく、適切な時点において、適切な条件下、例えば適切な濃度で適切な期間、各種薬剤を媒体に容易に加えることができる。例えば、細胞は、血清を含まない培地の存在下で薬剤と接触させてもよいし、血清を含む培地とともに薬剤と接触させてもよい。

【０１２０】

以下のコメントでは、各種薬剤を細胞に別々に与えることを論じている。しかしながら、上述したように、これらの薬剤は、細胞に一緒に、別々に、同時に、または順次に与えられてもよい。本明細書で言及されるように、本発明の方法で用いられる各種薬剤は、インビトロまたはインビボで細胞に与えられてもよい。後者の場合、以下でより詳細に述べるように、直接投与（すなわち、局所的投与）または間接投与（すなわち、全身投与または非局所的投与）によって与えられてもよい。

【０１２１】

用いられる特定の光感作性薬剤ならびに標的細胞の種類および位置などの要因に依存し、常用の技術を用いて当業者が容易に決定することができる適切な濃度および適切な期間、光感作性薬剤を細胞に接触させる。好都合には、光感作性薬剤の濃度は、光感作性薬剤が、例えば１つ以上の細胞内区画に取り込まれる、またはこれら細胞内区画に結合するなど、細胞に一旦取り込まれて、照射によって活性化した際に、例えば１つ以上の細胞内区画が溶解される、または破壊されるなど、１つ以上の細胞構造が破壊されるような濃度である。例えば、本明細書で言及される光感作性薬剤は、例えば１０～５０ μｇ／ｍｌの濃度で用いられてもよい。

【０１２２】

インビトロでの使用では、その範囲はより広く、例えば０．０００５～５００ μｇ／ｍｌである。インビボでのヒトの治療では、光感作性薬剤は、全身投与の場合、０．０５～２０ ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で用いられてもよい。あるいは、全身投与では、０．００５～２０ ｍｇ／ｋｇ体重の範囲で用いられてもよい。より好都合には、光感作性薬剤は、例えば皮内投与、皮下投与、または腫瘍内投与など、局所的に投与され、そのような場合に、用量は、１～５０００ μｇの範囲、例えば、１０～２５００ μｇ、２５～１０００ μｇ、５０～５００ μｇ、１０～３００ μｇ、または１００～３００ μｇであってもよい。好ましくは、用量は、１００ μｇ、１５０ μｇ、２００ μｇ、および２５０ μｇから選択される。好ましくは、用量は、７５～１２５ μｇであり、例えば１００ μｇである。与えられた用量は、ヒトの平均体重（すなわち７０ ｋｇ）あたりのものである。皮内注射では、１回の用量の光増感剤は、１００ μｌ～１ ｍｌに溶解されてもよく、すなわち、その濃度は、１～５００００ μｇ／ｍｌの範囲であってもよい。より小型の動物では、局所的に投与する場合に、異なる動物に対して投与を変化させる必要はほとんどないが、濃度範囲は異なっていてもよく、それなりに調節することができる。

【０１２３】

用いられる抗原の濃度は、用いられる抗原に依存する。好都合には、インビトロでは、濃度が０．００１～５００ μｇ／ｍｌ（例えば、２０～５００ μｇ／ｍｌ、２０～３００ μｇ／ｍｌ、２０～１００ μｇ／ｍｌ、２０～５０ μｇ／ｍｌ、１０～５０ μｇ／ｍｌ、５～５０ μｇ／ｍｌ、１～５０ μｇ／ｍｌ、０．０１～５０ μｇ／ｍｌ、または０．００１～５０ μｇ／ｍｌ）の抗原を用いてもよい。ペプチド抗原では、０．００１～５００ μｇ／ｍｌなどのより低い濃度、例えば０．００１～１ μｇ／ｍｌ、５ μｇ／ｍｌ、２５ μｇ／ｍｌ、５０ μｇ／ｍｌ、または１００ μｇ／ｍｌの濃度を用いてもよい。タンパク質抗原では、０．５～５００ μｇ／ｍｌなどのより高い濃度を用い

てもよい。インビボでの使用では、タンパク質抗原の用量は、０．５～５００ μｇ、例えば１０～１００ μｇまたは１０～２００ μｇの範囲であってもよい。ペプチド抗原では、インビボでの用量は、０．１～４０００ μｇが用いられてもよく、例えば０．１～２０００ μｇ、０．１～１０００ μｇ、または０．１～５００ μｇ、例えば０．１～１００ μｇが用いられてもよい。このような用量は、局所的投与に適している。件の薬剤の件の細胞への取り込み効率、および細胞内で達成されることが望まれる終濃度に応じて、適切な濃度を決定することができる。

【０１２４】

本明細書で定義されるＴＬＲリガンドの濃度も、用いられる特定の分子に依存しており、当業者であれば、適切な濃度および用量をわかっているであろう。下記表２に、インビトロおよびインビボにおける、適切な濃度または用量の例を示す。

【０１２５】

【表２】

表２

リガンド	インビトロでの濃度	インビボでの用量 （好ましくは局所投与）
ＬＰＳ	０．００１～１００ μｇ／ｍｌ	０．１～１００ μｇ
フラジェリン	１～１００ μｇ／ｍｌ	１～２００ μｇ
ポリ（ＩＣ）	０．０１～１００ μｇ／ｍｌ	１μｇ～５ｍｇ（または～１０ｍｇ） （例えば１０ μｇ～５ ｍｇ）
ｓｓＰｏｌｙＵ	１～１０００ｎｇ／ｍｌ	１０ μｇ～５ ｍｇ
ＭＰＬＡ	１～１０００ｎｇ／ｍｌ	２～５００ μｇ
イミダゾキノリン	０．０１～１００ μｇ／ｍｌ	１０～１０００ μｇ（または～１０ ｍｇ） 例えば、マウスで２０～１００ μｇ、 ヒトで１０ μｇ～１０ ｍｇ
ＣｐＧ ＯＤＮ	１～１００ μｇ／ｍｌ	１０～１０００ μｇ（または～１０ ｍｇ） 例えば、マウスで２０～１００ μｇ、 ヒトで１０ μｇ～１０ ｍｇ

【０１２６】

このように、好都合には、例えばインビトロでは１～１００ μｇ／ｍｌ（例えば２０～１００ μｇ／ｍｌまたは２０～５０ μｇ／ｍｌ）の濃度が用いられてもよい。インビボでは、イミダゾキノリン化合物の用量として１０～１０００ μｇが用いられてもよく、例えば、マウスでは２０～１００ μｇ、ヒトでは１０ μｇ～１０ ｍｇが用いられてもよい。例えばヒトへのイミキモドの局所的投与では、２．５～５０ ｍｇの用量が用いられてもよく、例えば２．５ ｍｇ／ｃｍ^{2}などの１～５ ｍｇ／ｃｍ^{2}などを用いてもよい。レシキモドでは、用量は、例えば１～５ ｍｇなどの０．１～５０ ｍｇであってもよく、例えば１～５ ｍｇ／ｃｍ^{2}であってもよい。同様の用量は、ガーディキモドにも適している。イミダゾキノリン化合物の皮内注射では、例えば少なくとも１０ μｇまたは５０ μｇなどのより少ない用量が用いられてもよく、例えば１０ μｇ～１ ｍｇを用いることができる。ＣｐＧオリゴヌクレオチドおよび他のＴＬＲリガンドについても、同様の用量が用いられてもよい。ポリ（ＩＣ）は、インビボにおいて、マウスでは１～１００ μｇ、ヒトでは１ μｇ～１０ ｍｇの用量で投与されてもよい。

【０１２７】

たいていの場合、光感作性薬剤、抗原分子、および本明細書で定義されるＴＬＲリガンドは、一緒に投与されるが、違っていてもよい。このように、投与（または細胞との接触）の時間、形態、または部の違いが、異なる成分それぞれに対して想定され、このような方法は、本発明の範囲に包含される。

【０１２８】
一実施形態において、ＣｐＧオリゴヌクレオチド、イミダゾキノリン化合物、ＬＰＳ、またはポリ（ＩＣ）分子などの、本明細書で定義されるＴＬＲリガンドは、例えばクリームまたはゲルなどの別処方で抗原とは別に投与されてもよく、経口投与（例えばレシキモド）などによって、抗原とは別に全身投与されてもよい。このように、一実施形態において、ＣｐＧオリゴヌクレオチドまたはイミダゾキノリン化合物などのＴＬＲリガンドは、抗原および／または光増感剤の投与よりも先に、例えば２４時間前に、局部的（局所的）前処理などによって投与されてもよい。ポリ（ＩＣ）またはＬＰＳなどのＴＬＲリガンドは、抗原よりも前に、または抗原と一緒に、または抗原よりも後に投与される場合がある。

【０１２９】
ＴＬＲリガンドは、例えば照射の約２時間前に、他の薬剤とは別に投与されてもよい。別の実施形態において、薬剤は、抗原と一緒に、または抗原と同じ時間に、すなわち同時に、投与されてもよい。

【０１３０】
細胞と光感作性薬剤、および／または抗原分子、および／または本明細書で定義されるＴＬＲリガンドとの接触は、好都合には、１５分～２４時間行われ、例えば３０分～４時間、好ましくは１．５～２．５時間行われる。あるいは、時間範囲は、約１時間～約４８時間であってもよく、例えば１２時間～３０時間、１６時間～２０時間などの約２時間～約４０時間または約６時間～約３６時間であってもよく、例えば１８時間または約１８時間であってもよい。

【０１３１】
好ましい実施形態において、細胞は、初めに、光感作性薬剤とともにインキュベートされる。一実施形態において、光感作性薬剤の投与と抗原分子および／またはＴＬＲリガンドの投与との間の時間は、数時間である。例えば、光感作性薬剤は、照射の１６～２０時間前、例えば１８時間前に与えられてもよく、抗原分子および／またはＴＬＲリガンドは、照射の１～３時間前、例えば２時間前に与えられてもよい。このように、光感作性薬剤の投与と抗原分子および／またはＴＬＲリガンドの投与との間の時間は、１５～２３時間の範囲であってもよい。

【０１３２】
このように、細胞は、光増感剤とインキュベートされた後、続いて抗原および／または本明細書で定義されるＴＬＲリガンドとともにインキュベートされる。好都合には、細胞は、光増感剤／抗原との接触後、照射までの間、光増感剤および抗原分子およびＴＬＲリガンドとのインキュベートのタイミングに応じて、例えば１．５時間～２．５時間などの３０分～４時間、細胞を光増感剤／抗原非含有媒体に入れてもよい。

【０１３３】
インビボにおいて、各種薬剤を標的細胞と接触させる適切な方法およびインキュベート時間は、用いられる薬剤の投与形態および種類などの要因に依存する。例えば、治療／照射される腫瘍、組織、または器官に、薬剤を注射する場合、注射地点付近の細胞は、注射地点から遠く離れた細胞よりも速く、薬剤と接触してこれを取り込む傾向があり、これら注射地点から離れた細胞は、より遅い時点で低濃度の薬剤と接触することになる。好都合には、時間としては、６～２４時間が用いられる。

【０１３４】
さらに、静脈注射によって投与された薬剤、または経口投与された薬剤は、標的細胞に到達するまでに時間がかかる場合があり、したがって、十分な、または最適な量の薬剤が標的細胞または標的組織に蓄積するためには、投与後長く、例えば数日、かかる場合がある。このように、インビボにおいて個々の細胞に必要な投与時間は、これらおよび他のパラメータに応じて変化しやすい。

【０１３５】
しかしながら、インビボでの状況は、インビトロよりも複雑ではあるけれども、本発明

の基本的概念は、なお同じである。すなわち、分子が標的細胞と接触する時間は、照射が行われる前に、適切な量の光感作性薬剤が標的細胞によって取り込まれ、かつ（ｉ）照射前または照射中に、例えば光感作性薬剤と同じ、または異なる細胞内区画など、細胞内に抗原分子（および場合によってはＴＬＲリガンド）がすでに取り込まれているか、または標的細胞と十分に接触してから取り込まれる、あるいは（ｉｉ）照射後に、抗原分子（および場合によってはＴＬＲリガンド）が細胞に取り込まれるのに十分な期間、細胞と接触するような時間でなければならない。

【０１３６】

本明細書で述べる薬剤のインビボでの投与では、当該技術分野において一般的な投与形態または標準的な投与形態であれば、例えば、体内面および体外面両方への、注射、点滴、局所的投与、経皮投与など、どのような形態を用いてもよい。インビボでの使用では、本発明は、光感作性薬剤を含む化合物または内在化される分子が局在化する細胞を含む組織であれば、体液部および固形組織など、どのような組織に対しても用いることができる。標的細胞によって光増感剤が取り込まれ、かつ光を適切に届けることができる限り、全ての組織を治療することができる。好ましい投与形態は、皮内投与または皮内注射、皮下投与または皮下注射、局所的投与または局所的注射、あるいは腫瘍内投与または腫瘍内注射である。好ましくは、投与は皮内注射によって行われる。

【０１３７】

抗原提示、免疫応答の発生、または予防接種など、所望の結果を達成するために、本方法またはその一部が繰り返されてもよく、例えば、「再接種」が行われてもよい。このように、適切な間隔を空けた後、本方法の全体をそのまま複数回（例えば、２回、３回、またはそれ以上）行ってもよいし、例えば本明細書で定義されるＴＬＲリガンドをさらに投与する、または照射工程を追加するなど、本方法の一部を繰り返してもよい。例えば、本方法または本方法の一部を、最初に行ってから、数日後、例えば７～２０日後などの５～６０日後（７日後、１４日後、１５日後、２１日後、２２日後、４２日後、または５１日後など）、好ましくは１４日後に再び行ってもよいし、数週間後、例えば１～５週間後（１週間後、２週間後、３週間後、または４週間後など）に、再び行ってもよい。適切な間隔を空けて、例えば２週間毎、つまり１４日毎に、本方法の全てまたは一部を複数回繰り返してもよい。好ましい実施形態において、本方法は、少なくとも１回繰り返される。別の実施形態において、本方法は２回繰り返される。

【０１３８】

一実施形態において、２回目またはその次に本方法を実施する際に、抗原分子が、光増感剤とともに投与されて照射を受ける。すなわち、２回目またはその次に本方法を実施する際には、ＴＬＲリガンドは投与されない。

【０１３９】

別の実施形態において、本発明の方法が実施される前に、本発明の方法の一部を実施してもよい。例えば、本発明の方法を実施する前に、ＴＬＲリガンドがない状態で、本方法を１回以上、例えば２回、実施してもよい。あるいは、本発明の方法を実施する前に、光増感剤がなく照射もしない状態で、本方法を１回以上、例えば２回、実施してもよい。本発明の方法を実施する数日前、例えば７日前または１４日前に、本方法の一部を実施してもよいし、数週間前、例えば１週間、３週間、または４週間前に、実施してもよい。本発明の方法が実施される前に、このような間隔を空けて、１回以上本方法の一部を繰り返してもよい。このように、好ましい態様において、抗原分子は、（例えば、上述した間隔を空けて）２回以上（例えば、被験体に）投与され、少なくとも該抗原分子の投与は、本発明の方法にしたがって行われる。

【０１４０】

光感作性薬剤を活性化する「照射」とは、以下に述べるように直接的または間接的に光をあてることをいう。このように、被験体または細胞が、例えば、直接的に（例えばインビトロで細胞それぞれに）光源から照射されてもよいし、例えば、インビボにおいて、細胞が皮膚の表面下にある場合、または全ての細胞が直接的に照射されるわけではない、す

なわち全ての細胞が他の細胞に遮蔽されているわけではない細胞層の形態である場合など、間接的に光源から照射されてもよい。細胞または被験体の照射は、光感作性薬剤、抗原分子、および本明細書で定義されるＴＬＲリガンドが投与されてから、約１８～２４時間後に行われてもよい。

【０１４１】

光感作性薬剤を活性化する光照射工程は、当該技術分野において周知である技術および手順にしたがって行われてもよい。用いられる光の波長は、用いられる光感作性薬剤に応じて選択される。当該技術分野において、適切な人工光源がよく知られており、例えば青色波長光（４００～４７５ ｎｍ）または赤色波長光（６２０～７５０ ｎｍ）を用いる。例えば、$TPCS_{2a}$では、４００～５００ ｎｍの波長、より好ましくは４３０～４４０ ｎｍなどの４００～４５０ ｎｍの波長、さらに好ましくは約４３５ ｎｍの波長または４３５ ｎｍの波長が用いられてもよい。適切である場合は、ポルフィリンまたはクロリンなどの光増感剤は、緑色光によって活性化されてもよく、例えば、キラーレッド（Killer Red）（エブロゲン社（Evrogen）、モスクワ、ロシア）光増感剤は、緑色光で活性化されてもよい。

【０１４２】

当該技術分野において適切な光源がよく知られており、例えば、ＰＣＩバイオテクＡＳ社（PCI Biotech AS）のルミソース（LumiSource）（登録商標）ランプが挙げられる。あるいは、６０ ｍW以下の調節可能な出力電源を有し、発光スペクトルが４３０～４３５ ｎｍであるＬＥＤ系照明装置を用いてもよい。赤色光では、適切な光源は、ＰＣＩバイオテクＡＳ社（PCI Biotech AS）の６５２ ｎｍレーザーシステム ＳＮ５７６００３ダイオードレーザーであるが、適切な赤色光源であればどのようなものを用いてもよい。

【０１４３】

本発明の方法において、細胞を光にあてる時間は、様々であってよい。そこを超えると細胞障害、ひいては細胞死が増加する最大限までは、光にあてる時間を増加させるにつれて、分子のサイトゾルへの内在化の効率は上昇する。

【０１４４】

照射工程の好ましい時間は、標的、光増感剤、標的細胞または標的組織に蓄積される光増感剤の量、および光増感剤の吸収スペクトルと光源の発光スペクトルとの重なりなどの要因に依存する。一般的には、照射工程の時間は、秒から分のオーダー、または数時間以下（さらには１２時間以下）であり、例えば、好ましくは６０分以下であり、例えば０．２５分～３０分または１分～３０分であり、例えば０．５～３分または１～５分または１～１０分であり、例えば３～７分であり、好ましくは約３分であり、例えば２．５～３．５分である。より短い照射時間が用いられてもよく、例えば１～６０秒であり、１０～５０秒、２０～４０秒、または２５～３５秒などである。

