

(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2008-522951
(P2008-522951A)

(43) 公表日 平成20年7月3日(2008.7.3)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00 Z N A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 E	4 C 0 7 6
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 H	4 C 0 8 4
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 113 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-522515 (P2007-522515)
 (86) (22) 出願日 平成17年6月23日 (2005.6.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年3月16日 (2007.3.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/022396
 (87) 国際公開番号 W02006/112869
 (87) 国際公開日 平成18年10月26日 (2006.10.26)
 (31) 優先権主張番号 60/589,052
 (32) 優先日 平成16年7月19日 (2004.7.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

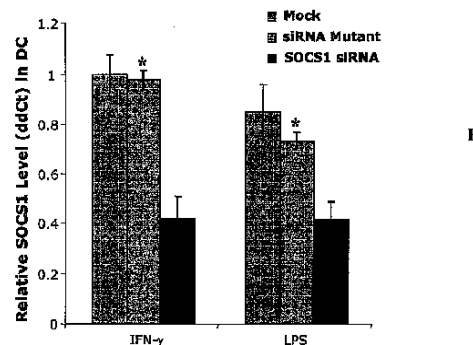
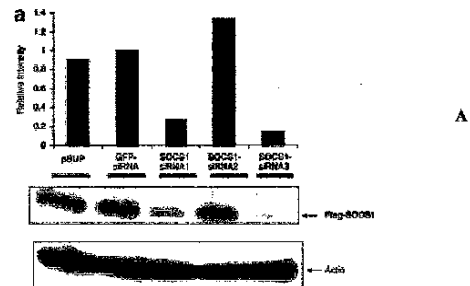
(71) 出願人 507021300
 ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン
 アメリカ合衆国テキサス州77030ヒューストン・ビーシーエム210-600デ
 イ・ワンベイラープラザ
 (74) 代理人 100060782
 弁理士 小田島 平吉
 (72) 発明者 チェン, シーイー
 アメリカ合衆国テキサス州77584ペ
 ランド・アビーウッドドライブ3923
 (72) 発明者 シェン, レイ
 アメリカ合衆国テキサス州77054ヒュ
 ーストン・アパートメント10-2イー・
 ケンブリッジストリート7900

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトカインシグナル伝達調節物質の調節および免疫療法のための応用

(57) 【要約】

本発明は、樹状細胞のような抗原提示細胞中のサイトカインシグナル伝達調節物質による抗原提示の調節に関する。本発明は、SOCS (SOCS1~7、CIS)、SHP (SHP-1およびSHP-2) 若しくはPIAS (PIAS1、PIAS3、PIASxおよびPIASy) のようなサイトカインシグナル伝達調節物質の調節による抗原提示の調節方法を提供する。本発明は、抗原提示がサイトカインシグナル伝達調節物質の調節により高められるワクチンおよび治療法を提供する。本発明はまた、自己腫瘍抗原の提示に頼る腫瘍のワクチン接種方法における自己寛容を破壊するための機構も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫細胞の免疫能を高めるための組成物であって、サイトカインシグナル伝達のサブレッサー（SOCS）、SH2含有ホスファターゼ（SHP）若しくは活性化型STATのタンパク質インヒビター（PIAS）のいずれか1種若しくはそれ以上のインヒビターを含んでなり、前記インヒビターが前記細胞中での負の調節経路を妨害する、上記組成物。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記インヒビターが、小分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA、アンチセンス核酸、リボザイム、トランスドミナントネガティブ変異体をコードする発現ベクター、細胞内抗体、ペプチドおよび小分子よりなる群から選択される、上記組成物。

10

【請求項 3】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記インヒビターが siRNA である、上記組成物。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の組成物であって、前記 siRNA が、二本鎖オリゴヌクレオチド、一本鎖オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドよりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項 5】

請求項 3 に記載の組成物であって、前記 siRNA が化学的に合成される、上記組成物。

20

【請求項 6】

生理学的に許容できる担体をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の組成物であって、前記生理学的に許容できる担体がリボソームである、上記組成物。

【請求項 8】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記インヒビターが、発現ベクターにクローン化された単離されたポリヌクレオチドによりコードされる、上記組成物。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の組成物であって、前記発現ベクターが、プラスミドDNA、ウイルスベクター、細菌ベクターおよび哺乳動物ベクターよりなる群から選択される、上記組成物。

30

【請求項 10】

請求項 8 に記載の組成物であって、前記発現ベクターが、前記単離されたポリヌクレオチドの宿主細胞のゲノム中への組込みを助長する組込みシグナル配列をさらに含んでなる、上記組成物。

【請求項 11】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記 SOCS が、SOCS 1、SOCS 2、SOCS 3、SOCS 4、SOCS 5、SOCS 6、SOCS 7、およびサイトカインで誘導可能な SH2 ドメイン含有タンパク質（CIS）よりなる群から選択される、上記組成物。

40

【請求項 12】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記 SHP が SHP - 1 および SHP - 2 よりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項 13】

請求項 1 に記載の組成物であって、前記 PIAS が、PIAS 1、PIAS 3、PIAS x および PIAS y よりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の組成物であって、最低 1 個のエピトープを有する抗原をさらに含んでなり、前記エピトープが哺乳動物において免疫応答を導き出すことが可能である、上記組

50

成物。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の組成物であって、前記抗原が発現ベクターにより発現される、上記組成物。

【請求項 16】

請求項 14 に記載の組成物であって、前記抗原が単離されたポリペプチドである、上記組成物。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の組成物であって、前記最低 1 個のエピトープが哺乳動物において CD4 + T 細胞応答を誘導する、上記組成物。

10

【請求項 18】

請求項 14 に記載の組成物であって、前記最低 1 個のエピトープが哺乳動物において CD8 + T 細胞応答を誘導する、上記組成物。

【請求項 19】

請求項 14 に記載の組成物であって、前記最低 1 個のエピトープが哺乳動物において B 細胞応答を誘導する、上記組成物。

【請求項 20】

請求項 14 に記載の組成物であって、前記抗原が疾患と関連する、上記組成物。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の組成物であって、前記疾患が、感染性疾患、癌および自己免疫疾患よりなる群から選択される、上記組成物。

20

【請求項 22】

請求項 20 に記載の組成物であって、前記抗原が感染性疾患と関連する、上記組成物。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の組成物であって、前記感染性疾患が、ウイルス、細菌、真菌および原生動物よりなる群から選択される病原性微生物により引き起こされる、上記組成物。

【請求項 24】

請求項 14 に記載の組成物であって、前記抗原がウイルス遺伝子によりコードされる、上記組成物。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の組成物であって、前記ウイルス遺伝子が、B 型肝炎ウイルス、C 型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、パピローマウイルスおよびヘルペスウイルスよりなる群から選択されるウイルス由来である、上記組成物。

30

【請求項 26】

請求項 24 に記載の組成物であって、前記抗原が、B 型肝炎ウイルス e 抗原遺伝子、B 型肝炎ウイルス表面抗原遺伝子、および B 型肝炎ウイルスコア抗原遺伝子よりなる群から選択されるウイルス遺伝子によりコードされる、上記組成物。

【請求項 27】

請求項 24 に記載の組成物であって、前記抗原が、ヒト免疫不全ウイルスの Env gp160 遺伝子、Gag 遺伝子、Pol 遺伝子、Rev 遺伝子、Tat 遺伝子、Vif 遺伝子および Nef 遺伝子よりなる群から選択されるウイルス遺伝子によりコードされる、上記組成物。

40

【請求項 28】

請求項 24 に記載の組成物であって、前記抗原が、パピローマウイルス E7 遺伝子およびパピローマウイルス E6 よりなる群から選択されるウイルス遺伝子によりコードされる、上記組成物。

【請求項 29】

請求項 25 に記載の組成物であって、前記抗原が、単純疱疹ウイルス 1 型、単純疱疹ウイルス 2 型、エプスタイン - バーウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6、ヒトヘルペスウイルス 7 およびヒトヘルペスウイルス 8 よりなる群から選択される

50

ヘルペスウイルス由来のウイルス遺伝子によりコードされる、上記組成物。

【請求項 30】

請求項 21 に記載の組成物であって、前記癌が、乳癌、子宮頸癌、黒色腫、腎癌および前立腺癌よりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項 31】

請求項 14 に記載の組成物であって、前記抗原が過剰発現される腫瘍関連抗原、精巣腫瘍抗原、変異した腫瘍関連抗原、分化腫瘍関連抗原チロシナーゼ、MART、trp、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、gp100、HER-2、Ras および PSA よりなる群から選択される腫瘍関連抗原である、上記組成物。

【請求項 32】

請求項 31 に記載の組成物であって、前記腫瘍関連抗原が、BCR-ABL、CASP、CDK、Ras、p53、HER-2/neu、CEA、MUC、TW1、PAP、スルビピン、テロメラゼ、EGFR、PSMA、PSA、PSCA、チロシナーゼ、MART、TRP、gp100、MART、MAGE、BAGE、GAGE、LAGE/NY-ESO、RAGE、SSX-2、CD19 および CD20 よりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項 33】

請求項 20 に記載の組成物であって、前記疾患が、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、乾癬およびクローン病よりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項 34】

サイトカイン若しくは Toll 様受容体 (TLR) アゴニストをさらに含んでなる、請求項 14 に記載の組成物。

【請求項 35】

請求項 34 に記載の組成物であって、前記サイトカイン若しくは TLR アゴニストが発現ベクターにより発現される、上記組成物。

【請求項 36】

請求項 34 に記載の組成物であって、前記 TLR アゴニストが単離されたポリペプチドである、上記組成物。

【請求項 37】

請求項 34 に記載の組成物であって、前記サイトカインが単離されたポリペプチドである、上記組成物。

【請求項 38】

請求項 34 に記載の組成物であって、前記サイトカインが、IL-12、TNF、IFN、IFN、IFN、IL-7、IL-2、IL-6、IL-15、IL-21 および IL-23 よりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項 39】

請求項 1 に記載の組成物であって、さらに、前記インヒビターがヤヌスキナーゼ (JAK) シグナル伝達の阻害を抑制する、上記組成物。

【請求項 40】

請求項 1 に記載の組成物であって、さらに、前記インヒビターが Toll 様受容体 (TLR) シグナル伝達の阻害を抑制する、上記組成物。

【請求項 41】

請求項 1 に記載の組成物であって、さらに、前記インヒビターが NF- κ B シグナル伝達の阻害を抑制する、上記組成物。

【請求項 42】

請求項 1 に記載の組成物であって、さらに、前記インヒビターが抗原受容体シグナル伝達の阻害を抑制する、上記組成物。

【請求項 43】

細胞の免疫能を高めるための組成物であって、インヒビターをコードする第一のポリヌクレオチド (前記インヒビターは前記細胞中でのサイトカインシグナル伝達の調節物質を

10

20

30

40

50

阻害するものである)、および最低1個のエピトープを有する抗原をコードする第二のポリヌクレオチド(前記最低1個のエピトープが哺乳動物における免疫応答を誘導するものである)を含んでなるベクターを含んでなる、上記組成物。

【請求項44】

請求項43に記載の組成物であって、前記サイトカインシグナル伝達調節物質が、SOC(SOCS1~7、CIS)、SHP(SHP-1およびSHP-2)ならびにPIAS(PIAS1、PIAS3、PIASxおよびPIASy)よりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項45】

請求項43に記載の組成物であって、前記インヒビターが、小分子干渉RNA(sirRNA)、マイクロRNA、アンチセンス核酸、リボザイム、トランスドミナントネガティブ変異体をコードする発現ベクター、細胞内抗体、ペプチドおよび小分子よりなる群から選択される、上記組成物。

10

【請求項46】

請求項43に記載の組成物であって、前記ベクターが、プラスミドDNA、ウイルスベクター、細菌ベクターおよび哺乳動物ベクターよりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項47】

細胞の免疫能を高めるための組成物であって、インヒビターをコードする第一のポリヌクレオチド(前記インヒビターは前記細胞中でのサイトカインシグナル伝達の調節物質を阻害するものである)、およびサイトカイン若しくはTLRアゴニストをコードする第二のポリヌクレオチドを含んでなるベクターを含んでなる、上記組成物。

20

【請求項48】

請求項47に記載の組成物であって、サイトカインをコードする前記第二のポリヌクレオチドが、IL-12、TNF、IFN、IFN、IFN、IL-7、IL-2、IL-6、IL-15、IL-21およびIL-23よりなる群から選択される、上記組成物。

【請求項49】

サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる細胞。

【請求項50】

請求項49に記載の細胞であって、前記サイトカインシグナル伝達調節物質が、SOC(SOCS1~7、CIS)、SHP(SHP-1およびSHP-2)ならびにPIAS(PIAS1、PIAS3、PIASxおよびPIASy)よりなる群から選択される、上記細胞。

30

【請求項51】

請求項49に記載の細胞であって、前記インヒビターが、小分子干渉RNA(sirRNA)、マイクロRNA、アンチセンス核酸、リボザイム、トランスドミナントネガティブ変異体をコードする発現ベクター、細胞内抗体、ペプチドおよび小分子よりなる群から選択される、上記細胞。

【請求項52】

請求項49に記載の細胞であって、細胞が、APC、樹状細胞、単球/マクロファージ、T細胞およびB細胞よりなる群から選択される免疫細胞である、上記細胞。

40

【請求項53】

請求項52に記載の細胞であって、T細胞が、細胞傷害性T細胞、ヘルパーT細胞および制御性T細胞である、上記細胞。

【請求項54】

最低1個のエピトープを有する抗原をさらに含んでなり、前記エピトープが哺乳動物において免疫応答を導き出すことが可能である、請求項49に記載の細胞。

【請求項55】

サイトカインをコードするポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターをさらに含んでなる、請求項49に記載の細胞。

50

【請求項 56】

サイレンスした (silenced) 細胞の生成方法であって、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターと細胞を接触させることを含んでなる、上記方法。

【請求項 57】

請求項 56 に記載の方法であって、前記サイトカインシグナル伝達調節物質が、SOCS (SOCS 1 ~ 7、CIS)、SHP (SHP - 1 および SHP - 2) ならびに PIAS (PIAS 1、PIAS 3、PIAS x および PIAS y) よりなる群から選択される、上記方法。

【請求項 58】

請求項 56 に記載の方法であって、前記インヒビターが、小分子干渉 RNA (siRNA)、マイクロ RNA、アンチセンス核酸、リボザイム、トランスドミナントネガティブ変異体をコードする発現ベクター、細胞内抗体、ペプチドおよび小分子よりなる群から選択される、上記方法。

