

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2014-505473

(P2014-505473A)

(43) 公表日 平成26年3月6日(2014.3.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/195 (2006.01)	C 0 7 K 14/195 Z N A	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 7
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求	(全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-548720 (P2013-548720)
 (86) (22) 出願日 平成23年9月20日 (2011. 9. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年7月12日 (2013. 7. 12)
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2011/079862
 (87) 国際公開番号 W02012/094905
 (87) 国際公開日 平成24年7月19日 (2012. 7. 19)
 (31) 優先権主張番号 201110023985.6
 (32) 優先日 平成23年1月14日 (2011. 1. 14)
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 513177956
 中国人民解放军军事医学科学院附属医院
 AFFILIATED HOSPITAL
 OF ACADEMY OF MILI
 TARY MEDICAL SCIENC
 ES, PLA
 中華人民共和国、北京市豊台区東大街8号
 NO. 8, DONGDA AVE, F
 ENGTAI DISTRICT, BE
 IJING 100071, CHINA
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊
 (74) 代理人 100109830
 弁理士 福原 淑弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B7-1-PE40KDEL外毒素融合遺伝子に基づくDNAワクチンおよびその使用

(57) 【要約】

本発明は免疫学および分子生物学の分野に関連し、B7-1-PE40KDEL外毒素融合遺伝子に基づくDNAワクチンおよびその使用に係るものである。特に、該DNAワクチンは、組み換え発現ベクターを含んでおり、該ベクターは、pcDNA3.1/Zeo(+)、pWLNE0、pSV2CAT、p0G44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL、およびアデノウイルスのような、選択された真核生物発現ベクターに有効に結合した外毒素融合遺伝子B7-1-PE40KDELを含んでいる。本発明は、また、外毒素融合遺伝子B7-1-PE40KDEL、コードされる外毒素融合蛋白、該外毒素融合蛋白遺伝子を含む組み換え発現ベクター、および該組み換え発現ベクターを含む組成物、に係るものである。本発明の該DNAワクチンは、同種異系組織/臓器の移植の拒絶反応、およびGVHDのような造血幹細胞移植の拒絶反応の治療または予防に非常に有効である。

【選択図】 図 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

外毒素融合蛋白B7-1-PE40KDELをコードする遺伝子であって、該遺伝子のヌクレオチド配列が以下の配列である遺伝子。

(1) 配列番号：1または配列番号：2に示される配列、

(2) 配列番号：1または配列番号：2に示される配列によりコードされる蛋白と同一の蛋白をコードする配列であって、そのヌクレオチド配列は、配列番号：1または配列番号：2に示される配列とは、コドンの縮重により相違している配列、

(3) 配列番号：1または配列番号：2に示される配列と厳格なハイブリダイズ条件下でハイブリダイズする配列であって、該配列によりコードされる蛋白が配列番号：1または配列番号：2によりコードされる蛋白と同一または類似の機能を有する配列、または

(4) 配列番号：1または配列番号：2に示される配列と、75%を超える、または好ましくは85%を超える同一性を有する配列。

【請求項 2】

請求項 1 記載の遺伝子によりコードされる外毒素融合蛋白。

【請求項 3】

請求項 1 記載の遺伝子に機能的に結合された組み換え発現ベクターであって、該発現ベクターは真核生物発現ベクターまたは原核生物発現ベクターから選択され、好ましくは、該遺伝子は、pcDNA3.1/Zeo(+), pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG, pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLおよびアデノウイルスから選択される発現ベクターのいずれかに機能的に結合している組み換え発現ベクター。

【請求項 4】

請求項 3 記載の組み換え発現ベクターであって、請求項 1 記載の遺伝子およびpcDNA3.1/Zeo(+)ベクターとからなる組み換え発現ベクター。

【請求項 5】

請求項 1 記載の遺伝子、請求項 2 記載の外毒素融合蛋白、あるいは請求項 3 または 4 記載の組み換え発現ベクターを含む組成物。

【請求項 6】

請求項 1 記載の遺伝子、請求項 2 記載の外毒素融合蛋白、あるいは請求項 3 または 4 記載の組み換え発現ベクター、および医薬的に許容可能なアジュバントを含むワクチン。

【請求項 7】

請求項 3 または 4 記載の組み換え発現ベクター、および医薬的に許容可能な免疫アジュバントを含むDNAワクチン。

【請求項 8】

請求項 5 記載の組成物、請求項 6 記載のワクチン、または請求項 7 記載のDNAワクチンの配合物であって、静脈注射、動脈注射、筋肉内注射、皮下注射、臓器注射、胸膜腔内注射および腹腔内注射による投与に適した形態で製造される配合物。

【請求項 9】

請求項 5 記載の組成物、請求項 6 記載のワクチン、または請求項 7 記載のDNAワクチンであって、水溶液または水で戻す凍結乾燥粉末の形態で配合され、注射または粘膜を介した投与方法により使用可能なもの。

【請求項 10】

同種異系組織および/または臓器の移植の拒絶反応を治療または予防する方法であって、請求項 5 記載の組成物、請求項 6 記載のワクチン、または請求項 7 記載のDNAワクチンを、それを必要とする患者に有効量投与することを含む方法。

【請求項 11】

請求項 5 記載の組成物、請求項 6 記載のワクチン、または請求項 7 記載のDNAワクチンの使用であって、同種異系組織及び/または臓器の移植の拒絶反応を治療または予防するための医薬の製造における使用。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

【発明の分野】

【0001】

本発明は免疫学および分子生物学の分野に関連し、B7-1-PE40KDEL外毒素融合遺伝子に基づくDNAワクチンおよびその使用に係るものである。本発明は、また、B7-1-PE40KDEL外毒素融合遺伝子、該融合遺伝子によりコードされる外毒素融合蛋白、該融合遺伝子を含む組み換え発現ベクター、および該組み換え発現ベクターを含む組成物に係るものである。

【発明の背景】

【0002】

同種異系の造血幹細胞移植(allo-HSCT)および実質臓器移植は、血液系腫瘍、ある種の遺伝病、急性重症放射線宿酔、および様々な実質臓器の不全および悪性腫瘍の治療に広く用いられてきた。ドナーとレシピエントとの間の主要組織適合性抗原(MHC)の相違により、マイナー組織適合性抗原(mHA)、組織特異的抗原、および非免疫学的因子のような多くの他の既知または未知の因子ともに、宿主対移植片病(HVGDs)および移植片対宿主病(GVHDsまたはGVHRs)が避けられず、それらが、同種異系組織移植の失敗および慢性移植片機能不全(GCD)の最も重要かつ根本的な原因の一つである。臓器移植が緊急に必要である患者の数の増加に伴い、ドナーの不足がますます顕著となりつつある。現在および将来において、MHCsが完全には一致していない、またはなかば適合しているにすぎない移植のケースが主流となり、造血幹細胞移植および臓器移植の新たな方向性を示すことになるだろう。GVHDおよびHVGDに対する予防および治療の伝統的な方法は、移植レシピエントにおける全免疫機能の破壊に基づくものであり、移植片対白血病(GVL)効果および抗炎症機能の喪失という代償を払いつつも、種々の高用量の免疫抑制薬の使用または移植片からのすべてのT細胞の除去により実施されている。GVHDおよびHVGDの発生および進展を防止する新たな戦略の背後にある基本的な方法が、特異的な免疫寛容によりT細胞の活性化の当初のステップが効果的に妨げられるか、誘導が妨げられ、それにより「サイトカイン・ストーム」の発生および進行を根本的に抑制するかどうかには掛っていることは疑いがないところである。したがって、理想的かつ効率的なallo-HSCTおよび臓器移植では、レシピエントの体内やドナーの移植片からすべてのT細胞を除くより、T細胞の同種異系抗原への当初の反応を修正又は変更すべきである。すなわち、レシピエントおよびドナーに特異的な免疫寛容の誘導は、レシピエントまたはドナーのT細胞の同種異系抗原への反応の除去または阻害をターゲットとするが、T細胞の他の抗原への通常の反応は依然として保持しているというものであるべきである。

【0003】

レシピエントおよびドナーのT細胞が造血幹細胞移植または臓器移植において2つの役割を演じていることは証明されている。造血幹細胞または臓器の生着、条件付感染(conditional infections)の抑制および抗白血病効果への寄与に加え、それはGVHDまたはHVGDの根本的な原因にもなり得る。この免疫応答は、T細胞による認識と活性化を通じて達成される。T細胞活性化には2つのシグナル、すなわちT細胞受容体シグナルおよび分化抗原群28(CD28)の同時刺激シグナルが必要である。最初のシグナルは第2のシグナルによって制御され、T細胞の活性化、部分的活性化またはアネルギーがもたらされる。したがって、T細胞受容体シグナルまたはCD28により仲介される同時刺激シグナルのいずれかをブロックすることによるT細胞活性化の阻害が、HVGDおよび急性GVHD(aGVHD)の予防のために重要な戦略である。細胞障害性Tリンパ球抗原4-1g(CTLA4-1g)またはB7抗体誘導特異的免疫寛容は、HVGDおよびaGVHDの予防という目的を達成するために主に用いられており、多くのin vivoおよびin vitroでの動物実験において有効であることが実証されている。しかし、この方法の欠点は、誘導された免疫寛容の期間が短く、誘導された無力なT細胞が他のシグナル伝達経路によって再活性化されうることから、治療が失敗に至ることである。加えて、ブロックのために用いられるモノクローナル抗体はほとんどマウスのものであり、その免疫原性が治療の有効性に影響する。

【0004】

したがって、良好な免疫寛容を有し、GVHDのような同種異系組織/臓器移植の拒絶反応

10

20

30

40

50

の治療または予防において有効なDNAワクチンが、この分野では緊急に求められている。

【発明の概要】

【0005】

多くの実験および創造的な研究の後、発明者は、B7-1-PE40KDEL外毒素融合遺伝子を見出し、驚くべきことに真核生物細胞にトランスフェクトされた組み換え発現ベクターpcDNA3.1/Zeo(+)-B7-1-PE40KDELが、転写され、翻訳され、翻訳後に修飾され、およびそれから細胞外空間に分泌されることを発見した。該ベクターpcDNA3.1/Zeo(+)-B7-1-PE40KDELは、効率的に真核生物細胞中で発現でき、その発現産物は、好適な標的となる免疫抑制活性を有する。発明者は、またpcDNA3.1/Zeo(+)-B7-1-PE40KDEL外毒素融合遺伝子に基づくDNAワクチンが、マウスaGVHDモデルにおける予防および治療において、有効であることを発見した。したがって、以下の発明が提供される。

10

【0006】

本発明の1つの側面は、B7-1-PE40KDEL外毒素融合遺伝子およびそのヌクレオチド配列に関するものであり、該配列は、配列番号：1または配列番号：2に示されるとおりである。

【0007】

B7-1-PE40KDELの配列およびオープンリーディングフレームの決定は、以下のように解析された：

【化 1】

配列番号: 1 のヌクレオチド配列(1850 塩基対 [bp]):

CGTTTAACTT AAGCTTGGTA CCTATGAGAGA CAGACACACT CCTGCTATGG GTACTGCTGC	60	
TCTGGGTTCC AGGTTCCACT GGTGACGTTA TCCACGTGAC CAAGGAAGTG AAAGAAGTAG	120	
CAACGCTGTC CTGTGGTCAC AATGTTTCTG TTGAAGAGCC GGCACAAACT CGCATCTACT	180	
GGCAAAAGGA GAAGAAAATG GTGCTGACTA TGATGTCTGG GGACATGAAT ATATGGCCCCG	240	10
AGTACAAGAA CCGGACCATC TTTGATATTA CTAATAACCT CTCCATTGTG ATCCTGGCTC	300	
TGCGCCCATC TGACGAGGGC ACATACGAGT GTGTTGTTCT GAAGTATGAA AAAGACGCTT	360	
TCAAGCGGGA ACACCTGGCT GAAGTGACGT TATCAGTCAA AGCTGACTTC CCTACACCTA	420	
GTATATCTGA CTTTGAAATT CCAACTTCTA ATATTAGAAG GATAATTTGC TCAACCTCTG	480	
GAGGTTTTCC AGAGCCTCAC CTCTCCTGGT TGGAAAATGG AGAAGAATTA AGTGCCATCA	540	
ACACAACAGT TTCCCAAGAT CCTGAAACTG AGCTCTATGC TGTTAGCAGC AAAGTGGATT	600	
TCAATATGAC AACCAACCAC AGCTTCATGT GTCTCATCAA GTATGGACAT TTAAGAGTGA	660	
ATCAGACCTT CAACTGGAAT ACAACCAAGC AAGAGCATT TCCCTGATAAC GGTGGCGGCG	720	20
GATCTGGAGG CCGTGGAAGC GGTGGTGGCT CGGGCGGTGG TGGGTCGGGC GGCAGCCTGG	780	
CCGCGCTGAC CGCGCACCAG GCTTGCCACC TGCCGCTGGA GACTTCCACC CGTCATCGCC	840	
AGCCGCGCGG CTGGGAACAA CTGGAGCAGT GCGGCTATCC GGTGCAGCGG CTGGTCGCCC	900	
TCTACCTGGC GCGCGGCTG TCGTGGAACC AGGTCGACCA GGTGATCCGC AACGCCCTGG	960	
CCAGCCCCGG CAGCGGCGGC GACCTGGGCG AAGCGATCCG CGAGCAGCCG GAGCAGGCC	1020	
GTCTTGCCCT GACCCTGGCC GCCGCCGAGA GCGAGCGCTT CGTCCGGCAG GGCACCGGCA	1080	
ACGACGAGGC CCGCGCGGCC AACGCCGACG TGGTGAGCCT GACCTGCCCG GTCGCCGCCG	1140	30
GTGAATGCGC GGGCCCGGCG GACAGCGGCG ACGCCCTGCT GGAGCGCAAC TATCCCACTG	1200	
GCGCGGAGTT CCTCGGCGAC GCGGCGACG TCAGCTTCAG CACCCGCGGC ACGCAGAACT	1260	
GGACGGTGGA GCGGCTGCTC CAGGCGCACC GCCAACTGGA GGAGCGCGGC TATGTGTTCG	1320	
TCGGCTACCA CGGCACCTTC CTCGAAGCGT CGCAAAGCAT CGTCTTCGGC GGGGTGCGCG	1380	
CGCGCAACCA GGACCTCGAC GCGATCTGGC GCGGTTTCTA TATCGCCGGC GATCCGGCGC	1440	
TGGCCTACGG CTACGCCCAG GACCAGGAAC CCGACGCACG CGGCCGGATC CGCAACGGTG	1500	
CCCTGCTGCG GGTCTATGTG CCGCGCTCGA GCCTGCCGGG CTCTACCGC ACCAGCCTGA	1560	40
CCCTGGCCGC GCCGGAGGCG GCGGGCGAGG TCGAACGGCT GATCGGCCAT CCGCTGCCGC	1620	
TGCGCCTGGA CGCCATCACC GGCCCCGAGG AGGAAGGCGG GCGCCTGGAG ACCATTCTCG	1680	
GCTGGCCGCT GGCCGAGCGC ACCGTGGTGA TTCCCTCGGC GATCCCCACC GACCCGCGCA	1740	
ACATCGGCGG CGACCTCGAC CCGTCCAGCA TCCCCGACAA GGAACAGGCG ATCAGCGCCC	1800	
TGCCGACTA CGCCAGCCAG CCCGGCAAAC CGCCGAAGGA CGAGCTGTAA	1850	