【０１４５】

当業者であれば、適切な光照射量を選択することができ、あらためて、光照射量は、用いられる光増感剤、および標的細胞または標的組織に蓄積される光増感剤の量に依存している。可視スペクトルの吸光係数（赤色領域における吸光係数、または青色光を用いる場合は青色領域における吸光係数；用いられる光増感剤による）の高い光増感剤を用いる場合は、光照射量は通常低い。例えば、６０ ｍW以下の調節可能な出力電源を有し、発光スペクトルが４３０～４３５ ｎｍであるＬＥＤ系照明装置を用いる場合、フルエンスが０．０５～２０ ｍW／ｃm^2の範囲、例えば２．０ ｍW／ｃm^2で、０．２４～７．２ Ｊ／ｃm^2の範囲の光照射量が用いられてもよい。あるいは、例えばルミソース（LumiSource）（登録商標）ランプを用いる場合、フルエンスが０．１～２０ ｍW／ｃm^2（例えば、ルミソース（LumiSource）（登録商標）では１３ｍW／ｃm^2）の範囲で、０．１～６ Ｊ／ｃm^2の範囲の光照射量が適切である。赤色光では、フルエンスが０．１～５ ｍW／ｃm^2の範囲、例えば０．８１ ｍW／ｃm^2で、０．０３～１ Ｊ／ｃm^2の範囲、例えば０．３ Ｊ／ｃm^2の光照射量が用いられてもよい。

【０１４６】

さらに、細胞の生存率を維持しようとする場合は、過剰なレベルの毒性種の生成は避けられるべきであり、関連するパラメータがそれに応じて調整されてもよい。

【０１４７】

本発明の方法は、光化学的処理によって、すなわち、光感作性薬剤が活性化する際に毒性種が生成することによる光力学的な治療効果によって、不可避的にいくらかの細胞障害を引き起こす場合がある。提案された使用によっては、この細胞死は重大ではないかもしれず、ある用途（例えば癌の治療）においては、実際のところ有利であるかもしれない。しかしながら、たいていの実施形態において、提示細胞に免疫応答を起こさせるために、細胞死は回避される。本発明の方法は、生存細胞の割合または比率が、光感作性薬剤の濃度に対応して光照射量を選択することによって調節されるように、変更されてもよい。あらためて、当該技術分野において、このような技術は知られている。

【０１４８】

好ましくは、実質的に全ての細胞、またはかなり大多数の細胞（例えば、少なくとも７５％の細胞、より好ましくは、少なくとも８０％、８５％、９０％、または９５％の細胞）が殺されない。インビトロでは、ＭＴＳ試験などの、当該技術分野において公知の標準的な技術によって、ＰＣＩ処理後の細胞の生存率を測定することができる。インビボでは、１種類以上の細胞の細胞死を、投与地点の半径１　ｃｍ以内で（または組織のある深さにおいて）、例えば顕微鏡によって評価してもよい。細胞死は、直ちには起こらない場合があるので、細胞死％は、照射後数時間以内（例えば照射後４時間以内）に生存している細胞の割合をいうが、好ましくは照射から４時間以上経過後の生存細胞％をいう。

【０１４９】

本方法は、インビボ、インビトロ、またはエキソビボで行われてもよい。好ましくは、本方法は、インビボでの投与のための細胞を産生するためにインビトロまたはエキソビボで用いられるか、または本方法はインビボで用いられる。このように、好ましい特徴において、本方法を用いて、被験体の免疫応答を起こしてもよい。

【０１５０】

このように、さらなる態様において、本発明は、被験体の免疫応答を起こす方法であって、該方法は、抗原分子、光感作性薬剤、および上記定義されるＴＬＲリガンドを該被験体に投与することと、該光感作性薬剤を活性化させるのに有効な波長の光を該被験体に照射することと、を含む方法であり、免疫応答が引き起こされる、方法を提供する。

【０１５１】

引き起こされ得る「免疫応答」は、体液性免疫および細胞媒介性免疫であってもよく、例えば、抗体産生の刺激、あるいは表面に「外部」抗原を発現する細胞を認識し破壊（そうでなければ排除）し得る細胞傷害性細胞またはキラー細胞の刺激であってもよい。このように、「免疫応答を刺激する」なる語は、全ての種類の免疫応答、および免疫応答を刺激する全ての種類の機構を含み、本発明の好ましい態様を形成するＣＴＬを刺激することを包含する。好ましくは、刺激される免疫応答は、細胞傷害性ＣＤ８　Ｔ細胞である。免疫応答の程度は、免疫応答のマーカー、例えば、ＩＬ－２またはＩＦＮγなどの分泌された分子によって、または抗原特異的Ｔ細胞の産生によって、評価されてもよい（例えば、実施例で述べるように評価されてもよい）。

【０１５２】

細胞傷害性細胞または抗体産生細胞の刺激には、抗原提示細胞によって、例えばＭＨＣクラスＩ提示などの特定の様式で、刺激される細胞に対して抗原が提示されることが必要である（例えば、ＣＤ８$^{+}$細胞傷害性Ｔ細胞の活性化にはＭＨＣ－Ｉ抗原提示が必要である）。好ましくは、免疫応答は、ＭＨＣ－Ｉ提示を介して刺激される。

【０１５３】

好ましくは、免疫応答を用いて、癌などの疾患、障害、または感染を治療または予防する。

【０１５４】

一実施形態において、癌は、黒色腫である。黒色腫は、黒色素細胞の悪性腫瘍であり、

黒色素細胞とは、皮膚の色のもととなる黒色素であるメラニンを産生する細胞である。これらの細胞は、大部分は皮膚に存在するが、腸および目を含む、体の他の部分にも見出される。黒色腫は、黒色素細胞を含むのであれば、体のどの部分でも生じ得る。

【０１５５】

本明細書で言及される「黒色腫」は、全ての種類の黒色腫を含み、例えば、表在性広範黒色腫、結節性黒色腫、黒子悪性黒色腫、線維形成性黒色腫、末端黒子型黒色腫およびメラニン欠乏性黒色腫、ポリープ様黒色腫、小母斑様細胞を有する黒色腫、ならびにスピッツ母斑の特徴を有する黒色腫などが挙げられる。

【０１５６】

黒色腫の大半は、皮膚で発生する（皮膚悪性黒色腫）が、黒色腫は、体内のどこでも発生し得、例えば、粘膜など内臓でも発生し得る。明細胞肉腫は、軟組織の悪性黒色腫である。黒色腫は、眼（ぶどう膜黒色腫）、外陰、膣、または直腸にも発生し得る。これらの黒色腫も、本発明の範囲に含まれる。好ましくは、治療される黒色腫は、皮膚黒色腫である。黒色腫は、転移性黒色腫、すなわち、原発性黒色腫由来であるが、異なる部位に転移して続発性腫瘍を生じた細胞にも及ぶ。本明細書で述べる黒色腫の治療または予防は、原発性黒色腫および／または原発性黒色腫由来の続発性腫瘍の治療に及ぶ。このように、本発明は、転移性黒色腫を治療するのにも有用である。

【０１５７】

別の実施形態において、癌は、パピローマウイルス、特にヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）に関連する癌か、あるいはパピローマウイルスが原因であるか誘発する癌である。上述したように、パピローマウイルスゲノムは、宿主細胞への一次感染直後に発現される読み枠（ＯＲＦ）を６つ（Ｅ１、Ｅ２、Ｅ４、Ｅ５、Ｅ６、およびＥ７）コードする初期領域（Ｅ）と、主要カプシドタンパク質Ｌ１および副カプシドタンパク質Ｌ２をコードする後期領域（Ｌ）とに分割される。ウイルスのＯＲＦは、全て一本のＤＮＡ鎖にコードされている。本発明によって用いられてもよいＨＰＶ抗原は、ＨＰＶ感染が引き起こす癌に関連し得るものであり、本明細書で述べる１つ以上の公知の抗原性ペプチドまたはＴ細胞エピトープであり得る。上述したように、ＨＰＶにはいくつかの種類があり、本発明にかかるＨＰＶに関連した癌は、例えばＨＰＶ－１６および／またはＨＰＶ－１８、あるいはＨＰＶ－３１またはＨＰＶ－４５など、どのような種類のＨＰＶに関連していてもよいし、どのような種類のＨＰＶによって引き起こされてもよい。本発明によって用いられる抗原は、Ｅ１タンパク質、Ｅ２タンパク質、Ｅ４タンパク質、Ｅ５タンパク質、Ｅ６タンパク質、およびＥ７タンパク質のいずれか、またはＬ１タンパク質およびＬ２タンパク質のいずれかに由来するものであってもよい。このように、抗原分子は、ＨＰＶ－１６およびＨＰＶ－１８のＥ２タンパク質、Ｅ６タンパク質、およびＥ７タンパク質のうち１つ以上に由来するものであってもよい。好ましい実施形態において、抗原分子は、ＨＰＶ－１６のＥ７配列、ＧＱＡＥＰＤＲＡＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫＣＤＳＴＬＲＬＣＶＱＳＴＨＶＤＩＲ（ＣＤ８エピトープを太字で示す）を包含する。このように、ＨＰＶ抗原は、３５アミノ酸のペプチドであってもよい。あるいは、抗原分子は、ＣＤ８エピトープであるＲＡＨＹＮＩＶＴＦのみ、すなわち、より短いペプチドであってもよい。

【０１５８】

別の実施形態において、疾患、障害、または感染は、ウイルス感染であり、好ましくはパピローマウイルス感染であり、特にヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）感染である。

【０１５９】

好ましくは、本方法は、予防接種に用いられる。本明細書で言及される「予防接種」は、疾患、障害、または感染の発症（またはさらなる進展）に対して予防効果または治療効果を有する免疫応答を誘起するための抗原（または抗原を含む分子）の使用をいい、その疾患、障害、または感染は、その抗原の異常な発現または異常な存在と関連している。好ましくは、疾患は癌であり、例えば、黒色腫またはＨＰＶなどのパピローマウイルスに関連する癌である。一実施形態において、予防接種は、例えば本明細書で述べる癌の治療において、治療効果を有する。別の実施形態において、予防接種は、例えば、癌を予防する

、または治療的接種による初期癌の治療後に癌がさらに進展することを抑制する、予防効果を有する。さらなる実施形態において、感染に対する免疫応答、例えば、ＨＰＶ感染などのウイルス感染に対する免疫応答が引き起こされる場合、予防接種は、実際に予防的である。

【０１６０】

本発明の方法の好ましい実施形態において、例えば、予防接種の被験体は、哺乳類であり、好ましくは、ネコ、イヌ、ウマ、ロバ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ、マウス、ラット、ウサギ、またはモルモットであるが、最も好ましくは、ヒトである。

【０１６１】

好ましくは、本明細書で述べる方法は、相乗効果を達成する。すなわち、（ｉ）ＴＬＲリガンドがない状態で抗原分子を用いて本方法を行うことによって観察される増強、および（ｉｉ）光感作性薬剤がなく照射工程も行わない状態で抗原分子を用いて本方法を行うことによって観察される増強、を合わせた分よりも、細胞表面における提示または引き起こされた免疫応答の程度が増強される、つまり、本方法の間で相乗効果が観察される。細胞表面における提示または引き起こされた免疫応答のレベルは、適切な手段、例えば、抗原特異的ＣＤ８＋細胞の数、またはＩＦＮγまたはＩＬ－２などの免疫応答活性化マーカーのレベルによって、評価されてもよい。

【０１６２】

本明細書で用いられる「相乗効果」とは、単なる相加効果を越える量的な改善をいう。

【０１６３】

本発明の方法で用いられる各種薬剤は、被験体に対して、別々に、順次に、または同時に投与されてよい。

【０１６４】

抗原分子または抗原分子の一部を細胞表面に発現する、本発明の方法に関する上述した態様および特徴は、適切である場合には、上記の免疫応答を起こす方法にも適用され得る。

【０１６５】

本発明は、細胞のサイトゾルに抗原分子を導入する方法であって、導入される抗原分子、光感作性薬剤、および本明細書で定義されるＴＬＲリガンドに該細胞を接触させることと、光感作性薬剤を活性化するのに有効な波長の光を細胞に照射することと、を含む方法も提供する。一旦活性化されると、該化合物を含む該細胞内の細胞内区画は、これら区画に含まれる分子をサイトゾルへ放出する。

【０１６６】

例えば、処理後の細胞を体に投与した後、インサイチュでの治療またはエキソビボでの治療のいずれかを行うために、上記本発明の方法をインビトロまたはインビボで用いてよい。

【０１６７】

本発明は、さらに、表面に抗原分子または抗原分子の一部を発現する細胞、またはその細胞群を提供し、ここで、細胞は、本明細書で定義される方法のいずれかによって得ることができる（または得られた）ものである。また、以下で述べる予防または治療に用いる細胞または細胞集団も提供される。

【０１６８】

細胞集団は、１つ以上の薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を他に含む医薬組成物に提供されてもよい。

【０１６９】

本発明は、抗原分子、光感作性薬剤、および本明細書で定義されるＴＬＲリガンド、ならびに１つ以上の薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤を含む医薬組成物も提供する。

【０１７０】

これらの組成物（および本発明の製品）は、薬学分野において公知の技術および手順に

したがう簡便な様式であればどのような様式で処方されてもよく、例えば、１つ以上の薬学的に許容される希釈剤、担体、または賦形剤が用いられる。本明細書で言及される「薬学的に許容される」とは、組成物（または製品）の他の成分と共存し、さらに受容者に生理学的に許容される成分をいう。組成物および担体または賦形剤材料の性質、用量などは、投与の選択肢および所望の経路、治療目的などにしたがって、常用の様式で選択されてもよい。用量は、同様に、常用の様式で決定されてもよいし、分子（あるいは、組成物または製品の成分）の性質、治療目的、患者の年齢、投与形態などによって決定されてもよい。光感作性薬剤に関しては、照射時に膜を破壊する効力／能力も考慮されるべきである。

【０１７１】

例えば抗原提示細胞などの細胞は、インビトロで調製されてもよい。治療法において、これらの細胞は、該細胞が、例えば予防目的または治療目的で、免疫応答を刺激し得るように、インビボで体に投与されてもよいし、エキソビボで体組織に投与されてもよい。

【０１７２】

このように、本発明は、予防または治療に用いるための、または例えば予防接種の目的で、例えば、被験体のＣＴＬを刺激するなど、免疫応答を刺激するのに用いるための、好ましくは該被験体の疾患、障害、または感染を治療または予防するための、特に黒色腫およびＨＰＶなどのパピローマウイルスに関連する癌などの癌を治療または予防するための、本明細書で定義される細胞集団（またはこれを含む組成物）、または抗原分子、光感作性薬剤、および本明細書で定義されるＴＬＲリガンドをさらに提供する。別の定義では、本発明は、被験体の免疫応答を刺激するのに用いられる薬物（例えばＣＴＬを刺激する）を調製するための、好ましくは該被験体の疾患、障害、または感染を治療または予防するための、また好ましくは予防接種のため、かつ／または黒色腫およびＨＰＶなどのパピローマウイルスに関連する癌などの癌を治療または予防するための、（ｉ）細胞集団、（ｉｉ）本明細書で定義される組成物、または（ｉｉｉ）抗原分子および／または光感作性薬剤および／またはＴＬＲリガンド、の使用を提供する。前記免疫応答は、好ましくは、本明細書で定義される方法によって刺激される。

【０１７３】

前記刺激、治療、または予防は、好ましくは、前記薬物を前記被験体に投与することを含む。

【０１７４】

抗原分子、光感作性薬剤、およびＴＬＲリガンドは、組み合わされて、組成物中に存在してもよい。別の表現では、本発明は、免疫応答を刺激する（例えば、被験体のＣＴＬを刺激する）、好ましくは該被験体の疾患、障害、感染を治療または予防する、特に予防接種を目的とする薬物の製造における、抗原分子および／または光感作性薬剤および／または本明細書で定義されるＴＬＲリガンドの使用を提供する。前記薬物は、該被験体への投与のために、細胞表面に抗原分子または抗原分子の一部を発現する、本明細書で定義される方法によって得られる細胞集団を含む。好ましくは、細胞集団は、このような方法で得られる。細胞集団は、被験体へ投与するためのものである。

【０１７５】

別の実施形態において、本発明は、被験体の免疫応答を刺激する（例えば、ＣＴＬを刺激する）ために、好ましくは該被験体の疾患、障害、または感染を治療または予防するために、抗原分子または抗原分子の一部を細胞表面に発現するのに用いる、抗原分子、光感作性薬剤、および本明細書で定義されるＴＬＲリガンドを提供する。前記使用は、好ましくは樹状細胞などの細胞集団を調製するための、本明細書で定義される方法を含む。これらの細胞は、その後、被験体に投与されてもよい。

【０１７６】

本発明は、抗原分子、光感作性薬剤、および本明細書で定義されるＴＬＲリガンドを含む組み合わせ製剤としての製品をさらに提供する。前記製品は、本明細書で定義される方法において、被験体の免疫応答を刺激する（つまり、抗原分子または抗原分子の一部を細

胞表面に発現させる、または抗原分子を細胞のサイトゾルへ内在化させる）ために、同時に、別々に、または順次に使用され、好ましくは被験体の疾患、障害、または感染を治療または予防するのに使用される。

【０１７７】

本発明は、被験体の免疫応答を刺激するのに用いるキットをさらに提供する。前記キットは、例えば、本明細書で定義される方法において、予防接種または免疫化に用いるため、あるいは抗原分子または抗原分子の一部を細胞表面に発現させるか、または抗原分子を細胞のサイトゾルへ内在化させるため、好ましくは被験体の疾患、障害、または感染を治療または予防するために使用される。前記キットは、