10

【請求項 59】

サイレンスかつパルスした細胞の生成方法であって、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターと細胞を接触させること、およびさらに最低 1 個のエピトープを有する抗原と前記細胞を接触させることを含んでなり、前記エピトープが哺乳動物において免疫応答を導き出すことが可能である、上記方法。

【請求項 60】

請求項 59 に記載の方法であって、前記サイトカインシグナル伝達調節物質が、SOCS (SOCS 1 ~ 7、CIS)、SHP (SHP - 1 および SHP - 2) ならびに PIAS (PIAS 1、PIAS 3、PIAS x および PIAS y) よりなる群から選択される、上記方法。

20

【請求項 61】

請求項 59 に記載の方法であって、前記インヒビターが、小分子干渉 RNA (siRNA)、マイクロ RNA、アンチセンス核酸、リボザイム、トランスドミナントネガティブ変異体をコードする発現ベクター、細胞内抗体、ペプチドおよび小分子よりなる群から選択される、上記方法。

【請求項 62】

哺乳動物において免疫応答を導き出す方法であって、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる組成物をその必要な哺乳動物に投与することを含んでなる、上記方法。

30

【請求項 63】

請求項 62 に記載の方法であって、前記サイトカインシグナル伝達調節物質が、SOCS (SOCS 1 ~ 7、CIS)、SHP (SHP - 1 および SHP - 2) ならびに PIAS (PIAS 1、PIAS 3、PIAS x および PIAS y) よりなる群から選択される、上記方法。

【請求項 64】

請求項 62 に記載の方法であって、前記インヒビターが、小分子干渉 RNA (siRNA)、マイクロ RNA、アンチセンス核酸、リボザイム、トランスドミナントネガティブ変異体をコードする発現ベクター、細胞内抗体、ペプチドおよび小分子よりなる群から選択される、上記方法。

40

【請求項 65】

哺乳動物において免疫応答を導き出す方法であって、サイレンスした細胞を含んでなる組成物をその必要な哺乳動物に投与することを含んでなり、前記サイレンスした細胞がサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる、上記方法。

【請求項 66】

請求項 65 に記載の方法であって、前記サイトカインシグナル伝達調節物質が、SOCS (SOCS 1 ~ 7、CIS)、SHP (SHP - 1 および SHP - 2) ならびに PIAS (PIAS 1、PIAS 3、PIAS x および PIAS y) よりなる群から選択される

50

、上記方法。

【請求項 67】

請求項 65 に記載の方法であって、前記インヒビターが、小分子干渉 RNA (siRNA)、マイクロ RNA、アンチセンス核酸、リボザイム、トランスドミナントネガティブ変異体をコードする発現ベクター、細胞内抗体、ペプチドおよび小分子よりなる群から選択される、上記方法。

【請求項 68】

請求項 65 に記載の方法であって、前記サイレンスした細胞が、その必要な哺乳動物に前記サイレンスした細胞を投与する前に *in vitro* で抗原と接触される、上記方法。

10

【請求項 69】

請求項 65 に記載の方法であって、前記サイレンスした細胞が、その必要な哺乳動物への前記サイレンスした細胞の投与後に *in vivo* で抗原と接触される、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

ヒトにおける不十分な抗原提示ならびに自然および適応免疫の活性化は、多くの病原性感染症および悪性細胞増殖を制御および消失することのヒト免疫系の失敗をもたらす。慢性感染症および癌のための成功裏の治療的ワクチンおよび免疫療法は、それらの病状と関連する攻撃的抗原を制御かつ消失することが可能である活発な免疫応答を誘導するための効率的な手段のための新たなアプローチの開発に左右される。

20

【0002】

抗原を認識する T 細胞の能力は、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) I 若しくは MHC II いずれかのタンパク質との抗原の会合に依存する。例えば、細胞傷害性 T 細胞は、MHC - I タンパク質とともに提示される抗原に応答する。従って、ウイルスに感染した細胞を死滅させるべきである細胞傷害性 T 細胞は、該細胞が適切な MHC - I タンパク質もまた発現しない場合にその細胞を死滅させることができない。ヘルパー T 細胞は MHC - II タンパク質を認識する。ヘルパー T 細胞活性は、一般に、抗原提示細胞上の抗原の認識および「自己」MHC - II タンパク質のこれらの細胞上での存在の双方に依存する。自己 MHC タンパク質を伴う抗原の認識のための要件は MHC 拘束と呼ばれる。MHC - I タンパク質は事実上全部の有核細胞の表面上で見出される。MHC - II タンパク質は、脾のマクロファージ、B 細胞および樹状細胞ならびに皮膚のランゲルハンス細胞を包含するある種の細胞の表面上で見出される。

30

【0003】

哺乳動物における免疫応答の装備における決定的な一段階は、MHC - II に拘束された外因性抗原を認識する CD4 + ヘルパー T 細胞の活性化である。これらの抗原は、樹状細胞 (DC) のような抗原提示細胞中の細胞エンドソーム経路で捕捉かつプロセッシングされる。エンドソームおよびリソソーム中で、抗原は小型の抗原ペプチドにプロセッシングされ、それらがゴルジ区画で MHC - II に複合体形成して抗原 - MHC - II 複合体を形成する。この複合体が細胞表面上で発現され、その発現が CD4 + T 細胞の活性化を誘導する。

40

【0004】

哺乳動物における効果的な免疫応答の誘導における他の決定的な事象は、CD8 + T 細胞および B 細胞の活性化を必要とする。CD8 + 細胞は、所望のタンパク質が、MHC - I 抗原と複合体形成されているプロセッシングされたタンパク質として細胞表面上に提示されるような様式で細胞により送られる (*routed*) 場合に活性化される。B 細胞は、MHC タンパク質に対する必要性を伴わずにそれらの表面免疫グロブリン (IgM および IgD) を介して抗原と相互作用し得る。しかしながら、CD4 + T 細胞の活性化は免疫系の全部の武器を刺激する。活性化に際して、CD4 + T 細胞 (ヘルパー T 細胞) はインターロイキンを産生する。これらのインターロイキンは免疫系の他の武器を活性

50

化するのを助ける。例えば、ヘルパーT細胞は、B細胞が抗体を産生するのを助けるインターロイキン-4 (IL-4) およびインターロイキン-5 (IL-5) ; CD4+ およびCD8+ T細胞を活性化するインターロイキン-2 (IL-2) ; ならびにマクロファージを活性化するインターフェロンを産生する。MHC-IIに拘束された抗原を認識するヘルパーT細胞は、細胞傷害性T細胞、マクロファージ、ナチュラルキラー細胞およびB細胞の活性化およびクローン増殖において中心的な役割を演じているため、抗原に反応してのヘルパーT細胞の活性化の初期事象が、その抗原に向けられた効果的な免疫応答の誘導に決定的に重要である。リソソームの膜貫通型タンパク質由来の配列を使用してヘルパーT細胞活性化を刺激する試みが報告されている。しかしながら、これらの試みは、試験されている哺乳動物におけるCD8+ T細胞およびB細胞に関して効果的な免疫応答の誘導をもたらさなかった。

10

【0005】

免疫応答においてT細胞が演じる決定的な役割に加え、DCが同等に重要である。DCは、自己抗原に対する免疫寛容の維持ならびに自然および適応免疫の活性化において重要な調節的役割を有する専門の抗原提示細胞である(非特許文献1;非特許文献2)。DCが微生物産物のような炎症前刺激に遭遇する場合に、細胞表面で発現される抗原ペプチドを負荷されたMHC分子および共刺激分子を上方制御することにより、該細胞の成熟過程が開始される。成熟および局所リンパ節へのホーミング後に、DCは免疫学的シナプスを形成することによりT細胞との接触を確立し、そこでT細胞受容体(TCR)および共刺激分子が、接着分子により囲まれる中心領域に集合する(非特許文献3)。一旦活性化されれば、CD8+ T細胞は数世代の間自律的に増殖し得、そしてさらなる抗原刺激を伴わずに細胞傷害機能を獲得し得る(非特許文献4;非特許文献5)。従って、DCにより提供されるペプチド-MHC複合体(シグナル1)および共刺激分子(シグナル2)のレベルおよび持続時間が、抗原特異的T細胞応答の大きさおよび運命を決定するために不可欠であると提案されている(非特許文献6;非特許文献7)。

20

【0006】

腫瘍ワクチンを開発するための大きな努力は、抗腫瘍免疫を高める一手段としてDCの成熟および共刺激を促進することを試みた。しかしながら、自己腫瘍関連抗原(TAA)に対する免疫の誘導は、固有の阻害機構(それらの多くは定義されるべきままである)により制限されている。既知の一阻害機構が、DC若しくは他の細胞上のB7ファミリー分子との細胞-細胞接触を介するエフェクターT細胞活性化の大きさを制御するために、T細胞上の細胞傷害性Tリンパ球抗原4(CTLA4)および関連分子により使用される。DCの成熟は、自己寛容の維持から免疫の誘導への決定的なスイッチとしてはたらく。しかしながら、成熟抗原提示DCが、それらが成熟の点を越えて適応免疫の大きさおよび持続時間を制御することを可能にするとみられる負の調節機構を有するかどうかは不明なままである。

30

【0007】

サイトカインは、複数の免疫細胞機能の調節に決定的に関与している(非特許文献8;非特許文献9)。DCは、リポ多糖(LPS)のような保存された微生物構造を認識する toll様受容体(TLR)を使用して、核因子B(NF- κ B)シグナル伝達経路を活性化することによりDC成熟を促進する(非特許文献10)。NF- κ Bファミリーメンバーが、その後、IL-12のような炎症前サイトカインの発現を媒介して、自然および適応免疫の誘導をもたらす(非特許文献10;非特許文献11;非特許文献12)。DC成熟後に、サイトカイン産生および細胞内シグナル伝達経路が、過度の自己免疫活性化を制限しつつ、外来抗原に対する有益な免疫応答を促進するようしっかりと調節されると考えられている。しかしながら、これらの経路の特異的なフィードバック阻害機構および自己抗原特異的免疫応答の生じる制御の重要性は、不十分に定義されたままである。

40

【0008】

Socs1は、インターフェロン(IFN)- γ 、インターロイキン(IL)-2、IL-6、IL-7、IL-12およびIL-15を包含する多様なサイトカインによるシ

50

グナル伝達の誘導可能な負のフィードバック調節物質である（非特許文献13；非特許文献14）。SOCS1は、擬似基質インヒビターとしての上流のヤヌスキナーゼ（JAK）の活性化ループに結合しかつ／若しくはプロテアソーム分解のためJAKを標的とすることにより、複数の転写のシグナルトランスデューサーおよび活性化物質（STAT）シグナル伝達経路を抑制する（非特許文献13；非特許文献14）。SOCS1はまた、そのSOCSボックス領域によるユビキチン媒介性のタンパク質分解のためp65タンパク質の標的を定めることにより、NF- κ Bシグナル伝達も阻害する（非特許文献15）。SOCS1欠損（-/-）マウスは、主として自由なサイトカインシグナル伝達の結果として、重症の全身性炎症ならびにTおよびNK細胞の異常な活性化を伴う新生児として死亡する（非特許文献16；非特許文献17；非特許文献18）。DC中でのSOCS1の機能についてはほとんど知られていないとは言え、最近の研究は、抗原提示細胞（APC）中でのシグナル伝達の制御におけるSOCS1の役割を示唆している（非特許文献13；非特許文献19）。マクロファージ中でのSOCS1発現はLPS若しくはCpG-DNA刺激により誘導され、また、SOCS1-/-マウスは、それらの野性型同腹子がそうであるよりLPSで誘導されるショックに対しより感受性である（非特許文献20；非特許文献21；非特許文献22；非特許文献23）。さらに、SOCS1-/-バックグラウンドでTおよびB細胞中でのSOCS1発現が回復されたマウスからのSOCS1-/-DCは、IFN γ およびLPSに対し反応亢進性であり、同種異系T細胞増殖を誘発し、そしてB細胞の異常な増殖および自己反応性抗体の産生を誘導する（非特許文献19）。

10

20

【0009】

DC中でのSOCS1の機能についてはほとんど知られていないとはいえ、最近の研究は、サイトカインシグナル伝達経路の調節におけるSOCS1の役割の役割を示した。例えば、SOCS1-/-DCがより成熟した表現型を表し、そしてシグナル伝達のためToll様受容体（TLR）4と相互作用するリポ多糖（LPS）に対し反応亢進性であることが観察されたことが示されている。SOCS1-/-DCが自己反応性抗体の産生を誘導したこともまた観察された。これらの観察結果は、おそらくJAK/STAT経路およびTLR/NF- κ B経路を制御することによる、SOCS1がDCの負の調節で果たす可能な役割を言外にほのめかした。

【0010】

哺乳動物における免疫応答を刺激するための免疫療法においてDCを使用するための多くの試みがなされた。これらの努力において、DCは、それらに抗原を負荷し、そしてそれらが癌患者で抗腫瘍免疫を刺激するようにex vivoの状況でそれらを成熟させることにより操作した。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）と闘うための免疫療法の使用に関して、有効なヒト免疫不全ウイルス（HIV）ワクチンは未だ出現していない。従って、哺乳動物における疾患の処置のため免疫応答を導き出す効率的かつ指向された手段に対する、当該技術分野で長年の切実なニーズが存在する。本発明はこのニーズを満たす。