【 0 0 0 8 】

上記配列において、下線部はKpnI制限酵素認識部位であり、枠で囲まれた部分はスター

	325		330		335											
Thr	Leu	Ala	Ala	Ala	Glu	Ser	Glu	Arg	Phe	Val	Arg	Gln	Gly	Thr	Gly	
		340						345					350			
Asn	Asp	Glu	Ala	Gly	Ala	Ala	Asn	Ala	Asp	Val	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
		355						360					365			
Pro	Val	Ala	Ala	Gly	Glu	Cys	Ala	Gly	Pro	Ala	Asp	Ser	Gly	Asp	Ala	
		370						375					380			
Leu	Leu	Glu	Arg	Asn	Tyr	Pro	Thr	Gly	Ala	Glu	Phe	Leu	Gly	Asp	Gly	
385					390						395				400	
Gly	Asp	Val	Ser	Phe	Ser	Thr	Arg	Gly	Thr	Gln	Asn	Trp	Thr	Val	Glu	10
				405						410					415	
Arg	Leu	Leu	Gln	Ala	His	Arg	Gln	Leu	Glu	Glu	Arg	Gly	Tyr	Val	Phe	
			420							425					430	
Val	Gly	Tyr	His	Gly	Thr	Phe	Leu	Glu	Ala	Ala	Gln	Ser	Ile	Val	Phe	
		435								440					445	
Gly	Gly	Val	Arg	Ala	Arg	Asn	Gln	Asp	Leu	Asp	Ala	Ile	Trp	Arg	Gly	
		450											460			
Phe	Tyr	Ile	Ala	Gly	Asp	Pro	Ala	Leu	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Ala	Gln	Asp	
465					470								475		480	
Gln	Glu	Pro	Asp	Ala	Arg	Gly	Arg	Ile	Arg	Asn	Gly	Ala	Leu	Leu	Arg	20
				485									490		495	
Val	Tyr	Val	Pro	Arg	Ser	Ser	Leu	Pro	Gly	Phe	Tyr	Arg	Thr	Ser	Leu	
			500										505		510	
Thr	Leu	Ala	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Glu	Val	Glu	Arg	Leu	Ile	Gly	
		515											520		525	
His	Pro	Leu	Pro	Leu	Arg	Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Gly	Pro	Glu	Glu	Glu	
		530											535		540	
Gly	Gly	Arg	Leu	Glu	Thr	Ile	Leu	Gly	Trp	Pro	Leu	Ala	Glu	Arg	Thr	
545					550								555		560	
Val	Val	Ile	Pro	Ser	Ala	Ile	Pro	Thr	Asp	Pro	Arg	Asn	Ile	Gly	Gly	30
				565									570		575	
Asp	Leu	Asp	Pro	Ser	Ser	Ile	Pro	Asp	Lys	Glu	Gln	Ala	Ile	Ser	Ala	
			580										585		590	
Leu	Pro	Asp	Tyr	Ala	Ser	Gln	Pro	Gly	Lys	Pro	Pro	Lys	Asp	Glu	Leu	
		595											600		605	

【 0 0 1 2 】

本発明の他の側面は、pcDNA3.1/Zeo(+)、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG、pSVK3、pBPV、pMSG、pSVLおよびアデノウイルスのような真核生物の発現ベクターに効率的に融合できる、細胞B7-1-PE40KDEL外毒素融合遺伝子を含む組み換え発現ベクターに関する。

【 0 0 1 3 】

本発明の1つの側面では、組み換え発現ベクターは、B7-1-PE40KDEL遺伝子およびpcDNA 3.1/Zeo(+)ベクターからなる。

【 0 0 1 4 】

本発明の他の側面は、本発明の組み換え発現ベクターのいずれかを含む組成物に関する。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、GVHDの治療または予防のための、本発明の組み換え発現ベクターのいずれかを含むDNAワクチンに関するものである。

【 0 0 1 6 】

本発明の1つの側面において、ここに記載されたDNAワクチンは医薬的に許容可能な免

10

20

30

40

50

疫アジュバントも含む。

【0017】

本発明の他の側面において、ここに記載されたDNAワクチンは、注射または粘膜を経由する免疫化、あるいは遺伝子銃によるトランスフェクトのために用いられる。特に、DNAワクチンは、以下の方法、すなわち、静脈注射、動脈注射、筋肉内注射、皮下注射、臓器注射、胸腔内注射および腹腔内注射の少なくとも1つによる免疫化のために用いられる。

【0018】

本発明の他の側面において、ここに記載されるDNAワクチンは、水溶液または水に戻した凍結乾燥粉末のいずれかの形態であって、注射または粘膜経由の投与に用いられる。

【0019】

本発明の他の側面は、DNAワクチンを製造する方法であって、配列番号：1または2のヌクレオチド配列およびpcDNA3.1/Zeo(+)ベクターを含むB7-1-PE40外毒素融合遺伝子を効率的に融合させる方法に関するものである。

【0020】

本発明に関してここに記載されるDNAワクチンを製造する方法は、以下の工程を含む：

1)シグナルペプチドおよびKpnI制限酵素認識部位を含む上流プライマー(P1)、およびXbaI制限酵素認識部位を含む下流プライマー(P2)が設計される。記載された該プライマー配列は、配列番号：4および配列番号：5として示されている。

【0021】

2)真核生物発現ベクター-pGEMT-B7-1-PE40KDELは、高正確性Pfu DNAポリメラーゼを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の鋳型として用いられる。

【0022】

3)PCR産物は回収される。回収されたPCR産物およびpcDNA3.1/Zeo(+)ベクターは、KpnI+XbaI制限酵素の両方で同時に消化(double-digested)され、消化された産物は電気泳動の後に回収される。

【0023】

4)消化された産物は回収される。

【0024】

5)二重消化されたPCR産物およびpcDNA3.1/Zeo(+)ベクターはライゲートされる。

【0025】

6)アンピシリン-耐性細菌クローンが選択され、プラスミドが抽出され、制限酵素による二重消化により同定される。正しい細菌クローンは冷凍保存される。

【0026】

7)細菌クローンは培養され、DNAワクチンのためのプラスミドが抽出され、精製される。

【0027】

8)得られたプラスミドは、薬学的に許容可能な免疫アジュバントと混合される。

【0028】

本発明の他の側面は、外毒素融合遺伝子、またはGVHDの治療または予防のためのDNAワクチンの製造における組み換え発現ベクターの使用に関する。

【0029】

本発明の更なる側面は、GVHDの治療または予防のための方法であって、治療または予防のために有効な量のDNAワクチンを患者に投与する工程を含む方法に関する。

【0030】

1日の用量は、患者に1度に投与してもよいし、または1日の間に2、3、4回またはそれ以上に分けて適切な間隔で低用量で投与してもよい。ここで記載する低用量は、単位用量として、たとえば、各単位用量が適切な用量の数値により分けられた1日の総用量に相当する用量を含んでいるように製造されることもできる。さらに、DNAワクチンは、1日1回、2日ごとに1回、週に1回、月に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、6ヶ月に1回、年1回、または2年に1回のような特定の間隔で投与されることもできる。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】真核生物発現ベクター-pcDNA3.1/B7-1-PE40KDELの構築の略図。ここでSはシグナルペプチド配列を示す。

【図2】B7-1-PE40KDELのPCR産物のアガロースゲル電気泳動による解析。レーン1はDNAマーカー、レーン2はB7-1-PE40KDELのPCR産物。

【図3】KpnI+XbaI制限酵素により二重消化された組み換えプラスミドpcDNA3.1/B7-1-PE40KDELのアガロースゲル電気泳動による解析。レーン1はDNAマーカー、レーン2はXbaIで消化された組み換えプラスミド、レーン3はKpnI+XbaIにより二重消化された組み換えプラスミド。

【図4】トランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40細胞の逆転写PCR(RT-PCR)産物のアガロースゲル電気泳動による解析。レーン1はDNAマーカー、レーン2はpcDNA3.1/B7-1-PE40KDELによりトランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40細胞におけるB7-1-PE40KDEL増幅産物、レーン3はβ-アクチンのPCR産物、レーン4はpcDNA3.1空ベクターによりトランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40細胞におけるB7-1-PE40KDELの増幅産物、レーン5はトランスフェクトされていないCHO-K1-RPE.40細胞におけるB7-1-PE40KDEL増幅産物。

【図5】トランスフェクトされた真核生物細胞から分泌されたB7-1-PE40KDEL融合蛋白のウェスタンブロット解析。レーン1はpcDNA3.1/Zeo(+)-B7-1-PE40KDELによりトランスフェクトされたもの、レーン2はpcDNA3.1/Zeo(+)空ベクターでトランスフェクトされたもの。

【図6A】Zeoでスクリーニングされた安定的にトランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40におけるシュードモナス(Pseudomonas)外毒素A(PEA)の発現の比較定量的結果。Aはリアルタイム定量PCR、Bは増幅曲線、Cは溶解度曲線。

【図6B】Zeoでスクリーニングされた安定的にトランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40におけるシュードモナス(Pseudomonas)外毒素A(PEA)の発現の比較定量的結果。Aはリアルタイム定量PCR、Bは増幅曲線、Cは溶解度曲線。

【図6C】Zeoでスクリーニングされた安定的にトランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40におけるシュードモナス(Pseudomonas)外毒素A(PEA)の発現の比較定量的結果。Aはリアルタイム定量PCR、Bは増幅曲線、Cは溶解度曲線。

【図7】PEA濃度測定標準曲線。

【図8】真核生物細胞の発現産物B7-1-PE40KDELの選択的阻害活性の比較。

【図9】筋肉内注射後のpcDNA3.1/B7-1-PE40KDELプラスミドの血清における発現レベルのアガロースゲル電気泳動による解析。

【図10】血中のPE40KDELMRNAの比較定量。

【図11A】抹消血中のCD3+CD28+T数のフローサイトメトリー解析の代表写真。

【図11B】抹消血中のCD3+CD28+T数のフローサイトメトリー解析の代表写真。

【図12】B7-1-PE40KDEL DNAワクチンの筋肉内注射後の抹消血CD28+T細胞の減少。

【図13】血清抗-PEA IgG抗体濃度測定標準曲線。

【図14】レシピエントマウスにおける典型的なGVHDの症状。典型的な円背(A)および脱毛(B)。

【図15】移植後のすべてのグループにおけるマウスの体重の変化。AはaGVHDモデルグループ；Bは骨髄移植グループ；Cは脾臓細胞注入グループ；Dは放射線だけのグループ。

【図16】移植後のキメリズム解析：性決定領域Y(Y染色体におけるsry遺伝子)のPCR産物の電気泳動。レーン1はDNAマーカー；レーン2はaGVHDモデルグループにおけるsry遺伝子増幅；レーン3は骨髄移植グループにおけるsry遺伝子増幅；レーン4は脾臓細胞注入グループにおけるsry遺伝子増幅；レーン5は放射線だけのグループにおけるsry遺伝子増幅。

【図17】aGVHDマウスの病理組織学的検査(ヘマトキシリンおよびエオシン[HE]染色×100)。Aは小腸；Bは肝臓；Cは脾臓；Dは皮膚。

【図18】移植後のすべてのグループにおけるGVHDマウスの生存率。

【図19】移植後のすべてのグループにおけるGVHDマウスの体重変化。

【図20】移植後のすべてのグループにおけるaGVHDマウスの白血球細胞(WBC)数の変化。

10

20

30

40

50

【図 2 1】B7-1-PE40KDEL DNAワクチンおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチンによる治療後のすべてのグループにおけるaGVHDマウスの小腸における病理組織学的変化(HE染色、40×)：Aグループ(B7-1-PE40KDEL DNAワクチン)、Bグループ(B7-2-PE40KDEL DNAワクチン)、Cグループ(B7-1-PE40KDEL DNAワクチン+B7-2-PE40KDEL DNAワクチン)、Dグループ(空のベクター)、Eグループ(シクロスポリンA[CsA]+メトトレキセート[MTX])およびFグループ(未治療aGVHDグループ)。

【図 2 2】B7-1-PE40KDEL DNAワクチンおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチンによる治療後のすべてのグループにおけるaGVHDマウスの皮膚における病理組織学的変化(HE染色、40×)：Aグループ(B7-1-PE40KDEL DNAワクチン)、Bグループ(B7-2-PE40KDEL DNAワクチン)、Cグループ(B7-1-PE40KDEL DNAワクチン+B7-2-PE40KDEL DNAワクチン)、Dグループ(空のベクター)、Eグループ(CsA+MTX)およびFグループ(未治療aGVHDグループ)。

【図 2 3】B7-1-PE40KDEL DNAワクチンおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチンによる治療後のすべてのグループにおけるaGVHDマウスの肝臓における病理組織学的変化(HE染色、40×)：Aグループ(B7-1-PE40KDEL DNAワクチン)、Bグループ(B7-2-PE40KDEL DNAワクチン)、Cグループ(B7-1-PE40KDEL DNAワクチン+B7-2-PE40KDEL DNAワクチン)、Dグループ(空のベクター)、Eグループ(CsA+MTX)およびFグループ(未治療aGVHDグループ)。

【図 2 4】B7-1-PE40KDEL DNAワクチンおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチンによる治療後のすべてのグループにおけるaGVHDマウスの生存曲線および生存時間の中央値。

【図 2 5】移植後のすべてのグループにおけるキメリズム解析：sry遺伝子(Y染色体)のPCR産物の電気泳動。レーン1はDNAマーカー；レーン2はB7-1-PE40KDEL DNAワクチングループにおけるsry遺伝子増幅；レーン3はB7-2-PE40KDEL DNAワクチングループにおけるsry遺伝子増幅；レーン4はB7-1-PE40KDEL DNAワクチン+B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループにおけるsry遺伝子増幅；レーン5はpcDNA3.1注入グループにおけるsry遺伝子増幅；レーン6はCsA+MTXグループにおけるsry遺伝子増幅；レーン7はaGVHDモデルグループ。

【図 2 6】aGVHDマウス末梢血のCD4⁺/CD8⁺率に関するDNAワクチンの効果。

【図 2 7 A】すべてのグループにおける末梢血のCD3⁺CD4⁺T/CD3⁺CD8⁺T率のフローサイトメトリー解析の代表写真。

【図 2 7 B】すべてのグループにおける末梢血のCD3⁺CD4⁺T/CD3⁺CD8⁺T率のフローサイトメトリー解析の代表写真。

【図 2 8】すべてのグループにおける末梢血のCD4⁺CD25⁺Treg/CD4⁺T率に関するDNAワクチンの効果。

【図 2 9】すべてのグループにおける末梢血のCD4⁺CD25⁺Treg率のフローサイトメトリー解析の代表写真。

【図 3 0】すべてのグループにおける末梢血のCD8⁺CD28⁻Ts率に関するDNAワクチンの効果。

【図 3 1】すべてのグループにおける末梢血のCD8⁺CD28⁻Ts率のフローサイトメトリー解析の代表写真。

【本発明の詳細な説明】

【0032】

本発明の実施形態は、以下に例を用いて詳細に説明されている。当業者は、以下の例が本発明を説明するためにのみ用いられるものであり、発明の範囲の限定とみなされるべきではないことに留意すべきである。特定の手法又は条件について言及されていない例に対しては、その手法および条件は、本分野の文献(たとえば、J. Sambrook et al., [Peitang Huang et al.による翻訳], Laboratory Manual of Molecular Cloning, Third Edition, Science Press)または製品マニュアルに記載された事項に基づくものである。試薬または器具の製造者の言及がない場合には、その試薬または器具は、すべての従来生産物であって商業的に購入しうるものである。

【0033】

例1：真核生物発現ベクター-pcDNA3.1/B7-1-PE40KDELの構築

1. 材料および方法

10

20

30

40

50

1.1 プラスミド、細胞および主要な試薬

原核生物発現ベクター-pGEMT-B7-1-PE40KDEL(2003.3.3)はわれわれのグループによって構築された。該ベクターを含む株はEscherichia coli DH5⁻-pGEMT-B7-PE40KDELと命名され、中国微生物菌株保存管理委員会普通微生物センター(China General Microbiological Culture Collection Center, No 1 Building, No.3, Beichen west Road, Chaoyang district Beijing, China)に受託番号CGMCC NO.4987として2011年6月27日に寄託された。前記発現ベクター-pcDNA3.1/Zeo(+)は我々の部門に保存されている。ZeocinTM、TRIzol およびLipofectamineTM2000はInvitrogen Corpから購入された。DMEM/F12培地はGibco Incから購入された。Jurkat細胞およびRaji細胞系は我々の部門に保存されていたものである。CHO-K1-RPE.40細胞系はJM MoehringおよびTJ Moehringにより樹立されたものであり、好意によりSucic Joseph博士から提供された。抗シュードモナス(Pseudomonas)外毒素Aウサギポリクローナル抗体は、Sigma Incから購入された。CD80モノクローナル抗体は、R&D Incから購入された。PVDF膜(ポリフッ化ビニリデン)およびアミコンウルトラ-4(Amicon Ultra-4)はMillipore Incから購入した。超増感化学発光検出試薬はPierce Incから購入された。MTS(CellTiter 96 Aqueous One Solution細胞増殖アッセイ)およびPureYieldTMプラスミドミディプレップシステム(midiprep system)はPromega Co. Ltd.から購入された。逆転写キットSYBR^(R) Premix Ex TaqTM、KpnI、XbaI、およびT4リガーゼはTaKaRa Bio. Incから購入された。TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)発色基質溶液および2x Pfu PCR MasterMixはTiangen Biotech(北京)Co., Ltdから購入された。QIAquickゲル抽出キットはQIAGEN Incから購入された。