本明細書で定義される光感作性薬剤を含む第１の容器と、

本明細書で定義される上記抗原分子を含む第２の容器と、

本明細書で定義されるＴＬＲリガンドを含む第３の容器と、

を含む。

【０１７８】

本発明の製品およびキットを用いて、本明細書で定義される細胞表面提示（または治療法）が達成されてもよい。

【０１７９】

またさらなる実施形態において、本発明は、好ましくは被験体の疾患、障害、または感染を治療または予防するために、被験体の免疫応答を起こす（例えばＣＴＬを刺激する）方法を提供する。前記方法は、本明細書で定義される方法にしたがって細胞集団を調製すること、およびその後に前記細胞を該被験体に投与すること、を含む。

【０１８０】

本願発明によって達成される抗原提示は、有利には、処理された細胞がインビボで投与される場合に、免疫応答の刺激をもたらしてもよい。好ましくは、該抗原分子または抗原分子の一部の含有体または包含体による次の攻撃に対する防御を付与する免疫応答が引き起こされ、その結果、本発明は、予防接種の方法としての特別な有用性を見出した。

【０１８１】

疾患、障害、または感染は、免疫応答が引き起こされること、例えば、正常細胞からの区別（および除去）を可能にする抗原（または発現レベル）に基づいて認識され得る異常細胞または外部細胞を除去することによって、治療または予防され得る疾患、障害、または感染である。用いられる抗原分子の選択によって、治療される疾患、障害、または感染が決定される。上述した抗原分子に基づいて、本明細書で述べる方法、使用、組成物、製品、キットなどを用いて、例えば、感染（上述したウイルス感染または細菌感染など）、癌、または多発性硬化症などを治療または予防してもよい。このような疾患、障害、または感染の予防が、予防接種を構成してもよい。

【０１８２】

本明細書で定義される「治療」とは、治療中の疾患、障害、または感染の１つ以上の症状を、治療前の症状に比べて、低減、緩和、または除去することをいう。「予防」とは、疾患、障害、感染が発症するのを遅らせる、または防止することをいう。予防は、絶対的（疾患が全く発症しない）であってもよいし、一部の個人に対してのみ、または限られた期間においてのみ、有効なものであってもよい。

【０１８３】

インビボでの細胞の投与では、当該技術分野において一般的である、または標準的である、細胞集団の投与形態であれば、どのような形態を用いてもよく、例えば、注射または点滴が適切な経路で用いられる。好都合には、細胞は、リンパ内注射によって投与される。好ましくは、被検体１ ｋｇあたり、１×１０^{4}～１×１０^{8}個の細胞が投与される（例えば、ヒトでは１ ｋｇあたり$１．４\times１０^{4}$～$２．８\times１０^{6}$個）。このように、例えば、ヒトでは、１回の服用で、すなわち、例えば予防接種１回の服用量として１回あたり、$０．１\times１０^{7}$～２０×１０^{7}個の用量の細胞を投与してもよい。必要であれば、この用量を後で繰り返すこともできる。

【０１８４】
次に、本発明を、以下の限定されない実施例において、以下の図面を参照してより詳細に説明する。
【図面の簡単な説明】
【０１８５】
【図１Ａ】図１Ａ～Ｃは、抗原としてのオボアルブミン（ＯＶＡ）と、そこに記されたＴＰＣＳ$_{2a}$（ＰＣＩ）およびＣｐＧまたはＲ８４８との混合物を、マウスにインビボで接種した後の血液（Ａ）および脾臓（ＢおよびＣ）における抗原特異的Ｔ細胞の％を示す。図１Ａは、パネル（Ａ）：接種から７日後の血液中の抗原特異的ＣＤ８＋ Ｔ細胞の％を示し、白丸は動物１匹を表す。
【図１Ｂ】図１Ｂは、パネル（Ｂ）：接種から１４日後の脾臓中の抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞の％を示し、白丸は動物１匹を表す。
【図１Ｃ】図１Ｃは、パネル（Ｃ）：図1Ｂのパネル（Ｂ）に示すものと同じデータを棒グラフ化したものである。
【図２Ａ】図２Ａは、パネルＡ：図１の説明文で述べるように接種されたマウスのＣＤ８＋脾臓細胞をＳＩＩＮＦＥＫＬ抗原ペプチドを用いてインビトロで刺激した後の、ＩＦＮ－γ産生量を示す。解析は、ＩＦＮ－γに対する細胞内染色およびフローサイトメトリーによる細胞の解析によって行った。
【図２Ｂ】図２Ｂは、パネルＢ：図２Ａのパネルに示すものと同じデータを棒グラフ化したものである。
【図３】図３は、図１の説明文で述べるように接種されたマウスの全脾臓細胞をＳＩＩＮＦＥＫＬ抗原ペプチドを用いてインビトロで刺激した後の、ＩＦＮ－γ産生量およびＩＬ－２産生量を示す。解析は、ＥＬＩＳＡによって行った。パネルＡおよびパネルＣは、ＳＩＩＮＦＥＫＬによる再刺激を行った場合および行わなかった場合の結果を示し、結果は、それぞれの検量線にしたがって補正を行わず、ＥＬＩＳＡアッセイから直接読み出した値として示されている。パネルＢおよびパネルＤは、ＳＩＩＮＦＥＫＬによる刺激を行った試料と同じデータを示し、ＩＦＮ－γの濃度およびＩＬ－２の濃度は、それぞれの検量線に基づいて算出されている。
【図４Ａ】図４Ａ～Ｆは以下のスキーム（Scheme）を示す。 図４Ａは、スキーム１：化合物５を合成するための合成経路である。試薬および条件は以下の通りである：（ａ）プロピオン酸、還流、１時間（２０％）；（ｂ）$NaNO_2$（１．８ｅｑ）、ＴＦＡ、ｒｔ、３分（６７％）；（ｃ）$SnCl_2.2H_2O$、ｃｏｎｃ．ＨＣｌ、６０℃、１時間（８８％）；（ｄ）ブロモアセチルブロミド、Et_3N、CH_2Cl_2、ｒｔ、１時間（６４％）；（ｅ）ピペラジン、CH_2Cl_2、ｒｔ、１時間（９４％）。
【図４Ｂ】図４Ｂは、スキーム２：Ｎ改変キトサン誘導体（ＴＰＰ－ＣＳ－ＴＭＡおよびＴＰＰ－ＣＳ－ＭＰ）の合成を示す。ここで、Ａは第１バッチの化合物を表し、Ｂは第２バッチの化合物を表す。試薬および条件は以下の通りである：（ａ）$MeSO_3H$／H_2O、１０℃～ｒｔ、１時間、（９０％）；（ｂ）ＴＢＤＭＳＣｌ、イミダゾール、ＤＭＳＯ、ｒｔ、２４時間（９６％）；（ｃ）ブロモアセチルブロミド、Et_3N、CH_2Cl_2、－２０℃、１時間（９２％）；（ｄ）化合物５すなわちＴＰＰ－ＮＨ－Ｐｉｐ（０．１ｅｑまたは０．２５ｅｑ）、Et_3N、$CHCl_3$、ｒｔ、２時間（９２～９０％）；（ｅ）NMe_3または１－メチルピペラジン、$CHCl_3$、ｒｔ、２４時間；（ｆ）ＴＢＡＦ、ＮＭＰ、５５℃、２４時間またはｃｏｎｃ．ＨＣｌ／ＭｅＯＨ、ｒｔ、２４時間。
【図４Ｃ】図４Ｃは、スキーム３：化合物１、化合物３、化合物２０、および化合物２１の合成スキームを示す。反応および条件は以下の通りである：（ａ）プロピオン酸、還流、１時間、（２０％）；（ｂ）$NaNO_2$（１．８ｅｑ）、ＴＦＡ、ｒｔ、３分；（ｃ）$SnCl_2.2H_2O$、ｃｏｎｃ．ＨＣｌ、６０℃、１時間（５４％）；（d_1）ｐ－トルエンスルホニルヒドラジド、K_2CO_3、ピリジン、還流、２４時間；（d_2）ｏ－クロラニル、CH_2Cl_2、ｒｔ（８０％）；（ｅ）クロロアセチルクロリド、Et_3N、CH_2Cl_2、ｒｔ、２時間、インサイチュ；（ｆ）ピペラジン、CH_2Cl_2、ｒｔ、１２時間（

６１％）。化合物２０および化合物２１の誘導体は全て、$TPCa_1$および$TPCa_2$の異性体を含む。しかしながら、スキームおよび構造図には、$TPCa_1$の構造のみを示している。

【図４Ｄ】図４Ｄは、スキーム４：化合物２２～化合物２８の合成スキームを示す。反応および条件は以下の通りである：（ａ）塩化アセチル、ＭｅＯＨ、還流、２４時間、（８７％）；（ｂ）$BF_3.Et_2O$、$CHCl_3$、ｒｔ、ｐ－クロラニル、４８時間（１４％）；（ｃ）２Ｎ ＫＯＨ（ＭｅＯＨ中）、ＴＨＦ：ピリジン（１０：１）、還流、２４時間（７１％）；（d_1）ｐ－トルエンスルホニルヒドラジド、K_2CO_3、ピリジン、還流、２４時間（d_2）ｏ－クロラニル、CH_2Cl_2：ＭｅＯＨ（７５：２５）、ｒｔ（７０％）；（ｅ）ＥＤＣＩ．ＨＣｌ、ＨＯＢＴ、Et_3N、Ｎ－Ｂｏｃ－ピペラジン５、ＤＭＦ、ｒｔ、２４時間（５４％）；（ｆ）ＴＦＡ、CH_2Cl_2、ｒｔ、１時間（８９％）。化合物２６～化合物２８の誘導体は全て、TPC_{c1}およびTPC_{c2}の異性体を含む。しかしながら、スキームおよび構造図には、TPC_{c1}の構造のみを示している。

【図４Ｅ】図４Ｅは、スキーム５Ａを示す。スキーム５Ａの試薬および条件は以下の通りである：（ａ）化合物２１すなわちＴＰＣ－ＮＨ－Ｐｉｐ（０．１ｅｑ）、Et_3N、$CHCl_3$、ｒｔ、２時間（７８％）；（ｂ）NMe_3または１－メチルピペラジン、$CHCl_3$、ｒｔ、２４時間。

【図４Ｆ】図４Ｆは、スキーム５Ｂを示す。スキーム５Ｂの試薬および条件は以下の通りである：（ａ）化合物２８すなわちＴＰＣ－ＣＯ－Ｐｉｐ（０．１ｅｑ）、Et_3N、ＮＭＰ、７５℃、１２時間（８９％）；（ｂ）NMe_3または１－メチルピペラジン、$CHCl_3$、ｒｔ、２４時間。

【図５Ａ】図５Ａ～Ｂは、アジュバントとしてのポリ（ＩＣ）およびＣｐＧの効果を示す。マウスを、１０ μｇのＯＶＡ；１００ μｇのＯＶＡ；１０ μｇのＯＶＡおよび１５０ μｇの$TPCS_{2a}$；１０ μｇのＯＶＡおよび５０ μｇのＯＤＮ２３９５ ＣｐＧオリゴヌクレオチド；１０ μｇのＯＶＡ、５０ μｇのＯＤＮ２３９５ ＣｐＧオリゴヌクレオチド、および１５０ μｇの$TPCS_{2a}$；１０ μｇのＯＶＡおよび５０ μｇのポリ（ＩＣ）；１０ μｇのＯＶＡ、５０ μｇのポリ（ＩＣ）、および１５０ μｇの$TPCS_{2a}$；を用いて免疫化するか、または未処理のままとした。$TPCS_{2a}$を与えたマウスには、照射を行った。７日目にマウスから採血し、フローサイトメトリーによって、ＯＶＡ特異的ＣＤ８ Ｔ細胞の度数を解析した。１４日目に脾臓細胞を採取し、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドで再刺激を行い、インターフェロンγ ＥＬＩＳＡによって解析した。図５Ａは、実験群の７日目の血液での平均値（全$CD8^+$細胞に対する抗原特異的$CD44^+$細胞の％）を示す（各群５匹、エラーバーは平均値の標準誤差）。

【図５Ｂ】図５Ｂは、１４日目の脾臓細胞をＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドで再刺激した後の、インターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）ＥＬＩＳＡの結果を示す。

【図６】図６は、ＯＶＡおよびポリ（ＩＣ）を用いた、マウスの１回目の免疫化および２回目の免疫化後の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。

【図７】図７は、２回目の免疫化後の実験に用いた個々の動物の、２回目（２２日目）の免疫化後の値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す（エラーバーは標準偏差）。

【図８】図８は、２回目の免疫化後の、ＴＲＰ－２ペンタマー染色された実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。

【図９】図９は、赤色光の照射を用いて光増感剤を活性化させた１回目の免疫化および２回目の免疫化後の、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。

【図１０】図１０は、１回目（７日目）の免疫化および２回目（２１日目）の免疫化後の、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す（エラーバーは平均値の標準誤差）。

【図１１】図１１は、１回目（７日目）の免疫化および２回目（２１日目）の免疫化後の

、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。
【図１２】図１２は、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドを用いて図に示すように再刺激を行った場合および行わなかった場合の、脾臓細胞におけるＥＬＩＳＡの平均値を示す。
【図１３】図１３は、１回目の免疫化および２回目の免疫化後の、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す（各群５匹、エラーバーは標準偏差）。
【図１４】図１４は、３回の免疫化後それぞれの、実験群の全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％を示す。
【図１５】図１５は、免疫化を３回行った後の、実験群の全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％を示す。
【図１６】図１６は、１回目の免疫化および２回目の免疫化後の、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す（各群５匹、エラーバーは標準偏差）。
【図１７】図１７は、３つの実験群における典型的な動物の、３回目の免疫化後のフローサイトメトリーのドットプロットを示す。
【図１８】図１８は、３回の免疫化後それぞれの、平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。
【図１９】図１９は、免疫化を２回行った後の、実験群の全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％を示す。
【図２０】図２０は、免疫化を２回行った後の、実験群の全ＣＤ８＋細胞 ＋／－ＳＥＭに対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％を示す。
【発明を実施するための形態】
【０１８６】
実施例
材料および方法
マウス
ＣＤ５７ＢＬ／６マウスを、ハーラン社（Harlan）（ホルスト、オランダ）から購入した。オボアルブミン（ＯＶＡ）のＭＨＣクラスＩ制限エピトープ$OVA_{257-264}$を認識するＴ細胞受容体についてトランスジェニックであるＯＴ－Ｉマウスを、チューリッヒ大学の施設内で飼育した（もともとは、タコニック・ヨーロッパ（Taconic Europe）（リュー、デンマーク）から購入）。全てのマウスは、特定病原体を除去した（ＳＰＦ）条件下で飼育され、行った手順は、スイス家畜当局によって承認された。ＯＴ－１マウスにおいて、Ｔ細胞受容体の遺伝子は、これらのマウスのＣＤ８＋ Ｔ細胞（ＯＴ－１細胞と呼ぶ）のほぼ全てが、オボアルブミン（ＯＶＡ）抗原の特定のペプチドエピトープ（ＳＩＩＮＦＥＫＬ）を特異的に認識するように設計された。
【０１８７】
免疫化のプロトコール
０日目に、雌のＣ５７ＢＬ／６マウスの尾静脈に、Ｒａｇ２／ＯＴ－１マウスの脾細胞１．５×10^6個を静脈注射した。このように、接種されたマウスは、ＯＶＡのＳＩＩＮＦＥＫＬエピトープが、抗原提示細胞のＭＨＣクラスＩで適切に提示された場合に限り、ＯＶＡのＳＩＩＮＦＥＫＬエピトープに応答することができるＣＤ８ Ｔ細胞の「バックグラウンド」を有する。このように、ＯＴ－１細胞を移すことによって、接種されたマウスにおける検出システムが「増強」され、抗原特異的ＣＤ８＋ Ｔ細胞ならびにＩＦＮ－γおよびＩＬ－２の産生を測定することによって、インビボでの接種効果を容易に分析することが可能になる。
【０１８８】
４時間後に、動物の腹腔に皮内接種を行った（以下に明示される成分を含む溶液を２×５０ μｌ）。４匹ずつの６群に対し、以下の全用量を与えた。
１群：２５ μｇ $TPCS_{2a}$（アンフィネックス（Amphinex））＋１０ μｇ オボアルブミン（ＯＶＡ、グレードＶ、シグマ・アルドリッチ社（Sigma-Aldrich））

２群：２５ μｇ ＴＰＣＳ$_{2a}$＋１０ μｇ オボアルブミン＋６０ μｇ ＣｐＧ
３群：２５ μｇ ＴＰＣＳ$_{2a}$＋１０ μｇ オボアルブミン＋１００ μｇ Ｒ８４８（レシキモド）
４群：１０ μｇ オボアルブミン
５群：１０ μｇ オボアルブミン＋６０ μｇ ＣｐＧ
６群：１０ μｇ オボアルブミン＋１００ μｇ Ｒ８４８（レシキモド）
用いたＣｐＧオリゴヌクレオチドは、２０ ｍｅｒのＢ型ＯＤＮ１８２６（合成はマイクロシンセ社（Microsynth）（バルガッハ、スイス）による）であり、配列は５’－ＴＣＣ ＡＴＧ ＡＣＧ ＴＴＣ ＣＴＧ ＡＣＧ ＴＴ－３’で、骨格は完全にチオリン酸エステル化（ＰＳ修飾）されていた。

【０１８９】
１日目に、１群、２群、および３群の動物に麻酔をかけ、ルミソース（LumiSource）ランプ（ＰＣＩバイオテクＡＳ社（PCI Biotech AS））を用いて、青色光を６分間照射した。抗原溶液を注射してから約１８時間後に動物に照射を行い、照射のフルエンス率は、約１３ ｍＷ／ｃｍ^{2}であった。７日目に、マウスの尾静脈から採血し、フローサイトメトリー解析（下記プロトコール参照）のために、血液細胞をＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー（プロイミューン社（ProImmune））、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色した。１４日目に、マウスを安楽死させ、脾臓を採取した。脾細胞の一定分量をＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド（ＥＭＣマイクロコレクション社（EMC microcollections）、テュービンゲン、ドイツ）で再刺激し、細胞内ＩＦＮ－γの発現を見るために染色し、フローサイトメトリー解析によって解析した（以下参照）。脾細胞の別の一定分量を細胞培養液に再懸濁し、再刺激を行わずにこの培地中で一晩（単に、実施上の理由のため）おき、上述のようにＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマーで染色して、フローサイトメトリーによって解析した（下記プロトコール参照）。