30

【非特許文献1】Banchereauら、1998、Narute 392：245-52

【非特許文献2】Steinmanら、2003、Annu. Rev. Immunol. 21：685-711

【非特許文献3】Dustinら、2000、Nat. Immunol. 1：23-9

【非特許文献4】Kaechら、2001、Nat. Immunol. 2：415-22

【非特許文献5】van Stipdonkら、2001、Nat. Immunol. 2：423-9

【非特許文献6】Lanzavecchiaら、2001、Nat. Immunol. 2：487-92

【非特許文献7】Gettlerら、2003、Nat. Immunol. 4：355-60

【非特許文献8】Curtisingerら、2003、J. Exp. Med. 197：141-51

40

50

【非特許文献 9】Valenzuela *ら*, 2002, *J. Immunol.* 169: 6842 - 9

【非特許文献 10】Akira *ら*, 2004, *Nat. Rev. Immunol.* 4: 499 - 511

【非特許文献 11】Beutler *ら*, 2003, *Nat. Rev. Immunol.* 3: 169 - 176

【非特許文献 12】Janeway *ら*, 2002, *Annu. Rev. Immunol.* 20: 197 - 216

【非特許文献 13】Kubo *ら*, 2003, *Nat. Immunol.* 4: 1169 - 76

【非特許文献 14】Alexander *ら*, 2004, *Annu. Rev. Immunol.* 22: 503 - 29

【非特許文献 15】Ryo *ら*, 2003, *Mol. Cell.* 12: 1413 - 26

【非特許文献 16】Marine *ら*, 1999, *Cell* 98: 609 - 16

【非特許文献 17】Alexander *ら*, 1999, *Cell* 98: 597 - 608

【非特許文献 18】Naka *ら*, 2001, *Immunity* 14: 535 - 45

【非特許文献 19】Hanada *ら*, 2003, *Immunity* 19: 437 - 50

【非特許文献 20】Crespo *ら*, 2000, *Biochem. J.* 349: 99 - 104

【非特許文献 21】Dalpke *ら*, 2001, *J. Immunol.* 166: 7082 - 9

【非特許文献 22】Nakagawa *ら*, 2002, *Immunity* 17: 677 - 87

【非特許文献 23】Kinjyo *ら*, 2002, *Immunity* 17: 583 - 91

【発明の開示】

【0011】

[発明の要約]

本発明は、免疫細胞の免疫能を高めるための組成物を包含する。好ましくは、該組成物は、サイトカインシグナル伝達のサプレッサー (SOCS)、SH2 含有ホスファターゼ (SHP) 若しくは活性化型 STAT のタンパク質インヒビター (PIAS) のいずれか 1 種若しくはそれ以上のインヒビターを含んでなる。より好ましくは、該インヒビターは前記細胞中で負の調節経路を妨害する。

【0012】

特定の一態様において、インヒビターは、小分子干渉 RNA (siRNA)、マイクロ RNA、アンチセンス核酸、リボザイム、トランスドミナントネガティブ変異体をコードする発現ベクター、細胞内抗体、ペプチドおよび小分子よりなる群から選択される。好ましくは、インヒビターは siRNA である。

【0013】

さらなる一局面において、siRNA は、二本鎖オリゴヌクレオチド、一本鎖オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドよりなる群から選択される。

【0014】

なお別の局面において、siRNA は化学的に合成される。

【0015】

本発明の別の態様は、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる組成物を包含し、該組成物は生理学的に許容できる担体をさらに含んでなる。好ましくは、生理学的に許容できる担体はリポソームである。

【0016】

別の態様において、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターは、発現ベクターにクローン化された単離されたポリヌクレオチドによりコードされる。該発現ベクターは、プラスミド DNA、ウイルスベクター、細菌ベクターおよび哺乳動物ベクターよりな

10

20

30

40

50

る群から選択される。別の局面において、発現ベクターは、単離されたポリヌクレオチドの宿主細胞のゲノム中への組み込みを助長する組み込みシグナル配列をさらに含んでなる。

【0017】

本発明はまた、サイトカインシグナル伝達のサプレッサー(SOCS)のインヒビターも包含し、SOCSは、SOCS1、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、およびサイトカインで誘導可能なSH2ドメイン含有タンパク質(CIS)よりなる群から選択される。

【0018】

別の局面において、本発明はSH2含有ホスファターゼ(SHP)のインヒビターを包含し、SHPはSHP-1およびSHP-2よりなる群から選択される。

10

【0019】

さらなる一局面において、本発明は活性化型STATのタンパク質インヒビター(PIAS)のインヒビターを包含し、PIASは、PIAS1、PIAS3、PIASxおよびPIAsyよりなる群から選択される。

本発明はまた、免疫細胞の免疫能を高めるための組成物も包含し、該組成物は最低1個のエピトープを有する抗原をさらに含んでなる。好ましくは、エピトープは哺乳動物において免疫応答を導き出すことが可能である。別の局面において、エピトープは哺乳動物においてCD4+ T細胞応答を誘導する。なお別の局面において、エピトープは哺乳動物においてCD8+ T細胞応答を誘導する。さらなる一局面において、エピトープは哺乳動物においてB細胞応答を誘導する。

20

【0020】

別の態様において、抗原は発現ベクターにより発現される。さらなる一局面において、抗原は単離されたポリペプチドである。

【0021】

なお別の態様において、抗原は疾患と関連する。好ましくは、疾患は、感染性疾患、癌および自己免疫疾患よりなる群から選択される。

【0022】

一局面において、感染性疾患は、ウイルス、細菌、真菌および原生動物よりなる群から選択される病原性微生物により引き起こされる。

【0023】

別の態様において、抗原はウイルス遺伝子によりコードされる。好ましくは、ウイルス遺伝子は、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、パピローマウイルスおよびヘルペスウイルスよりなる群から選択されるウイルス由来である。

30

【0024】

一局面において、抗原は、B型肝炎ウイルスe抗原遺伝子、B型肝炎ウイルス表面抗原遺伝子、およびB型肝炎ウイルスコア抗原遺伝子よりなる群から選択されるウイルス遺伝子によりコードされる。

【0025】

別の局面において、抗原は、ヒト免疫不全ウイルスのEnv gp160遺伝子、Gag遺伝子、Pol遺伝子、Rev遺伝子、Tat遺伝子、Vif遺伝子およびNef遺伝子よりなる群から選択されるウイルス遺伝子によりコードされる。

40

【0026】

さらなる一局面において、抗原は、パピローマウイルスE7遺伝子およびパピローマウイルスE6よりなる群から選択されるウイルス遺伝子によりコードされる。

【0027】

なお別の局面において、抗原は、単純疱疹ウイルス1型、単純疱疹ウイルス2型、エプスタイン-バーウイルス、サイトメガロウイルス、ヒトヘルペスウイルス6、ヒトヘルペスウイルス7およびヒトヘルペスウイルス8よりなる群から選択されるヘルペスウイルス由来のウイルス遺伝子によりコードされる。

【0028】

50

一態様において、抗原は癌と関連し、癌は、乳癌、子宮頸癌、黒色腫、腎癌および前立腺癌よりなる群から選択される。

【0029】

さらなる一局面において、腫瘍関連抗原は、過剰発現される腫瘍関連抗原、精巣腫瘍抗原、変異した腫瘍関連抗原、分化腫瘍関連抗原チロシナーゼ、MART、trp、MAGE-1、MAGE-2、MAGE-3、gp100、HER-2、RasおよびPSAよりなる群から選択される。

【0030】

なお別の局面において、腫瘍関連抗原は、BCR-ABL、CASP、CDK、Ras、p53、HER-2/neu、CEA、MUC、TW1、PAP、スルビピン、テロメラゼ、EGFR、PSMA、PSA、PSCA、チロシナーゼ、MART、TRP、gp100、MART、MAGE、BAGE、GAGE、LAGE/NY-ESO、RAGE、SSX-2、CD19およびCD20よりなる群から選択される。

10

【0031】

別の態様において、抗原は、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、乾癬およびクローン病よりなる群から選択される疾患と関連する。

【0032】

本発明はまた、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビター、および免疫応答を導き出すことが可能な最低1個のエピトープを有する抗原を含んでなり、かつ、サイトカイン若しくはToll様受容体(TLR)アゴニストをさらに含んでなる組成物も包含する。

20

【0033】

一局面において、サイトカイン若しくはTLRアゴニストは発現ベクターにより発現される。好ましくは、サイトカイン若しくはTLRアゴニストは単離されたポリペプチドである。

【0034】

別の局面において、サイトカインは、IL-12、TNF、IFN、IFN、IFN、IL-7、IL-2、IL-6、IL-15、IL-21およびIL-23よりなる群から選択される。

【0035】

本発明はまた、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる組成物も包含し、該インヒビターはヤヌスキナーゼ(JAK)シグナル伝達の阻害を抑制する。

30

【0036】

別の態様において、組成物は、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなり、Toll様受容体(TLR)シグナル伝達の阻害を抑制する。

【0037】

なお別の態様において、組成物は、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなるは、NF- κ Bシグナル伝達の阻害を抑制する。

【0038】

本発明は、細胞の免疫能を高めるための組成物を包含し、該組成物は、インヒビターをコードする第一のポリヌクレオチド(該インヒビターは前記細胞中でのサイトカインシグナル伝達の調節物質を阻害し)、および最低1個のエピトープを有する抗原をコードする第二のポリヌクレオチド(最低1個のエピトープが哺乳動物における免疫応答を誘導する)を含んでなるベクターを含んでなる。

40

【0039】

本発明はまた、細胞の免疫能を高めるための組成物も包含し、該組成物は、インヒビターをコードする第一のポリヌクレオチド(さらに、該インヒビターは前記細胞中でのサイトカインシグナル伝達の調節物質を阻害し)、およびサイトカインをコードする第二のポリヌクレオチドを含んでなるベクターを含んでなる。好ましくは、サイトカインをコードする第二のポリヌクレオチドは、IL-12、TNF、IFN、IFN、IFN

50

、IL-7、IL-2、IL-6、IL-15、IL-21およびIL-23よりなる群から選択される。

【0040】

本発明はまた、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる細胞も包含する。好ましくは、該細胞は、APC、樹状細胞、単球/マクロファージ、T細胞およびB細胞よりなる群から選択される免疫細胞である。

【0041】

別の局面において、細胞は最低1個のエピトープを有する抗原をさらに含んでなり、最低1個のエピトープは哺乳動物において免疫応答を導き出すことが可能である。

【0042】

なお別の局面において、細胞は、サイトカインをコードするポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターをさらに含んでなる。

【0043】

本発明はまた、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターと細胞を接触させることを含んでなる、サイレンスした(silenced)細胞の生成方法も包含する。

【0044】

別の態様において、本発明は、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターと細胞を接触させること、およびさらに最低1個のエピトープを有する抗原と該細胞を接触させることを含んでなる、サイレンスしかつパルスした細胞の生成方法も包含し、最低1個のエピトープは哺乳動物において免疫応答を導き出すことが可能である。

【0045】

本発明はまた、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる組成物をその必要な哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物において免疫応答を導き出す方法も包含する。

【0046】

本発明の別の態様は、サイレンスした細胞を含んでなる組成物をその必要な哺乳動物に投与することを含んでなる、哺乳動物において免疫応答を導き出す方法を包含し、該サイレンスした細胞はサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる。好ましくは、サイレンスした細胞は、その必要な哺乳動物にサイレンスした細胞を投与する前に*in vitro*で抗原と接触される。別の局面において、サイレンスした細胞はまた、その必要な哺乳動物へのサイレンスした細胞の投与後に*in vivo*で抗原と接触され得る。

【0047】

[発明の詳細な記述]

本発明は、免疫細胞中のサイトカインシグナル伝達調節物質を調節することにより免疫細胞の免疫能を高めることに関する。本発明は、サイトカインシグナル伝達のサブレッサー(SOCS)、SH2含有リン酸(SHP)若しくは活性化型STATsのタンパク質インヒビター(PIAS)のような、サイトカインシグナル伝達調節物質の調節により免疫細胞における抗原提示を調節するための組成物および方法を提供する。本発明は、免疫細胞の免疫能がサイトカインシグナル伝達調節物質の調節により高められるワクチンおよび治療法を提供する。加えて、本発明は、腫瘍ワクチン接種における自己寛容を破壊するための機構もまた提供する。従って、本発明は、細胞の免疫刺激能力を高めることにより免疫細胞中の負の調節性シグナル伝達経路を妨害するという治療上の利点を提供する。

【0048】

定義

本明細書で使用される以下の用語のそれぞれは、本節でそれと関連づけられる意味するところを有する。

【0049】

冠詞「a」および「an」(ある)は、該冠詞の文法上の目的語の1つ若しくは1つ以上(すなわち最低1つ)を指すために本明細書で使用する。例として、「an elem

10

20

30

40

50

ent」(ある要素)は1つの要素若しくは1つ以上の要素を意味している。

【0050】

「約」という用語は、当業者により理解されることができ、そしてそれが使用される文脈で若干の程度変動することができる。

【0051】

「同種異系の」は、同一種の異なる動物由来の移植片を指す。

【0052】

「同種異系抗原」は、レシピエントにより発現される抗原と異なる抗原である。

【0053】

本明細書で使用される場所の「抗体」という用語は、抗原上の特定の1エピトープに特異的に結合することが可能である免疫グロブリン分子を指す。抗体は、天然の供給源若しくは組換え供給源由来の無傷の免疫グロブリンであり得、また、無傷の免疫グロブリンの免疫活性部分であり得る。抗体は、典型的には免疫グロブリン分子の四量体である。本発明における抗体は、例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fv、FabおよびF(ab)₂、ならびに一本鎖抗体およびヒト化抗体(Harlowら、1988; Houstonら、1988; Birdら、1988)を包含する多様な形態で存在する。

10

【0054】

本明細書で使用される場所の「抗原」若しくは「Ag」という用語は、免疫応答を惹起する分子と定義する。この免疫応答は、抗体産生、若しくは特異的な免疫学的に適切な細胞の活性化のいずれか、または双方を伴う。当業者は、事実上全部のタンパク質若しくはペプチドを包含するいかなる巨大分子も抗原としてはたらき得ることを理解するであろう。さらに、抗原は組換え若しくはゲノムDNA由来であり得る。当業者は、免疫応答を導き出すタンパク質をコードするヌクレオチド配列若しくは部分的ヌクレオチド配列を含んでなるいかなるDNAも、従って、その用語が本明細書で使用される場所の「抗原」をコードすることを理解するであろう。さらに、当業者は、抗原は、ある遺伝子の完全長ヌクレオチド配列によってのみコードされる必要がないことを理解するであろう。本発明は、限定されるものでないが1種以上の遺伝子の部分的ヌクレオチド配列の使用を挙げることができること、および、これらのヌクレオチド配列は所望の免疫応答を導き出すために多様な組合せで配置されることが容易に明らかである。さらに、当業者は、抗原は「遺伝子」によりコードされることが全く必要でないことを理解するであろう。抗原は合成されて生成され得るか、若しくは生物学的サンプル由来であり得ることが容易に明らかである。こうした生物学的サンプルは、限定されるものでないが、組織サンプル、腫瘍サンプル、細胞若しくは生物学的液体を挙げることができる。