10

20

【0034】

1.2 主な機器

使用された主な機器には、9700 PCR装置(PerkinElmer)、Du^(R)640紫外線検出器(Beckman)、Mini II蛋白電気泳動装置およびセミドライ式蛋白導入装置(Bio-Rad)、Gel-Pro3.1ゲルイメージングシステム(Media Cybernetics)、550 自動マイクロプレートリーダーおよびリアルタイム定量PCR装置(Stratagene、Mx3005P)が含まれる。

【0035】

1.3 真核生物発現ベクター-pcDNA3.1/B7-1-PE40KDELの構築

シグナルペプチド配列およびKpnI制限酵素認識部位を含む上流プライマー(P1)と、XbaI制限酵素認識部位を含む下流プライマー(P2)が設計された。シグナルペプチド配列は、Invitrogen Inc.のpSecTag2-Bベクターの配列、すなわちマウスIgのk鎖V-J2-Cのシグナルペプチドに基づくものであって、細胞外空間に大量に分泌されることができるといった。プライマーの配列は以下のとおりであった：

30

上流プライマーP1：

【化2】

上流 プライマー P1:

5' GGTACCTATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCC O
AGGTTCCACTGGTGACGTTATCCACGTGACCAAGGAAGTG 3' (配列番号: 4, 下線部はKpn
I制限酵素認識部位、枠で囲まれた部分は スタートコドン、およびイタリック体
の部分はシグナルペプチドコード配列である。)

40

【0036】

下流プライマーP2：

P2: 5' TCTAGATTACAGCTCGTCCCTTCGGCGG 3' (配列番号: 5, 下線部はXbaI制限酵素認識部位である。)

50

シグナルペプチド配列が付加されたP1配列は長すぎるため、スプライスオーバーラップエクステンション(SOE)PCR法が、P1をオーバーラッピング増幅のための2つのプライマーに分割するために用いられた。

【0037】

P1-A:

5' CTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGTGACGTTATCCACGTGACCAAGGAAGTG 3' (配列番号:6)

P1-B:

5' GGTACCTATGGAGACAGACACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCA 3' (配列番号:7)

【0038】

原核生物発現ベクターであるGEMT-B7-1-PE40KDELプラスミドが、テンプレートとして用いられ、高忠実度Pfu DNAポリメラーゼがPCR増幅のために用いられた。反応系は以下のとおりであった:

2×PfuPCRマスターミックス	12.5 μl
P1(20 μM)	0.5 μl
P2(20 μM)	0.5 μl
pGEMT-B7-1-PE40KDEL(1:50)	3 μl
ddH ₂ O	8.5 μl
全容積	25 μl

【0039】

PCR反応条件は以下のとおりであった: 96 °Cで5分間のプレ変性、96 °Cで1分間の変性、63 °Cで1分間のアニーリング、および72 °Cで2分間の30サイクルの伸長、それに続く72 °Cで10分間の伸長。生産物は、1%アガロースゲル電気泳動を用いて分離された。

【0040】

PCR産物は回収され、回収されたPCR産物およびpcDNA3.1/Zeo(+)ベクターは、KpnI+XbaIにより同時に消化され、消化された産物は電気泳動の後に回収された。消化系は以下のとおりであった:

10×バッファM	2 μl
XbaI	1 μl
KpnI	1 μl
0.1%BSA	2 μl
回収PCR産物およびpcDNA3.1/Zeo(+)ベクター	14 μl
全容積	20 μl

【0041】

混合物は、37 °Cで3時間水槽に置かれた。

【0042】

消化産物は以下の工程で回収された:

1)アガロースゲルからの標的バンドは、清潔な刃で切り出され1.5ml EPチューブ内に置かれた。

【0043】

2)ゲルは計量され、バッファQGに対応する容積が、100mgゲル:300 μlバッファQG.の比率で添加された。

【0044】

3)ゲルは50 °Cで10分間、水槽中で完全に溶解するまでインキュベートされ、チューブは十分に攪拌するために2-3分ごとに上下をひっくり返した。

【0045】

4)1容積のイソプロパノールが添加され十分に攪拌された。

【0046】

5)試料はQIAquickカラムにロードされ、1分間遠心処理された。液体を廃棄後、0.5mlのバッファQGが添加され、試料はさらに1分間遠心処理された。

【0047】

10

20

30

40

50

6) 廃液を廃棄後、75mlのバッファPEが添加され、カラムは2 - 5分間放置され、1分間遠心処理された。

【0048】

7) 廃液の廃棄後、カラムは1分間遠心処理され、清潔な1.5ml EPチューブ内に置かれた。

【0049】

8) 30マイクロリットルの注射グレードのH₂Oがカラムメンブレンの中心に添加され、1分間放置後、チューブは1分間遠心処理された。それから溶離液が収集された。

【0050】

9) 二重消化されたPCR産物およびpcDNA3.1/Zeo(+)ベクターはライゲーションされた。ライゲーション反応は、以下のように組み合わせられた：

10

2×T4リガーゼバッファ	5 μl
T4リガーゼ	1 μl
二重消化されたPCR産物	3 μl
二重消化されたpcDNA3.1/Zeo(+)ベクター	1 μl
全容積	10 μl

【0051】

ライゲーション反応液で満たされたチューブは4℃の氷水中に一晩置かれた。

【0052】

以下の方法が、ライゲーション産物をDH5aコンピテント細菌にトランスフェクトするために用いられた：

20

1) 5ミリリットルのライゲーション産物および20 μlの試薬は滅菌水で100 μlに希釈され；それから反応液は後に使用するために氷上に置かれた。

【0053】

2) DH5aコンピテント細菌は氷上で解凍され(5分間)、上記の希釈されたプラスミドが添加された。

【0054】

3) 混合液は氷上に20分間置かれ、室温で10分間放置された。前記細菌は培養皿の上に置かれ、37℃で一晩インキュベートされた。

【0055】

30

アンピシリン耐性細菌クローンが選択され、プラスミドが抽出され、それから制限酵素による二重消化により選別された(上記と同様の条件)。陽性クローンは、配列決定のためにTaKaRa Bio., Inc.に送付された。

【0056】

正しい配列を有する前記細菌クローンは凍結保存され、培養され、および寄託され、Escherichia coli DH5α-pcDNA3.1/B7-1-PE40KDELという名称で、2011年6月27日に中国微生物菌株保存管理委員会普通微生物センター(China General Microbiological Culture Collection Center, No 1 Building, No.3, Beichen west Road, Chaoyang district Beijing, China, 寄託番号はCGMCC NO.4986)に寄託された。PureYield™プラスミド抽出キットが、多量のプラスミドを抽出し精製するために使用された。精製されたプラスミドは、OD_{260/280}の比が1.8-2.0で濃度が>0.5 μg/μlの食塩水中で溶解された。

40

【0057】

1.4 組み換えプラスミドpcDNA3.1/B7-1-PE40KDELのCHO-K1-RPE.40細胞中での一過性の発現

0.5×10⁵-2×10⁵のCHO-K1-RPE.40細胞が6ウェルプレート(2mlの培地：DMEM/F12、7.5%FBS、1×非必須アミノ酸)中に接種された後、リポソームトランスフェクション法が適用された：4 μlのプラスミドおよび10 μlのLipofectamine™2000がそれぞれ250 μlのOPTI-MEM 1培地で希釈され、それから混合され、20分間インキュベートされた。混合液は、ゆっくりと6ウェルプレートに加えられ、それから37℃、5%CO₂で6時間インキュベートされた。それから培地は、完全DMEM培地に置き換えられた。48時間後、細胞および上澄み液が集め

50

られ、RT-PCRおよびウェスタンブロット解析を用いて選別された。

【 0 0 5 8 】

1.5 トランスフェクトされた細胞におけるB7-1-PE40KDEL mRNAのRT-PCR解析

トランスフェクションから48時間後、増殖相にあるCHO-K1-RPE.40細胞は、PBSで2回洗浄された。TRIzolキットの指示書にしたがって全RNAが抽出され、それから前述のP1およびP2プライマーを用いたPCR増幅のために、cDNAに逆転写された。 -アクチンが対照コントロールとして使用された。

【 0 0 5 9 】

逆転写反応は以下のように組み合わせられた：

MgCl ₂	2 μ l	10
10 × RNA PCRバッファ	1 μ l	
dNTP混合液	1 μ l	
RNaseインヒビター	0.25 μ l	
AMV	0.5 μ l	
オリゴdT	0.5 μ l	
RNA	4.75 μ l	
全容積	10 μ l	

【 0 0 6 0 】

反応条件は、42 °C で30分間、99 °C で5分間、それから5 °C で5分間であった。

【 0 0 6 1 】

PCR反応系は以下のとおりであった：

MgCl ₂	3 μ l	
10 × LAバッファ	4 μ l	
ddH ₂ O	31.75 μ l	
LA Taq	0.25 μ l	
P1(20 μ m)	0.5 μ l	
P2(20 μ m)	0.5 μ l	
第一鎖 (First-Strand) cDNA	10 μ l	
全容積	50 μ l	

【 0 0 6 2 】

反応条件は、以下のとおりである：96 °C で5分間の前変性、96 °C で1分間の変性、55 °C で1分間のアニーリング、および、72 °C で3分間、30サイクルの伸長、それに続く72 °C で10分間の伸長。PCR産物は1%アガロースゲル電気泳動で同定された。

【 0 0 6 3 】

-アクチンプライマーの配列は以下のとおりである：

上流プライマー-P1： 5' CTG TGG CAT CCA CGA AAC TA 3' (配列番号：8)

下流プライマー-P2： 5' ACA TCT GCT GGA AGG TGG AC 3' (配列番号：9)

【 0 0 6 4 】

1.6 トランスフェクト細胞におけるB7-1-PE40KDEL蛋白発現のウェスタンブロット解析

1) 蛋白電気泳動：トランスフェクション後48時間で、CHO-K1-RPE.40細胞培養物の上澄みが収集され、濃縮された。続いて、15 μ lの試料および15 μ lの2 × SDSローディングバッファが組み合わせられ、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)のために5分間煮沸された。蛋白電気泳動は、80Vで蛋白のバンドが濃縮ゲルから泳動するまで行われ、その後、150Vで、蛋白のバンドが分離ゲルの底に到達するまで電気泳動され、その時点で電源が切られた。蛋白電気泳動の配合は以下のとおりである：

	10%分離ゲル(5ml)	5%濃縮ゲル(2ml)	
ddH ₂ O	1.90ml	1.40ml	
30%アクリルアミド	1.70ml	0.33ml	
1.5M Tris-HCl(pH 8.8)	1.30ml		
1.0M Tris-HCl(pH 6.8)		0.25ml	50

10%SDS	0.05ml	0.02ml
10%過硫酸アンモニウム	0.05ml	0.02ml
TEMED	0.002ml	0.002ml

【0065】

2)メンブレンへの転写：蛋白は、フッ化ポリビニリデン(PVDF)メンブレンに電氣的に転写された。PVDFメンブレンとして、Immobilon-Pが選択され、メタノール中に15秒間、その後水中に2分間、それから電氣的転写バッファ中に20分間、浸された。その間、フィルター紙およびゲルは、電氣的転写バッファ中で15分間洗浄された。転写系は、+(白色)/3層フィルター紙/メンブレン/ゲル/3層フィルター紙/黒色として準備された。転写は、60mAで40分間行われた。

10

【0066】

3)メンブレンは、室温で2時間ブロックされた。

【0067】

4)ブロッキング溶液とともに適切に希釈された一次抗体、ウサギ抗PEA抗血清、またはCD80モノクローナル抗体が添加され、メンブレンは、4℃で一晩インキュベートされた。

【0068】

5)メンブレンは、TBSTで3回、各5分間洗浄された。

【0069】

6)ブロッキング溶液とともに希釈されたHRP-抗ウサギまたはHRP-抗ヤギIgG二次抗体が添加され、メンブレンは室温で1時間インキュベートされた。

20

【0070】

7)メンブレンは、TBSTで3回、各10分間洗浄された。

【0071】

8)ECL法がゲルの像を現像するために用いられた。

【0072】

1.7 組み換えプラスミドpcDNA3.1/B7-1-PE40KDELによるCHO-K1-RPE.40細胞の安定的トランスフェクション

リポソームトランスフェクションが、1.4.節で概略が示されたと同様の手順で行われた。トランスフェクションの24時間後、トランスフェクトされた細胞は、1:20の割合で希釈され、ZeocinTMが800 µg/mlの濃度まで添加された。培地は4日ごとに交換され、Zeo(+)クローンのサイズが徐々に増大しているときに、細胞は24ウェルのプレートに接種された。細胞がコンフルエントな状態に達したとき、細胞は、複数プレートでの継続的培養のために、6ウェルのプレートに接種された。細胞は、リアルタイム定量RT-PCR法により確認され、陽性細胞クローンは凍結保存され後の使用のために保存された。

30

【0073】

1.8 酵素標識イムノソルベント検定法(ELISA)によるトランスフェクトされた細胞におけるB7-1-PE40KDEL蛋白発現の分析

1)トランスフェクションの48時間後、安定的にトランスフェクトされた細胞の培養物の上澄みが採集され濃縮された。

【0074】

2)一晩のうちに、10マイクロリットルの濃縮液は1:10の割合で希釈され、96ウェルのプレートに加えられた。各ウェルの容積は100 µlであり、各試料につき3つのウェルが準備された。

40

【0075】

3)試料は、ブロッキング溶液で1時間ブロックされた。

【0076】

4)抗PEAポリクローナル抗体が添加され、37℃で1時間インキュベートされた。

【0077】

5)プレートはPBSTで3回洗浄された。

【0078】

50

6)HRP-抗ウサギIgG抗体が添加され、37 で1時間インキュベートされた。

【 0 0 7 9 】

7)プレートはPBSTで3回洗浄された。

【 0 0 8 0 】

8)発色TMB溶液が添加され、15分後に、反応は2mol/LのH₂SO₄により反応が停止された。450nmにおいて光吸収値が測定され、対応する濃度が計算された。

【 0 0 8 1 】

9)トランスフェクトされていない細胞が、ブランクコントロールとして使用され、PEAが標準曲線を描く場合の標準として使用された(Kirman JR, Seder RA. DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory? Curr Opin Immunol, 2003, 15: 47 10
1-476)。

【 0 0 8 2 】

1.9 真核生物で発現したB7-1-PE40KDELの選択的細胞障害性の解析

CD28を高発現するヒトリンパ腫細胞系のJurkat細胞とpcDNA3.1/B7-1-PE40KDELで安定的にトランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40陽性細胞は、96ウェルプレートで濃度 1×10^5 /ml、37、5%CO₂で48時間、共培養された。それから20μlのMTSが添加され；1時間後、490nmでの吸光度値が測定され、細胞障害活性が算出された。CD28を低発現するヒトBurkitt'sリンパ腫細胞系Rajiがネガティブコントロールとして使用された。細胞死率は以下のように算出された：

細胞死率=(1 - 安定的にトランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40細胞と標的細胞との共培養ウェル中での生存細胞数 / トランスフェクトされていないCHO-K1-RPE.40細胞と標的細胞との共培養ウェル中での生存細胞数) × 100% 20

【 0 0 8 3 】

2. 結果

2.1 真核生物発現ベクター-pcDNA3.1/B7-1-PE40KDELの構築

B7-1-PE40KDEL融合遺伝子を真核生物細胞中で発現させるために、B7-1-PE40KDELおよびZeo(+)遺伝子を含む真核生物発現ベクター-pcDNA3.1/B7-1-PE40KDELが、図1に示すように構築された。設計されたPCRプライマーが、ヒトB7-1-PE40KDELを増幅するために使用され、アガロースゲル電気泳動により分析された。予測される1,850bpの明確なバンドが観察された(図2)。回収された二重消化産物は、真核生物発現ベクター-pcDNA3.1/Zeo(+)のKpnI およびXbaI制限酵素認識部位にクローニングされ、組み換えプラスミドpcDNA3.1/B7-1-PE40KDELが構築され、要請クローンを得るために、その後、抽出され、電気泳動され(図3) 30
、配列決定によりスクリーニングされた(図4.配列は別添1に示されている)。配列決定の結果、シグナルペプチド配列に続く配列中には、いかなる点突然変異もフレームシフトも存在しないことが明らかとなり、原核生物発現プラスミドpRSETA-B7-1-PE40KDELの配列と一致していた。B7-1-PE40KDEL、ヒトB7-1およびPE40間の蛋白の一次構造および二次構造の比較結果は表1に示されている。