【０１９０】
脾臓細胞のＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー染色
細胞培地に再懸濁し、再刺激を行わずにこの培地中で一晩（単に、実施上の理由のため）おいた細胞に対して、脾臓細胞に対するＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー染色およびフローサイトメトリーを行った。

【０１９１】
ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー染色およびフローサイトメトリー
尾から、全血を５～１０滴採取し、赤血球溶解溶液（シグマ社（Sigma））を０．５ ｍｌ加えた。５～６分後、細胞を遠沈させ、０．５ ｍｌのＰＢＳで２回洗浄した。細胞ペレットをＦＡＣＳバッファー（０．０１％ アジ化ナトリウムを含む２％ ＦＣＳ／ＰＢＳ）に再懸濁し、Ｕ型の９６穴プレートに移し、氷上で１０分間、ＦｃＲ阻止抗体（１．０ μｌ 抗ＣＤ１６／ＣＤ３２、ファーミンジェン社（Pharmingen））とインキュベートした（１ μｌ＋４９ μｌ ＦＡＣＳバッファー）。洗浄せずに、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー－ＰＥ（プロイミューン社（ProImmune）；１試料あたり５ μｌ）を加え、混合し、３７℃で１５分間インキュベートした。洗浄せずに、蛍光ラベルしたＣＤ８またはＣＤ４４を終濃度が１：１００となるように加え、氷上で２５～４５分間インキュベートした。細胞を１００ μｌのＦＡＣＳバッファーで洗浄し、１００ μｌのＦＡＣＳバッファーに懸濁した。細胞を、ＦＡＣＳカント（FACSCanto）を用いて解析した。

【０１９２】
エキソビボでの脾細胞の再刺激
脾臓の破砕、および溶解バッファー（シグマ社（Sigma））中で１～２分攪拌後２％ ＦＣＳ／ＰＢＳで洗浄することによる２％ ＦＣＳ／ＰＢＳ中での細胞の分離によって、細胞内染色のために脾細胞を単離、調製した。完全培地の細胞懸濁液を２４穴プレート１ウェルあたり１ ｍｌ（５００，０００細胞／ｍｌ）加え、各ウェルに５ μｇ／ｍｌのＳＩＩＮＦＥＫＬ を加え、３７℃で一晩インキュベートした。ブレフェルディンＡ（Brefeldin A）（１～２ μｇ／ｍｌ）を各ウェルに加え、３７℃で４時間インキュベートした。

細胞をU型の９６穴プレートに移し、２％ ＦＣＳ／ＰＢＳで洗浄し、ＦｃＲ阻止抗体（１．０ μｌ 抗ＣＤ１６／ＣＤ３２、ファーミンジェン社（Pharmingen））を加えたＦＡＣＳバッファー５０ μｌに再懸濁し、氷上で１０分間インキュベートした。洗浄せずに、細胞を、表面抗体ＣＤ８またはＣＤ４４と氷上で２０～４５分インキュベートし（暗所）、ＦＡＣＳバッファーで洗浄し、氷上で１０～２０分間、１００ μｌのパラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）（ＰＢＳ中１％）に再懸濁することで固定した。細胞をＦＡＣＳバッファーで洗浄し、１００ μｌのＮＰ４０（ＰＢＳ中０．１％）に再懸濁し、氷上で３分間インキュベートした。ＦＡＣＳバッファーで洗浄した後、蛍光ラベルしたインターフェロンγ抗体を加え、氷上、暗所で３５分間インキュベートした。ＦＡＣＳバッファーで洗浄し、再懸濁した後、ＦｌｏｗＪｏ８．５．２ソフトウェア（ツリー・スター社（Tree Star, Inc.）、アシュランド、ＯＲ）を用いたＦＡＣＳカント（FACSCanto）によって、細胞を解析した。

【０１９３】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリー（ＦＡＣＳカント（FACSCanto）、ＢＤバイオサイエンス社（BD Biosciences）、サンノゼ、ＵＳＡ）によって、ＯＶＡ特異的Ｔ細胞の度数を求めた。フローサイトメトリーを行う前に、各抗体で別々に染色したビーズを用いて補正を行った。抗体染色の前に、赤血球溶解溶液（シグマ社（Sigma））を用いて、赤血球を溶解した。各試料につき１００００のＣＤ８$^{+}$のイベントを記録し、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー陽性細胞の割合を、ツリー・スター社（Tree Star, Inc.）（アシュランド、ＯＲ；http://www.flowjo.com/）のＦｌｏｗＪｏ８．５．２ソフトウェアを用いて算出した。

【０１９４】

ＥＬＩＳＡ

当該分子用のレディ・セット・ゴー！（Ready-set Go!）キット（ｅバイオサイエンス社（eBioscience））を用い、製造元の説明書にしたがってＥＬＩＳＡを行った。

【０１９５】

実施例１：インビボでのＯＶＡの接種に対するＴＬＲリガンドの効果

上述した免疫化のプロトコールによって、マウスにインビボで接種を行った。７日後に血液を、１４日後に脾臓を単離した。血液に関しては、抗原特異的ＣＤ８＋ Ｔ細胞についての解析を行い、脾臓細胞に関しては、抗原特異的ＣＤ８＋ Ｔ細胞についての直接的な解析か、インビトロで再刺激した後のＩＦＮ－γまたはＩＬ－２の産生についての解析のいずれかを行った。

【０１９６】

血液または脾臓における抗原特異的Ｔ細胞レベル

抗原特異的Ｔ細胞レベルを、抗原特異的Ｔ細胞に特異的に結合する、蛍光ラベルした抗原特異的「ペンタマー」を用いてフローサイトメトリーによって測定した。動物における全ＣＤ８＋ Ｔ細胞に対する抗原特異的ＣＤ８＋Ｔ細胞数の％を求めた（免疫化のプロトコールで述べた染色およびフローサイトメトリー解析、ならびにＳＩＩＮＦＥＫＬ染色の詳細を参照）。

Ｔ細胞に対する一般的な刺激効果は、抗原特異的な細胞の％を増加させない内因性Ｔ細胞にも影響を及ぼすので、内因性Ｔ細胞は、この効果の抗原特異性に対する内部標準として役立つ。典型的には、ＯＴ－１細胞の％を、接種前、および接種後の（複数の）時点において測定した。抗原のみの効果（「従来の接種」）を、抗原＋ＰＣＩの効果と比較した。

【０１９７】

脾臓細胞における、抗原によるエキソビボでの刺激後のＩＦＮ－γ産生レベル（フローサイトメトリー）

接種から１４日後に採取した脾臓を、脾細胞単離に供し、ＳＩＩＮＦＥＫＬ抗原ペプチドによる再刺激、および上記プロトコールで述べたフローサイトメトリーによるＣＤ８＋ Ｔ細胞の解析のためのＩＦＮ－γ産生の細胞内染色を行った。

【０１９８】
脾臓細胞における、抗原によるエキソビボでの刺激後のＩＦＮ－γおよびＩＬ－２産生レベル（ＥＬＩＳＡ）
接種から１４日後に採取した脾臓を、脾細胞単離に供し、ＳＩＩＮＦＥＫＬ抗原ペプチドによる再刺激、および上記プロトコールで述べたＥＬＩＳＡによるＩＦＮ－γおよびＩＬ－２産生の解析を行った。
【０１９９】
結果
血液または脾臓における抗原特異的Ｔ細胞レベル
結果を図１に示す。７日目に分析を行ったところ、ＰＣＩが、ＯＶＡ抗原のみの場合よりも有意に優れた効果を誘導したことがわかる（Ａ）。ＣｐＧオリゴヌクレオチドも、ＯＶＡのみの場合よりも接種を改善したが、ＰＣＩほどではなかった。Ｒ８４８のみでは、ＯＶＡのみの場合よりも接種を改善することはなく、むしろ接種の効果をいくぶん阻害しているようであった。ＰＣＩをＲ８４８またはＣｐＧと組み合わせると、ＰＣＩ＋ＯＶＡの効果と比較して、接種が改善された。この改善は、接種から１４日後に脾臓細胞を解析すると、さらに顕著であった（ＢおよびＣ）。この時点で、ＰＣＩ＋ＯＶＡ処理のみの効果は、バックグラウンドレベルまで戻っており、ＰＣＩを含まないＲ８４８／ＣｐＧ＋ＯＶＡの群の場合も同様であったことがわかる。しかしながら、Ｒ８４８またはＣｐＧをＰＣＩと組み合わせた２群においては、実質的に優れた効果が観察され、特にＲ８４８で顕著であった。
【０２００】
脾臓細胞における、抗原によるエキソビボでの刺激後のＩＦＮ－γ産生レベル（フローサイトメトリー）
ＩＦＮ－γおよびＩＬ－２は、抗原による刺激後にＣＤ８＋ Ｔ細胞が産生するサイトカインである。結果を図２に示す。図１に示す結果と一致して、このパラメータを分析した場合に、ＣｐＧ／Ｒ８４８とＰＣＩとを組み合わせることによって最も優れた効果が達成され、ＣｐＧ＋ＰＣＩはＲ８４８＋ＰＣＩよりも優れているように思われる、ということが図２に示されている。また、抗原のみ（ＯＶＡ）では検出可能な効果は得られなかったが、ＯＶＡ＋ＰＣＩでは観察可能な効果が誘導されたこともわかる。ＰＣＩを含まないＣｐＧ／Ｒ８４８＋ＯＶＡの群では、効果は得られなかった（ＣｐＧ）か、またはかろうじて検出可能な効果が得られた（Ｒ８４８）が、ＯＶＡ＋ＣｐＧ＋ＰＣＩの組み合わせおよびＯＶＡ＋Ｒ８４８＋ＰＣＩの組み合わせでは、それぞれ、ＯＶＡ＋ＰＣＩよりも約６倍および約２．５倍優れていた。
【０２０１】
脾臓細胞における、抗原によるエキソビボでの刺激後のＩＦＮ－γ産生レベル（ＥＬＩＳＡ）
結果を図３に示す。図３のパネルＡおよびパネルＣは、ＯＶＡ＋ＣｐＧ／Ｒ８４８＋ＰＣＩの群において、ＩＦＮ－γの産生およびＩＬ－２の産生の両方が最も高くなったこと、およびその産生は、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド抗原による刺激に依存していたことを示し、その効果が抗原特異的であることを示す。パネルＢおよびパネルＤは、ＣｐＧ／Ｒ８４８＋ＯＶＡ＋ＰＣＩの群における効果は、他の処理群よりも実質的に優れていたことを示している。
【０２０２】
実施例２：インビボでのＯＶＡの接種に対する他のＴＬＲリガンドの効果
上記の方法を用いて、インビボでの接種を行う。このように、４匹ずつの１４群に対し、以下の全用量を与える上述した方法を行ってもよい。
１群：２５０ μｇ ＴＰＣＳ$_{2a}$（アンフィネックス（Amphinex））＋１０ μｇ オボアルブミン（ＯＶＡ、グレードＶ、シグマ・アルドリッチ社（Sigma-Aldrich））
２群：２５０ μｇ ＴＰＣＳ$_{2a}$＋１０ μｇ オボアルブミン＋５０ μｇ ＬＰＳ（ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas Gingivalis））

３群：２５０ μｇ ＴＰＣＳ$_{2a}$＋１０ μｇ オボアルブミン＋５０ μｇ ＬＰＳ（大腸菌（E. coli））
４群：２５０ μｇ ＴＰＣＳ$_{2a}$＋１０ μｇ オボアルブミン＋５０ μｇ ＬＰＳ（サルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota））
５群：２５０ μｇ ＴＰＣＳ$_{2a}$＋１０ μｇ オボアルブミン＋１００ μｇ ＭＰＬＡ（サルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota））
６群：２５０ μｇ ＴＰＣＳ$_{2a}$＋１０ μｇ オボアルブミン＋１ ｍｇ ポリ（Ｉ：Ｃ）
７群：２５０ μｇ ＴＰＣＳ$_{2a}$＋１０ μｇ オボアルブミン＋１ ｍｇ ｓｓＰｏｌｙＵ
８群：１０ μｇ オボアルブミン
９群：１０ μｇ オボアルブミン＋５０ μｇ ＬＰＳ（ポルフィロモナス・ジンジバリス（Porphyromonas Gingivalis））
１０群：１０ μｇ オボアルブミン＋５０ μｇ ＬＰＳ（大腸菌（E. coli））
１１群：１０ μｇ オボアルブミン＋５０ μｇ ＬＰＳ（サルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota））
１２群：１０ μｇ オボアルブミン＋１００ μｇ ＭＰＬＡ（サルモネラ・ミネソタ（Salmonella minnesota））
１３群：１０ μｇ オボアルブミン＋１ ｍｇ ポリ（Ｉ：Ｃ）
１４群：１０ μｇ オボアルブミン＋１ ｍｇ ｓｓＰｏｌｙＵ

ポリ（Ｉ：Ｃ）、ＬＰＳ、ＭＰＬＡ、およびｓｓＰｏｌｙＵは、全てインビボジェン社（Invivogen）製である。

【０２０３】

実施例３：インビボでのＯＶＡの接種に対するポリ（ＩＣ）およびＣｐＧの効果

材料および方法

動物

Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、ハーラン社（Harlan）（ホルスト、オランダ）から購入した。ＣＤ８ Ｔ細胞受容体トランスジェニックＯＴ－Ｉマウス（Ｂ６．１２９Ｓ６－Ｒａｇ２ｔｍ１Ｆｗａ Ｔｇ（ＴｃｒａＴｃｒｂ）１１００Ｍｊｂ）を、タコニック・ヨーロッパ（Taconic Europe）（リュー、デンマーク）またはジャクソン・ラボラトリー（Jackson Laboratories）（バー・ハーバー、メイン州）から購入した。ＯＴ－Ｉ ＣＤ８ Ｔ細胞は、オボアルブミンのＨ－２Ｋ^{b}制限エピトープＳＩＩＮＦＥＫＬ（ＯＶＡ、ａａ２５７～２６４）を認識する。マウスは全てＳＰＦ条件下で飼育され、行った手順は、スイスおよびノルウェーの家畜当局によって承認された。

【０２０４】

材料および細胞

ニワトリＯＶＡをシグマ・アルドリッチ社（Sigma-Aldrich）（ブフス、スイス）から、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをＥＭＣマイクロコレクション社（EMC microcollections）（テュービンゲン、ドイツ）から、ポリ（ＩＣ）（高ＭＷ）およびＣｐＧオリゴヌクレオチドＯＤＮ２３９５をインビボジェン社（InvivoGen）（サンディエゴ、ＵＳＡ）から購入した。光増感剤であるジスルホン酸テトラフェニルクロリン（ＴＰＣＳ$_{2a}$）を、ＰＣＩバイオテク社（PCI Biotech）（ライサカー、ノルウェー）から入手した。ＯＶＡ、ＴＰＣＳ$_{2a}$、および、目的に適合する場合は、ポリ（ＩＣ）をＰＢＳ中で混合し、遮光した状態を維持し、調製してから６０分以内にマウスに投与した。ルミソース（LumiSource）（商標）（ＰＣＩバイオテク社（PCI Biotech））を用いた照射によって、ＴＰＣＳ$_{2a}$を活性化した。

【０２０５】

マウスの皮内光増感および免疫化

免疫化の１日前に、雌のＯＴ－１マウスから脾臓およびリンパ節を単離し、溶血（赤血球溶解バッファー ハイブリ・マックス（Hybri-Max）、シグマ・アルドリッチ社（Sigma-

Aldrich））によって、均質化した細胞懸濁液から赤血球を除去した。残った細胞をＰＢＳで洗浄し、７０ミクロンのナイロン濾過器を通して濾過し、２×１０^{6}個のＯＴ－１細胞を、静脈注射によって、受容者である雌のＣ５７ＢＬ／６マウスに投与した。ＳＩＩＮＦＥＫＬ特異的ＣＤ８ Ｔ細胞の養子免疫伝達によって、フローサイトメトリーによる免疫応答の測定が容易となる。１日後または８時間後、マウスの尾から採血を行い、ＯＶＡ特異的ＣＤ８ Ｔ細胞の基準度数解析のために、ヘパリンが入った試験管に血液を集めた。

【０２０６】

次に、マウスの腹部領域の毛を剃り、ＯＶＡからなる、あるいはＯＶＡ、ＴＰＣＳ$_{2a}$、ポリ（ＩＣ）（５０ μｇ）またはＣｐＧオリゴヌクレオチド（５０ μｇ）の異なる混合物からなるワクチンを、２９Ｇ注射針を付けたシリンジを用いて皮内注射した。ワクチンは、遮光した状態を維持し、調製してから６０分以内に用いられた。ワクチンは、腹部の正中線の左側および右側に、５０ μｌずつ２回注射して与えられた。ＯＶＡは、１０ μｇまたは１００ μｇの用量で用いられ、ＴＰＣＳ$_{2a}$の用量は１５０ μｇであった。ワクチンを注射してから１８時間後、ケタミン（２５ ｍｇ／ｋｇ体重）およびキシラジン（４ ｍｇ／ｋｇ）の混合物を腹腔内注射することによって、マウスに麻酔をかけ、ルミソース（LumiSource）光源上に置いた（照射および光増感剤ＴＰＣＳ$_{2a}$の活性化のため）。照射時間は、６分であった。

【０２０７】

その後７日目および１４日目に、マウスの尾から採血を行い、赤血球を溶血によって除去してから、フローサイトメトリーによって、抗原特異的ＣＤ８ Ｔ細胞を解析した。実験の最後（１４日目）に、マウスを安楽死させ、脾細胞をエキソビボで解析した。