20

30

【0055】

「抗原提示細胞」(APC)はT細胞を活性化することが可能である細胞であり、そして、限定されるものでないが単球/マクロファージ、B細胞および樹状細胞(DC)を挙げることができる。

【0056】

「樹状細胞」若しくは「DC」という用語は、リンパ系若しくは非リンパ系組織中で見出される形態上類似の細胞型の多様な集団のいかなるメンバーも指す。これらの細胞は、それらの際だった形態、高レベルの表面MHCクラスII発現を特徴とする。DCは多数の組織供給源から単離し得る。DCは、MHC拘束性T細胞を感作するための高い能力を有し、そしてin situでT細胞への抗原の提示で非常に有効である。抗原はT細胞の発達および免疫寛容の間に発現される自己抗原、ならびに正常な免疫過程の間に存在する外来抗原でありうる。

40

【0057】

本明細書で使用される場所の「活性化DC」は、抗原でパルスされかつ免疫細胞を活性化することが可能となったDCである。

【0058】

50

本明細書で使用される場所の「成熟DC」という用語は、高レベルのMHCクラスII、CD80(B7.1)およびCD86(B7.2)分子を発現する樹状細胞と定義する。対照的に、未熟樹状細胞は低レベルのMHCクラスII、CD80(B7.1)およびCD86(B7.2)分子を発現するが、しかし抗原を取り込む大きな能力を有する。
【0059】

「抗原負荷APC」若しくは「抗原パルスAPC」は、抗原に曝露されかつ該抗原により活性化されたAPCを包含する。例えば、APCは例えば抗原の存在下での培養の間に*in vitro*でAg負荷されたようになりうる。APCはまた、抗原への曝露により*in vivo*でも負荷されうる。
【0060】

「抗原負荷APC」は、伝統的に2つの方法、すなわち(1)抗原ペプチドとして知られる小型ペプチドフラグメントをAPCの外側に直接「パルスする」か；若しくは(2)APCを全タンパク質若しくはタンパク質粒子とともにインキュベートし、それらはその後該APCにより取り込まれる、の1つで調製する。これらのタンパク質はAPCにより小型ペプチドフラグメントに消化され、そして最終的にはAPC表面上に輸送かつ提示される。加えて、抗原負荷APCは、抗原をコードするポリヌクレオチドを該細胞に導入することによってもまた生成させ得る。
【0061】

本明細書で使用される場所の「サイレンスしたAPC」若しくは「サイレンスしたDC」という用語は、本発明のサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターに曝露されたそれぞれAPC若しくはDCを指す。インヒビターは好ましくはsiRNAの形態にある。インヒビターは、限定されるものでないがSOCS、SHP、PIASなどを挙げることができるサイトカインシグナル伝達調節物質を阻害することが可能である。サイレンスしたAPCは、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターで処理されていないそれ以外は同一のAPCと比較した場合に、高められた免疫能を有する。
【0062】

「アンチセンス」は、とりわけ、ポリペプチドをコードする二本鎖DNA分子の非コーディング鎖の核酸配列、若しくは非コーディング鎖に実質的に相同である配列を指す。本明細書で定義される場所のアンチセンス配列は、ポリペプチドをコードする二本鎖DNA分子の配列に相補的である。アンチセンス配列がDNA分子のコーディング鎖のコーディング部分にのみ相補的であることは必要ではない。アンチセンス配列は、ポリペプチドをコードするDNA分子のコーディング鎖上で指定される制御配列に相補的であることができ、その制御配列はコーディング配列の発現を制御する。
【0063】

本明細書で使用される場所の「自己免疫疾患」という用語は、自己免疫応答から生じる障害と定義する。自己免疫疾患は、自己抗原に対する不適切かつ過度の応答の結果である。自己免疫疾患の例は、限定されるものでないが、とりわけ、アジソン病、円形脱毛症、強直性脊椎炎、自己免疫性肝炎、自己免疫性耳下腺炎、クローン病、糖尿病(I型)、栄養障害性表皮水疱症、精巣上体炎、糸球体腎炎、グレーヴス病、ギラン・バレー症候群、橋本病、溶血性貧血、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、重症筋無力症、尋常性天疱瘡、乾癬、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、強皮症、シェーグレン症候群、脊椎関節症、甲状腺炎、血管炎、白斑、粘液水腫、悪性貧血、潰瘍性大腸炎を挙げることができる。
【0064】

本明細書で使用される場所の「自己の」という用語は、それが後に個体に再導入されるはずである同一個体由来のいかなる物質も指すことを意味している。
【0065】

本明細書で使用される場所の「癌」という用語は、異常な細胞の急速かつ制御されない増殖を特徴とする疾患と定義する。癌細胞は局所で、若しくは血流およびリンパ系により身体の他の部分に広がり得る。多様な癌の例は、限定されるものでないが、乳癌、前立

10

20

30

40

50

腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、皮膚癌、膵癌、結腸直腸癌、腎癌、肝癌、脳腫瘍、リンパ腫、白血病、肺癌などを挙げることができる。

【0066】

「サイトカインシグナル伝達調節物質」若しくは「サイトカインのシグナル伝達 (signal ing) の調節物質」若しくは「サイトカインのシグナル伝達 (signal transduction) の調節物質」は、細胞中でのサイトカインのシグナル伝達の伝達経路を負に調節することが可能であるタンパク質を指す。限定されるものでないがサイトカインシグナル伝達の調節物質は、サイトカインシグナル伝達のサプレッサー (SOCS1~SOCS7、サイトカインで誘導可能なSH2ドメイン含有タンパク質 (CIS))、SH2含有ホスファターゼ (SHP) および活性化型STATのタンパク質インヒビター (PIAS) を挙げることができる。

10

【0067】

本明細書で使用される場所の「DNA」という用語はデオキシリボ核酸と定義する。

【0068】

「ドナー抗原」は、レシピエントに移植されるべきドナー組織により発現される抗原を指す。

【0069】

「レシピエント抗原」は、ドナー抗原に対する免疫応答の標的を指す。

【0070】

本明細書で使用される場所の「エフェクター細胞」は、抗原に対する免疫応答を媒介する細胞を指す。エフェクター細胞の一例は、限定されるものでないがT細胞およびB細胞を挙げることができる。

20

【0071】

「コードすること」は、ヌクレオチド (すなわちrRNA、tRNAおよびmRNA) の定義された配列若しくはアミノ酸の定義された配列のいずれかを有する、生物学的過程での他のポリマーおよび巨大分子の合成のための鋳型としてはたらく、遺伝子、cDNA若しくはmRNAのようなポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定の配列の固有の特性、ならびにそれら由来の生物学的特性を指す。従って、遺伝子は、その遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳が細胞若しくは他の生物学的系においてタンパク質を産生する場合に、タンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列がmRNA配列に同一でありかつ通常配列表に提供されるコーディング鎖、および遺伝子若しくはcDNAの転写の鋳型として使用される非コーディング鎖双方を、その遺伝子若しくはcDNAのタンパク質若しくは他の産物をコードすると称し得る。

30

【0072】

本明細書で使用される場所の「内因性の」は、生物体、細胞、組織若しくは系からの、若しくはそれらの内側で産生されるいかなる物質も指す。

【0073】

本明細書で使用される場所の「外因性の」という用語は、生物体、細胞、組織若しくは系から導入されるか若しくはそれらの外側で産生されるいかなる物質も指す。

【0074】

本明細書で使用される場所の「エピトープ」という用語は、Bおよび/若しくはT細胞応答を誘導する免疫応答を導き出し得る抗原上の小型の化学分子と定義する。抗原は1個若しくはそれ以上のエピトープを有し得る。大部分の抗原は多くのエピトープを有する。すなわちそれらは多価である。一般に、エピトープは大きさが大まかに5アミノ酸および/若しくは糖である。当業者は、一般に、分子の特定の直線的配列よりもむしろ全体的な三次元構造が抗原特異性の主たる基準であり、そして従って1エピトープを別のものと識別することを理解している。

40

【0075】

本明細書で使用される場所の「発現」という用語は、そのプロモーターにより駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および/若しくは翻訳と定義する。

50

【0076】

本明細書で使用される「発現ベクター」という用語は、転写されることが可能な遺伝子産物の少なくとも一部分をコードする核酸配列を含有するベクターを指す。いくつかの場合、RNA分子は、その後タンパク質、ポリペプチド若しくはペプチドに翻訳される。他の場合は、これらの配列は翻訳されない（例えばアンチセンス分子、siRNA、リボザイムなどの製造において）。発現ベクターは、多様な制御配列（特定の宿主生物体での効果的に連結されたコーディング配列の転写およびおそらく翻訳に必要な核酸配列を指す）を含有し得る。転写および翻訳を支配する制御配列に加え、ベクターおよび発現ベクターは、他の機能を同様に供する核酸配列を含有しうる。

【0077】

本明細書で使用される「ヘルパーT細胞」という用語は、その第一の機能が他のBおよびTリンパ球ならびに若しくはマクロファージの活性化および機能を促進することであるエフェクターT細胞と定義する。大部分のヘルパーT細胞はCD4 T細胞である。

【0078】

本明細書で使用される「異種の」という用語は、異なる種由来であるDNA若しくはRNA配列またはタンパク質と定義する。

【0079】

本明細書で使用される「相同な」は、2種のポリマー分子間、例えば2種の核酸分子、例えば2種のDNA分子若しくは2種のRNA分子間、または2種のポリペプチド分子間のサブユニット配列の類似性を指す。2種の分子の双方中の1サブユニット位置が同一の単量体サブユニットにより占有される場合、例えば、2種のDNA分子のそれぞれ中のある位置がアデニンにより占有される場合には、それらはその位置で相同である。2配列間の相同性は、一致するか若しくは相同な位置の数の直接の関数であり、例えば、2種の化合物の配列中の位置の半分（例えば長さ10サブユニットのポリマー中の5位置）が相同である場合には、該2配列は50%相同であり、位置の90%すなわち10のうち9が一致しているか若しくは相同である場合は、該2配列は90%の相同性を共有する。例として、DNA配列3'ATTGCC5'および3'TATGGCは50%の相同性を共有する。

【0080】

本明細書で使用される「相同性」は「同一性」と同義に使用される。

【0081】

本明細書で使用される「免疫原」は、哺乳動物において体液性抗体および/若しくは細胞媒介性の免疫応答を刺激若しくは誘導することが可能である物質を指す。

【0082】

本明細書で使用される「免疫グロブリン」若しくは「Ig」という用語は、抗体として機能するタンパク質の一分類と定義する。タンパク質のこの分類に包含される5種のメンバーはIgA、IgG、IgM、IgDおよびIgEである。IgAは、唾液、涙液、母乳、胃腸分泌物、ならびに呼吸および尿生殖器系の粘液分泌物のような身体の分泌物中に存在する主要な抗体である。IgGは最も一般的な循環抗体である。IgMは大部分の哺乳動物において一次免疫応答で産生される主免疫グロブリンである。それは凝集、補体固定および他の抗体応答において最も効率的な免疫グロブリンであり、そして細菌およびウイルスに対する防御で重要である。IgDは、既知の抗体機能を有しないが、しかし抗原受容体としてはたらきうる免疫グロブリンである。IgEは、アレルゲンへの曝露に際して肥満細胞および好塩基球からのメディエーターの放出を引き起こすことにより即時型過敏反応を媒介する免疫グロブリンである。

【0083】

「単離された核酸」は、天然に存在する状態でそれに隣接している配列から分離されている核酸セグメント若しくはフラグメント、すなわち、該フラグメントに通常隣接する配列、すなわちそれが天然に存在するゲノム中で該フラグメントに隣接する配列から取り出

10

20

30

40

50

されたDNAフラグメントを指す。該用語はまた、細胞中でそれに天然に付随する核酸すなわちRNA若しくはDNA、またはタンパク質に天然に付随する他の成分から実質的に精製された核酸にも当てはまる。該用語は、従って、例えば、ベクター、自律複製プラスミド若しくはウイルス、または原核生物若しくは真核生物のゲノムDNAに組み込まれているか、あるいは他の配列に依存しない別個の分子として（すなわちPCR若しくは制限酵素消化により製造されたcDNAまたはゲノム若しくはcDNAフラグメントとして）存在する、組換えDNAを包含する。それはまた、付加的なポリペプチド配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部である組換えDNAも包含する。

【0084】

本発明の状況において、普遍的に存在する核酸塩基の以下の略語を使用する。「A」はアデノシンを指し、「C」はシトシンを指し、「G」はグアノシンを指し、「T」はチミジンを指し、そして「U」はウリジンを指す。

10

【0085】

本明細書で使用されるところの「主要組織適合遺伝子複合体」若しくは「MHC」という用語は、組織適合性のもっとも重要な決定子の1つである、その多くが抗原提示に関与する進化的に関係する細胞表面タンパク質をコードする遺伝子の特定の一集団と定義する。クラスI MHC若しくはMHC-Iは主としてCD8 Tリンパ球への抗原提示で機能する。クラスII MHC若しくはMHC-IIは主としてCD4 Tリンパ球への抗原提示で機能する。

【0086】

本明細書で使用されるところの「調節する」という用語は、生物学的状態のいかなる変化、すなわち増大、減少なども指すことを意味している。例えば、「調節する」という用語は、限定されるものでないがSOCS1 mRNAの転写、SOCS1 mRNAの安定性、SOCS1 mRNAの翻訳、SOCS1ポリペプチドの安定性、SOCS1の翻訳後修飾、若しくはそれらのいずれかの組合せを挙げることができる、SOCS1の発現若しくは活性を正に若しくは負に調節する能力を指す。さらに、調節するという用語は、限定されるものでないが樹状細胞の免疫能と関連するSOCS1の活性を挙げることができる、活性の増大、減少、遮蔽、変化、無効化若しくは回復を指すのに使用し得る。「調節する」という用語はまた、SOCS2、SOCS3、SOCS4、SOCS5、SOCS6、SOCS7、CIS、PIAS (PIAS1、PIAS3、PIASxおよびPIASy)、SHP (SHP-1およびSHP-2)、若しくは関係するいかなる他の活性にも当てはまりうる。

20

30

【0087】

別の方法で指定されない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、相互の縮重バージョンでありかつ同一アミノ酸配列をコードする全部のヌクレオチド配列を包含する。タンパク質若しくはRNAをコードするヌクレオチド配列という句は、タンパク質をコードするヌクレオチド配列がいずれかのバージョンでイントロン（1個若しくは複数）を含有しうる程度までイントロンもまた包含しうる。