【表 1】

表 1: B7-1-PE40KDEL 融合蛋白、B7-1 および
PE40 間の蛋白の一次構造および二次構造の比較

構造	B7-1-PE40 KDEL	
	一次構造	二次構造
B7-1-208 (1-208aa)	25aa ロイシン→プロリン 156aa ヒスチジン→アルギニン	変更なし
Link-19 (209-227aa)		
PE40-360 (228-587aa)	247aa フェニルアラニン→セリン 397aa バリン→イソロイシン	変更なし 変更なし

10

【 0 0 8 4 】

2.2 真核生物細胞からのB7-1-PE40KDEL外毒素融合遺伝子の発現解析

正しい配列を有する真核生物発現ベクター-pcDNA3.1/B7-1-PE40KDELは、CHO-K1-RPE.40細胞に一過性のトランスフェクトをされ、発現されたB7-1-PE40KDEL融合蛋白を検出するために、以下の方法が用いられた：第一にRT-PCRがトランスフェクトされた細胞中のB7-1-PE40KDEL mRNAの発現を検出するために用いられた。pcDNA3.1/B7-1-PE40KDELでトランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40細胞には、1,850bpの明確なバンドが見られ、該明確なバンドは空のベクターでトランスフェクトされたCHO-K1-RPE.40細胞には見られなかった。β-アクチンのPCR産物が内部参照として用いられた(図4)。ウェスタンブロット解析が、細胞培養物の上澄み中のB7-1-PE40KDEL融合蛋白の抗原性と分泌発現を検出するために行われた。結果は、ウサギ抗PEA抗血清またはCD80モノクローナル抗体を用いて62-83kDaの陽性バンドが見られたが、空のベクターでトランスフェクトされた細胞ではバンドは見られなかった(図5)。

20

30

【 0 0 8 5 】

2.3 安定的にトランスフェクトされた細胞のスクリーニングとB7-1-PE40KDEL融合蛋白の発現解析

スクリーニングされた40クローンのリアルタイム半定量解析により、16クローンが陽性である事が示された。これらの陽性クローンは、その後、培養されバッチで凍結保存された(図6)。安定的にトランスフェクトされた細胞におけるB7-1-PE40KDELの分泌発現量を検出するために、いくつかの陽性クローンの細胞培養物の上澄みをサンプルとして、ELISAおよび既知の濃度のPEAを標準として用いて、蛋白濃度の標準曲線のグラフを描いた(表2、図7)。これらのサンプルからの各上澄みのOD値は、それぞれの安定的にトランスフェクトされたクローンにおける分泌量を得るために標準曲線と比較された。結果は表3に示されている。結果によると、トランスフェクション後24時間で、約287pg/mlのPEA蛋白が 1×10^6 の安定的にトランスフェクトされた細胞で発現していることが示されている。

40

【表 2】

表 2: 異なる濃度の PEA 標準物質の ELISA 検出値

PEA 濃度 (pg/ml)	OD 値
0	0.105
78.125	0.177
156.25	0.232
312.5	0.47
625	0.627
1250	1.143
2500	1.772
5000	2.477

10

【0086】

OD₄₅₀を縦座標としPEA濃度を横座標として、Curve Expert 1.3ソフトウェアを用いて標準曲線を描いた。多項近似式の標準曲線(図7)は、安定的にトランスフェクトされた細胞株の細胞培養物の上澄みからPEA濃度を算出するために用いられた。

20

【表 3】

表 3: 異なる陽性クローンにおける B7-1-PE40KDEL 融合蛋白の発現レベル

クローン No.	OD450 値	PEA 濃度 (pg/ml)
クローン 1*	0.352	268.26
クローン 2*	0.317	230.3
クローン 4	0.385	303.98
クローン 32	0.425	347.28

30

【0087】

2.4 真核生物で発現したB7-1-PE40KDELの選択的細胞障害活性

CD28を高発現するヒトリンパ腫細胞系Jurkatが、真核生物で発現したB7-1-PE40KDELの選択的細胞障害活性を検出するために用いられた。CD28を低発現するヒトBurkitt'sリンパ腫細胞系Rajiが、ネガティブコントロールとして使用された。MTTの結果によれば、安定的にトランスフェクトされた細胞とJurkat細胞と一緒にインキュベーションしてから48時間後のOD値は0.782であり、トランスフェクトされていない細胞ではOD値は1.466、Jurkat細胞単独では1.29、安定的にトランスフェクトされた細胞とRaji細胞を共培養した場合は1.296、トランスフェクトされていない細胞単独では1.564であった。前記式によれば、安定的にトランスフェクトされた細胞によるJurkat細胞とRaji細胞の細胞死の率は、92.8%と15%であり、特に、この結果により、真核生物で発現されたB7-1-PE40KDELが、CD28陽性細胞に対して、in vitroで良好な選択的阻害効果を有することが確認された(図8)。

40

【0088】

例2: B7-1-PE40KDELのDNAワクチン(1)によるaGVHDに対する保護

1. 材料および方法

1.1 プラスミド、細胞および主な試薬

真核生物発現ベクター-pcDNA3.1/B7-1-PE40KDELが、我々のグループにより構築された。

50

この真核生物現ベクターは、以前にDr. Hong Xueにより構築され保存されていたものである。ウサギ抗シュードモナス (Pseudomonas) 外毒素Aポリクローナル抗体は、Sigma Incから購入された。FITC-抗マウスCD3抗体、PE-抗マウスCD28抗体およびPharmlyse™は、BD Incから購入された。SYBR^(R)Premix Ex Taq™ (perfect real-time)は、TaKaRa Bio. Incから購入された。注射用のMTXは、Jiangsu Hengrui Medicine Co., Ltd.から購入され、シクロスポリンAは、Novartis Pharma Schweiz AGから購入された。マウスリンパ球分離溶液Tianjin Hao Yang Biological Products Co. Ltdから購入された。

【0089】

ドナー雄マウスC57BL/6(H2b)およびレシピエント雌マウスBalb/c(H2d)は、特別の病原体フリーの環境に収容され、実験の当初の体重は16-18gおよび18-22gであった。すべての実験動物は、Animal Center of the Academy of Military Medical Sciencesにより提供され、飼育条件は、特定の病原体フリー (SPF) レベルであった。Department of Pathology at the Affiliated Hospital of the Academy of Military Medical Sciencesが、病理学的サンプルの準備および観察を補助した。フローサイトメトリー解析は、Institute of Radiation Medicine of the Academy of Military Medical Sciencesにより行われた。リアルタイム定量PCR解析は、Affiliated Hospital of the Academy of Military Medical Sciencesの血液センターで行われた。

【0090】

1.2 主要な機器

in vivo遺伝子導入器具WJ2002(Scientz Biotechnology Co. Ltd.)および自動マイクロプレート読取り機550(Bio-Rad Laboratories, Inc.)が我々の研究で使用された。

【0091】

1.3 aGVHDマウスモデルの樹立

レシピエントマウスには、感染を防ぐために、移植の一週間前にゲンタマイシン(32×10⁴U/L)およびエリスロマイシン(250mg/L)を含む飲料水が与えられ、滅菌されたクリーンベンチ (laminar airflow cabinet) 内で飼育された。60Coの全身照射(TBI)(8.0Gy、線量率は1.8Gy/分)が、移植の4時間前に施された。

【0092】

ドナー骨髄細胞および脾臓細胞の調製は以下のように行われた：C57BL/6ドナーマウスは、頸椎脱臼により屠殺され、その後、75%エタノールに数分間漬けられた。大腿骨は、無菌的に外科用鋏により得られ、RPMI-1640培養培地が骨髄を骨髄腔から流し出すために使用され、その後、200メッシュの細胞篩を通して移動された。次に、0.83%塩化アンモニウム溶液が赤血球を洗浄するために用いられ、続けて、RPMI-1640培養培地で2回洗浄した(1000rpm、10分間)。これにより骨髄細胞の単一細胞の懸濁液が得られた。それから細胞濃度が1×10⁸/mlに調整された。加えて、脾臓が無菌的に取り除かれ、200メッシュの細胞篩の上に置かれた。細胞が遠心処理により収集された後、0.83%NH₄Cl溶液が赤血球を洗浄するために用いられ、その後、RPMI-1640培養培地で2回洗浄された(1000rpm、10分間)。得られた脾臓細胞の単一細胞懸濁液は、その後、細胞濃度1×10⁸/mlに調整された。

【0093】

調製された脾臓細胞および骨髄細胞は、尾部静脈注射により、全グループのレシピエントマウスに注入された。注入された細胞の数は、2×10⁷脾臓細胞/マウスおよび1×10⁷骨髄細胞/マウスであった。安定的なaGVHDマウスモデルの樹立は、移植後の、身体的な徴候、造血再生の評価、病理学的解析およびキメリズム解析により確認された。

【0094】

1.4 aGVHDマウスにおけるB7-1-PE40KDEL DNAワクチンによるaGVHDに対する保護のプロトコール

60匹のaGVHDマウスが、ランダムに、各グループがマウス10匹からなる6グループに分けられた：(1)B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループ；(2)B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループ；(3)B7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループ；(4)空のベクターグループ；(5)CsA+MTXポジティブコントロールグループ；および(6)非処置aGVHDグループ。空のベ

クターおよびDNAワクチンベクターの双方は、生理食塩水に溶解された。プラスミドベクターのRNAのコンタミネーションはなかった。内毒素が除去された。超螺旋性DNAがDNAの70%-80%を占めていた。OD₂₆₀/OD₂₈₀率は1.8-2.0の範囲であった。濃度は0.5 μg/μlを下回らなかった。予備実験によれば、75 μgのB7-1-PE40KDEL DNAワクチンが注入されたとき、aGVHDに対する保護は副作用がほとんどなく良好であった。移植後ただちに、75 μgの空のベクターまたはDNAワクチンベクターが、マウスの四頭筋に注射され、遺伝子を効率よく体へ送達するために、注射部位に電気パルス伸介刺激が与えられた。パルスのパラメーターは以下のとおりである：電圧、200V/cm；パルス幅、10ms；パルス数、6；周波数、1Hz (Mir LM, Bureau MF, Gehl J, et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96: 4262-4267)。「金基準」であるCsA+MTX養生法は、臨床診療ではよく用いられているが、コントロール薬物として採用された。CsAは、腹腔内注射により1日1回1.5mg/kg.dの用量で投与された。MTXは、腹腔内注射により、1、3、6および11日に0.4mg/kg.dの用量で投与された (Xu K, Li C, Pan X, et al. Study of Relieving Graft-versus-Host Disease by Blocking CD137-CD137 Ligand Costimulatory Pathway in Vitro. Int J Hematol, 2007, 86:84-90.)。

10

【0095】

1.5 標準マウスにおけるB7-1-PE40 KDEL DNAワクチンの発現

電気パルス伸介筋肉内注射が、75 μgの精製されたB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの、標準Balb/Cマウスの四頭筋への注射に使用され、電気刺激が与えられた(200V/cm、10ms、1Hz、6パルス)。1、7、14、21、28、および35日目に、注射後、血液を採集するために眼球が除去され、ヘパリンで処理された。トリゾール (TRIzol) キットが、RNAを抽出するために使用され、RT-PCRが、B7-1-PE40KDEL mRNAの発現を定性的に検出するために使用された。リアルタイム定量PCRが、さらにPE40 mRNAの血液発現レベルを比較するために使用された。-アクチンが、内部参照として使用された。

20

【0096】

RNA抽出は以下のように行われた：マウスリンパ球分離溶液がマウスの末梢血(約1ml)から白血球細胞を単離するために使用され、1mlのトリゾールが添加される前にPBSで2回洗浄された。単離された細胞は、室温で5分間放置され、その後200 μlのクロロフォルムが添加され、振とうにより十分に混合された。層別化の後、混合物は4 および12,000gで15分間遠心処理された。上層の水性層は、他のチューブに移され、500 μlのイソプロパノールが添加され、十分に混合された。室温で10分間放置後、混合物は4 °Cおよび12,000gで10分間、遠心処理された。上澄みは廃棄され、RNAはチューブの底にあり、75%エタノールで洗浄後、4 および8000gで5分間遠心処理された。その後、上澄みは廃棄された。エタノールを完全に蒸発させた後、RNAは適切な量のDEPC処理水に溶解され、UV分光光度計で定量的に測定された。

30

【0097】

逆転写の反応条件は、以下のとおりである：

MgCl ₂	2 μl
10 × RNA PCRバッファ	1 μl
dNTP	1 μl
RNase阻害因子	0.25 μl
AMV	0.5 μl
オリゴdT	0.5 μl
RNA	0.5 μg
全容積	10 μl

40

【0098】

反応条件は、42 °Cで30分間、99 °Cで5分間および55 °Cで5分間である。

【0099】

マウス -アクチンプライマーの配列は：

50

上流プライマー-P1： 5' AGG CAT CCT GAC CCT GAA GTA C 3' (配列番号：10)

下流プライマー-P2： 5' TCT TCA TGA GGT AGT CTG TCA G 3' (配列番号：11)

【0100】

PCR反応は以下のように組み立てられた：

SYBR ^(R) Premix Ex Taq TM (2x)	12.5 μl
ddH ₂ O	10.5 μl
P1(20 μM)	0.5 μl
P2(20 μM)	0.5 μl
cDNA	1 μl
全容積	25 μl

10

リアルタイムPCR反応：

第1部：前変性

反復：1サイクル

95 で5分間

第2部：PCR反応

反復：35サイクル

94 で30秒

59 で30秒

72 で60秒

第3部：解離

20

【0101】

1.6 標準マウスにおけるB7-1-PE40KDEL DNAワクチンのIn vivo活性

75 μgの精製されたB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの注射後、1、7、14、21、28および35日に、マウス眼球が除去され、血液が採集されヘパリンで処理された。FITC-抗マウスCD3抗体およびPE-抗マウスCD28抗体の双方を1マイクロリットル、100 μlの抗凝固性の血液に添加し、その後、室温で、暗所で30分間インキュベートした。次に、2mlのPharmlyseTM赤血球溶解素バッファが添加され、その後、室温で、暗所で15分間インキュベートされた。混合液は、それから1500rpmで5分間遠心処理された。上澄みの廃棄後、ペレットはPBSに再懸濁され、その後、1500rpmで5分間遠心処理された。上澄みの廃棄後、0.5mlの2%パラホルムアルデヒド-PBSが検出のために添加された。

30

【0102】

1.7 B7-1-PE40KDEL DNAワクチンで処置された標準マウスにおける抗PEA抗体の検出(Chen SY, Yang AG, Chen JD, et al. Potent antitumor activity of a new class of tumor-specific killer cells. Nature, 1997, 385:78-80.)

B7-1-PE40KDEL DNAワクチンの筋肉内注射から21日後、マウス眼球が除去され、血液が採集され遠心処理され、後に使用するために血清が-20 で保存された。ELISAは以下のように実施された：PEA(1mg/mL)がコーティングバッファに溶解され、各ウェルは200ng/100 μlでコートされ、その後、4 で一晩インキュベートされた。翌日、ウェルはPBSTで2-3回洗浄され、それからウシ血清ブロッキング溶液中で、室温で2時間ブロックされた。血清サンプルおよび標準サンプル(100 μl/well)は、37 で1時間インキュベートされ、PBSTで3回洗浄された。次に、1：50,000の割合で希釈された100 μlのHRP-抗マウスIgG抗体が各ウェルに添加され、37 で1時間インキュベートされた。PBSTで4回洗浄した後、100 μlのTMB色素溶液が各ウェルに添加され、37 で15分間インキュベートされた。反応は、50 μlの2M H₂SO₄を各ウェルに添加することで終了され、吸光度値が450nmで測定された。ウサギ抗PEAポリクローナル抗体が、ポジティブコントロールとして用いられ、pcDNA3.1の空のベクターを注射したマウスの血清がネガティブコントロールとして使用された。

40

【0103】

1.8 B7-1-PE40KDEL DNAワクチンの毒性および副作用

75 μgのB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの筋肉内注射後、身体的な徴候およびマウスの行動が観察された。加えて、7、14および21日目に、B7-1-PE40KDEL DNAワクチンがマウスにお

50

いて毒性または副作用があるかに関する予備的観察を行うために、心臓、肝臓、脾臓、肺および腎臓が病理組織学的検査のために採取された。

【0104】

1.9 GVHDマウスの身体的徴候に関するB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの効果

全グループのマウスの体重が毎日測定され、毛、精神および下痢などが観察された。

【0105】

1.10 GVHDマウスにおける造血再生に関するB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの効果

事前調整の後に、20 μ lの血液が尾の静脈から採集され、通常の間隔で血球計によりカウントするために380 μ lの白血球細胞希釈液で希釈され、全グループのマウスにおける血液および造血再生の変化を理解するために使用された。

10

【0106】

1.11 GVHDマウスにおけるキメリズムに関するB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの効果

異なる性のマウスが、骨髄移植におけるドナーおよびレシピエントとして使用された。したがって、ゲノムDNAは、雌レシピエントマウスの末梢血から抽出することができ、Y染色体特異的遺伝子sryのプライマーは、移植の生着の検出のために雄ドナーマウスのY染色体をPCR増幅するために設計することができた。

【0107】

sryプライマー-1: 5' -TGTGGTCCCGTGGTGAGA-3' (配列番号12);

プライマー-2: 5' -ATCAACAGGCTGCCAATAAAA-3' (配列番号13).