【０２０８】

免疫応答の解析

フローサイトメトリーによる解析のために、抗ＣＤ８抗体およびＨ－２Ｋ^{b}／ＳＩＩＮＦＥＫＬプロ５ペンタマー（プロイミューン社（Proimmune）、オックスフォード、ＵＫ）を用いて細胞を染色することで、血液中のＯＶＡ特異的ＣＤ８ Ｔ細胞の度数を測定した。フローサイトメトリーによってＣＤ４４の発現を調べることで、細胞の活性化の状況をさらに解析した。細胞の解析は、ＦＡＣＳカント（FACSCanto）（ＢＤバイオサイエンス社（BD Biosciences）、サンノゼ、ＵＳＡ）を用いて行い、またＦｌｏｗＪｏ８．５．２ソフトウェア（ツリー・スター社（Tree Star, Inc.）、アシュランド、ＯＲ）を用いた。

ＥＬＩＳＡ解析のために、２×１０^{5}個の脾細胞を、９６穴プレートで、０．００５ μｇ／ｍｌのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドを用いて再刺激した。７２時間後、上清を集め、ＥＬＩＳＡ（ｅバイオサイエンス社（eBioscience）、製造元の説明書にしたがって行った）によってＩＦＮ－γを解析した。

【０２０９】

ポリ（ＩＣ）およびＣｐＧ実験

材料および方法に述べたように実験を行い、接種から７日後のマウス血液試料を、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。１４日目の脾臓細胞をＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドで再刺激し、上述したように、インターフェロンγ ＥＬＩＳＡによって解析した。マウスは全て、上述したようにＯＴ－１細胞を投与された。

以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスは、ＯＴ－１細胞を投与されているが、接種または照射は行わなかった。

２．ＯＶＡ：１０ μｇのＯＶＡをマウスに接種した。照射は行わなかった。

３．ＯＶＡ １００ μｇ：１００ μｇのＯＶＡ混合物をマウスに接種した。照射は行わなかった。

４．ＯＶＡ １０ μｇ ＰＣＩ：１０ μｇのＯＶＡ＋１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物をマウスに接種した。上述のように照射を行った。

５．ＣｐＧ ＯＶＡ：１０ μｇのＯＶＡ＋５０ μｇのＯＤＮ２３９５ ＣｐＧオリゴヌクレオチドの混合物をマウスに接種した。照射は行わなかった。

６．ＣｐＧ ＯＶＡ／ＰＣＩ：１０ μｇのＯＶＡ＋５０ μｇのＯＤＮ２３９５ ＣｐＧオリゴヌクレオチド＋１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物をマウスに接種した。上述のように照射を行った。

７．ポリ（ＩＣ） ＯＶＡ：１０ μｇのＯＶＡ＋５０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物をマウスに接種した。照射は行わなかった。

８．ポリ（ＩＣ） ＯＶＡ／ＰＣＩ：１０ μｇのＯＶＡ＋５０ μｇのポリ（ＩＣ）＋１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物をマウスに接種した。上述のように照射を行った。

【０２１０】

図５Ａは、実験群の平均値（全ＣＤ８$^{+}$細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４$^{+}$細胞の％）を示す。ＣｐＧアジュバントおよびポリ（ＩＣ）アジュバントを単独で用いた場合、非常に控えめな効果しか発揮されなかった（ＣｐＧ）か、あるいは有意な効果は発揮されなかった（ポリ（ＩＣ））ということ、また単独で用いられたＰＣＩは、これらアジュバントのいずれよりも実質的により強力であったことがわかる。しかしながら、ＰＣＩをＣｐＧまたはポリ（ＩＣ）と組み合わせて用いると、明らかな相乗効果が見られ、ＰＣＩ＋ポリ（ＩＣ）の組み合わせで最も顕著であった。

【０２１１】

図５Ｂは、脾臓細胞をＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドで再刺激した後の、インターフェロンγ（ＩＦＮ－γ）ＥＬＩＳＡの結果を示す。まず第一に、ＩＦＮ－γの産生は、再刺激に完全に依存していた（未刺激細胞の棒グラフは、ほとんど見えない）ことがわかり、このことは、その産生が厳密に抗原特異的であったことを示している。また、ＣｐＧ群またはポリ（ＩＣ）群（ＯＶＡ単独群も）の細胞では、ほとんど効果がなかったが、ＰＣＩ処理群の全てにおいて、再刺激の強力な効果が観察され、あらためて、ＰＣＩ＋ＣｐＧ群およびＰＣＩ＋ポリ（ＩＣ）群において相乗効果があり、後者の群がより優れた組み合わせであることもわかる。

【０２１２】

実施例４～実施例１６では、以下の材料および方法を用いた：

動物

Ｃ５７ＢＬ／６マウスを、ハーラン社（Harlan）（ホルスト、オランダ）から購入した。ＣＤ８ Ｔ細胞受容体トランスジェニックＯＴ－Ｉマウス（Ｂ６．１２９Ｓ６－Ｒａｇ２ｔｍ１Ｆｗａ Ｔｇ（ＴｃｒａＴｃｒｂ）１１００Ｍｊｂ）を、タコニック・ヨーロッパ（Taconic Europe）（リュー、デンマーク）またはジャクソン・ラボラトリー（Jackson Laboratories）（バー・ハーバー、メイン州）から購入した。ＯＴ－Ｉ ＣＤ８ Ｔ細胞は、オボアルブミンのＨ－２Ｋ^{b}制限エピトープＳＩＩＮＦＥＫＬ（ＯＶＡ、ａａ２５７～２６４）を認識する。マウスは全てＳＰＦ条件下で飼育され、行った手順は、スイスおよびノルウェーの家畜当局によって承認された。

【０２１３】

材料および細胞

ニワトリＯＶＡをシグマ・アルドリッチ社（Sigma-Aldrich）（ブフス、スイス）から、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドをＥＭＣマイクロコレクション社（EMC microcollections）（テュービンゲン、ドイツ）から、ＴＲＰ－２（配列はＳＶＹＤＦＦＶＷＬ）、ｇｐ１００（配列はＫＶＰＲＮＱＤＷＬ）およびＨＰＶ １６ Ｅ７（配列はＧＱＡＥＰＤＲＡＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫＣＤＳＴＬＲＬＣＶＱＳＴＨＶＤＩＲ、ＣＤ８エピトープを下線で示す）をユナイテッド・ペプチド社（United Peptides）（ハーンドン、ＶＡ）から、入手した。ポリ（ＩＣ）、ＣｐＧオリゴヌクレオチドＯＤＮ２３９５、ＭＰＬＡ－ＳＭ、イミキモド、およびレシキモドをインビボジェン社（InvivoGen）（サンディエゴ、ＵＳＡ）から入手した。光増感剤であるジスルホン酸テトラフェニルクロリン（ＴＰＣＳ$_{2a}$）を、ＰＣＩバイオテク社（PCI Biotech）（ライサカー、ノルウェー）から入手した。

ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＴＲＰ－２ペンタマー、およびＨＰＶペンタマーを、プ

ロイミューン社（Proimmune）（オックスフォード、ＵＫ）から入手した（プロイミューンのペプチドコードは、それぞれ、０９３、１８５、および５０２Ｈである）。

【０２１４】

養子免疫伝達されたＯＴ－１細胞によるマウスの皮内光増感および免疫化

免疫化の１日前に、雌のＯＴ－１マウスから脾臓およびリンパ節を単離し、溶血（赤血球溶解バッファー ハイブリ・マックス（Hybri-Max）、シグマ・アルドリッチ社（Sigma-Aldrich））によって、均質化した細胞懸濁液から赤血球を除去した。残った細胞をＰＢＳで洗浄し、７０ミクロンのナイロン濾過器を通して濾過し、2×10^{6}個のＯＴ－１細胞を、静脈注射によって、受容者である雌のＣ５７ＢＬ／６マウスに投与した。ＳＩＩＮＦＥＫＬ特異的ＣＤ８ Ｔ細胞の養子免疫伝達によって、フローサイトメトリーによる免疫応答の測定が容易となる。１日後または８時間後、マウスの尾から採血を行い、ＯＶＡ特異的ＣＤ８ Ｔ細胞の基準度数解析のために、ヘパリンが入った試験管に血液を集めた。

【０２１５】

皮内免疫化のために、マウスの腹部領域の毛を剃り、ＯＶＡからなる、あるいはＯＶＡ、$TPCS_{2a}$、および異なるアジュバントの混合物からなるワクチンを、２９Ｇ注射針を付けたシリンジを用いて皮内注射した。ワクチンは、遮光した状態を維持し、調製してから６０分以内に用いられた。ワクチンは、腹部の正中線の左側および右側に、５０ μｌずつ２回注射して与えられた。ワクチンを注射してから１８時間後、ケタミン（２５ ｍｇ／ｋｇ体重）およびキシラジン（４ ｍｇ／ｋｇ）の混合物を腹腔内注射することによって、マウスに麻酔をかけ、各実験に応じて、以下に述べるように照射を行った。

【０２１６】

７日目に、マウスの尾から採血を行い、赤血球を溶血によって除去してから、フローサイトメトリーによって、抗原特異的ＣＤ８ Ｔ細胞を解析した。実験の最後（１４日目）に、マウスを安楽死させ、脾細胞をエキソビボで解析した。

【０２１７】

正常マウスの皮内光増感および免疫化

マウスの腹部領域の毛を剃り、ＯＶＡタンパク質または異なるペプチド抗原（各実験に明示されている）、$TPCS_{2a}$、および異なるワクチンアジュバントからなるワクチンを、２９Ｇ注射針を付けたシリンジを用いて皮内注射した。ワクチンは、遮光した状態を維持し、調製してから６０分以内に用いられた。ワクチンは、腹部の正中線の左側および右側に、５０ μｌずつ２回注射して与えられた。抗原および$TPCS_{2a}$は、異なる用量（各実験に明示されている）で用いられた。ワクチン注射後、指定された時点において（通常は１８時間であるが、いくつかの実験では異なる）、ケタミン（２５ ｍｇ／ｋｇ体重）およびキシラジン（４ ｍｇ／ｋｇ）の混合物を腹腔内注射することによって、マウスに麻酔をかけ、各実験に応じて、上述のように照射を行った。

【０２１８】

免疫化後７日目（場合によっては６日目）に、マウスの尾から採血を行い、赤血球を溶血によって除去してから、フローサイトメトリーによって、抗原特異的ＣＤ８ Ｔ細胞を解析した。いくつかの実験では、各実験に応じて指定された時点で、マウスの免疫化を複数回（２回または３回）行った。この場合、免疫化してから６日後または７日後に、血液試料を抜き取り、以下に述べるように、フローサイトメトリーによって解析を行った。

【０２１９】

免疫化したマウスに対する照射

いくつかの実験では、ルミソース（LumiSource）（商標）（ＰＣＩバイオテク社（PCI Biotech））を用いた照射によって$TPCS_{2a}$を活性化した。通常、ルミソースによる照射は、免疫化してから１８時間後に６分間行ったが、いくつかの実験では、以下で述べるように変更した。他の実験では、以下で述べるように、青色光を発するＬＥＤ系照明装置（ＰＣＩバイオテクＡＳ社（PCI Biotech AS））を用い、いくつかの実験では、ＰＣＩ６５２ ｎｍレーザーシステム ＳＮ５７６００３ダイオードレーザー（ＰＣＩバイオテクＡ

Ｓ社（PCI Biotech AS））を用いて照射を行った。

【０２２０】

ペンタマー染色による免疫応答の解析

抗ＣＤ８抗体、抗ＣＤ４４抗体、および用いられた抗原に応じた異なるペンタマーを用いて細胞を染色した後、血液中の抗原特異的ＣＤ８ Ｔ細胞の度数を、フローサイトメトリーによって測定した。フローサイトメトリーによってＣＤ４４の発現を調べることで、細胞の活性化の状況を解析した。細胞の解析は、ＦＡＣＳカント（FACSCanto）（ＢＤバイオサイエンス社（BD Biosciences）、サンノゼ、ＵＳＡ）を用いて行い、またＦｌｏｗＪｏ８．５．２ソフトウェア（ツリー・スター社（Tree Star, Inc.）、アシュランド、ＯＲ）を用いた。

【０２２１】

ＥＬＩＳＡによる免疫応答の解析

ＥＬＩＳＡ解析のために、2×10^5個の脾細胞を、９６穴プレートで、０．００５ μｇ／ｍｌのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドを用いて再刺激した。７２時間後、上清を集め、ＥＬＩＳＡ（ｅバイオサイエンス社（eBioscience）、製造元の説明書にしたがって行った）によってＩＦＮ－γを解析した。

【０２２２】

実施例４：ＯＶＡおよびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの、正常マウスにおける効果

正常マウスに対する接種について、上述したように実験を行った。０日目および１４日目に、以下に明示される２００ μｇのＯＶＡタンパク質、１５０ μｇのＴＰＣS_{2a}、および５０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて動物を免疫化した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後７日目の血液試料を、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。

２．ＯＶＡ ２００：２００ μｇのＯＶＡでマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

３．ＯＶＡ ２００／ＰＣＩ：２００ μｇのＯＶＡおよび１５０ μｇのＴＰＣS_{2a}の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

４．ＯＶＡ ２００／ポリ（ＩＣ）：２００ μｇのＯＶＡおよび５０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

５．ＯＶＡ ２００／ポリ（ＩＣ）：２００ μｇのＯＶＡ、１５０ μｇのＴＰＣS_{2a}、および５０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

【０２２３】

図６は、１回目の免疫化および２回目の免疫化後の実験群（各群５匹）の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。特に２回目の免疫化後、ポリ（ＩＣ）のみ（４群）またはＰＣＩのみ（３群）の場合よりもＰＣＩおよびポリ（ＩＣ）の組み合わせ（５群）の場合に、実質的に優れた免疫化が行われた。

【０２２４】

実施例５：ＳＩＩＮＦＥＫＬおよびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの、正常マウスにおける効果

正常マウスに対する接種について、上述したように実験を行った。０日目および１５日目に、以下に明示される１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣS_{2a}、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて動物を免疫化した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後７日目の血液試料を、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。

２．ＳＩＩＮ １００：１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドでマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

３．ＳＩＩＮ １００／ＰＣＩ：１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

４．ＳＩＩＮ １００／ポリ（ＩＣ）：１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

５．ＳＩＩＮ １００／ポリ（ＩＣ）／ＰＣＩ：１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

【０２２５】

図７は、２回目の免疫化後の、実験に用いた個々の動物の値を示し、ＰＣＩ＋ポリ（ＩＣ）の組み合わせ（５群）では、全ての動物が免疫化に応答したが、他の群では、弱い応答を示した動物が１匹いたのみ（ＳＩＩＮ １００／ＰＣＩ群）であったことを示す。

【０２２６】

実施例６：黒色腫抗原ペプチドおよびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの、正常マウスにおける効果

正常マウスに対する接種について、上述したように実験を行った。０日目および１４日目に、以下に明示されるＴＲＰ－２ペプチドおよびｇｐ－１００ペプチド（各５０ μｇ）、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、ならびに１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて動物を免疫化した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後７日目の血液試料を、ＴＲＰ－２ペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１：未処理 ＴＲＰ－２：マウスに対して、免疫化または照射を行わず、血液試料をＴＲＰ－２ペンタマーで染色した。

２．ＴＲＰ－２／ポリ（ＩＣ）：ＴＲＰ－２ペプチド、ｇｐ１００ペプチド、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化した。照射は行わなかった。血液試料をＴＲＰ－２ペンタマーで染色した。

３．ＴＲＰ－２／ＰＣＩ：ＴＲＰ－２ペプチド、ｇｐ１００ペプチド、および１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。血液試料をＴＲＰ－２ペンタマーで染色した。

４．ＴＲＰ－２／ポリ（ＩＣ）／ＰＣＩ：ＴＲＰ－２ペプチド、ｇｐ１００ペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。血液試料をＴＲＰ－２ペンタマーで染色した。

【０２２７】

図８は、２回目の免疫化後の、ＴＲＰ－２ペンタマー染色された実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。ＴＲＰ－２抗原をポリ（ＩＣ）のみ（２群）またはＰＣＩのみ（３群）とともに用いた場合、未処理の動物で見られるものを超えるような、抗原特異的細胞の有意な増加は観察されなかったことがわかる。それに比べて、ポリ（ＩＣ）およびＰＣＩの組み合わせ（４群）の場合は、明らかな相乗効果があり、抗原特異的ＣＤ８＋ Ｔ細胞の数は有意に増加した。

【０２２８】

実施例７：正常マウスにおいてＯＶＡおよびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの赤色光照射による解析

正常マウスに対する接種について、材料および方法で述べたように実験を行った。０日目および１４日目に、以下に明示される１０ μｇまたは１００ μｇのＯＶＡタンパク質、１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇまたは５０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて動物を免疫化した。ＰＣＩ６５２ ｎｍレーザーシステム ＳＮ５７６００３ダイオードレーザーを用いて、０．３ Ｊ／ｃｍ^{2}の光照射量で照射を行った。照射は、０．８１ ｍＷ／ｃｍ^{2}のフルエンス率で送達された（すなわち、照射時間は約６分）。各免疫化

後７日目の血液試料を、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。

２．ＯＶＡ １０：１０ μｇのＯＶＡでマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

３．ＯＶＡ １００：１００ μｇのＯＶＡでマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

４．ＯＶＡ １０／赤色光ＰＣＩ：１０ μｇのＯＶＡおよび１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

５．ＯＶＡ １００／赤色光ＰＣＩ：１００ μｇのＯＶＡおよび１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

６．ＯＶＡ １０／赤色光ＰＣＩ＋ポリ（ＩＣ）：１０ μｇのＯＶＡ、１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および５０ μｇのポリ（ＩＣ）（１回目の免疫化）または１０ μｇのポリ（ＩＣ）（２回目の免疫化）の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

７．ＯＶＡ １００／赤色光ＰＣＩ＋ポリ（ＩＣ）：１００ μｇのＯＶＡ、１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および５０ μｇのポリ（ＩＣ）（１回目の免疫化）または１０ μｇのポリ（ＩＣ）（２回目の免疫化）の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