【0088】

本明細書で使用されるところの「ポリヌクレオチド」という用語はヌクレオチドの鎖と定義する。さらに、核酸はヌクレオチドのポリマーである。従って、本明細書で使用されるところの核酸およびポリヌクレオチドは互換性である。当業者は、核酸が単量体の「ヌクレオチド」にハイブリダイズし得るポリヌクレオチドであるという一般的知識を有する。該単量体のヌクレオチドはヌクレオシドに加水分解され得る。本明細書で使用されるところのポリヌクレオチドは、限定されるものでないが、組換え手段、すなわち通常のクローニング技術およびPCRTMなどを使用する組換えライブラリー若しくは細胞ゲノムからの核酸配列のクローニング、ならびに合成手段を挙げることができる、当該技術分野で利用可能ないずれかの手段により得られる全部の核酸配列を、限定されるものでないが挙げることができる。

40

【0089】

50

本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、定義された配列を通常有するアミノ酸残基の鎖と定義する。本明細書で使用される「ポリペプチド」という用語は、「ペプチド」および「タンパク質」という用語を相互に包括する。

【0090】

「増殖」は、類似の形態の実体の再生若しくは増加、例えば細胞の増殖を指すのに本明細書で使用する。すなわち、増殖はより多数の細胞の産生を包含し、そして、とりわけ、細胞の数を単純に計数すること、細胞中への³H-チミジンの取り込みを測定することなどにより測定し得る。

【0091】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始するのに必要とされる、細胞の合成機構若しくは導入された合成機構により認識されるDNA配列と定義する。

10

【0092】

本明細書で使用される「プロモーター/制御配列」という用語は、プロモーター/制御配列に作動可能に連結された遺伝子産物の発現に必要とされる核酸配列を意味している。いくつかの例において、この配列はコアプロモーター配列であることができ、また、他の例において、この配列は、エンハンサー配列、および遺伝子産物の発現に必要とされる他の調節エレメントもまた包含しうる。プロモーター/制御配列は、例えば組織特異的様式で遺伝子産物を発現するものでありうる。

【0093】

「構成的」プロモーターは、遺伝子産物をコード若しくは指定するポリヌクレオチドと作動可能に連結される場合に、細胞のほとんどの若しくは全部の生理学的条件下で該細胞中で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列である。

20

【0094】

「誘導可能な」プロモーターは、遺伝子産物をコード若しくは指定するポリヌクレオチドと作動可能に連結される場合に、実質的に、プロモーターに対応する誘導物質が細胞中に存在する場合にのみ、該細胞中で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列である。

【0095】

「組織特異的」プロモーターは、遺伝子産物をコード若しくは指定するポリヌクレオチドと作動可能に連結される場合に、実質的に、細胞が該プロモーターに対応する組織型の細胞である場合にのみ、該細胞中で遺伝子産物を産生させるヌクレオチド配列である。

30

【0096】

本明細書で使用される「RNA」という用語はリボ核酸と定義する。

【0097】

本明細書で使用される「組換えDNA」という用語は、異なる供給源からのDNAの片を結合することにより製造されるDNAと定義する。

【0098】

本明細書で使用される「組み換えポリペプチド」という用語は、組換えDNAの方法を使用することにより製造されるポリペプチドと定義する。

【0099】

本明細書で使用される「自己抗原」という用語は、宿主の細胞若しくは組織により発現される抗原と定義する。自己抗原は腫瘍抗原でありうるが、しかし、ある態様においては、正常および腫瘍双方の細胞中で発現される。当業者は、自己抗原が細胞中で過剰発現されうることを容易に理解するであろう。

40

【0100】

本明細書で使用される「実質的に精製された」細胞は、他の細胞型を本質的に含まない細胞である。実質的に精製された細胞はまた、その天然に存在する状態でそれに通常伴う他の細胞型から分離された細胞も指す。いくつかの場合には、実質的に精製された細胞の集団は細胞の均質な集団を指す。他の例において、本用語は、単に、それらの天然の状態ですれらが通常伴う細胞から分離された細胞を指す。いくつかの態様において、

50

細胞は *in vitro* で培養される。他の態様において、細胞は *in vitro* で培養されない。

【0101】

本明細書で使用される場所の「T細胞」という用語は、多様な細胞媒介性の免疫反応に参画する胸腺由来細胞と定義する。

【0102】

本明細書で使用される場所の「B細胞」という用語は骨髄および/若しくは脾由来の細胞と定義する。B細胞は、抗体を産生するプラズマ細胞に発達し得る。

【0103】

本明細書で使用される場所の「治療上有効な量」は、組成物を投与する哺乳動物に有益な効果を提供するのに十分な治療的組成物の量である。

10

【0104】

本明細書で使用される場所の「トランスフェクトされた」若しくは「形質転換された」若しくは「形質導入された」という用語は、外因性の核酸を宿主細胞中に移入若しくは導入する過程を指す。「トランスフェクトされた」若しくは「形質転換された」若しくは「形質導入された」細胞は、外因性の核酸でトランスフェクト、形質転換若しくは形質導入されたものである。該細胞は初代被験体細胞およびその子孫を包含する。

【0105】

本明細書で使用される場所の「転写制御下」若しくは「効果的に連結される」という句は、プロモーターが、RNAポリメラーゼによる転写の開始およびポリヌクレオチドの発現を制御するためにポリヌクレオチドに関して正しい場所および方向にあることを意味している。

20

【0106】

本明細書で使用される場所の「ワクチン」という用語は、哺乳動物への物質の投与後に免疫応答を惹起するのに使用される物質と定義する。

【0107】

「ベクター」は、単離された核酸を含んでなりかつ該単離された核酸を細胞の内部に送達するのに使用し得る組成物である。限定されるものでないが、直鎖状ポリヌクレオチド、イオン性若しくは両親媒性化合物と会合したポリヌクレオチド、プラスミドおよびウイルスを挙げることができる多数のベクターが当該技術分野で既知である。従って、「ベクター」という用語は、自律複製するプラスミド若しくはウイルスを包含する。該用語は、例えばポリリシン化合物、リポソームなどのような、細胞中への核酸の移入を容易にするプラスミド以外およびウイルス以外の化合物を包含するとともにまた解釈されるべきである。ウイルスベクターの例は、限定されるものでないがアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどを挙げることができる。

30

【0108】

本明細書で使用される場所の「ウイルス」という用語は、全細胞内で複製することが可能である、外側の脂質エンベロープを伴う若しくは伴わないタンパク質コート中に封入された核酸(RNA若しくはDNA)よりなる粒子と定義する。

【0109】

「異種の」は、異なる種の動物由来の移植片を指す。

40

【0110】

記述

哺乳動物におけるサイトカインシグナル伝達に基づく制御されないシグナル伝達は破壊的な生物学的結果を有し得る。従ってシグナル伝達経路は多様なレベルでしっかりと制御されている。限定されるものでないがサイトカインシグナル伝達のサプレッサー(SOCS)、SH2含有ホスファターゼ(SHP)および活性化型STATのタンパク質インヒビター(PIAS)を挙げることができる多様な型のサイトカインシグナル伝達の調節物質が存在する。

【0111】

50

サイトカインシグナル伝達の誘導可能なインヒビターはサイトカインシグナル伝達のサブレッサー (SOCS) タンパク質であり、それらの8種のファミリーメンバー、すなわちSOCS1~SOCS7およびサイトカインで誘導可能なSH2ドメイン含有タンパク質(CIS)が存在する。SOCSタンパク質はサイトカイン受容体若しくは会合したJAKを認識し、そしてシグナル伝達の直接の妨害およびユビキチン媒介性のプロテオソーム分解への受容体複合体のターゲティングの双方により、シグナル伝達を減弱する。

【0112】

限定されるものでないが(SHP-1およびSHP-2)を挙げることができるSHPタンパク質は構成的に発現され、そして、ヤヌスキナーゼ(JAK)およびその受容体のようなシグナル伝達中間体を脱リン酸化することによりサイトカインシグナル伝達を減弱し得る。限定されるものでないがPIAS1、PIAS3、PIASxおよびPIASyを挙げることができる、活性化型STATのタンパク質インヒビター(PIAS)ファミリーのメンバーもまた構成的に発現され、そしてSTAT活性を抑制することによりシグナル伝達を減弱する。ユビキチン様タンパク質による修飾の過程はSTAT活性のPIAS媒介性の抑制に関わる。

10

【0113】

本発明は、サイトカインシグナル調節物質のこれらの型のいずれか1種若しくはそれ以上の阻害が治療的利益を提供するという発見に関する。従って、本発明は、免疫細胞中のサイトカインシグナル伝達調節物質を調節してそれにより免疫細胞の免疫能を高めるための組成物および方法を含んでなる。該組成物は以下、すなわちサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビター、抗原、サイレンスした免疫細胞、パルスした細胞、抗原でパルスしたサイレンスした免疫細胞、サイトカインなどの最低1種若しくはそれ以上のいかなる組合せも包含する。該組成物はin vivo免疫化および/若しくはex vivo治療のためのワクチンでありうる。

20

【0114】

本発明は、APC中の決定的な制御点を不能にすることによりワクチンの効力を高めるための包括的手段としてサイレンスしたAPCを提供する。本発明のサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビター若しくはサイレンスしたAPCでのワクチン接種は抗原特異的免疫を高める。サイトカインシグナル伝達調節物質のサイレンシングは、抗原を提示する免疫原性のAPCがin vivoで抗原特異的T細胞を持続的に刺激することを可能にするからである。本発明の一態様において、サイレンスしたAPCは、APC成熟および制御性T細胞抑制を阻害する炎症前サイトカインの産生を高めることにより、制御性T細胞のスイッチを切ることが可能である。

30

【0115】

サイレンスしたAPCを生成することに加え、本発明はまた、サイレンスした細胞傷害性Tリンパ球(CTL)も包含する。本開示は、本発明の方法を使用してサイレンスしたCTLが高められた細胞溶解活性を表すことを示す。高められた細胞溶解活性を有するCTLは細胞療法および/若しくはワクチン接種において治療的利益を提供する。

調節物質のインヒビター

本明細書の開示に基づき、本発明は、サイトカインシグナル伝達調節物質を阻害するための包括的概念を包含し、その際に該調節物質は免疫応答に関するシグナル伝達経路を調節することを伴う。

40

【0116】

一態様において、本発明は免疫細胞の免疫能を高めるための組成物を含んでなる。該組成物は、以下の調節物質、すなわちSOCS、SHP若しくはPIASのいずれか1種若しくはそれ以上のインヒビターを含んでなる。本発明の別の局面において、該組成物は細胞中の負の調節経路を妨害する。

【0117】

サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる組成物は、小分子干渉RNA(sRNA)、マイクロRNA、アンチセンス核酸、リボザイム、トランスドミナ

50

ントネガティブ変異体をコードする発現ベクター、細胞内抗体、ペプチドおよび小分子よりなる群から選択される。

【0118】

当業者は、本明細書に提供される開示に基づき、細胞中のサイトカインシグナル伝達調節物質のmRNAおよび/若しくはタンパク質レベルを低下させるための一方法が、調節物質をコードする核酸の発現を低下若しくは阻害することによることを認識するであろう。従って、細胞中のサイトカインシグナル伝達調節物質のタンパク質レベルは、例えばアンチセンス分子若しくはリボザイムのような、遺伝子発現を阻害する若しくは低下させる分子若しくは化合物を使用してもまた低下させ得る。

【0119】

好ましい一態様において、調節配列はプラスミドベクターにより発現されるアンチセンス核酸配列である。アンチセンス発現ベクターを使用して哺乳動物細胞若しくは哺乳動物それ自身をトランスフェクトし、それにより細胞中のサイトカインシグナル伝達調節物質の所望のインヒビターの低下された内因性発現を引き起こす。しかしながら、本発明は、アンチセンス分子での細胞のトランスフェクションによりサイトカインシグナル伝達調節物質の発現を阻害することに制限されると解釈されるべきでない。むしろ、本発明は、限定されるものでないが、リボザイムの使用、非機能的サイトカインシグナル伝達調節物質（すなわちトランスドミナントネガティブ変異体）の発現、および細胞内抗体の使用を挙げることができる、細胞中でのタンパク質の発現若しくは活性を阻害するための当該技術分野で既知の他の方法を包含する。

【0120】

アンチセンス分子および遺伝子発現を阻害するためのそれらの使用は当該技術分野で公知である（例えば、*Oligodeoxyribonucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press 中、Cohen、1989を参照されたい）。アンチセンス核酸は、特定のmRNA分子の少なくとも一部分に対し、その用語が本明細書の別の場所で定義されるところの相補的であるDNA若しくはRNA分子である（*Weintraub*、1990、*Scientific American* 262:40）。細胞中で、アンチセンス核酸は対応するmRNAにハイブリダイズして二本鎖分子を形成し、それにより遺伝子の翻訳を阻害する。

【0121】

遺伝子の翻訳のアンチセンス阻害方法の使用は当該技術分野で既知であり、そして例えばMarcus-Sakura（1988、*Anal. Biochem.* 172:289）に記述されている。こうしたアンチセンス分子は、Inoue、1993、米国特許第5,190,931号明細書により教示されるところのアンチセンス分子をコードするDNAを使用する遺伝子発現を介して細胞に提供しうる。

【0122】

あるいは、本発明のアンチセンス分子を合成で作成しかつその後細胞に提供しうる。約10ないし約30の間、およびより好ましくは約15ヌクレオチドのアンチセンスオリゴマーが好ましい。それらは容易に合成されかつ標的細胞に導入されるためである。本発明により企図される合成アンチセンス分子は、未改変オリゴヌクレオチドに比較して改良された生物学的活性を有する、当該技術分野で既知のオリゴヌクレオチド誘導体を包含する（米国特許第5,023,243号明細書を参照されたい）。

【0123】

遺伝子発現を阻害するためのリボザイムおよびそれらの使用もまた当該技術分野で公知である（例えば、Cechら、1992、*J. Biol. Chem.* 267:17479-17482；Hampelら、1989、*Biochemistry* 28:4929-4933；Ecksteinら、国際特許公開第WO 92/07065号明細書；Altmanら、米国特許第5,168,053号明細書を参照されたい）。リボザイムは、DNA制限エンドヌクレアーゼに類似の様式で他の一本鎖RNAを特異的に切断する能