【0108】

1.12 GVHDマウスの組織病理学に関するB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの効果

移植後21日目に、全グループのマウスの肝臓、脾臓、小腸および皮膚が除去され、10%ホルマリン溶液で固定され、その後、組織病理学的変化を観察するために、パラフィン切片が作成されHE染色が行われた。

20

【0109】

1.13 統計的解析

SPSS 13.0ソフトウェアが、統計的解析のために使用された。t検定が、2つのグループ間の平均測定データにおける相違の統計的有意性を検定するために用いられた。ノンパラメトリック検定(Mann-Whitney検定)が、2つのグループ間の整列されたデータの比較に用いられた。P<0.05の場合に統計的に有意と考えた。SPSS 13.0ソフトウェアは、Kaplan-Meier生存カーブを描くためにも使用された。

30

【0110】

2. 結果

2.1 標準マウスにおけるB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの発現

RT-PCRの結果(図9)は、B7-1-PE40KDEL DNAワクチンの注射後、1、7、14、21、28および35日目にB7-1-PE40KDELのmRNAが検出可能であることを示している。我々は、 β -アクチンを内部標準として使用した。

【0111】

リアルタイム定量PCR(図10)は、PE40KDEL mRNAの発現が、1および7日目に比較的高く、それから発現レベルは時間経過とともに、28および35日目の最低レベルまで徐々に減少したことを示している。

40

【0112】

2.2 標準マウスにおけるB7-1-PE40KDEL DNAワクチンのin vivo活性

B7-1-PE40KDELは、CD28を高レベルで発現している細胞を特異的に殺傷することができるので、B7-1-PE40KDEL DNAワクチンを注射したマウスの末梢血からのCD28⁺T細胞の除去を分析するために、フローサイトメトリー解析が行われ、幾何平均蛍光強度(Geo mean)として示された(図11)。結果は、B7-1-PE40KDEL DNAワクチンの筋肉内注射から7日後に、CD28⁺T除去効果が現れ始め、血液CD28⁺T細胞の幾何平均蛍光強度がコントロールの標準マウスのそれと比較して低いことを示した。注射後21日目には、CD28⁺Tの数は最低のレベルに低下した。注射後28および35日目には、CD28⁺Tの数は徐々に回復したが、CD28⁺T細胞

50

胞の幾何平均蛍光強度は、依然として標準マウスより低いままであった。この結果は、B7-1-PE40KDELの発現レベルの低下に伴い、CD3⁺CD28⁺T細胞が通常レベルに回復する傾向をみせているということを示唆している(図12)。

【0113】

2.3 B7-1-PE40KDEL DNAワクチンの筋肉内注射後のマウスにおける抗PEA抗体血清の検出
ELISAを使用して抗PEA抗体のレベルが検出された。市販の抗PEA抗体が、標準曲線を描くための標準として使用された。OD₄₅₀が横座標として使用され、抗PEA抗体濃度が縦座標として使用され、CurveExpert 1.3ソフトウェアを使用して標準曲線が描かれた(図13)。二次近似式が抗PEA抗体血清の濃度を産出するために用いられた(表4)。B7-1-PE40KDEL DN
Aワクチンを筋肉内注射したグループの抗PEA抗体レベルは、ポジティブコントロールグル
ープのそれと比較して有意に低く(p<0.05)、ネガティブコントロールグループ(すなわち
空のベクター注射グループ)のそれと比較して差異は見られなかった。

10

【表4】

表4: B7-1-PE40KDEL DNA ワクチンの
筋肉内注射後 21 目のマウスにおける抗 PEA 抗体血清レベル

グループ	吸光度値(450 nm)	濃度 (pg/ml)
pcDNA3.1/B7-1-PE40KDEL (75 μg)	0.283±0.029*	63.824±6.402 *
pcDNA3.1 グループ (ネガティブコントロール)	0.139±0.022*	49.814±1.669 *
ポジティブコントロール	0.564±0.084	312.458±3.842

20

* ポジティブコントロールとの比較を示す、P<0.05

【0114】

2.4 標準マウスにおけるB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの毒性および副作用

30

75 μgのB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの筋肉内注射後、マウスは毎日観察されたが、身体的徴候や行動における異常は見られなかった。注射後7、14および21日目に除去された心臓、肝臓、脾臓、肺および腎臓の病理組織学的検査は、いかなる病理学的変化も示さなかった。

【0115】

2.5 aGVHDマウスモデルの樹立

移植の1週間後、レシピエントマウスは、毛色の変化、気力低下、食欲の減少、腹部および頭部における重篤な脱毛、下痢、黒糞、潰瘍および円背のような、典型的なGVHD症状を示し始める(図14)。その平均体重は、ほぼ1g/dayの割合で徐々に減少し、10日目には約14.77±1.66gの低点に到達する。その後、体重は増加し始め、それから14日目以降に再び徐々に減少し始め、死に至る。全体重損失は死亡時に約8gであった(図15)。末梢血中でカウントされる白血球細胞数は、1日目から低下し始め、3~4日目に最低(0.69±0.18×10⁹/L)となった。カウント数は6日目に回復し始め、14日目にピークに達し、その後低下し続けた。白血球細胞数は、死亡時には1.54±0.14×10⁹/Lであった。移植後35日目には、雄ドナーマウスの特異的Y-染色体sry遺伝子配列を、図16に示すように371-bpの断片として、すべてのレシピエントマウスの末梢血において検出することができ、移植が成功したことを示唆した。病理学的検査により典型的なGVHDの病理学的所見が以下のように示された：
(i)腸粘膜における腺上皮細胞の壊死が小腸組織において見られ、上皮細胞および腺腔において壊死細胞の残骸が存在した；腺上皮細胞sは扁平であり、腺は嚢胞性であり、腺の数は減少し、腺は消滅し、および粘膜上皮細胞は脱落した(図17-A)；
(ii)肝臓組織にお

40

50

いて、病巣の肝臓細胞の縮退および壊死が起き、リンパ球および好酸球の浸潤が観察された(図17-B)。肝臓細胞は膨化し変質した；(iii)脾臓において、我々は、大量の出血、脾性の繊維症、脾臓洞の拡張および出血、ならびに脾臓細胞の散在を観察した(図17-C)；(iv)皮下領域において繊維組織の増殖が観察され、真皮においてリンパ球の浸潤が起こった(図17-D)。GVHDモデルグループのすべてのマウスが放射線照射後24日以内に死亡し、生存時間の中央値は22.7日であった。骨髓移植グループの平均生存時間は60日を越えており、長期生存と考えられる。脾臓細胞注入グループの生存時間の中央値は9.6日であった。放射線照射単独のグループの生存時間の中央値は12.3日であった。すべてのグループのマウスの生存率はKaplan-Meier生存曲線において描かれた(図18)。上に列挙した典型的なGVHD症状のすべてにおいて、我々は安定した急性GVHDマウスモデルが樹立されたことを確認し、成功率は100%近かった。

10

【0116】

2.6 aGVHDマウスの身体的徴候に関するB7-1-PE40KDELおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチンの効果

B7-1-PE40KDEL DNAワクチン(B7-1と呼ぶ。)、B7-2-PE40KDEL DNAワクチン(B7-2と呼ぶ。)、およびB7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチン(B7-1+B7-2と呼ぶ)による治療の後、円背および脱毛の症状は他のグループと比較してかなり改善した。組み合わせ治療グループにおける脱毛の始まる時期は、他のグループにおけるより3-6日遅かった。便中の出血や肛門周囲の膨化は見られなかった。マウスの体重減少は、B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループにおいて最も少なく、続いてCsA+MTXグループ、B7-1-PE40KDEL +B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループ、およびB7-2-PE40KDEL DNAワクチングループであった。空のベクターグループおよび未処置のGVHDグループ(NSグループ)のマウスは、最大の体重減少を示した。すべてのグループのGVHDマウスの処置後の体重変化を図19に示す。

20

【0117】

2.7 aGVHDマウスの造血再生に関するB7-1-PE40KDELおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチンの効果

すべてのグループのaGVHDマウスの末梢血におけるWBC(白血球)の数は、1日目から減少し始め、3~4日目の約 $0.6 \times 10^9/L$ の低値に至る。WBC数は、6日目に回復し始め、回復のレベルは、B7-1-PE40KDEL DNAワクチン、B7-2-PE40KDEL DNAワクチン、B7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチン、およびCsA+MTXのグループにおける方が、空のベクターグループおよび未処置グループよりも高かった。すべてのグループのうち、WBCの回復レベルは、B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループにおいて最大であった。続いて、すべてのグループにおいて、WBC数は、再び $>1.0 \times 10^9/L$ まで減少した(図20)。

30

【0118】

2.8 aGVHDマウスの組織病理学に関するB7-1-PE40KDELおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチンの効果

すべてのグループのマウスの小腸組織に関して、処置後21日目に病理学的解析が行われた(図21)。結果によれば、グループC(B7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチン)およびグループE(CsA+MTX)において、良好な腺上皮細胞の完全性と比較的少ない壊死細胞がみられることが明らかとなった。グループF(未処置のaGVHDグループ)においては、大量の粘液腺上皮細胞の壊死が見られ、粘膜上皮の脱落が最も重篤であった。皮膚の病理学的解析(図22)は、グループD(空のベクターグループ)およびグループF(未処置のaGVHDグループ)における、真皮領域における重篤な繊維組織の増殖を明らかにした。グループA(B7-1-PE40KDEL DNAワクチン)、グループB(B7-2-PE40KDEL DNAワクチン)、グループC(B7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチン)、およびグループE(CsA+MTX)においては、病変はより軽度であり、リンパ球浸潤の程度もグループDおよびFにおけるよりも低かった。肝臓の病理学的解析(図23)は、グループAのみにおいて、肝臓細胞の膨化および水腫変性の程度が比較的低いことを明らかにした。他のグループにおいては、病巣の肝臓細胞変性および壊死、リンパ球および好酸球の浸潤、ならびに重篤な肝臓細胞の膨化および変性が見られた。

40

【0119】

50

2.9 aGVHDマウスの生存時間に関するB7-1-PE40KDELおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチンの効果

7-1-PE40KDEL DNAワクチングループのマウスの生存時間は最長であり、生存時間の中央値は、51日であった。B7-2-PE40KDEL DNAワクチンおよびB7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループ、空のベクターグループ、CsA+MTXグループ、および未処置グループの生存時間の中央値は、それぞれ41、47、22.5、39.7、および21.5日であった。すべてのグループのマウスの生存率は、Kaplan-Meier生存曲線において描かれた(図24)。

【0120】

2.10 B7-1-PE40KDELおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチンによる処置後のすべてのグループのaGVHDマウスのキメリズム評価

移植後21日目に、雄ドナーマウスの特異的Y-染色体sry遺伝子が、すべての処置グループのマウスの末梢血から検出可能であり(図25)、すべてのグループにおいて移植が成功したことを示唆した。

【0121】

例3：B7-1-PE40KDEL DNAワクチンによるaGVHDに対する保護(2)

1. 材料および方法

1.1 実験動物

ドナー雄マウスC57BL/6(H2b)およびレシピエント雌マウスBalb/c(H2d)は、特定の病原体フリーの環境に収容され、実験開始時には体重は16-18gおよび18-22gであった。すべての実験動物は、Animal Center of the Academy of Military Medical Sciencesから提供され、飼育条件は特定の病原体フリー(SPF)のレベルであった。

【0122】

1.2 医薬および試薬

真核生物発現ベクターpcDNA3.1/Zeo(+)-B7-2-PE40KDELが、我々の部門において構築され保存された。真核生物発現ベクターは、第1部で述べたとおりに構築され保存された。注射用のMTXはJiangsu Hengrui Medicine Co., Ltdから購入された。シクロスポリンAはNovartis Pharma Schweiz AG.から購入された。FITC-抗マウスCD3抗体、PE-抗マウスCD28抗体、PE-Cy5-抗マウスCD8抗体、PE-Cy5-抗マウスCD4抗体、PE-抗マウスCD4抗体、およびPE-抗マウスCD25抗体は、すべてBD Incから購入された。Fluorokine MAPマウスインターフェロン(IFN)、インターロイキン(IL)-2、IL-4、IL-10、IL-12、腫瘍壊死因子(TNF)キット、およびサイトカイン検出のためのLuminex液体チップ(liquid chips)は、R&D Incにより提供された。腫瘍成長因子(TGF) およびIL-2 ELISAキットは、R&D Incにより提供された。

【0123】

1.3 aGVHDマウスモデルの樹立

レシピエントマウスには、感染を防ぐために、移植の一週間前にゲンタマイシン(32×10^4 U/L)およびエリスロマイシン(250mg/L)を含む飲料水が与えられ、滅菌されたクリーンベンチ(laminar airflow cabinet)内で飼育された。60Coの全身照射(TBI)(8.0Gy、線量率は1.8Gy/分)が、移植の4時間前に施された。

【0124】

ドナー骨髄細胞および脾臓細胞の調製は以下のように行われた：C57BL/6ドナーマウスは、頸椎脱臼により屠殺され、その後、75%エタノールに数分間漬けられた。大腿骨は、無菌的に外科用鋏により得られ、RPMI-1640培養培地が骨髄を骨髄腔から流し出すために使用され、その後、200メッシュの細胞篩を通して移動された。次に、0.83%塩化アンモニウム溶液が赤血球を洗浄するために用いられ、続けて、RPMI-1640培養培地で2回洗浄した(1000rpm、10分間)。結果として、骨髄細胞の単一細胞の懸濁液が得られた。それから細胞濃度が 1×10^8 /mlに調整された。加えて、脾臓が無菌的に取り除かれ、200メッシュの細胞篩の上に置かれた。細胞が遠心処理により収集された後、0.83% NH_4Cl 溶液が赤血球を洗浄するために用いられ、その後、RPMI-1640培養培地で2回洗浄された(1000rpm、10分間)。結果として、脾臓細胞の単一細胞懸濁液が得られ、その後、細胞濃度は 1×10^8 /mlに調

10

20

30

40

50

整された。

【 0 1 2 5 】

調製された脾臓細胞および骨髓細胞は、尾部静脈注射により、全グループのレシピエントマウスに注入された。注入された細胞の数は、 2×10^7 脾臓細胞/マウスおよび 1×10^7 骨髓細胞/マウスであった。安定的なaGVHDマウスモデルの樹立は、移植後の、身体的な徴候、造血再生の評価、病理学的解析およびキメリズム分析により確認された。

【 0 1 2 6 】

1.4 aGVHDマウスにおけるB7-1-PE40KDEL DNAワクチンによるaGVHDに対する保護プロトコル

B7-PE40KDEL DNAワクチンおよび他の処置処置の保護プロトコルは以下のとおりであった：薬剤は、すべてのグループのマウスに、移植後1日目に投与された。各グループがマウス5匹からなる6グループは以下のとおりであった：(1)B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループ；(2)B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループ；(3)B7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループ；(4)空のベクターグループ；(5)CsA+MTXコントロールグループ；(6)未処置のaGVHDグループ；および(7)標準コントロールグループ。空のベクターおよびDNAワクチンベクターの双方は、生理食塩水に溶解された。プラスミドベクターのRNAのコンタミネーションはなかった。内毒素が除去された。超螺旋性DNAがDNAの70%-80%を占めていた。OD₂₆₀/OD₂₈₀率は1.8-2.0の範囲であった。濃度は0.5 μg/μlを下回らなかった。移植後ただちに、75 μgの空のベクターまたはDNAワクチンベクターが、マウスの四頭筋に注射され、注射部位に電気パルス伸介刺激が与えられた。パルスのパラメーターは以下のとおりである：電圧、200V/cm；パルス幅、10ms；パルス数、6；周波数、1Hz。「金基準」であるCsA+MTX養生法は、臨床診療ではよく用いられているが、コントロール薬物として採用された。CsAは、腹腔内注射により1日1回1.5mg/kg.dの用量で投与された。MTXは、腹腔内注射により、1、3、6および11日に0.4mg/kg.dの用量で投与された。