【０２２９】

図９は、赤色光の照射を用いて光増感剤を活性化させた１回目の免疫化および２回目の免疫化後の、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。１０ μｇのＯＶＡ抗原を用いる場合、ポリ（ＩＣ）およびＰＣＩの組み合わせ（６群）が、免疫応答を達成するために必要であり、抗原のみまたはＰＣＩとの組み合わせ（４群）では、免疫化効果は得られなかったということがわかる。１００ μｇのＯＶＡ抗原を用いる場合、抗原のみ（３群）でもわずかに効果が得られたが、ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩの組み合わせとともに用いた場合（７群）の効果が、実質的により優れていた。

【０２３０】

実施例８：正常マウスにおいてＳＩＩＮＦＥＫＬおよびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの解析

正常マウスに対する接種について、上述したように実験を行った。０日目および１４日目に、以下に明示される５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて動物を免疫化した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後７日目の血液試料を、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。

２．ＳＩＩＮ ５０：５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドでマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

３．ＳＩＩＮ ５０／ＰＣＩ：５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

４．ＳＩＩＮ ５０／ポリ（ＩＣ）：１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

５．ＳＩＩＮ ５０／ポリ（ＩＣ）／ＰＣＩ：５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

【０２３１】

図１０は、１回目（７日目）の免疫化および２回目（２１日目）の免疫化後の、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す（エラーバーは平均値の標準誤差）。ポリ（ＩＣ）およびＰＣＩの組み合わせ（５群）の場合、強い免疫応答が得られるが、他の群では、いずれも応答は見られなかったことがわかる。このよ

うに、ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩの組み合わせの場合、強い相乗効果が得られる。

【０２３２】

実施例９：正常マウスにおいてＳＩＩＮＦＥＫＬおよびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの解析

正常マウスに対する接種について、上述したように実験を行った。０日目および１４日目に、以下に明示される１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および５０ μｇのポリ（ＩＣ）（後者は１回目の免疫化のみ）の混合物を用いて動物を免疫化した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後７日目の血液試料を、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。２８日目に、動物を殺処分して、脾臓を採取し、脾臓細胞をＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドで再刺激して、方法で述べたようにＥＬＩＳＡで解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。

２．２×ＳＩＩＮ １００：両方の免疫化において、１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドでマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

３．２×ＳＩＩＮ １００／ＰＣＩ：両方の免疫化において、１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$でマウスを免疫化し、照射を行った。

４．１×ＳＩＩＮ １００／ポリ（ＩＣ） ／ １×ＳＩＩＮ １００：１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび５０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化し（１回目の免疫化）、１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドでマウスを免疫化した（２回目の免疫化）。照射は行わなかった。

５．１×ＳＩＩＮ １００／ポリ（ＩＣ）／ＰＣＩ；１×ＳＩＩＮ １００／ＰＣＩ：１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および５０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物でマウスを免疫化し（１回目の免疫化）、１００ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$でマウスを免疫化した（２回目の免疫化）。両方の免疫化において、照射を行った。

【０２３３】

図１１は、１回目（７日目）の免疫化および２回目（２１日目）の免疫化後の、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。ポリ（ＩＣ）およびＰＣＩの組み合わせ（５群）を、１回目の免疫化のみに用い、２回目の免疫化ではＰＣＩのみを用いる場合であっても、この組み合わせの場合に、非常に優れた免疫応答が得られることがわかる。

【０２３４】

図１２は、ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドを用いて図に示すように再刺激を行った場合および行わなかった場合の、脾臓細胞におけるＥＬＩＳＡの平均値を示す。実験群５で行った処理（１回目の免疫化ではＰＣＩおよびポリ（ＩＣ）の組み合わせを用い、２回目の免疫化ではＰＣＩのみを用いる）によって、再刺激後にインターフェロンγの産生の実質的な増加が誘導されたが、これは、他のどの実験群でも見られなかったということがわかる。

【０２３５】

実施例１０：ＭＰＬＡまたはイミキモドの効果の解析

正常マウスに対する接種について、上述したように実験を行った。０日目および１４日目に、以下に明示される２００ μｇのＯＶＡタンパク質、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および５０ μｇのイミキモドまたは１０ μｇのＭＰＬＡ－ＳＭの混合物を用いて動物を免疫化した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後７日目の血液試料を、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。

２．ＯＶＡ ２００：２００ μｇのＯＶＡでマウスを免疫化した。照射は行わなかっ

た。

３．ＯＶＡ ２００／ＰＣＩ：２００ μｇのＯＶＡおよび１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

４．ＯＶＡ ２００／イミキモド：２００ μｇのＯＶＡおよび５０ μｇのイミキモドの混合物でマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

５．ＯＶＡ ２００／イミキモド／ＰＣＩ：２００ μｇのＯＶＡ、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および５０ μｇのイミキモドの混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

６．ＯＶＡ ２００／ＭＰＬＡ：２００ μｇのＯＶＡおよび１０ μｇのＭＰＬＡ－ＳＭの混合物でマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

７．ＯＶＡ ２００／ＭＰＬＡ／ＰＣＩ：２００ μｇのＯＶＡ、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのＭＰＬＡ－ＳＭの混合物でマウスを免疫化し、照射を行った。

【０２３６】

図１３は、１回目の免疫化および２回目の免疫化後の、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す（各群５匹、エラーバーは標準偏差）。イミキモド（５群）を用いた場合およびＭＰＬＡアジュバント（７群）を用いた場合の両方において、抗原としてＯＶＡタンパク質を用いた場合、ＰＣＩとの組み合わせによって、アジュバントのみを用いた場合（それぞれ４群および６群）に達成されるよりも実質的に優れた免疫化効果が誘導されたことがわかる。

【０２３７】

実施例１１：正常マウスにおいてＳＩＩＮＦＥＫＬおよびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩ、３回目の免疫化後の記憶応答

正常マウスに対する接種について、材料および方法で述べたように実験を行った。０日目および１４日目に、以下に明示される５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて動物を免疫化した。５１日目にポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩ処理による３回目の免疫化を行うことで、免疫記憶の生成を調べた。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後８日目（１回目の免疫化）、７日目（２回目の免疫化）、または６日目（３回目の免疫化）の血液試料を、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。

２．ＳＩＩＮ ５０ ポリ（ＩＣ）／ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩ：最初の２回の免疫化において、５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１０ μｇのポリ（ＩＣ）でマウスを免疫化した。照射は行わなかった。３回目の免疫化において、５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）でマウスを免疫化した。照射を行った。

３．ＳＩＩＮ ５０ ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩ／ＳＩＩＮ ５０ ＰＣＩ：最初の２回の免疫化において、５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）でマウスを免疫化した。３回目の免疫化において、５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$でマウスを免疫化した。３回全ての免疫化において、マウスに対して照射を行った。

【０２３８】

図１４は、３回の免疫化後それぞれの、実験群の（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。３回目の免疫化が、ＰＣＩのみで行われていたとしても（３群）、ポリ（ＩＣ）およびＰＣＩの組み合わせの場合に、３回目の免疫化によって非常に強い免疫応答および有意な増加が誘導されたことがわかる。それに比べて、最初の２回の免疫化においてポリ（ＩＣ）のみを用いた場合は、免疫応答はほとんどなく、ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩを用いて３回目の免疫化を行っても、免疫化を有意に高めることはなさそうであった。図１１および図１２の結果とまとめると、この結果は、ペプチド抗原を用いる

場合は、ポリ（ＩＣ）およびＰＣＩの組み合わせが、免疫応答の開始に必要十分であるが、この免疫応答は、ＰＣＩのみで実質的に高めることができることを示す。反対に、ポリ（ＩＣ）を用いて免疫化を２回行った後であっても、ポリ（ＩＣ）のみでは免疫応答を開始することはできず、免疫応答が観察されず、またポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩを用いた３回目の免疫化によって応答を高めようという試みも成功しなかった。このことは、ポリ（ＩＣ）のみでは免疫応答を全く開始できないということを示す。また、データは、ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩの組み合わせで生じた免疫応答を、２回目の免疫化から３７日後に行った３回目の免疫化によって強力に高めることができるため、この免疫応答が長く持続するということも示している。

【０２３９】

実施例１２：ＨＰＶペプチド抗原およびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの、正常マウスにおける効果

正常マウスに対する接種について、材料および方法で述べたように実験を行った。０日目および１４日目に、以下に明示される５０ μｇのＨＰＶペプチド抗原またはＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド抗原、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて動物を免疫化した。以下に明示するように、７日目、１４日目、および５１日目の３回、動物を免疫化に供した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後８日目（１回目の免疫化）、７日目（２回目の免疫化）、または６日目（３回目の免疫化）の血液試料を、ＨＰＶペンタマーまたはＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理ＳＩＩＮ：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。血液試料をＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマーで染色した。

２．未処理ＨＰＶ：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。血液試料をＨＰＶペンタマーで染色した。

３．ＳＩＩＮ ５０ ポリ（ＩＣ）／ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩ：最初の２回の免疫化において、５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１０ μｇのポリ（ＩＣ）でマウスを免疫化した。照射は行わなかった。３回目の免疫化において、５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）でマウスを免疫化した。照射を行った。

４．ＨＰＶ ５０：３回の免疫化全てにおいて、５０ μｇのＨＰＶペプチドでマウスを免疫化した。照射は行わなかった。

５．ＨＰＶ ５０／ＰＣＩ／ＨＰＶ ５０ ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩ（３rd）：最初の２回の免疫化において、５０ μｇのＨＰＶペプチドおよび１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$でマウスを免疫化した。３回目の免疫化において、５０ μｇのＨＰＶペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）でマウスを免疫化した。３回の免疫化全てにおいて、マウスに対して照射を行った。

６．ＨＰＶ ５０／ポリ（ＩＣ）／ＨＰＶ ５０ ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩ（３rd）：最初の２回の免疫化において、５０ μｇのＨＰＶペプチドおよび１０ μｇのポリ（ＩＣ）でマウスを免疫化した。照射は行わなかった。３回目の免疫化において、５０ μｇのＨＰＶペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）でマウスを免疫化した。照射を行った。

【０２４０】

図１５は、免疫化を３回行った後の、実験群の（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。６群では、同一の免疫化条件でＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドを用いた場合（３群）とほぼ同じ大きさで、ＨＰＶ特異的免疫応答が誘導されたことがわかる。このことは、ＰＣＩおよびポリ（ＩＣ）の組み合わせが、ウイルス性癌関連ＨＰＶＥ７抗原に対する免疫応答を誘導するのにも有効であることを示し、また、ＭＨＣクラスＩへの提示が可能となるには、細胞内への取り込みおよびタンパク質分解処理がおそらく必要となる長鎖ペプチド抗原（３５アミノ酸）に対する免疫応答を、ＰＣＩ＋ポリ（ＩＣ

）が誘導することも示している。これは、処理されることなく提示され得るＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド抗原および黒色腫ペプチド抗原とは対照的である。

【０２４１】

実施例１３：照射タイミングの効果

正常マウスに対する接種について、上述したように実験を行った。０日目および１４日目に、以下に明示される２００ μｇのＯＶＡタンパク質、１５０ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）を用いて動物を免疫化した。全ての群において、ＴＰＣＳ$_{2a}$を照射１８時間前に注射し、一方ＯＶＡ抗原およびポリ（ＩＣ）は、ＴＰＣＳ$_{2a}$との混合物として照射１８時間前に注射されるか、照射２時間前にＴＰＣＳ$_{2a}$とは別に注射されるかのいずれかとした。照射は、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間行った。各免疫化後７日目の血液試料を、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。

２．ＯＶＡ ２００：２００ μｇのＯＶＡでマウスを免疫化した。ＴＰＣＳ$_{2a}$は投与されず、照射は行わなかった。

３．ＯＶＡ ２００ ＰＣＩ（２ｈ）：マウスに、照射１８時間前にＴＰＣＳ$_{2a}$を注射し、照射２時間前に２００ μｇのＯＶＡで免疫化した。

４．ＯＶＡ ２００ ＰＣＩ（１８ｈ）：照射の１８時間前に、ＴＰＣＳ$_{2a}$およびのＯＶＡでマウスを免疫化した。

５．ＯＶＡ ２００ ＰＣＩ Ｐ（ＩＣ）（２ｈ）：マウスに、照射１８時間前にＴＰＣＳ$_{2a}$を注射し、照射２時間前に２００ μｇのＯＶＡ＋１０ μｇのポリ（ＩＣ）で免疫化した。

【０２４２】

図１６は、１回目の免疫化および２回目の免疫化後の、実験群の平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す（各群５匹、エラーバーは標準偏差）。照射のわずか２時間前に抗原＋ポリ（ＩＣ）を投与した場合も、ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩの組み合わせによって免疫応答が増強されることがわかる。

【０２４３】

実施例１４：ＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの、正常マウスにおける効果。免疫化を３回行った場合の、ＰＣＩ＋ポリ（ＩＣ）とポリ（ＩＣ）との比較。

正常マウスに対する接種について、材料および方法で述べたように実験を行った。０日目、１４日目、および４２日目に、以下に明示される５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて動物を免疫化した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後７日目の血液試料を、ＳＩＩＮＦＥＫＬペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理 ＳＩＩＮ：マウスに対して、免疫化または照射を行わず、血液試料をＳＩＩＮペンタマーで染色した。

２．ＳＩＩＮ／ポリ（ＩＣ）：５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチドおよび１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物で、マウスを３回免疫化した。照射は行わなかった。

３．ＳＩＩＮ／ポリ（ＩＣ）／ＰＣＩ：５０ μｇのＳＩＩＮＦＥＫＬペプチド、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物で、マウスを免疫化し、照射を行った。

【０２４４】

図１７は、３つの実験群における典型的な動物の、３回目の免疫化後のフローサイトメトリーのドットプロットを示し、非常に強い応答が、ポリ（ＩＣ）＋ＰＣＩの組み合わせによって誘導されたことを明確に示している。

【０２４５】
図１８は、３回の免疫化後それぞれの、平均値（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。ＰＣＩ＋ポリ（ＩＣ）の組み合わせによって、非常に強い免疫応答が誘導され、３回目の免疫化後の血液試料において、約３０％が抗体特異的ＣＤ８Ｔ細胞となったことがわかる。それに比べて、抗原およびポリ（ＩＣ）アジュバントのみを用いて免疫化を３回行った場合は、その効果は非常に小さかった（３回の免疫化後、陽性細胞は０．２８％であった）。
【０２４６】
実施例１５：ＨＰＶ長鎖ペプチド抗原およびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの、正常マウスにおける効果
正常マウスに対する接種について、上述したように実験を行った。「長鎖」ペプチド抗原として、ＨＰＶ１６ Ｅ７配列ＧＱＡＥＰＤＲＡＨＹＮＩＶＴＦＣＣＫＣＤＳＴＬＲＬＣＶＱＳＴＨＶＤＩＲを用いた。０日目および１４日目に、５０ μｇのＨＰＶ長鎖ペプチド抗原、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）（以下ｐ（ＩＣ）と示す）の混合物を用いて動物を免疫化した。以下に示すとおり、７日目および１４日目の２回、動物を免疫化に供した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後６日目の血液試料を、ＨＰＶペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。
１．２×ＨＰＶ：５０ μｇのＨＰＶ長鎖ペプチドを用いて、マウスを２回免疫化した。照射は行わなかった。
２．２×ＨＰＶ＋ｐ（ＩＣ）：５０ μｇのＨＰＶ長鎖ペプチドおよび１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて、マウスを２回免疫化した。照射は行わなかった。
３．２×ＨＰＶ＋ｐ（ＩＣ）＋ＰＣＩ：５０ μｇのＨＰＶ長鎖ペプチド、１０ μｇのポリ（ＩＣ）、および１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物を用いて、マウスを２回免疫化した。どちらの免疫化においても、照射を行った。
４．１：ＨＰＶ＋ｐ（ＩＣ）＋ＰＣＩ．２：ＨＰＶ＋ＰＣＩ：５０ μｇのＨＰＶ長鎖ペプチド、１０ μｇのポリ（ＩＣ）、および１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物（１回目の免疫化）、および５０ μｇのＨＰＶ長鎖ペプチドおよび１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物（２回目の免疫化）を用いて、マウスを免疫化した。どちらの免疫化においても、照射を行った。
５．１：ＨＰＶ＋ＰＣＩ．２：ＨＰＶ＋ｐ（ＩＣ）＋ＰＣＩ：５０ μｇのＨＰＶ長鎖ペプチドおよび１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物（１回目の免疫化）、および５０ μｇのＨＰＶ長鎖ペプチド、１０ μｇのポリ（ＩＣ）、および１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物（２回目の免疫化）を用いて、マウスを免疫化した。どちらの免疫化においても、照射を行った。
【０２４７】
図１９は、免疫化を２回行った後の、実験群の（全ＣＤ８＋細胞に対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。３群（ＰＣＩ＋ｐ（ＩＣ）の組み合わせを用いて免疫化を２回行った）においては、強いＨＰＶ特異的な免疫応答が誘導され、４群および５群（ＰＣＩ＋ｐ（ＩＣ）の組み合わせを用いた免疫化を１回、ＰＣＩのみを用いた免疫化を１回行った）においては、ＰＣＩを用いない実験群（１群および２群）と比較して、弱いがまだ有意な免疫応答が観察された。このことは、ＰＣＩおよびポリ（ＩＣ）の組み合わせが、ウイルス性癌関連ＨＰＶ Ｅ７抗原に対する免疫応答を誘導するのに有効であり、この組み合わせを用いた２回の免疫化が、このような免疫化１回とＰＣＩのみで行う免疫化１回とを組み合わせた場合よりも有効であることを示す。また、ＨＰＶ長鎖ペプチド抗原を用いる場合、ｐ（ＩＣ）アジュバントは、ＰＣＩと組み合わせずに用いる時は効果がないということも示している。
【０２４８】
実施例１６：ＨＰＶ短鎖ペプチド抗原およびポリ（ＩＣ）とともに用いたＰＣＩの、正常

マウスにおける効果

正常マウスに対する接種について、上述したように実験を行った。「短鎖」ペプチド抗原として、ＨＰＶ１６ Ｅ７ ＣＤ８エピトープＲＡＨＹＮＩＶＴＦを用いた。０日目および１３日目に、５０ μｇのＨＰＶ短鎖ペプチド抗原、１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$、および１０ μｇのポリ（ＩＣ）（以下ｐ（ＩＣ）と示す）の混合物を用いて動物を免疫化した。以下に示すとおり、７日目および１３日目の２回、動物を免疫化に供した。免疫化してから１８時間後に、ルミソース（LumiSource）照明装置を用いて６分間の照射を行った。各免疫化後６日目の血液試料を、ＨＰＶペンタマー、ＣＤ８抗体、およびＣＤ４４抗体で染色し、上述したように、フローサイトメトリーによって解析した。以下の実験群が含まれる。