10

20

30

40

50

力を有するRNA分子である。これらのRNAをコードするヌクレオチド配列の改変により、分子はRNA分子中の特定のヌクレオチド配列を認識しかつそれを切断するように工
作し得る (Cech、1988、J. Amer. Med. Assn. 260:3030)。
このアプローチの大きな一利点は、リボザイムが配列特異的であるという事実である。

【0124】

リボザイムの2種の基本的な型、すなわちテトラヒメナ型 (Hasselhoff、1988、Nature 334:585) およびハンマーヘッド型が存在する。テトラヒメナ型リボザイムは長さ4塩基である配列を認識する一方、ハンマーヘッド型リボザイムは長さ11~18塩基の塩基配列を認識する。配列が長くなるほど、配列が標的mRNA種中に独占的に存在するであろう見込みが大きくなる。結果、ハンマーヘッド型リボザイムは、特定のmRNA種を不活性化するためにテトラヒメナ型リボザイムより好ましく、また、18塩基の認識配列は、多様な無関係のmRNA分子内に無作為に存在しうるより短い認識配列より好ましい。

10

【0125】

サイトカインシグナル伝達調節物質の発現を阻害するために有用なリボザイムは、限定されるものでないがSOCS (SOCS1~7、CIS)、SHP (SHP-1およびSHP-2) ならびにPIAS (PIAS1、PIAS3、PIASxおよびPIASy) を挙げることができる本発明の所望のサイトカインシグナル伝達調節物質のmRNA配列に相補的である基本的リボザイム構造に標的配列を組み込むことにより設計しうる。所望のサイトカイン調節物質を標的とするリボザイムは、商業的に入手可能な試薬 (Applied Biosystems, Inc.、カリフォルニア州フォスターシティ) を使用して合成しうるか、若しくはそれらはそれらをコードするDNAから遺伝子的に発現させうる。

20

【0126】

本発明の別の局面において、サイトカインシグナル伝達調節物質は、該サイトカインシグナル伝達調節物質を不活性化かつ/若しくは隔絶する (sequester) 方法により阻害し得る。であるから、サイトカインシグナル伝達調節物質の効果を阻害することは、トランスドミナントネガティブ変異体を使用することにより達成し得る。あるいは、そうでなければサイトカインシグナル伝達調節物質に対するアンタゴニストとして既知の、所望のサイトカイン調節物質に特異的な細胞内抗体を使用しうる。一態様において、アンタゴニストは、サイトカインシグナル伝達調節物質の結合パートナーを妨害しかつそれにより対応する野性型のサイトカインシグナル伝達調節物質と競合するという所望の特性を有するタンパク質および/若しくは化合物である。別の態様において、アンタゴニストは、サイトカインシグナル伝達調節物質を妨害しかつそれにより該サイトカインシグナル伝達調節物質を隔絶するという所望の特性を有するタンパク質および/若しくは化合物である。

30

【0127】

小分子干渉RNA (siRNA)

小分子干渉RNA (siRNA) は、目的の遺伝子若しくはポリヌクレオチドを標的とする一組のヌクレオチドを含んでなるRNA分子である。本明細書で使用されるところの「siRNA」という用語は、限定されるものでないが、(i) 二本鎖RNAポリヌクレオチド、(ii) 一本鎖ポリヌクレオチド、および(iii) こうしたポリヌクレオチドが1、2、3、4若しくはそれ以上のヌクレオチドの変化若しくは置換をその中に有する(i) 若しくは(ii) いずれかのポリヌクレオチドを挙げることができる、全部の形態のsiRNAを包含する。

40

【0128】

二本鎖ポリヌクレオチドの形態のsiRNAは、長さが約18塩基対、約19塩基対、約20塩基対、約21塩基対、約22塩基対、約23塩基対、約24塩基対、約25塩基対、約26塩基対、約27塩基対、約28塩基対、約29塩基対若しくは約30塩基対を含んでなる。該二本鎖siRNAはサイトカインシグナル伝達調節物質の発現および/若

50

しくは活性を妨害することができる。。

【0129】

一本鎖 *siRNA* は、目的の遺伝子若しくはポリヌクレオチドを標的とする RNA ポリヌクレオチド配列の一部を含んでなる。一本鎖 *siRNA* は、長さが約 18 ヌクレオチド、約 19 ヌクレオチド、約 20 ヌクレオチド、約 21 ヌクレオチド、約 22 ヌクレオチド、約 23 ヌクレオチド、約 24 ヌクレオチド、約 25 ヌクレオチド、約 26 ヌクレオチド、約 27 ヌクレオチド、約 28 ヌクレオチド、約 29 ヌクレオチド若しくは約 30 ヌクレオチドのポリヌクレオチドを含んでなる。一本鎖 *siRNA* は、SOCS (SOCS1 ~ SOCS7、CIS)、SHP、PIAS のような標的ポリヌクレオチド若しくはそれらのバリエーションの発現および/若しくは活性を妨害することが可能である。一本鎖 *siRNA* はまた、相補配列にアニーリングして、サイトカインシグナル伝達調節物質の発現および/若しくは活性を妨害することが可能である dsRNA をもたらすことも可能である。

10

【0130】

なお別の局面において、*siRNA* は二本鎖若しくは一本鎖いずれかのポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドを含んでなり、該 *siRNA* は 1、2、3、4 若しくはそれ以上のヌクレオチドの変化若しくは置換をその中に有する。

【0131】

siRNA ポリヌクレオチドは、転写後の遺伝子サイレンシング機構を介して起こると一般に考えられる RNA 活性を妨害する RNA 核酸分子である。*siRNA* ポリヌクレオチドは、好ましくは二本鎖 RNA (dsRNA) を含んでなるが、しかしそのように制限されることを意図しておらず、そして一本鎖 RNA を含みうる (例えば Martinez ら、2002 Cell 110: 563-74 を参照されたい)。本発明に包含される *siRNA* ポリヌクレオチドは、ヌクレオチド (リボヌクレオチド若しくはデオキシリボヌクレオチドまたは双方の組合せ) および/あるいは本明細書に提供されるもののヌクレオチドアナログ (例えば典型的に 5' から 3' のホスホジエステル結合にあるオリゴヌクレオチド若しくはポリヌクレオチドなど) の他の天然に存在する、組換えの、若しくは合成の一本鎖若しくは二本鎖ポリマーを含みうる。従って、相補ヌクレオチドの塩基対形成の十分に確立された原理を考えれば、*siRNA* ポリヌクレオチドの転写を指図することが可能な DNA 配列として本明細書に開示されるある種の例示的配列が、対応する RNA 配列およびそれらの相補物を記述することもまた意図していることが認識されるであろう。

20

30

【0132】

siRNA は RNA ポリメラーゼプロモーターのプロモーターを含有する DNA (ゲノム、cDNA 若しくは合成) を鋳型として使用して転写されうる。例えば、プロモーターは U6 プロモーター若しくは H1 RNA ポリメラーゼ III プロモーターであり得る。あるいは、*siRNA* は合成で派生される RNA 分子でありうる。ある態様において、*siRNA* ポリヌクレオチドは平滑端を有しうる。ある他の態様において、*siRNA* ポリヌクレオチドの少なくとも一方の鎖は、*siRNA* ポリヌクレオチドのいずれかの鎖の 3' 端に「突出する」(すなわち相対する鎖の相補塩基と塩基対形成しない) 最低 1、および好ましくは 2 ヌクレオチドを有する。本発明の好ましい一態様において、*siRNA* ポリヌクレオチド二重鎖の各鎖は 3' 端に 2 ヌクレオチドの突出を有する。該 2 ヌクレオチドの突出は、好ましくはチミジンジヌクレオチド (TT) であるが、しかし、他の塩基、例えば TC ジヌクレオチド若しくは TG ジヌクレオチド、またはいずれかの他のジヌクレオチドもまた含みうる。突出ジヌクレオチドは、干渉を標的とするポリヌクレオチドの配列の 5' 端の 2 ヌクレオチドに相補的であってもまたよい。*siRNA* ポリヌクレオチドの 3' 端の論考については、例えば第 WO 01/75164 号明細書を参照されたい。

40

【0133】

好ましい *siRNA* ポリヌクレオチドは、約 18 ~ 30 ヌクレオチド塩基対、好ましくは約 18、約 19、約 20、約 21、約 22、約 23、約 24、約 25、約 26 若しくは

50

約 27 塩基対、および他の好ましい態様においては約 19、約 20、約 21、約 22 若しくは約 23 塩基対、または約 27 塩基対の二本鎖ポリヌクレオチドを含んでなり、ここで「約」の使用は、ある態様においておよびある条件下で、選択されたポリペプチドの発現を妨害することが可能である機能的 siRNA ポリヌクレオチドを生じさせるプロセッシング的 (processive) 切断段階が絶対的に効率的ではないかもしれないことを示す。これゆえに、siRNA ポリヌクレオチドは、該 siRNA のプロセッシング、生合成若しくは人工的合成での変動性の結果として、1、2、3、4 若しくはそれ以上の塩基対だけ長さが (例えばヌクレオチド挿入若しくは欠失により) 異なりうる 1 種若しくはそれ以上の siRNA ポリヌクレオチド分子を包含しうる。本発明の siRNA ポリヌクレオチドは、特定の配列と 1、2、3 若しくは 4 ヌクレオチドで (例えば転移若しくは塩基移行を包含するヌクレオチド置換により) 異なることにより変動性を表すポリヌクレオチド配列もまた含みうる。これらの差違は、分子の長さ、二本鎖ポリヌクレオチドのセンス鎖に存するか若しくはアンチセンス鎖に存するかに依存して、特定の siRNA ポリヌクレオチド配列のヌクレオチド位置のいずれでも起こりえる。ヌクレオチドの差違は二本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖で見出されることがあり、ここで置換ヌクレオチドが典型的に水素結合の塩基対形成を生じるとみられる相補ヌクレオチドは必ずしも対応して置換されなくてもよい。好ましい態様において、siRNA ポリヌクレオチドは特定のヌクレオチド配列に関して均一である。

10

【0134】

本発明の siRNA ポリヌクレオチドを含んでなるポリヌクレオチドは、ある態様においては、典型的にはスペーサー配列により分離される (例えば約 18 ~ 30 ヌクレオチドの) 一本鎖オリゴヌクレオチドフラグメントおよびその逆相補物を含んでなる一本鎖ポリヌクレオチド由来でありうる。あるこうした態様により、スペーサーの切断が該一本鎖オリゴヌクレオチドフラグメントおよびその逆相補物を提供し、その結果、それらはアニーリングして、場合によってはいずれか若しくは双方の鎖の 3' 端および / 若しくは 5' 端からの 1、2、3 若しくはそれ以上のヌクレオチドの付加若しくは除去をもたらしうる付加的なプロセッシング段階で本発明の二本鎖 siRNA ポリヌクレオチドを形成しうる。ある態様において、スペーサーは、スペーサーの切断、および場合によってはいずれか若しくは双方の鎖の 3' 端および / 若しくは 5' 端からの 1、2、3、4 若しくはそれ以上のヌクレオチドの付加若しくは除去をもたらしうるその後のプロセッシング段階の前に、該フラグメントおよびその逆相補物がアニーリングしかつ (例えばヘアピンポリヌクレオチドのような) 二本鎖構造を形成することを可能にする長さのものである。スペーサー配列は、従って、二本鎖核酸にアニーリングされる場合に siRNA ポリヌクレオチドをもたらす、2 個の相補ポリヌクレオチド配列の領域間に存する、本明細書で提供されるところのいかなるポリヌクレオチド配列でもありうる。好ましくは、スペーサー配列は最低 4 ヌクレオチドを含んでなる。ある態様において、スペーサーは、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21 ~ 25、26 ~ 30、31 ~ 40、41 ~ 50、51 ~ 70、71 ~ 90、91 ~ 110、111 ~ 150、151 ~ 200 若しくはそれ以上のヌクレオチドを含みうる。スペーサーにより分離される 2 個の相補ヌクレオチド配列を含んでなる単一ヌクレオチド鎖由来の siRNA ポリヌクレオチドの例が記述されている (例えば、Brummelkampら、2002 Science 296:550; Paddisonら、2002 Genes Develop. 16:948; Paulら、2002 Nat. Biotechnol. 20:505-508; Grabarekら、2003 BioTechniques 34:734-44)。

20

30

40

【0135】

ポリヌクレオチドバリエーションは、siRNA ポリヌクレオチドの活性が実質的に消失されないような 1 個若しくはそれ以上の置換、付加、欠失および / 若しくは挿入を含有しうる。siRNA ポリヌクレオチドの活性に対するヌクレオチド内容のいずれかのこうした変化の影響は、一般に、本明細書の別の場所に記述されるとおり評価しうる。バリエーション

50

は、好ましくは、天然のSOCS(SOCS1~SOCS7、CIS)、SHP(SHP-1およびSHP-2)若しくはPIAS(PIAS1、PIAS3、PIASxおよびPIAsy)をコードするポリヌクレオチド配列の一部に最低約75%、78%、80%、85%、87%、88%若しくは89%の同一性、およびより好ましくは最低約90%、92%、95%、96%若しくは97%の同一性を表す。同一性パーセントは、当業者に公知のコンピュータアルゴリズムを使用することを包含するいずれかの方法を使用して、該ポリヌクレオチドの配列を標的ポリヌクレオチドの対応する部分と比較することにより容易に決定しうる。これらはAlign若しくはBLASTアルゴリズムを包含する(Altschul、1991、J.Mol.Biol.219:555-565;HenikoffとHenikoff、1992、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915-10919)。

10

【0136】

ある種のsiRNAポリヌクレオチドバリエーションは、標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの一部に実質的に相同であり得る。これらのポリヌクレオチドバリエーション由来の一本鎖ポリヌクレオチドは、適度にストリンジェント条件下で、標的ポリペプチドをコードする天然に存在するDNA若しくはRNA配列にハイブリダイズすることが可能である。標的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に適度にストリンジェント条件下で検出可能にハイブリダイズするsiRNAポリヌクレオチドは、特定の標的ポリヌクレオチドに相補的である最低10の連続するヌクレオチド、より好ましくは11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29若しくは30の連続するヌクレオチドを包含するヌクレオチド配列を有しうる。ある好ましい態様において、こうしたsiRNA配列(若しくはその相補物)は、発現の妨害が望ましい標的ポリペプチドをコードする単一の特定のポリヌクレオチドに独特であることができる。ある他の態様において、該配列(若しくはその相補物)は、ポリペプチド発現の妨害が望ましい標的ポリペプチドをコードする2種若しくはそれ以上の関連するポリヌクレオチドにより共有されうる。