【 0 1 2 7 】

1.5 Luminex液体チップ (liquid chip) によるaGVHDマウスにおける血清サイトカインの検出

移植後、7、14および21日後に、マウスの眼窩下の静脈叢から血液が吸引された。血清が遠心処理により分離された後、以下の工程が実施された。各サンプルは繰り返し検査された。

【 0 1 2 8 】

1) 実験前の以下を含む調製：
 20ミリリットルの洗浄バッファ濃縮液は500mlの洗浄バッファに希釈された；
 サンプルは4倍に希釈された：37.5 μlのRD6-40+12.5 μlのサンプル；
 標準サンプルの希釈：標準サンプルは0.9mlのRD6-40により標準カクテルに希釈され、さらに種々の濃度に希釈された；
 ミクロスフィアの希釈：50 μlのミクロスフィア濃縮液 5mlのミクロスフェア希釈液；
 ビオチン抗体の希釈：50 μlのビオチン抗体濃縮液 5mlのビオチン抗体希釈液；
 スレプトアビジンPEの希釈：55 μlのストレプトアビジン濃縮液 5.5mlの洗浄バッファ。

【 0 1 2 9 】

2) すべての試薬、標準およびサンプルは、室温で調製された。

【 0 1 3 0 】

3) 100マイクロリットルの洗浄バッファが、マイクロプレート上のメンブレンを予め湿らせるために使用され、液体は真空洗浄機により除去された。

【 0 1 3 1 】

4) 希釈されたミクロスフィアは、シェイカーの穏やかな振とうにより再懸濁され、50 μlのミクロスフィアが各ウェルに添加された。

【 0 1 3 2 】

5) 各ウェルに50 μlの標準サンプルが添加された後、ウェルは密閉され、続いて、室温

、暗所で(アルミフォイルでカバーして)3時間インキュベーションした。

【0133】

6)液体は真空洗浄機により除去され、プレートは3回100 μ lの洗浄バッファで洗浄された。

【0134】

7)50 μ lのビオチン抗体の希釈混合液の添加後、ウェルはメンブレンで密閉され、続けて、500 \pm 50rpmで振とうしつつ、室温、暗所で(アルミフォイルでカバーして)1時間インキュベーションした。

【0135】

8)プレートは、6)に記載されているように3回洗浄された。

10

【0136】

9)50 μ lのストレプトアビジンPEが各ウェルに添加された後、ウェルはメンブレンで密閉され、続いて、500 \pm 50rpmで振とうしつつ、室温、暗所で(アルミフォイルでカバーして)0.5時間インキュベートされた。

【0137】

10)プレートは6)に記載されたように3回洗浄された。

【0138】

11)100 μ lの洗浄バッファが、細胞を際懸濁するために各ウェルに添加された後、プレートは室温で2時間、500 \pm 50rpmで振とうされた。

【0139】

20

12)解析はLuminexTM100装置により90分間行われた。

【0140】

1.6 ELISAキットによるaGVHDマウス中の血清サイトカインの検出

適合するマウスTGF β LuminexキットおよびELISAキットが存在しないため、我々は、ヒトTGF β とマウスTGF β が高い相同性を有するという事実を考慮して、ヒトTGF β ELISAキットを代替試薬として用いた。血清IL-2濃度を決定することは困難である。しかし、T細胞が活性化するとIL-2はその受容体に(、およびサブユニットに)結合し、サブユニットは細胞表面から脱落し、血清中で検出可能となり、可溶性IL-2受容体(sIL-2R)と呼ばれる。したがって、ELISAキットはマウスにおけるsIL-2Rの再検出に使用できる。

【0141】

30

マウスにおける血清sIL-2RおよびヒトTGF β の検出方法は以下のとおりである：

1)室温に予備的に平衡させた後、必要とされるプレートは密閉バッグから取り出された。

【0142】

2)1つのウェルは空のまま残しておき、サンプル(1:1希釈)および異なる濃度の標準サンプル(100 μ l/well)が他のウェルに添加された。ウェルはその後プレートカバーで密閉され、インキュベーターで37 $^{\circ}$ Cで90分間インキュベートされた。

【0143】

3)プレートは4回洗浄された。空のウェルを除き、ビオチン抗体使用溶液(100 μ l/well)が各ウェルに添加された。ウェルはその後プレートカバーで密閉され、インキュベーターで37 $^{\circ}$ Cで60分間インキュベートされた。

40

【0144】

4)プレートは4回洗浄された。空のウェルを除いて酵素結合(enzyme-conjugating)使用溶液(100 μ l/well)が添加された。ウェルはその後プレートカバーで密閉され、インキュベーターで37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートされた。

【0145】

5)プレートは4回洗浄された。色素物質(chromogenic agent)(100 μ l/well)が添加され、プレートはインキュベーターで37 $^{\circ}$ C、暗所で10-15分間インキュベートされた。

【0146】

6)停止溶液(100 μ l/well)が添加され、ウェルはよく混合され、OD₄₅₀値はすぐに(5分

50

以内)測定された。

【0147】

結果の解釈；

CurveExpert 1.3ソフトウェアが、標準曲線を描くために用いられた。標準曲線のグラフを描く際に、標準サンプルの濃度が横座標として用いられ、OD値が縦座標として用いられた。サンプルの濃度はそのOD値を用い標準曲線上で決定することができる。サンプルのOD値が標準曲線の上限よりも高いときは、サンプルは再測定のために適切に希釈される。希釈倍率はその後サンプル濃度を算出する間に増大される。

【0148】

1.7 aGVHDマウスにおける末梢血中T細胞亜集団の解析

10

移植から2週間後、末梢血が吸引されヘパリンナトリウムで処理された。その後、FITC-抗マウスCD3抗体、PE-抗マウスCD28抗体、PE-Cy5-抗マウスCD8抗体、PE-Cy5-抗マウスCD4抗体、PE-抗マウスCD4抗体、およびPE-抗マウスCD25モノクローナル抗体が添加された。CD4⁺/CD8⁺およびCD3⁺CD8⁺CD28⁻抑制性T細胞亜集団(Ts細胞)およびCD4⁺CD25⁺制御性T細胞亜集団(Treg細胞)における変化を検出するために、フローサイトメトリ解析が行われた。方法は以下のとおりであった：

1)1μgの対応する蛍光ラベル抗体が100μlの抗凝固性の血液に添加された後、サンプルは室温、暗所で30分間インキュベートされた。

【0149】

2)2ミリリットルのPharmlyse™赤血球溶解素バッファが添加され、続いて室温、暗所で15分間インキュベートされた。

20

【0150】

3)サンプルは1500rpmで6分間遠心処理され、上澄みの廃棄後、PBSで再懸濁され、その後1500rpmで5分間再度遠心処理された。

【0151】

4)上澄みは廃棄され、0.5mlの2%パラホルムアルデヒド/PBSが検出のために添加された。

【0152】

1.8 統計的解析

データは +sとして表現され、SPSS 13.0ソフトウェアが統計的解析に用いられた。ANOVAおよびDunnettのt-検定が、グループ間に等分散性がみられた場合の比較に用いられた。P<0.05のときに統計的に有意であると考えられる。ノンパラメトリック解析が、分散の不均一性が見られた場合に用いられた。

30

【0153】

2. 結果

2.1 B7-1-PE40KDEL DNAワクチンによる処置後のaGVHDマウスにおける血清サイトカインの変化

移植後7、14および21日目に、Luminex液体チップおよびELISA法が、すべての実験グループのマウスにおける血清サイトカインの変化を検出するために用いられた。結果は、表1に示されている。結果は、aGVHDマウスの中では、標準コントロールグループと比較して、Th1サイトカインの中で、IFN γ 、IL-2およびTNF α が有意に高く(P<0.01)、特に発病の開始の初期の段階から移植後7日の期間に高いことが明らかとなった。移植後14日までに、IFN γ レベルは徐々に減少し、21日までには、IFN γ は通常のレベルに復帰した。対照的にIL-2およびTNF α 、すなわちTh1サイトカインのうちの2つ、のレベルは、通常よりも高いまま維持された。IL-4(Th2サイトカイン)およびTGF- β (Th3サイトカイン)のレベルの変化については、実験グループと標準コントロールグループとの間で統計的な相違は見られなかった。驚くべきことに、7および14日目のaGVHDマウスにおけるIL-10(Th2サイトカイン)のレベルが、標準コントロールグループと比較して有意に高かった。利用可能な検出方法の感度のため、IL-12を検出することは困難であった。

40

【0154】

50

表5に示すように、移植後7日間は、IFN γ のようなTh1サイトカインの減少は、B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループ、B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループおよびB7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループのマウスにおいて最も有意であった($P<0.01$)。IFN γ レベルは、CsA+MTXグループにおいては、7日目においても依然として高く、aGVHDグループと比較したときにその相違は有意であった($P<0.01$)。しかし、14および21日目には、B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループと同様に、IFN γ レベルはCsA+MTXグループにおける標準に復帰した。加えて、IL-2レベルは、B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループおよびCsA+MTXグループの双方において、効果的に減少し、aGVHDコントロールグループと比較したときにその相違は有意であった($P<0.05$)。対照的に、Th1サイトカインに対する効果では、TNF α はB7-1-PE40KDEL DNAワクチングループまたはCsA+MTXグループにおいては有意でなかった。

10

【 0 1 5 5 】

表5に示すように、IL-4およびIL-10のようなTh2サイトカイン、およびTh3サイトカインであるTGF- β (これらは炎症の抑制に関わっている)に対し、Th2サイトカインIL-4に関する効果において、B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループおよびCsA+MTXグループに統計的な相違はなかった。Th2サイトカインIL-10のレベルはB7-1-PE40KDEL DNAワクチングループおよびCsA+MTXグループの双方において、効果的に増加し、aGVHDコントロールグループのレベルと比較したときに、その相違は統計的に有意であった。Th3サイトカインTGF- β に対しては、B7-1-PE40KDEL DNAワクチンのみはそのレベルを効果的に増加させ、B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループは有意な効果を示さなかった。対照的に、CsA+MTXグループはTh3サイトカインTGF- β の発現レベルがわずかに減少した。

20

【 雑 5 】

表 5: aGVHD マウスの末梢血中の Th1、Th2 および Th3 サイトカインに対する B7-1-PE40KDEL DNA ワクチンの効果

グループ	Th1, Th2 および Th3 サイトカイン (pg/ml)						
	INF- γ	TNF- α	IL-2	IL-4	IL-10	TGF- β	
標準グループ + 7 日 + 14 日 + 21 日	0 0 0	0.52 \pm 0.27 0.52 \pm 0.27 0.52 \pm 0.27	11.17 \pm 3.47 11.17 \pm 3.47 11.17 \pm 3.47	284.50 \pm 22.18 284.50 \pm 22.18 284.50 \pm 22.18	4.70 \pm 0.78 4.70 \pm 0.78 4.70 \pm 0.78	1072.55 \pm 147.85 1072.55 \pm 147.85 1072.55 \pm 147.85	
NS グループ + 7 日 + 14 日 + 21 日	1465.03 \pm 316.77 122.37 \pm 49.38 12.29 \pm 8.69	19.97 \pm 3.69 11.24 \pm 0.73 9.64 \pm 3.72	20.54 \pm 1.58 23.44 \pm 2.52 23.43 \pm 0.89	277.94 \pm 22.14 271.03 \pm 22.62 268.76 \pm 29.97	8.76 \pm 0.53 9.99 \pm 2.15 6.88 \pm 1.40	1239.27 \pm 450.30 1036.73 \pm 268.11 1378.67 \pm 541.84	
ベクターグループ + 7 日 + 14 日 + 21 日	1053.63 \pm 109.48 73.94 \pm 24.60 13.69 \pm 6.26	15.47 \pm 1.25 13.30 \pm 1.45 13.15 \pm 2.38	29.47 \pm 1.58 21.65 \pm 1.26 19.65 \pm 1.58	272.80 \pm 17.47 225.88 \pm 27.93 238.48 \pm 29.56	9.29 \pm 1.63 10.72 \pm 0.88 6.36 \pm 1.51	1080.59 \pm 275.75 1146.16 \pm 231.18 1071.19 \pm 88.58	
CsA+MTX + 7 日 + 14 日 + 21 日	1874.66 \pm 102.67 0 0	14.58 \pm 0.36 1 0.43 \pm 3.33 21.81 \pm 6.29	17.83 \pm 2.25 19.39 \pm 4.45 17.41 \pm 3.46	297.65 \pm 19.15 232.96 \pm 15.66 286.30 \pm 33.10	11.57 \pm 2.29 7.47 \pm 1.41 10.32 \pm 2.62	908.40 \pm 141.63 873.54 \pm 136.44 972.62 \pm 186.71	
B7-1-PE40KDEL + 7 日 + 14 日 + 21 日	533.10 \pm 122.13 0 0	19.61 \pm 1.06 15.58 \pm 3.22 10.43 \pm 3.33	18.31 \pm 1.58 20.09 \pm 0.95 23.44 \pm 1.90	304.99 \pm 26.43 268.46 \pm 3.60 255.04 \pm 10.23	12.40 \pm 1.88 12.29 \pm 2.51 7.47 \pm 0.28	1045.65 \pm 124.69 1601.20 \pm 484.05 1526.97 \pm 402.29	
B7-2-PE40KDEL + 7 日 + 14 日 + 21 日	602.20 \pm 101.64 14.63 \pm 7.52 0	20.08 \pm 5.27 17.86 \pm 2.13 15.72 \pm 1.97	14.04 \pm 3.12 17.19 \pm 1.90 11.39 \pm 2.52	272.86 \pm 26.22 273.75 \pm 20.84 255.88 \pm 18.82	13.03 \pm 1.68 12.08 \pm 1.33 12.50 \pm 1.33	1036.53 \pm 76.14 1205.81 \pm 122.57 1363.53 \pm 366.11	
B7-1+B7-2-PE40KDEL + 7 日 + 14 日 + 21 日	419.59 \pm 137.29 0 0	16.73 \pm 0.18 12.14 \pm 1.28 17.35 \pm 2.13	15.85 \pm 8.20 3.18 \pm 5.68 21.65 \pm 1.26	261.58 \pm 18.46 257.22 \pm 10.24 247.09 \pm 15.32	11.97 \pm 0.63 10.75 \pm 3.21 9.49 \pm 0.29	1322.33 \pm 245.55 1256.07 \pm 368.46 847.32 \pm 155.79	

10

20

30

40

【 0 1 5 6 】

2.2 B7-1-PE40KDEL DNA ワクチンによる処置後の aGVHD マウス中の末梢血 T 細胞亜集団の変化

50

移植の2週間後、3種のT細胞亜集団(すなわちCD4⁺/CD8⁺、CD4⁺CD25⁺TregおよびCD8⁺CD28⁻Ts亜集団)を検出するために、フローサイトメトリー解析が行われた。結果および代表写真が図26-31および表6に示されている。

【 0 1 5 7 】

結果は、標準グループにおいては、CD4/CD8率は約3.2であり、放射線照射および移植後のaGVHDマウスにおける場合と大きく逆転していた。放射線照射および移植後のaGVHDマウスを標準グループと比較すると、CD3⁺CD8⁺T細胞の割合が有意に増加し、その一方でCD3⁺CD4⁺の割合は有意に減少していた。B7-1-PE40KDEL DNAワクチンおよびB7-2-PE40KDEL DNAワクチン、B7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチン、ならびにCsA+MTX処置は、CD4/CD8の割合を有意に逆転させるものではなかった(図26-27および表6)。

10

【 0 1 5 8 】

特定のT細胞亜集団がB7-1-PE40KDEL DNAワクチングループおよびCsA+MTXグループにおける免疫調節に関わっているか否かを決定するために、我々は、各グループおよびコントロールグループにおけるCD4⁺リンパ球間のCD4⁺CD25⁺Treg集団の変化を比較した(図28-29および表5)。結果は、CD4⁺CD25⁺Treg集団は、B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループおよびB7-1-PE40KDEL+B7-1-PE40KDEL DNAワクチングループにおいて、空のベクターグループおよびNSコントロールグループにおけると比較して、有意に高いことを示した(P<0.01およびP<0.05)。CD4⁺CD25⁺Treg集団は、B7-2-PE40KDEL DNAワクチングループにおいても、空のベクターグループおよびNSコントロールグループにおけると比較して高かった(P<0.05)が、B7-2-PE40KDEL DNAワクチンの効果はB7-1-PE40KDEL DNAワクチンの効果よりも弱かった。