１．未処理：マウスに対して、免疫化または照射を行わなかった。

２．２×ＨＰＶ短鎖：５０ μｇのＨＰＶ短鎖ペプチドでマウスを２回免疫化した。照射は行わなかった。

３．２×ＨＰＶ短鎖＋ｐ（ＩＣ）：５０ μｇのＨＰＶ短鎖ペプチドおよび１０ μｇのポリ（ＩＣ）の混合物を用いて、マウスを２回免疫化した。照射は行わなかった。

４．２×ＨＰＶ短鎖＋ＰＣＩ：５０ μｇのＨＰＶ短鎖ペプチド、１０ μｇのポリ（ＩＣ）、および１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物を用いて、マウスを２回免疫化した。どちらの免疫化においても、照射を行った。

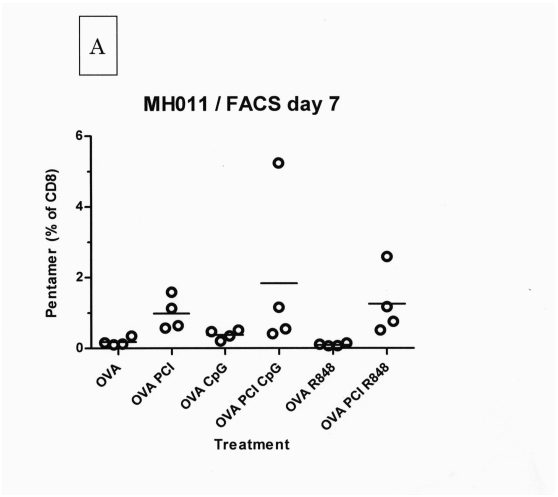
５．２×ＨＰＶ短鎖＋ｐ（ＩＣ）＋ＰＣＩ：５０ μｇのＨＰＶ短鎖ペプチド、１０ μｇのポリ（ＩＣ）、および１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物を用いて、マウスを２回免疫化した。どちらの免疫化においても、照射を行った。

６．１：ＨＰＶ短鎖＋ｐ（ＩＣ）＋ＰＣＩ．２：ＨＰＶ短鎖＋ＰＣＩ：５０ μｇのＨＰＶ短鎖ペプチド、１０ μｇのポリ（ＩＣ）、および１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物（１回目の免疫化）、および５０ μｇのＨＰＶ短鎖ペプチドおよび１００ μｇのＴＰＣＳ$_{2a}$の混合物（２回目の免疫化）を用いて、マウスを免疫化した。どちらの免疫化においても、照射を行った。

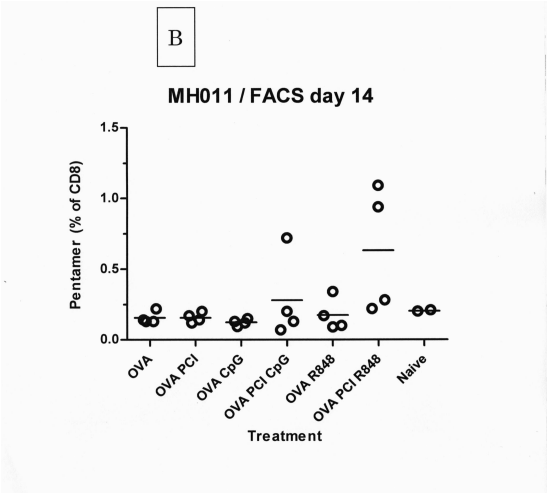
【０２４９】

図２０は、免疫化を２回行った後の、実験群の（全ＣＤ８＋細胞 ＋／－ＳＥＭに対する抗原特異的ＣＤ４４＋細胞の％）を示す。ｐ（ＩＣ）＋ＰＣＩの組み合わせを用いて免疫化した群（５群および６群）のどちらにおいても、有意な免疫応答が誘導され、両方の免疫化でこの組み合わせを用いた５群において、より優れた効果が達成されたことがわかる。それに比べて、両方の免疫化にｐ（ＩＣ）のみまたはＰＣＩのみを用いた群においては、免疫応答は観察されなかった（未処理の動物（１群）および抗原のみで免疫化された動物（２群）との比較）。このことは、ウイルス性癌関連ＨＰＶ Ｅ７抗原が短鎖ペプチドとして送達される場合でも、ＰＣＩおよびポリ（ＩＣ）の組み合わせが、ウイルス性癌関連ＨＰＶ Ｅ７抗原に対する免疫応答を誘導するのに有効であり、また、ｐ（ＩＣ）＋ＰＣＩの組み合わせを用いて免疫化を２回行う場合に、ｐ（ＩＣ）のみ、またはＰＣＩのみを用いる場合に比べて、強力な相乗効果が得られることを示している。