20

【0137】

適する適度なストリンジェント条件は、例えば、5xSSC、0.5%SDS、1.0mMEDTA(pH8.0)の溶液中でポリヌクレオチドを前洗浄すること;50~70°C、5xSSCで1~16時間(例えば一夜)ポリヌクレオチドをハイブリダイズさせること;次いで、0.05~0.1%SDSを含有する2x、0.5xおよび0.2xSSCの1種若しくはそれ以上のそれぞれで22~65°Cで24~40分間、ポリヌクレオチドを1若しくは2回洗浄することを包含する。付加的なストリンジェント条件には、ハイブリダイゼーション条件は、50~60°Cで0.1xSSCおよび0.1%SDS中15~40分間の1回の付加的な洗浄を包含しうる。当業者は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェント条件の変動が、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーションおよび洗浄段階に使用される時間、温度および/若しくは溶液の濃度を変えることにより達成されうることを理解するであろう。適する条件は、部分的に、使用されるプローブ、およびプロットされるプロバンド(proband)核酸サンプルの特定のヌクレオチド配列にもまた依存しうる。従って、適してストリンジェント条件は、ポリヌクレオチドの所望の選択性が同定される場合に、ある他の発端体配列にハイブリダイズしない一方で1種若しくはそれ以上のある発端体配列にハイブリダイズするその能力に基づいて、過度の実験を伴わずに容易に選択され得ることが認識されるであろう。

30

40

【0138】

本発明の配列特異的siRNAポリヌクレオチドは、いくつかの基準の1個若しくはそれ以上を使用して設計しうる。例えば、目的のポリペプチドをコードする配列に同一の約21の連続するヌクレオチドを有するsiRNAポリヌクレオチドを設計するため、該ポリヌクレオチド配列のオープンリーディングフレームを、以下の特徴、すなわち(1)およそ1:1の、しかし2:1若しくは1:2を超えないA+T/G+C比;(2)5'端のAAジヌクレオチド若しくはCAジヌクレオチド;(3)55°C未満の温度で融解する

50

内的ヘアピンループ；(4)37 未満の温度で融解するホモダイマー（(3)および(4)で記述されることの融解温度の計算は当業者に既知のコンピュータソフトウェアを使用して決定し得る）；(5)いずれかの他の既知のポリヌクレオチド配列に存在するとして同定されていない最低16の連続するヌクレオチドの配列、の1種若しくはそれ以上を有する約21塩基配列長さについて走査しうる。あるいは、siRNAポリヌクレオチド配列は、多様な供給元、例えばOligo Engine, TM. (ワシントン州シアトル)；Dharmacon, Inc. (コロラド州ラファイエット)；Ambion Inc. (テキサス州オースチン)；およびQIAGEN, Inc. (カリフォルニア州バレンシア)から商業的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して設計しかつ選ぶことができる。Elbashirら、2000 Genes & Development 15:188-200；Elbashirら、2001 Nature 411:494-98もまた参照されたい。siRNAポリヌクレオチドはその後、当該技術分野で既知かつ本明細書の別の場所に記述される方法に従って、標的ポリペプチドの発現を妨害する能力について試験しうる。siRNAポリヌクレオチドの有効性の決定は、標的ポリペプチドの発現を妨害するその能力の考慮のみならず、しかしまた該siRNAポリヌクレオチドが宿主細胞に対し毒性であるかどうかも包含する。例えば、所望のsiRNAはRNA干渉活性を表すとみられ、かつまた望ましくない生物学的結果を表すとみられない。望ましくない生物学的結果の一例は、宿主細胞中への該siRNAの導入の結果として細胞死が望ましくない細胞のアポトーシスである。

【0139】

本開示に基づき、本発明のsiRNAが、多様な程度までの標的ポリペプチド発現のサイレンシングを遂げうることが認識されるはずである。siRNAは、従って最初にそれらの有効性について試験されなければならない。siRNAの選択を、標的ポリペプチドの発現を妨害若しくは調節する所定のsiRNAの能力に基づきそれから行う。従って、所望の標的ポリペプチドの発現を妨害することが可能である特定のsiRNAポリペプチド配列の同定は、各siRNAの製造および試験を必要とする。各siRNAの試験方法および本発明での使用のための適するsiRNAの選択は本明細書で実施例に完全に示している。タンパク質発現を妨害する全部のsiRNAが生理学上重要な効果を有することができるわけではないため、本開示はまた、本発明のsiRNAを使用しての標的タンパク質発現の妨害のレベルが臨床上適切な意義を有するかどうかを決定するための多様な生理学的に関連するアッセイもまた示す。

【0140】

当業者は、遺伝暗号の縮重の結果として多くの異なるヌクレオチド配列が同一のポリペプチドをコードしうることを容易に認識するであろう。すなわち、あるアミノ酸は数種の異なるコドンの1種によりコードされることができ、そして、当業者は、特定のヌクレオチド配列が別のものと異なる一方で、該ポリヌクレオチドが実際には同一のアミノ酸配列をもつポリペプチドをコードしうることを容易に決定し得る。であるから、コドン使用頻度の差違により変動するポリヌクレオチドを、本発明によりとりわけ企図している。

【0141】

siRNAのポリヌクレオチドは、とりわけ望ましいsiRNAポリヌクレオチドの製造に有用である多様な技術のいずれを使用して製造してもよい。例えば、ポリヌクレオチドは適する細胞若しくは組織型から調製したcDNAから増幅しうる。こうしたポリヌクレオチドはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を介して増幅しうる。このアプローチを使用して、配列特異的プライマーを本明細書に提供される配列に基づき設計し、また、購入若しくは直接合成しうる。プライマーの増幅された一部分を使用して、適するDNAライブラリーから公知の技術を使用して完全長遺伝子若しくはその所望の一部分を単離しうる。ライブラリー(cDNA若しくはゲノム)は、増幅に適する1種若しくはそれ以上のポリヌクレオチドプローブ若しくはプライマーを使用してスクリーニングする。好ましくは、ライブラリーはより大きなポリヌクレオチド配列を包含するように大きさを選択する。ランダムプライムライブラリーもまた、遺伝子の5'および他の上流領域を同定するために

好ましいことができる。ゲノムライブラリーはイントロンおよび伸長する5'配列を得るために好ましい。本発明により企図される*siRNA*ポリヌクレオチドは、*siRNA*ポリヌクレオチド配列のライブラリーからもまた選択しうる。

【0142】

ハイブリダイゼーション技術のため、部分的ポリヌクレオチド配列を、公知の技術を使用して（例えばニックトランスレーション若しくは^{3'2'P}での末端標識により）標識しうる。細菌若しくはバクテリオファージライブラリーをその後、標識プローブを伴う変性細菌コロニー（若しくはファージブラークを含有する菌叢）を含有するフィルターへのハイブリダイゼーションによりスクリーニングしうる（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratories、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、2001を参照されたい）。ハイブリダイズするコロニー若しくはブラークを選択かつ増殖させ、そしてDNAをさらなる分析のため単離する。

10

【0143】

あるいは、部分的cDNA配列から完全長のコーディング配列を得るための多数の増幅技術が当該技術分野で既知である。こうした技術内で、増幅は一般にPCRを介して実施される。1種のこうした技術が「cDNA端の迅速増幅」すなわちRACEとして既知である（例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratories、ニューヨーク州コールドスプリングハーバー、2001を参照されたい）。

20

【0144】

標的ポリペプチドの発現を妨害するのに有用な多数の特異的*siRNA*ポリヌクレオチド配列が、本明細書に包含される実施例、図面および配列表に提示される。*siRNA*ポリヌクレオチドは、一般に、例えば固相化学合成を包含する当該技術分野で既知のいずれの方法によっても製造しうる。ポリヌクレオチド配列の改変は、オリゴヌクレオチド指向性の部位特異的突然変異誘発のような標準的突然変異誘発技術を使用してもまた導入しうる。さらに、*siRNA*は、それらの安定性および/若しくは送達特性を向上させるように化学的に改変若しくは他の分子と複合させうる。本発明の一面面として、1個若しくはそれ以上のリボース糖がそれらから除去されている本明細書に記述されるところの*siRNA*が包含される。

30

【0145】

あるいは、*siRNA*ポリヌクレオチドは、適するDNA配列（例えば標的ポリペプチド若しくはその所望の一部をコードするポリヌクレオチド配列）の*in vitro*若しくは*in vivo*転写により生成させうるが、但し、該DNAは適するRNAポリメラーゼプロモーター（例えばT7、U6、H1若しくはSP6のような、とは言え他のプロモーターが同等に有用でありうる）とともにベクターに組み込まれる。加えて、*siRNA*ポリヌクレオチドは、所望の*siRNA*が*in vivo*で生成されるような転写（および場合によっては適切なプロセッシング段階）を支援するDNA配列（例えば本明細書に提供されるところの組換え核酸構築物）がそうであろうように、哺乳動物に投与しうる。

40

【0146】

一態様において、*siRNA*ポリヌクレオチド（該*siRNA*ポリヌクレオチドは標的ポリペプチドの発現を妨害することが可能である）を、サイレンスした細胞を生成させるのに使用し得る。生物学的供給源とある時間接触される場合に標的ポリペプチドの発現の有意の減少をもたらすいかなる*siRNA*ポリヌクレオチドも、本発明に包含される。好ましくは、該減少は、該*siRNA*の非存在下で検出される標的ポリペプチドの発現のレベルに関して約10%より大きく、より好ましくは約20%より大きく、より好ましくは約30%より大きく、より好ましくは約40%、約50%、約60%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%若しくは約98%より大きい。好ましくは

50

、細胞中の *siRNA* ポリヌクレオチドの存在は、いかなる望ましくない毒性の効果、例えば、アポトーシスが *RNA* 干渉の所望の結果でない細胞のアポトーシス若しくは死ももたらさないか若しくは引き起こさない。

【0147】

別の態様において、*siRNA* ポリヌクレオチドは、生物学的供給源とある時間接触される場合に標的ポリペプチドの発現の有意の減少をもたらす。好ましくは、該減少は、該 *siRNA* の非存在下で検出される標的ポリペプチドの発現レベルに関して、約10%~20%、より好ましくは約20%~30%、より好ましくは約30%~40%、より好ましくは約40%~50%、より好ましくは約50%~60%、より好ましくは約60%~70%、より好ましくは約70%~80%、より好ましくは約80%~90%、より好ましくは約90%~95%、より好ましくは約95%~98%である。好ましくは、細胞中の *siRNA* ポリヌクレオチドの存在は、いかなる望ましくない毒性の効果ももたらさないか若しくは引き起こさない。

10

【0148】

なお別の態様において、*siRNA* ポリヌクレオチドは、生物学的供給源とある時間接触される場合に標的ポリペプチドの発現の有意の減少をもたらす。好ましくは、該減少は、該 *siRNA* の非存在下で検出される標的ポリペプチドの発現レベルに関して、約10%若しくはそれ以上、より好ましくは約20%若しくはそれ以上、より好ましくは約30%若しくはそれ以上、より好ましくは約40%若しくはそれ以上、より好ましくは約50%若しくはそれ以上、より好ましくは約60%若しくはそれ以上、より好ましくは約70%若しくはそれ以上、より好ましくは約80%若しくはそれ以上、より好ましくは約90%若しくはそれ以上、より好ましくは約95%若しくはそれ以上、より好ましくは約98%若しくはそれ以上である。好ましくは、細胞中の *siRNA* ポリヌクレオチドの存在は、いかなる望ましくない毒性の効果ももたらさないか若しくは引き起こさない。

20

【0149】

であるから、本発明は、配列番号1~3、21~23および27~56に例示されるところの *siRNA* のような *siRNA* ポリヌクレオチドを含んでなる。配列番号1~3および21~23は、それぞれ、SOCS1のネズミおよびヒトの *siRNA* の候補配列の配列である。配列番号27~32、33~38、39~44、45~50および51~56は、それぞれPIAS1、PIAS3、PIASx、PIASyおよびSHP-1のヒト *siRNA* の候補配列の配列である。*siRNA* の配列を図30に描く。サイトカインシグナル伝達の多様な調節物質のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、当業者に既知のコンピュータ化されたデータベースで見出さる。1つのこうしたデータベースは国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information)のGenbankおよびGenPeptデータベースである。これらの既知の遺伝子の核酸配列は、本明細書に開示される技術を使用して、若しくは当業者に既知であろういずれかの技術(例えば、Sambrookら、2001)により増幅し、本明細書に開示される配列と結合(例えば連結し)かつ/若しくは発現させうる。核酸は *in vitro* 発現系で発現させうるとは言え、好ましい態様において、核酸は *in vivo* 複製および/若しくは発現のためのベクターを含んでなる。

30

40

【0150】

siRNA の改変

本発明の *siRNA* ポリヌクレオチドの生成後に、当業者は、該 *siRNA* ポリヌクレオチドが治療的化合物として該 *siRNA* を改良するように改変し得るある特徴を有することができることを理解するであろう。従って、*siRNA* ポリヌクレオチドは、ホスホロチオエート、若しくは他の結合すなわちメチルホスホネート、スルホン、スルフェート、ケチル、ホスホロジチオエート、ホスホルアミデート、リン酸エステルなどを包含するようにそれを改変することにより分解に抵抗するようさらに設計しうる(例えば、Agrwalら、1987 Tetrahedron Lett. 28:3539-3542;

50

Stecら、1985 Tetrahedron Lett. 26:2191-2194; Moodyら、1989 Nucleic Acids Res. 12:4769-4782; Eckstein、1989 Trends Biol. Sci. 14:97-100; Stein、Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression、Cohen編、Macmillan Press、ロンドン中pp.97-117(1989)を参照されたい)。

【0151】

本発明のいかなるポリヌクレオチドも、*in vivo*でのその安定性を増大させるようにさらに改変しうる。可能な改変は、限定されるものでないが、5'および/若しくは3'端での隣接配列の付加;バックボーン中のホスホジエステル結合よりむしろホスホチオエート若しくは2'-O-メチルの使用;ならびに/またはイノシン、ケオシンおよびワイプトシンなど、ならびにアセチル、メチル、チオならびに他の修飾された形態のアデニン、シチジン、グアニン、チミンおよびウリジンのような非伝統的塩基の包含を挙げることができる。