20

【 0 1 5 9 】

加えて、我々は、他の調節性T細胞による免疫ネットワークの調節における変化を比較した(すなわち、すべてのグループにおけるCD8⁺CD28⁻Ts集団における変化)。結果は図30-31および表6に示されている。CD8⁺CD28⁻Ts集団は、B7-1-PE40KDEL DNAワクチン、B7-2-PE40KDEL DNAワクチン、B7-1-PE40KDEL+B7-2-PE40KDEL DNAワクチンおよびCsA+MTXグループにおいて、空のベクターグループおよびNSコントロールグループにおけると比較して高く、その差は有意である(P<0.01)ことが理解できる。

【表 6】

表 6: aGVHD マウスの末梢血中の CD4 ⁺ CD25 ⁺ および CD8 ⁺ CD28 ⁻ T サブグループおよび CD4/CD8 率に対する B7-1-PE40KDEL DNA ワクチンの効果			
グループ	%CD4 ⁺ CD25 ⁺ T	%CD8 ⁺ CD28 ⁻ T	CD4/CD8 率
標準グループ			
+ 7 日	1.53±0.60	14.46±1.50	3.25±0.84
+ 14 日	1.53±0.60	14.46±1.50	3.25±0.84
+ 21 日	1.53±0.60	14.46±1.50	3.25±0.84
NS グループ			
+ 7 日	2.04±1.05	0.89±0.94	0.31±0.02
+ 14 日	1.25±0.34	9.18±6.34	0.23±0.01
+ 21 日	1.32±0.40	7.25±2.18	0.42±0.09
ペクターグループ			
+ 7 日	1.38±0.59	0.69±0.12	0.31±0.01
+ 14 日	1.31±0.44	14.64±1.25	0.21±0.04
+ 21 日	1.32±0.43	5.66±2.53	0.42±0.07
CsA+MTX			
+ 7 日	1.55±1.06	1.71±0.66	0.27±0.04
+ 14 日	1.27±0.27	14.39±1.71	0.24±0.03
+ 21 日	1.38±1.05	6.33±2.93	0.45±0.04
B7-1-PE40KDEL			
+ 7 日	1.73±0.72	2.01±0.24	0.34±0.04
+ 14 日	2.22±0.50	18.76±6.21	0.19±0.02
+ 21 日	4.88±4.18	5.71±1.01	0.44±0.11
B7-2-PE40KDEL			
+ 7 日	1.11±0.51	2.55±0.64	0.27±0.03
+ 14 日	1.93±1.21	22.67±6.74	0.20±0.03
+ 21 日	1.39±0.36	9.54±2.94	0.39±0.02
B7-1+B7-2-PE40KDEL			
+ 7 日	2.59±2.04	2.51±0.34	0.27±0.01
+ 14 日	1.94±0.14	20.20±5.44	0.20±0.01
+ 21 日	1.96±0.11	6.41±3.00	0.29±0.05

10

20

30

40

【0160】

本発明の実施形態は詳細に記載されており、当業者により理解可能である。発行された文献にしたがって、詳細は変更または置換可能である。これらの変更は本発明の保護の範囲内である。本発明の全範囲は、添付したクレームおよびその均等物によって与えられる。

【 図 1 】

図 1

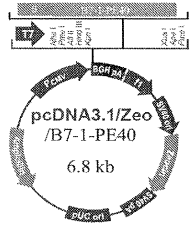


Fig. 1

【 図 4 】

図 4

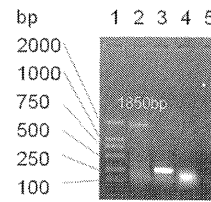


Fig. 4

【 図 2 】

図 2

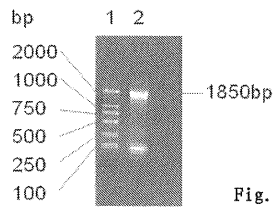


Fig. 2

【 図 5 】

図 5

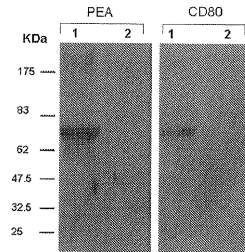


Fig. 5

【 図 3 】

図 3

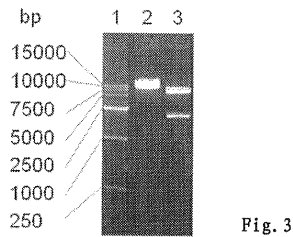


Fig. 3

【 図 6 A 】

図 6(A)

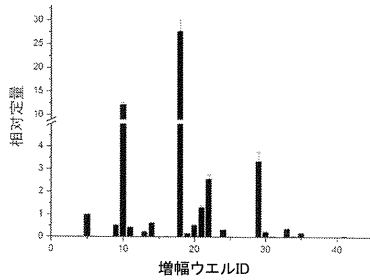


Fig. 6 (A)

【 図 6 C 】

図 6(C)

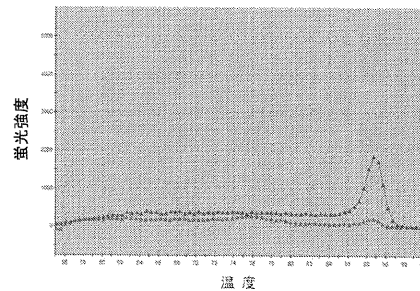


Fig. 6 (C)

【 図 6 B 】

図 6(B)

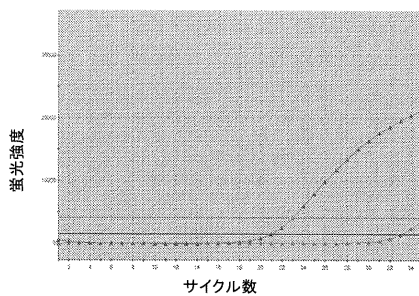


Fig. 6 (B)

【 図 7 】

図 7

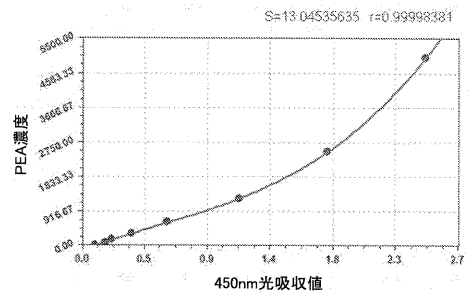


Fig. 7

【 図 8 】

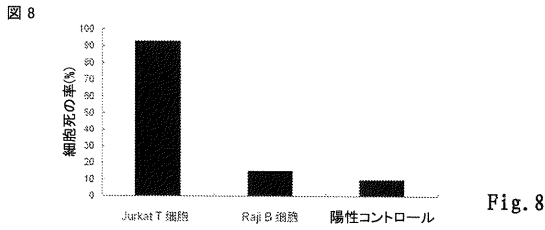


Fig. 8

【 図 9 】

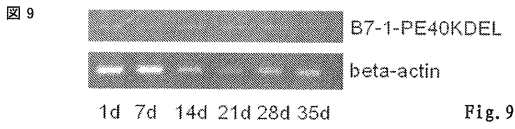


Fig. 9

【 図 10 】

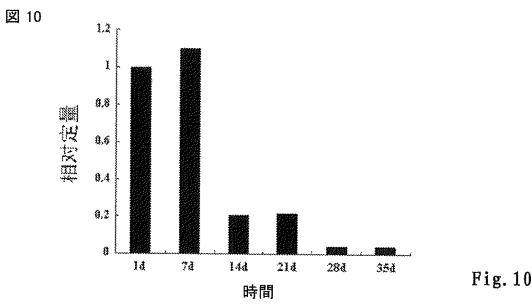


Fig. 10

【 図 11 A 】

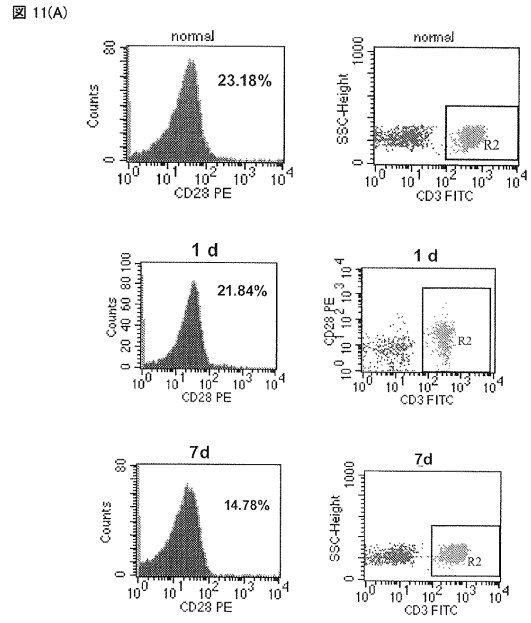


Fig. 11 (A)

【 図 11 B 】

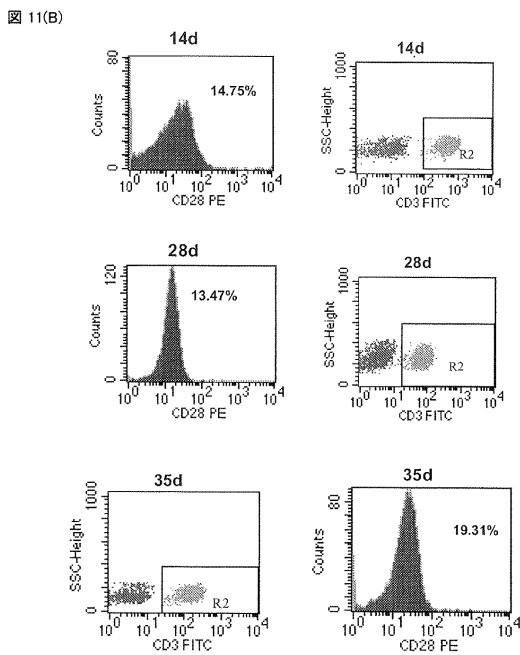


Fig. 11 (B)

【 図 12 】

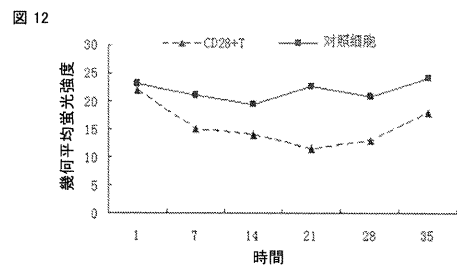


Fig. 12

【 図 13 】

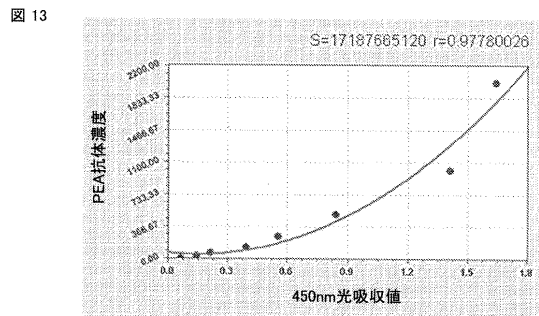
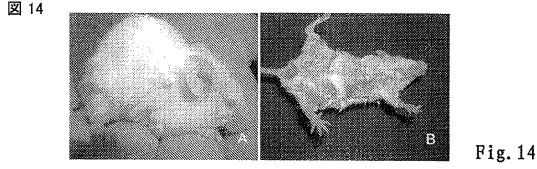
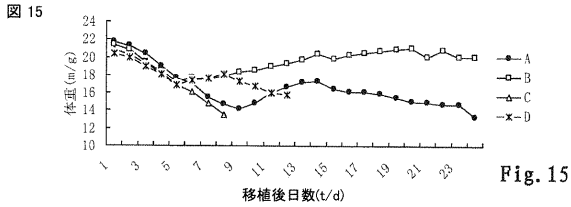


Fig. 13

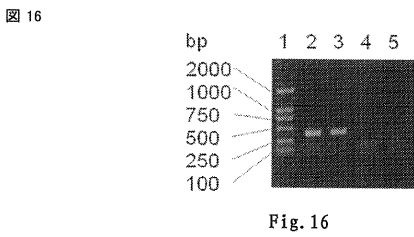
【 図 1 4 】



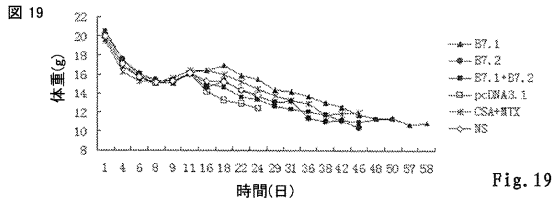
【 図 1 5 】



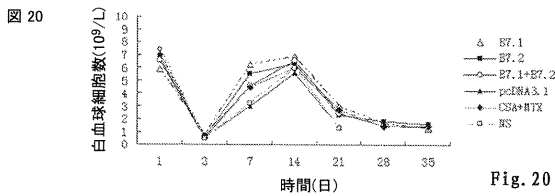
【 図 1 6 】



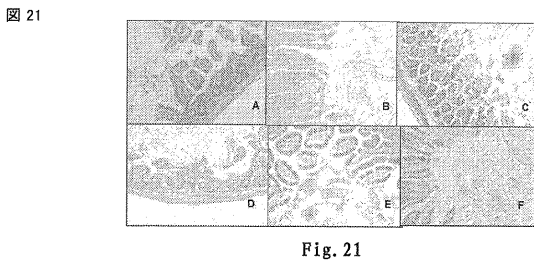
【 図 1 9 】



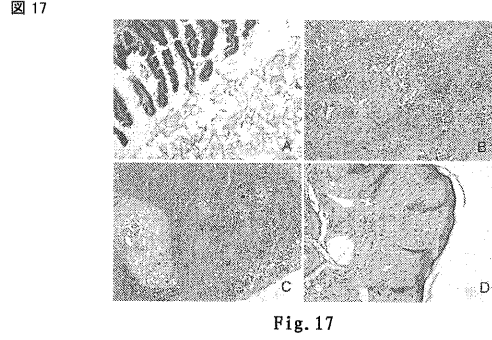
【 図 2 0 】



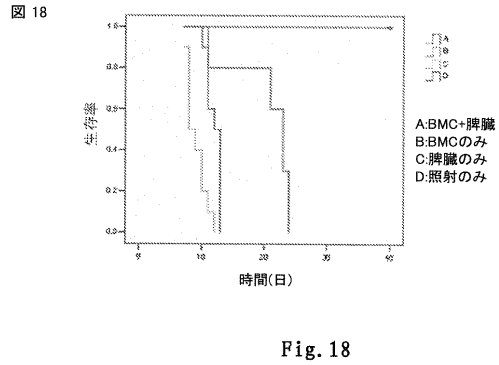
【 図 2 1 】



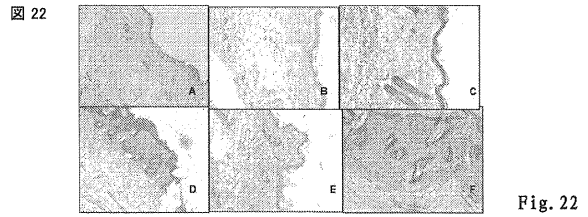
【 図 1 7 】



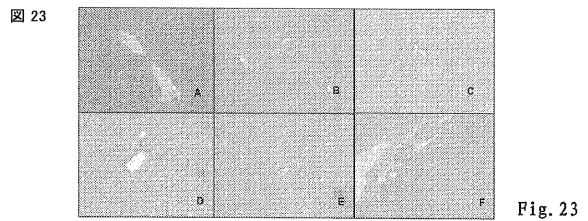
【 図 1 8 】



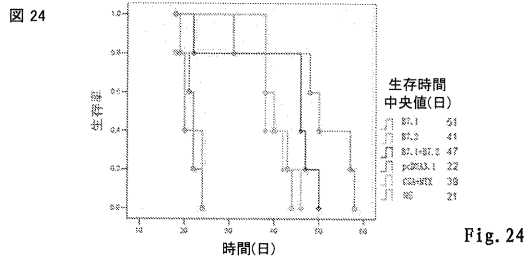
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 2 5 】