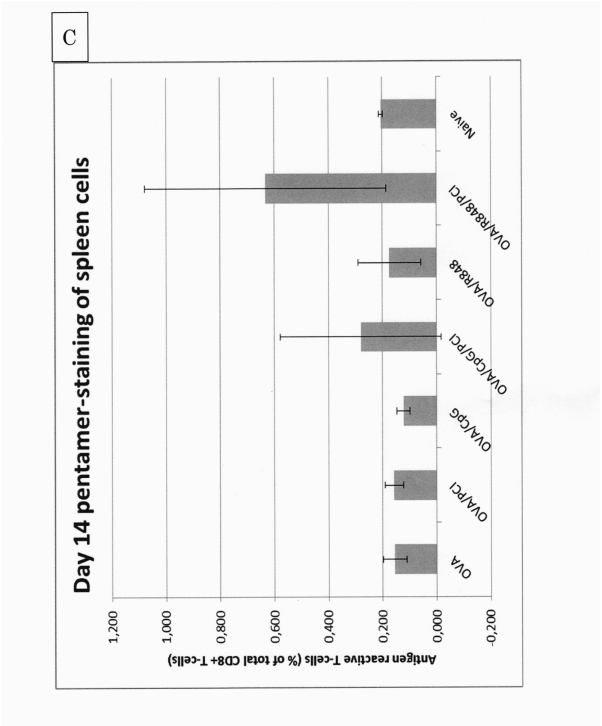
【図１Ａ】



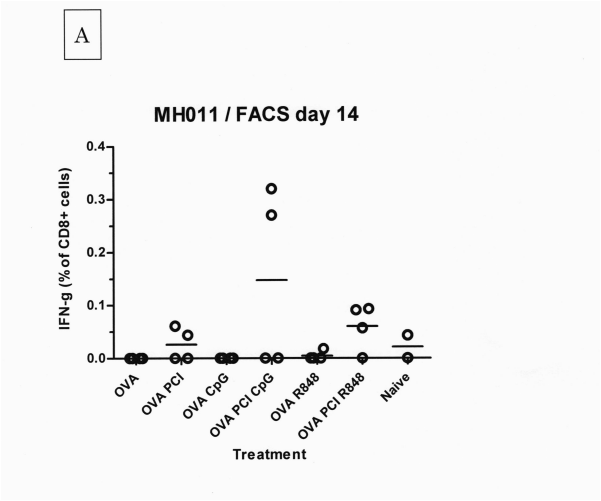
【図１Ｂ】



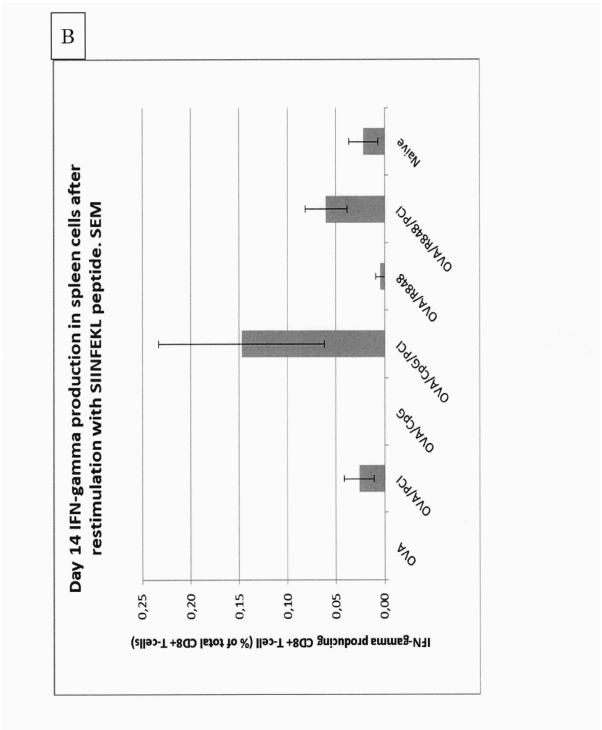
【図１Ｃ】



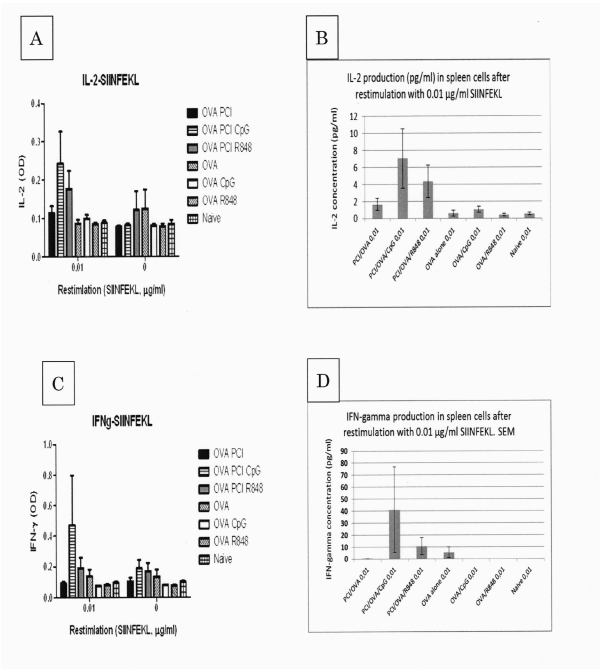
【図２Ａ】



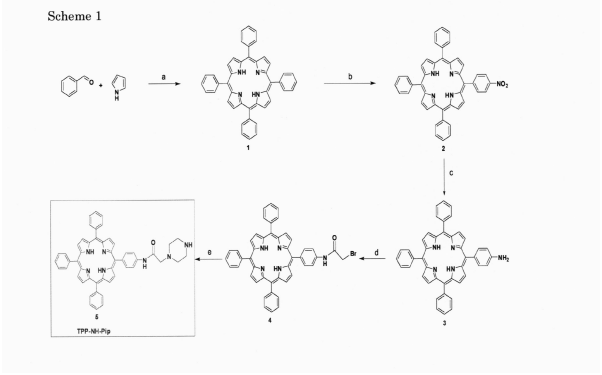
【図２Ｂ】



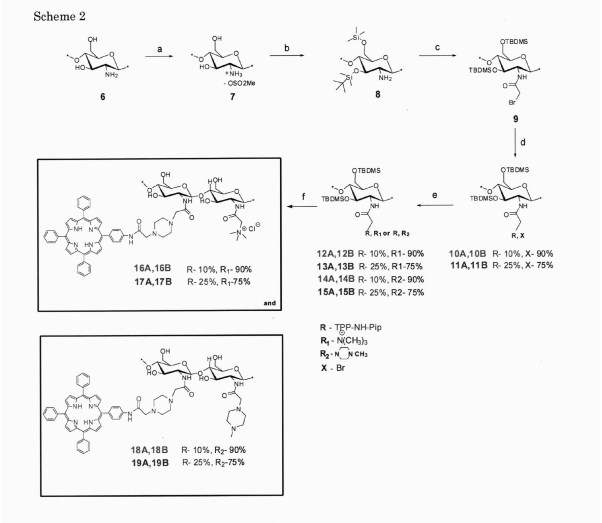
【図３】



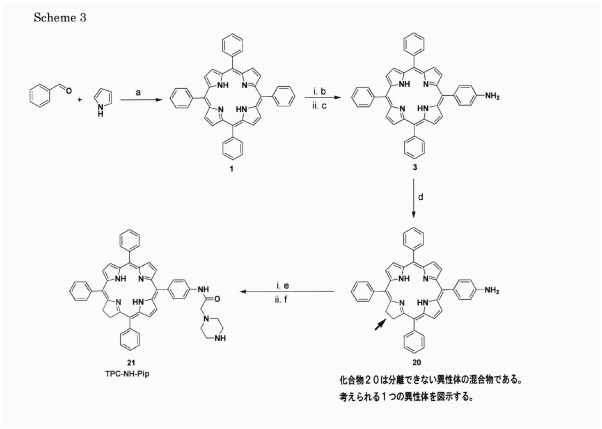
【図４Ａ】



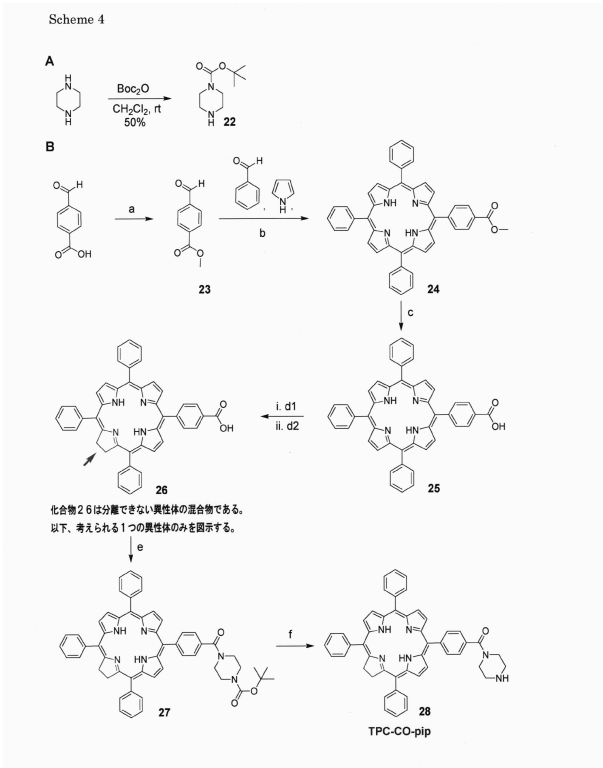
【図４Ｂ】



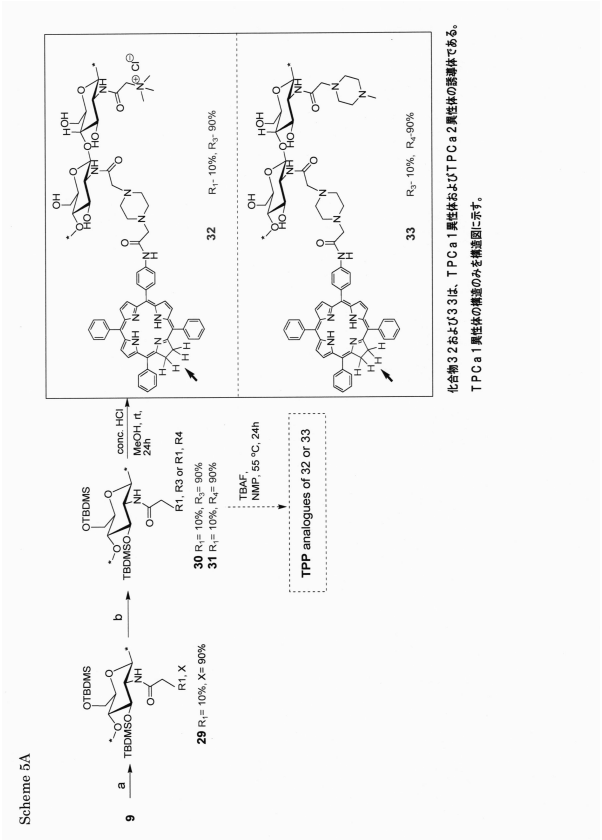
【図４Ｃ】



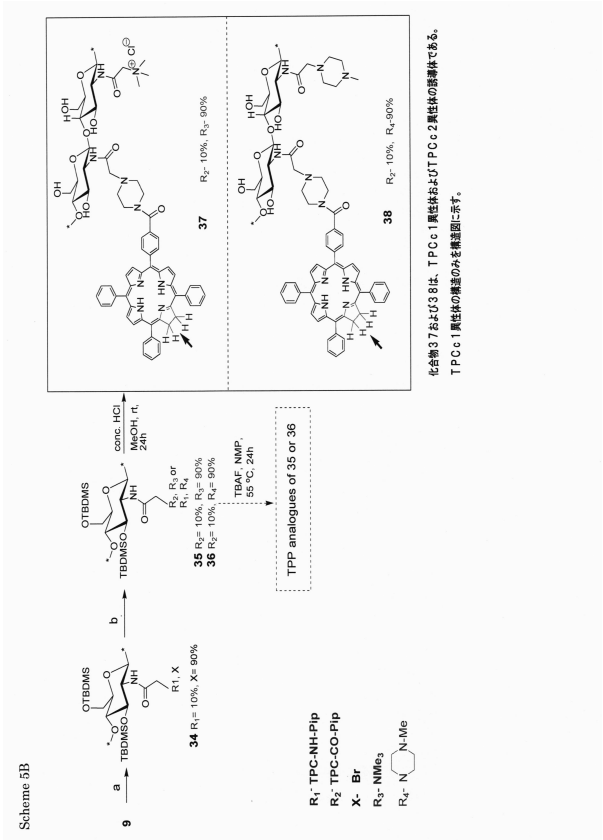
【図４Ｄ】



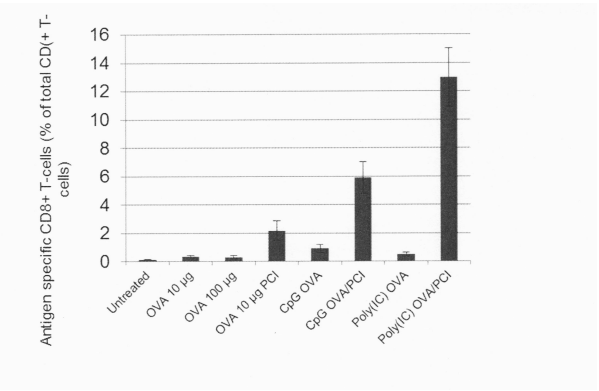
【図４Ｅ】



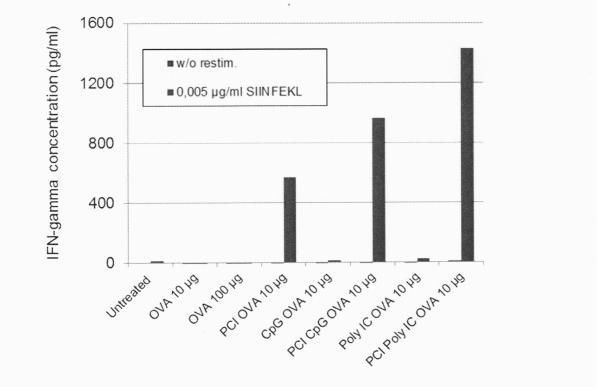
【図４Ｆ】



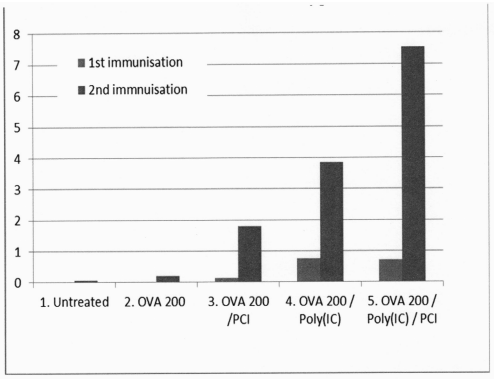
【図５Ａ】



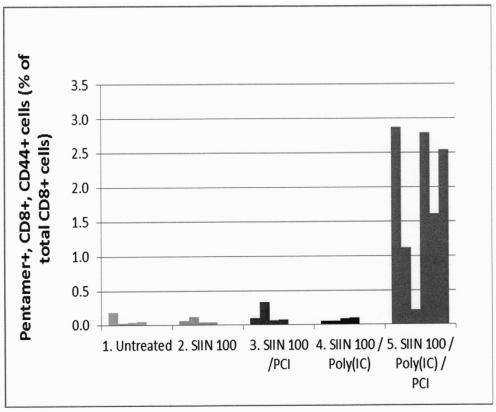
【図５Ｂ】



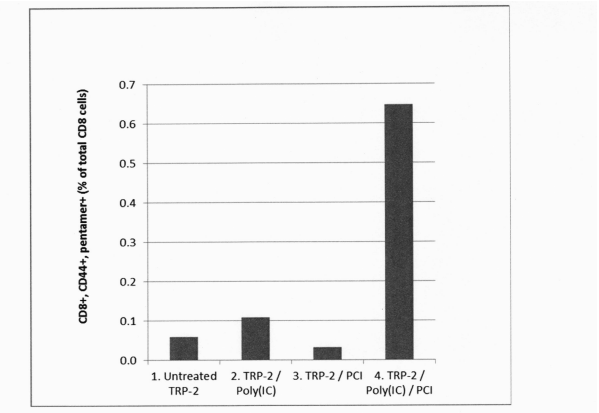
【図６】



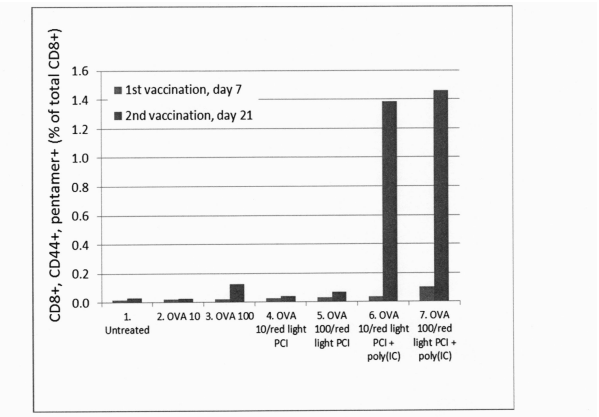
【図７】



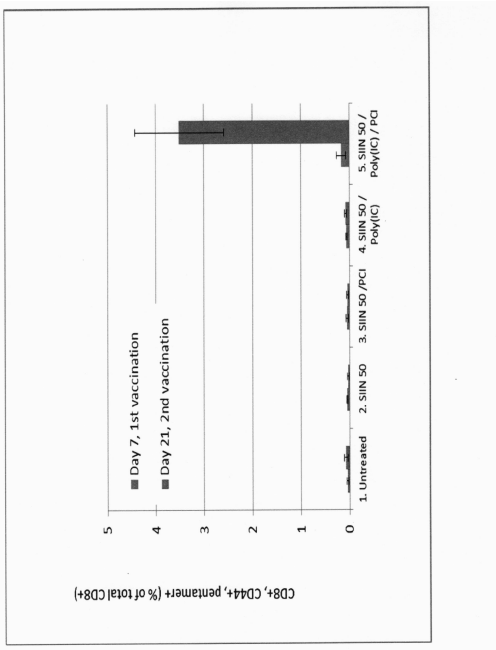
【図８】



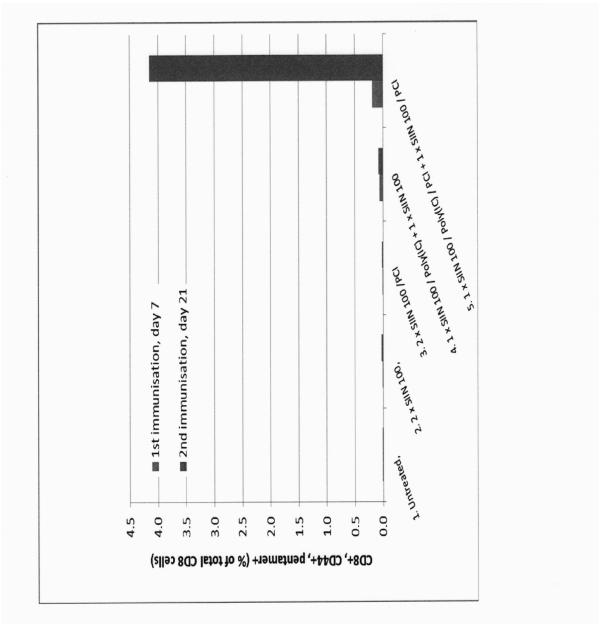
【図９】



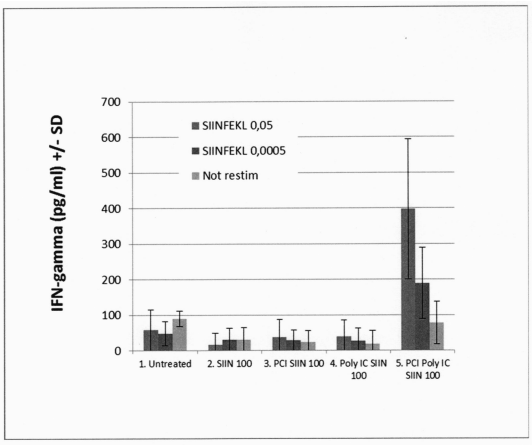
【図１０】



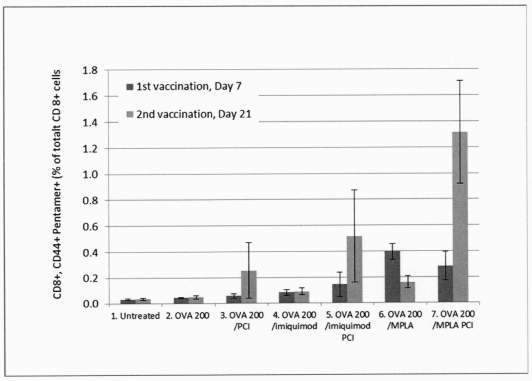
【図１１】



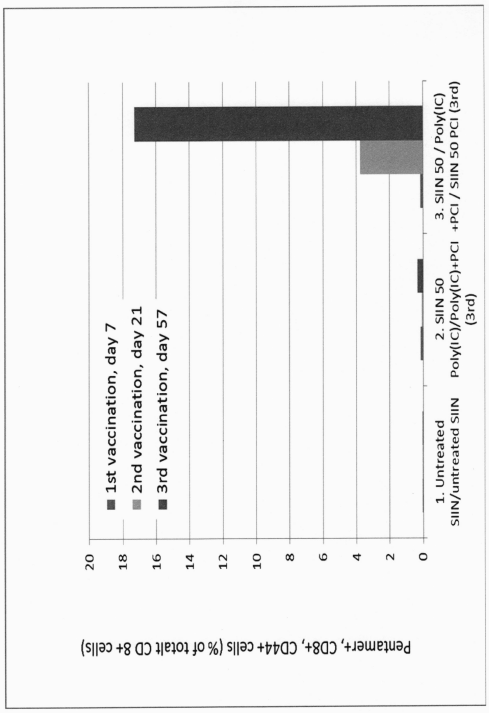
【図１２】



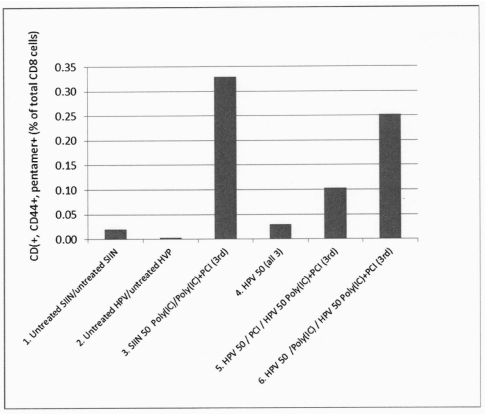
【図１３】



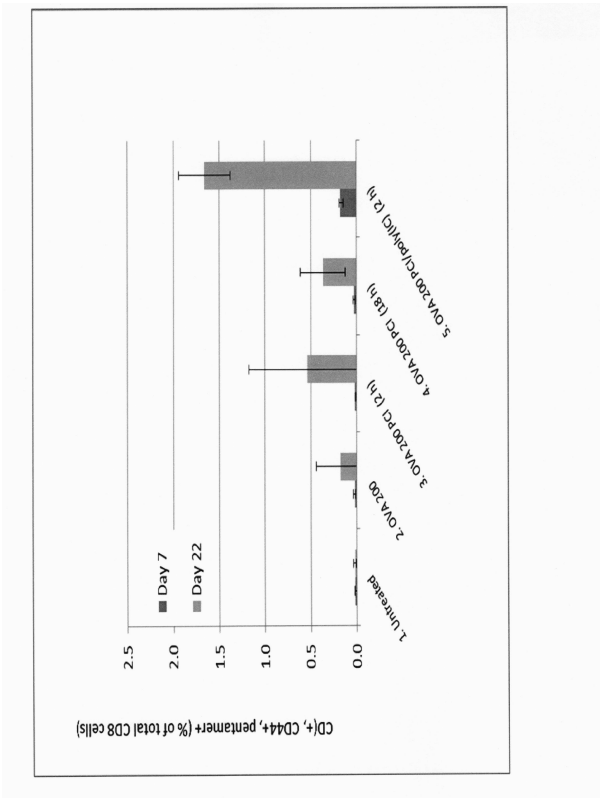
【図１４】



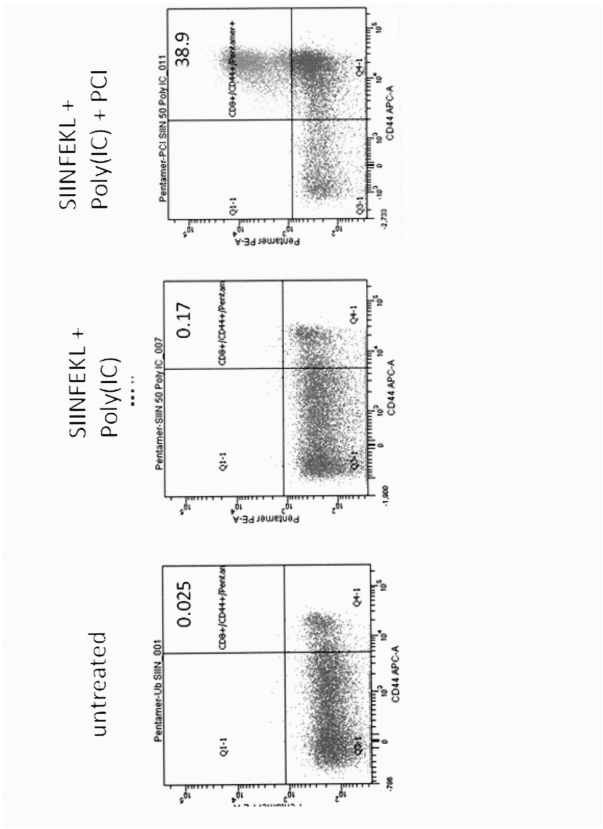
【図１５】



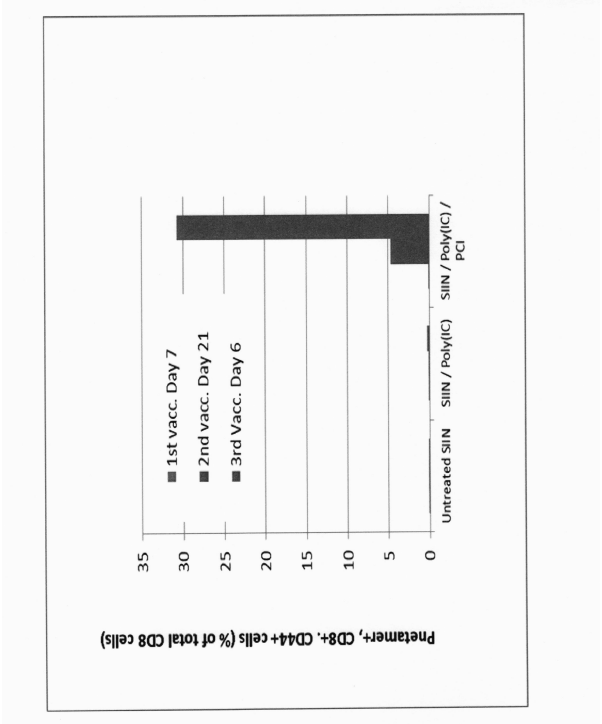
【図１６】



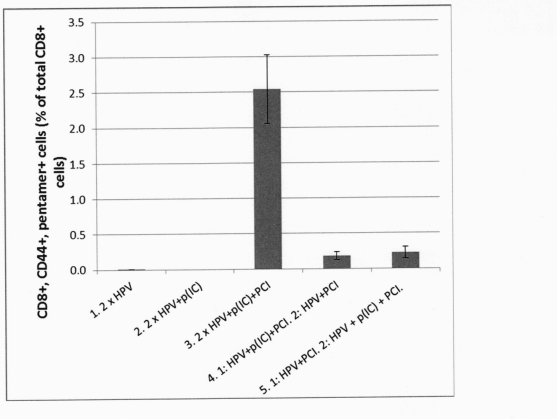
【図１７】



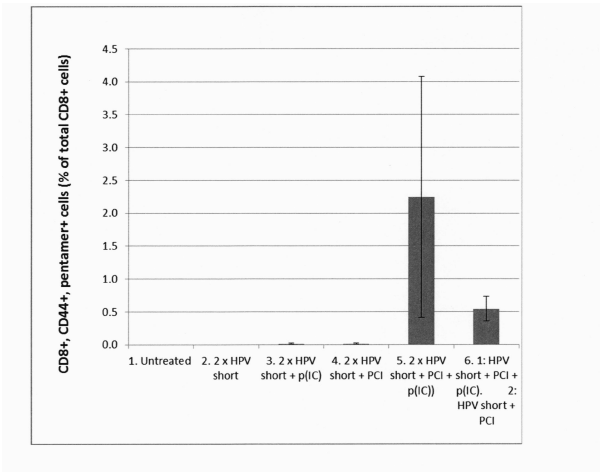
【図１８】



【図１９】



【図２０】



【配列表】

0006684215000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI		
A61K	***41/00***	***(2020.01)***	A61K	41/00	
A61K	***48/00***	***(2006.01)***	A61K	48/00	
A61K	***31/7088***	***(2006.01)***	A61K	31/7088	
A61K	***31/715***	***(2006.01)***	A61K	31/715	
A61K	***35/15***	***(2015.01)***	A61K	35/15	Z
C12N	***15/06***	***(2006.01)***	C12N	15/06	ZNA
C12N	***15/07***	***(2006.01)***	C12N	15/07	
C12N	***5/0784***	***(2010.01)***	C12N	5/0784	

(56)参考文献 特表２００４－５２００２１（ＪＰ，Ａ）
特表２００２－５４１０７２（ＪＰ，Ａ）
特表２０１３－５０１７６９（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５２００２０（ＪＰ，Ａ）
特表２０１０－５０４０８０（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００９／００６２７１９（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０１１／０１８６３６（WO，Ａ１）
Kornbluth, R. S. and Stone, G. W., Journal of Leukocyte Biology, ２００６年, Vol. 80, Issue 5, p. 1084-1102
Steinhagen, F. et al., Vaccine, ２０１１年, Vol. 29 , Issue 17, p. 3341-3355
LIU, Philip T. et al., Therapeutic implications of the TLR and VDR partnership, TRENDS in Molecular Medicine, ２００７年, Vol. 13, No. 3, p. 117-124
O'NEILL, Luke A. J. et al., Therapeutic Targeting of Toll-like Receptors for Infectious and Inflammatory Disease and Cancer, PHARMACOLOGICAL REVIEWS, ２００９年, Vol. 61, No. 2, p. 177-197

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　３１／００－３３／４４
Ａ６１Ｐ　　１／００－４３／００
Ａ６１Ｋ　３５／００－５１／１２
Ｃ１２Ｎ　　１／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＭＥＤＩＣＡＬ　ＯＮＬＩＮＥ