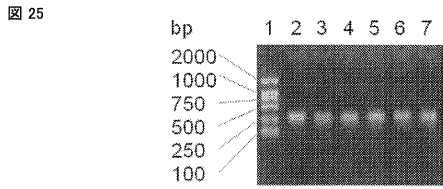


Fig. 25

【 2 6 】

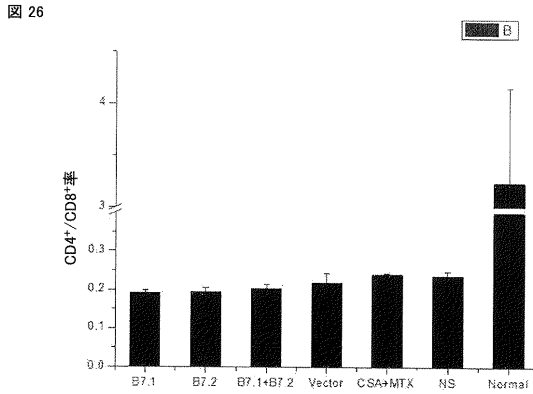


Fig. 26

【 2 7 A 】

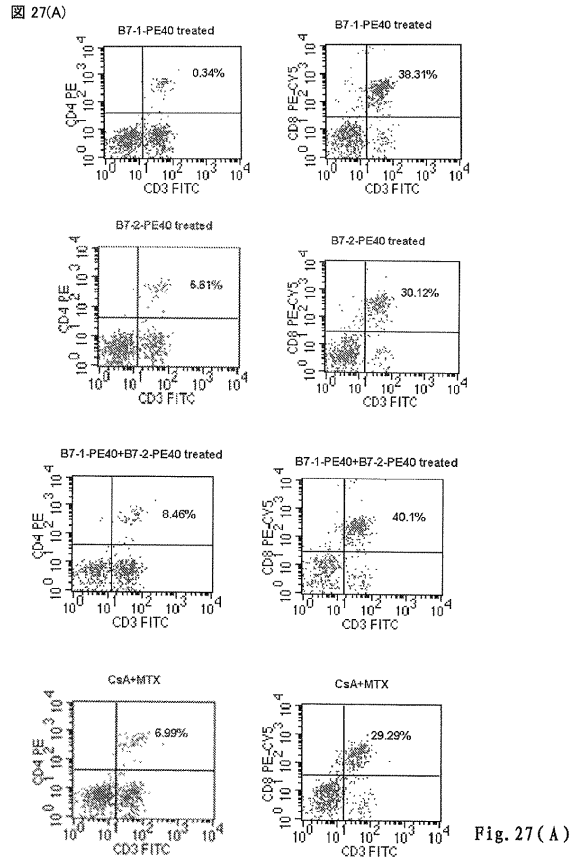


Fig. 27 (A)

【 2 7 B 】

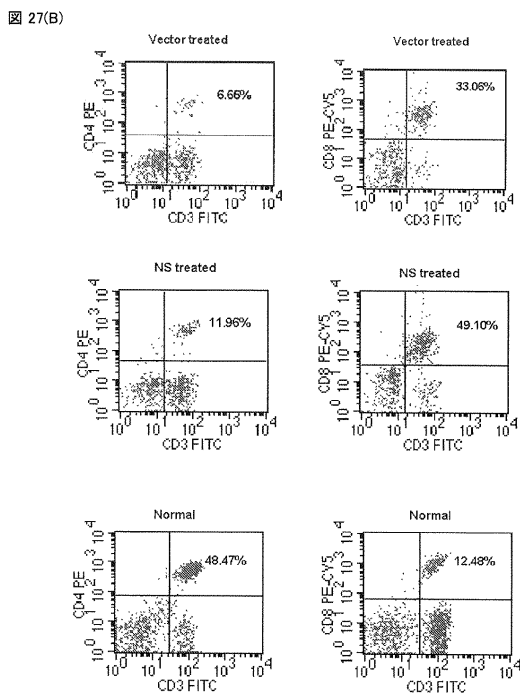


Fig. 27 (B)

【 2 8 】

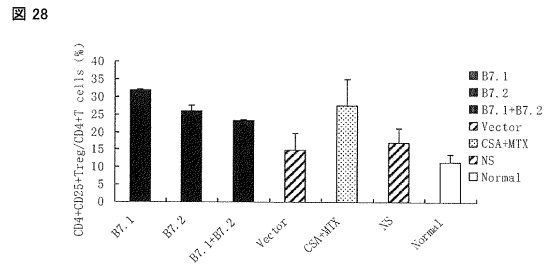


Fig. 28

【 図 29 】

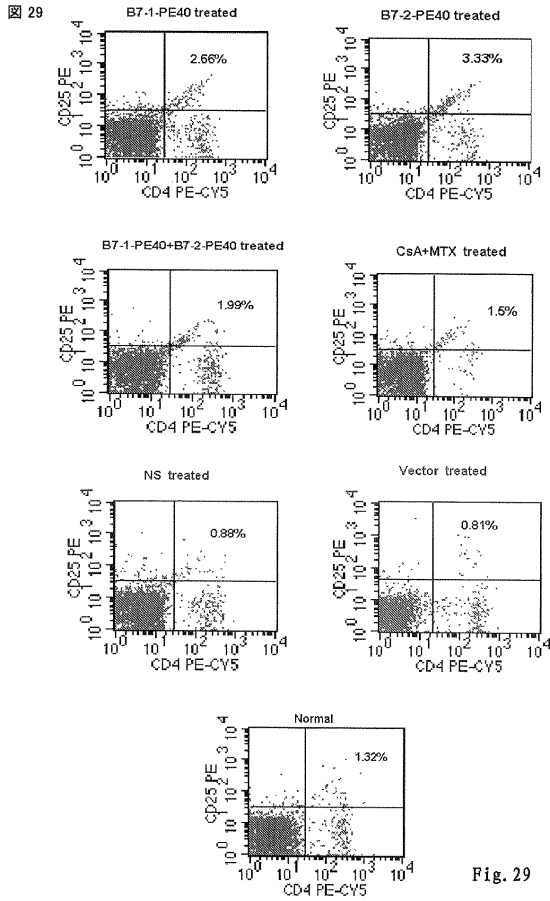


Fig. 29

【 図 30 】

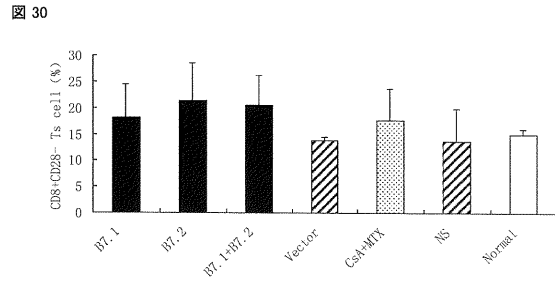


Fig. 30

【 図 31 】

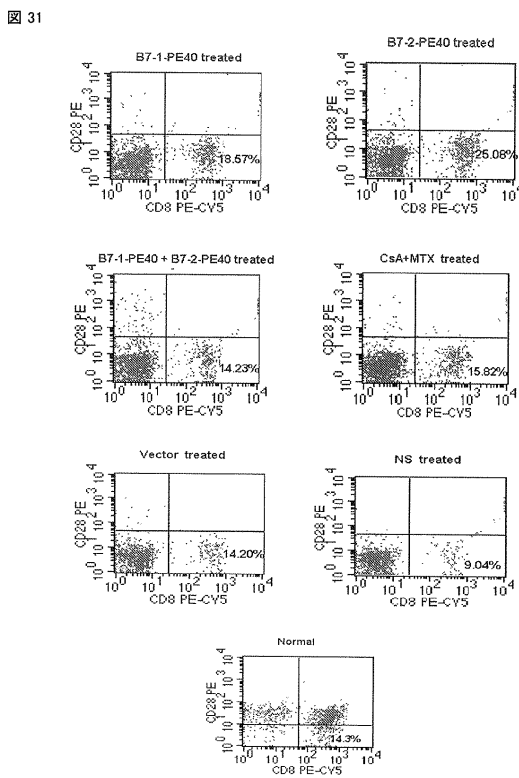


Fig. 31

【配列表】

2014505473000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/079862**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purposes of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/079862**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10 relate to a method for the treatment of disease in the human or animal body.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2011/079862
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See the extra sheet		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC: C12N, C07K, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
Data bases: CPRSABS, CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE (BIOSIS, EMBASE, MEDLINE), CNKI, Genbank+EMBL+DDBJ		
Search terms: exotosin, ectotoxin, exogenous toxin, exotoxin, fusion protein, B7-1-PE40KDEL, search for SEQ ID NO: 1-3		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 102161998 A (AFFILIATED HOSPITAL OF THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES), 24 August 2011 (24.08.2011), see claims 1-10	1-9, 11
A	CN 101824424 A (AFFILIATED HOSPITAL OF THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES), 08 September 2010 (08.09.2010), see claims 1-10	1-9, 11
A	CN 101343328 A (BEIJING BO'AOTAI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.), 14 January 2009 (14.01.2009), see the whole document	1-9, 11
A	WO 2004110390 A2 (IMMUNOMEDICS INC.), 23 December 2004 (23.12.2004), see the whole document	1-9, 11
A	WO 2006056464 A2 (PIERIS PROTEOLAB AG et al.), 01 June 2006 (01.06.2006), see the whole document	1-9, 11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 14 December 2011 (14.12.2011)	Date of mailing of the international search report 29 December 2011 (29.12.2011)	
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer XING, Yunlong Telephone No.: (86-10) 62411094	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/079862

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG, Huili et al., The Prediction of the Molecular Biology Characteristics of Recombinant Fusion Exotoxin B7-1-Linker-PE40 and B7-2-Linker-PE40, JOURNAL OF EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, ISSN: 1009-2137, vol. 9, no. 4, pages 327-332, 31 December 2001 (31.12.2001), see the whole document	1-9, 11
A	HU, Xiaomei et al., Research advances in Pseudomonas aeruginosa exotoxin A gene expression, PROGRESS IN MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY, ISSN: 1005-5673, vol. 32, no. 3, pages 73-75, 31 December 2004 (31.12.2004), see the whole document	1-9, 11
A	LIAO, C.W. et al., Fusion protein vaccine by domains of bacterial exotoxin linked with a tumor antigen generates potent immunologic responses and antitumor effects, CANCER RESEARCH, vol. 65, no. 19, pages 9089-9098, 01 October 2005 (01.10.2005), see the whole document	1-9, 11
A	JOSHI, B.H. et al., Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and Pseudomonas exotoxin in Escherichia coli, PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, vol. 39, no. 2, pages 189-198, 28 February 2005 (28.02.2005), see the whole document	1-9, 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2011/079862

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102161998 A	24.08.2011	None	
CN 101824424 A	08.09.2010	None	
CN 101343328 A	14.01.2009	WO 2010022639 A1	04.03.2010
WO 2004110390 A2	23.12.2004	US 2004219203 A1	04.11.2004
		EP 1644729 A2	12.04.2006
		AU 2004247270 A1	23.12.2004
		JP 2007523857 A	23.08.2007
		INCHENP 200600178 E	29.06.2007
		INCHENP 200906457 E	05.03.2010
		US 7829064 B2	09.11.2010
		AU 2004247270 B2	02.12.2010
		IN 242335 B	27.08.2010
		WO 2006056464 A2	01.06.2006
US 2009042785 A1	12.02.2009		
US 7892827 B2	22.02.2011		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/079862

CONTINUATION OF BOX A:

IPC:

C12N 15/62 (2006.01) i

C12N 15/79 (2006.01) i

C07K 19/00 (2006.01) i

A61K 48/00 (2006.01) i

A61P 37/06 (2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2011/079862
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC:C12N,C07K,A61K,A61P		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
数据库: CPRSABS,CNABS, DWPI,SIPOABS, CNTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, ISI WEB OF KNOWLEDGE (BIOSIS, EMBASE, MEDLINE), CNKI, Genbank+EMBL+DDBJ		
检索词: 外毒素, 融合蛋白, exotosin, ectotoxin, exogenous toxin, exotoxin, fusion protein, B7-1-PE40KDEL, 对 SEQ ID NO: 1-3 的检索		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN102161998A (中国人民解放军军事医学科学院附属医院), 24.08 月 2011 (24.08.2011), 参见权利要求 1-10	1-9,11
A	CN101824424A (中国人民解放军军事医学科学院附属医院), 08.09 月 2010(08.09.2010), 参见权利要求 1-10	1-9,11
A	CN101343328A (北京博翱泰生物技术有限公司), 14.01 月 2009 (14.01.2009), 参见全文	1-9,11
A	WO2004110390A2 (IMMUNOMEDICS INC), 23.12 月 2004 (23.12.2004), 参见全文	1-9,11
A	WO2006056464A2 (PIERIS PROTEOLAB AG 等), 01.06 月 2006 (01.06.2006), 参见全文	1-9,11
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)		"&" 同族专利的文件
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件		
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		
国际检索实际完成的日期 14. 12 月 2011(14.12.2011)	国际检索报告邮寄日期 29.12 月 2011 (29.12.2011)	
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	授权官员 邢云龙 电话号码: (86-10) 62411094	

国际检索报告

国际申请号 PCT/CN2011/079862

C(续). 相关文件		
类型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	张惠丽等人, “B7-PE40 新型重组融合外毒素的分子生物学特性预测”, 中国实验血液学杂志, ISSN: 1009-2137, 第 9 卷, 第 4 期, 327-332 页, 31.12 月 2001 (31.12.2001), 参见全文	1-9,11
A	胡晓梅等人, “铜绿假单胞菌外毒素 A 基因表达的研究进展”, 微生物学免疫学进展, ISSN: 1005-5673, 第 32 卷, 第 3 期, 73-75 页, 31.12 月 2004(31.12.2004), 参见全文	1-9,11
A	Liao, CW 等人, “Fusion protein vaccine by domains of bacterial exotoxin linked with a tumor antigen generates potent immunologic responses and antitumor effects”, CANCER RESEARCH, 第 65 卷, 第 19 期, 9089-9098 页, 01.10 月 2005(01.10.2005), 参见全文	1-9,11
A	Joshi, BH 等人, “Optimization of expression and purification of two biologically active chimeric fusion proteins that consist of human interleukin-13 and Pseudomonas exotoxin in Escherichia coli”, PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, 第 39 卷, 第 2 期, 189-198 页, 28.02 月 2005(28.02.2005), 参见全文	1-9,11

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2011/079862

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1、关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是在下列基础上进行的:

a. 序列表的提交或提供

 纸件形式 电子形式

b. 提交或提供时间

 包含在申请提交时的国际申请中 以电子形式与国际申请一起提交 为检索之用随后提交本单位

2、 另外,在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下,提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2011/079862

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：10

因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
权利要求10涉及治疗人体或动物体疾病的方法。

2. 权利要求：

因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. 权利要求：

因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。

2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。

3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：

4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：

关于异议的说明： 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2011/079862

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102161998A	24.08.2011	无	
CN101824424A	08.09.2010	无	
CN101343328A	14.01.2009	WO2010022639A1	04.03.2010
WO2004110390A2	23.12.2004	US2004219203A1	04.11.2004
		EP1644729A2	12.04.2006
		AU2004247270A1	23.12.2004
		JP2007523857A	23.08.2007
		INCHENP200600178E	29.06.2007
		INCHENP200906457E	05.03.2010
		US7829064B2	09.11.2010
		AU2004247270B2	02.12.2010
		IN242335B	27.08.2010
WO2006056464A2	01.06.2006	EP1814988A2	08.08.2007
		US2009042785A1	12.02.2009
		US7892827B2	22.02.2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2011/079862

A 栏的续页:

IPC:

C12N 15/62(2006.01) i

C12N 15/79(2006.01) i

C07K 19/00(2006.01) i

A61K 48/00(2006.01) i

A61P 37/06(2006.01) i

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 9/14 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 K 9/14	
A 6 1 K 35/76 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
	A 6 1 K 35/76	

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

(74) 代理人 100088683
弁理士 中村 誠

(74) 代理人 100103034
弁理士 野河 信久

(74) 代理人 100075672
弁理士 峰 隆司

(74) 代理人 100140176
弁理士 砂川 克

(72) 発明者 シ、ヨンジ
中華人民共和国、北京市豊台区東大街8号

(72) 発明者 ルオ、ユアン
中華人民共和国、北京市豊台区東大街8号

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA03 BA31 BA38 CA04 CA20 DA02 EA04 GA13
4C076 AA12 AA29 BB11 BB13 BB14 BB15 BB16 CC07
4C085 AA03 AA38 CC21 CC40 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06
4C087 AA01 AA02 BC83 MA17 MA43 MA66 NA14 ZB08
4H045 AA11 BA10 BA41 CA11 DA83 EA31 FA74