【0152】

ベクター

他の関連する局面において、本発明はインヒビターをコードする単離された核酸を包含し、該インヒビター、好ましくは*siRNA*は、該核酸が該核酸によりコードされるタンパク質の発現を指図することが好ましくは可能であるようなプロモーター/制御配列を含んでなる核酸に操作可能に連結されているサイトカインシグナル伝達調節物質を阻害する。従って、本発明は、例えばSambrookら(2001、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク)およびAusubelら(1997、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク)に記述されるもののような、細胞中の外因性DNAの同時の発現を伴う細胞中への外因性DNAの導入のための発現ベクターおよび方法を包含する。

【0153】

別の局面において、本発明は*siRNA*ポリヌクレオチドを含んでなるベクターを包含する。好ましくは、*siRNA*ポリヌクレオチドは標的ポリペプチドの発現を阻害することが可能であり、該標的ポリペプチドはSOCS(SOCS1~7、CIS)、SHP若しくはPIASよりなる群から選択される。所望のポリヌクレオチドのベクター中への取り込みおよびベクターの選択は、例えばSambrookら、上記およびAusubelら、上記に記述されるとおり当該技術分野で公知である。

【0154】

*siRNA*ポリヌクレオチドは多数の型のベクターにクローン化し得る。しかしながら、本発明はいずれかの特定のベクターに制限されると解釈されるべきでない。代わりに、本発明は、容易に入手可能かつ/若しくは当該技術分野で公知である夥しいベクターを包含すると解釈されるべきである。例えば、本発明の*siRNA*ポリヌクレオチドは、限定されるものでないが、プラスミド、ファージミド、ファージ誘導体、動物ウイルスおよびコスミドを挙げることができるベクターにクローン化し得る。特定の目的のベクターは、発現ベクター、複製ベクター、プローブ生成ベクターおよび配列決定ベクターを包含する。

【0155】

特定の態様において、発現ベクターは、ウイルスベクター、細菌ベクターおよび哺乳動物細胞ベクターよりなる群から選択される。上で論考された組成物の少なくとも一部若しくは全部を含んでなる多数の発現ベクター系が存在する。原核生物および/若しくは真核生物ベクターに基づく系を、ポリヌクレオチド若しくはそれらのコグネイトのポリペプチドを産生するための本発明での使用に使用し得る。多くのこうした系が商業的にかつ広範

10

20

30

40

50

に入手可能である。

【0156】

さらに、発現ベクターはウイルスベクターの形態で細胞に提供しうる。ウイルスベクター技術は当該技術分野で公知であり、そして例えば Sambrookら(2001)および Ausubelら(1997)、ならびに他のウイルス学および分子生物学の手引書に記述されている。ベクターとして有用であるウイルスは、限定されるものでないがレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスおよびレンチウイルスを挙げることができる。一般に、適するベクターは、最低1種の生物体中で機能的な複製起点、プロモーター配列、便宜的な制限エンドヌクレアーゼ部位および1種若しくはそれ以上の選択可能なマーカーを含有する。(例えば、第WO 01/96584号明細書;第WO 01/29058号明細書;および米国特許第6,326,193号明細書を参照されたい。

10

【0157】

siRNAの発現のため、各プロモーター中の最低1モジュールが、RNA合成の開始部位の位置を定めるよう機能する。これの最良の既知の例はTATAボックスであるが、しかし、哺乳動物の末端デオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターおよびSV40遺伝子のプロモーターのような、TATAボックスを欠く数種のプロモーターにおいては、開始部位それ自身の上にある別個の要素が、開始の場所を固定するのに役立つ。

【0158】

付加的なプロモーター要素、すなわちエンハンサーは、転写開始の頻度を調節する。典型的には、これらは開始部位の30~110bp上流の領域に配置されるとは言え、多数のプロモーターが開始部位の下流の機能的要素を同様に含有することが最近示された。プロモーター要素間の間隔は頻りに柔軟性であり、その結果、プロモーター機能は、要素が相互に関して反転若しくは移動されている場合に保存される。チミジンキナーゼ(tk)プロモーターにおいては、プロモーター要素間の間隔を、活性が減少し始める前に50bp離れてまで増大させ得る。プロモーターに依存して、個々の要素は、転写を活性化するために協同的に若しくは独立してのいずれでも機能し得るようである。

20

【0159】

プロモーターは、コーディングセグメントおよび/若しくはエキソンの上流に配置される5'非コーディング配列を単離することにより得られるであろうとおり、遺伝子若しくはポリヌクレオチド配列と天然に会合しているものでありうる。こうしたプロモーターは「内因性」と称され得る。同様に、エンハンサーは、その配列の下流若しくは上流のいずれかに配置されるポリヌクレオチド配列と天然に会合しているものでありうる。あるいは、組換え若しくは異種プロモーター(その天然の環境で該ポリヌクレオチド配列と通常は会合していないプロモーターを指す)の制御下にコーディングポリヌクレオチドセグメントを配置することにより、ある種の利点を獲得することができる。組換え若しくは異種エンハンサーは、その天然の環境でポリヌクレオチド配列と通常会合していないエンハンサーもまた指す。こうしたプロモーター若しくはエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーター若しくはエンハンサー、およびいずれかの他の原核生物、ウイルス若しくは真核生物細胞から単離されたプロモーター若しくはエンハンサー、ならびに、「天然に存在し」ない、すなわち発現を変える多様な転写制御領域の多様な要素および/若しくは変異体を含有するプロモーター若しくはエンハンサーを包含しうる。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成で製造することに加え、配列は、本明細書に開示される組成物とともに、組換えクローニングおよび/若しくはPCRTMを包含する核酸増幅技術を使用して製造しうる(米国特許第4,683,202号明細書、米国特許第5,928,906号明細書)。さらに、ミトコンドリア、葉緑体などのような核以外の小器官内での配列の転写および/若しくは発現を指図する制御配列を同様に使用し得ることが企図されている。

30

40

【0160】

当然、発現に選択した細胞型、小器官および生物体中でのDNAセグメントの発現を効

50

果的に指図するプロモーターおよび/若しくはエンハンサーを使用することが重要であることができる。分子生物学の当業者は、一般に、タンパク質発現のためのプロモーター、エンハンサーおよび細胞型の組合せの使用方法を知っている。例えば Sambrookら(2001)を参照されたい。使用されるプロモーターは、構成的、組織特異的、誘導可能、ならびに/または、組換えタンパク質および/若しくはペプチドの大スケール生産で有利であるような、導入されたDNAセグメントの高レベル発現を指図するのに適切な条件下で有用でありうる。プロモーターは異種であっても若しくは内因性であってもよい。

【0161】

本明細書に提示される実験実施例で例示されるプロモーター配列は、前初期サイトメガロウイルス(CMV)プロモーター配列である。このプロモーター配列は、それに効果的に連結されたいかなるポリヌクレオチド配列の高レベルの発現も駆動することが可能な、強力な構成的プロモーター配列である。しかしながら、限定されるものでないがSV40初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス(MMTV)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)末端反復配列(LTR)プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、トリ白血球ウイルスプロモーター、エプスタイン-バーウイルス前初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ならびに、限定されるものでないがアクチンプロモーター、ミオシンプロモーター、ヘモグロビンプロモーターおよび筋クレアチンプロモーターを挙げることができるヒト遺伝子プロモーターを挙げることができる、他の構成的プロモーター配列もまた使用しうる。さらに、本発明は構成的プロモーターの使用に制限されるべきでない。誘導可能なプロモーターもまた本発明の一部として企図している。本発明での誘導可能なプロモーターの使用は、こうした発現が望ましい場合にそれが効果的に連結されているポリヌクレオチド配列の発現のスイッチを入れる、若しくは発現が望ましくない場合に該発現のスイッチを切ることが可能な分子スイッチを提供する。誘導可能なプロモーターの例は、限定されるものでないがメタロチオニン(metallothionein)プロモーター、グルココルチコイドプロモーター、プロゲステロンプロモーターおよびテトラサイクリンプロモーターを挙げることができる。さらに、本発明は組織特異的プロモーターの使用を包含し、このプロモーターは所望の組織中でのみ活性である。組織特異的プロモーターは当該技術分野で公知であり、そして、限定されるものでないがHER-2プロモーターおよびPSA関連プロモーター配列を挙げることができる。

【0162】

siRNAの発現を評価するために、細胞中に導入されるべき発現ベクターは、ウイルスベクターによりトランスフェクト若しくは感染されることが探求される細胞の集団からの発現細胞の同定および選択を容易にするために、選択可能なマーカー遺伝子若しくはレポーター遺伝子のいずれかまたは双方もまた含有し得る。他の態様において、選択可能なマーカーは別個の一片のDNA上で運搬されかつトランスフェクション手順で使用されうる。選択可能なマーカーおよびレポーター遺伝子の双方は、宿主細胞中での発現を可能にするために適切な制御配列と隣接させうる。有用な選択可能なマーカーは当該技術分野で既知であり、そして例えばneoなどのような抗生物質耐性遺伝子を包含する。

【0163】

レポーター遺伝子は、潜在的にトランスフェクトされた細胞を同定するため、および制御配列の機能性を評価するために使用する。容易にアッセイ可能なタンパク質をコードするレポーター遺伝子が当該技術分野で公知である。一般に、レポーター遺伝子は、レシピエントの生物体若しくは組織中に存在しないか若しくはそれらにより発現されず、かつ、何らかの容易に検出可能な特性、例えば酵素活性によりその発現が明示されるタンパク質をコードする遺伝子である。レポーター遺伝子の発現は、該DNAをレシピエント細胞に導入した後の適した時点でアッセイする。

【0164】

適するレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、分泌型アルカリホスファターゼをコードする遺伝子、若しくは緑色蛍光タンパク質遺伝子を包含しうる(例えば、Ui-Teiら、2000

10

20

30

40

50

F E B S L e t t . 4 7 9 : 7 9 - 8 2 を参照されたい)。適する発現系は公知であり、そして公知の技術を使用して調製しうるか、若しくは商業的に得ることができる。ユニークな内的制限部位を使用して、若しくはユニークでない制限部位の部分消化により、内的欠失構築物を生成させうる。構築物をその後、高レベルの s i R N A ポリヌクレオチドおよび/若しくはポリペプチド発現を表す細胞にトランスフェクトしうる。一般に、レポーター遺伝子の最高レベルの発現を示す最小の 5' 隣接領域をもつ構築物をプロモーターと同定する。こうしたプロモーター領域をレポーター遺伝子に連結することができ、そしてプロモーターに駆動される転写を調節する能力について剤を評価するのに使用しうる。

【 0 1 6 5 】

サイレンスされた免疫細胞の生成

一態様において、本発明は細胞中へのサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを発現するための細胞に基づく系を提供する。細胞に基づく系は「サイレンスした細胞」を指し、細胞、およびインヒビターを発現するための発現ベクターを含んでなる。しかしながら、本発明は、発現ベクターを含んでなる細胞に制限されるべきでなく、しかしむしろ、本発明のサイレンスした細胞は、本発明のいかなる型のインヒビター、すなわち化学合成した s i R N A で改変した細胞も包含すると解釈されるべきである。いかなる場合にも、インヒビターを含んでなるサイレンスした細胞は、該インヒビターでそのようにサイレンスされていないそれ以外は同一の細胞に比較して、高められた免疫能を有する。サイレンスした細胞は、単独で若しくは他の治療とともにの哺乳動物レシピエントへの投与に適する。

【 0 1 6 6 】

本発明は、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを含んでなる細胞を包含する。該インヒビターは、限定されるものでないが S O C S、S H P 若しくは P I A S を挙げることができるサイトカインシグナル伝達調節物質を阻害することが可能である。一局面において、細胞は、インヒビターをコードするポリヌクレオチドを含んでなるベクターでトランスフェクトし得る。該ポリヌクレオチドは細胞に組込まれる必要はない。別の局面において、細胞はベクターでトランスフェクトされる必要は全くなく、しかしむしろ、細胞はベクターから発現されないインヒビターに曝露される。こうしたインヒビターの一例は、化学合成した s i R N A である。

【 0 1 6 7 】

発現ベクターの状況において、ベクターは、当該技術分野のいずれかの方法により宿主細胞、例えば哺乳動物、細菌、酵母若しくは昆虫細胞に容易に導入し得る。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的若しくは生物学的手段により宿主細胞に移入し得る。本発明のポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターの導入は、サイトカインシグナル伝達調節物質に関してサイレンスした細胞を生じることが容易に理解される。

【 0 1 6 8 】

宿主細胞中へのポリヌクレオチドの物理的導入方法は、リン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子照射、微小注入、電気穿孔などを包含する。ベクターおよび/若しくは外因性核酸を含んでなる細胞の製造方法は当該技術分野で公知である。例えば、S a m b r o o k ら (2 0 0 1、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y、N e w Y o r k) および A u s u b e l ら (1 9 9 7、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y、J o h n W i l e y & S o n s、N e w Y o r k) 中を参照されたい。

【 0 1 6 9 】

宿主細胞中への目的のポリヌクレオチドの生物学的導入方法は D N A および R N A ベクターの使用を包含する。ウイルスベクター、およびとりわけレトロウイルスベクターは、遺伝子の哺乳動物、例えばヒト細胞中への最も広範に使用される挿入方法となった。他のウイルスベクターは、レンチウイルス、ボックスウイルス、単純疱疹ウイルス I 型、アデ

10

20

30

40

50

ノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなど由来であり得る。例えば米国特許第5,350,674号および同第5,585,362号明細書を参照されたい。

【0170】

宿主細胞中へのポリヌクレオチドの化学的導入手段は、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型乳剤、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを包含する脂質に基づく系のようなコロイド分散系を包含する。in vitroおよびin vivoでの送達ベヒクルとしての使用のための好ましいコロイド系はリポソーム（すなわち人工的膜小胞）である。こうした系の製造および使用は当該技術分野で公知である。

【0171】

宿主細胞中に外因性核酸を導入するため、もしくは本発明のインヒビターに細胞を別の方法で曝露するのに使用される方法に関係なく、宿主細胞中での組換えDNA配列の存在を確認するために多様なアッセイを実施しうる。こうしたアッセイは、例えば、サザンおよびノーザンブロッティング、RT-PCRおよびPCRのような当業者に公知の「分子生物学的」アッセイ；例えば免疫学的手段（ELISAおよびウエスタンブロット）若しくは本発明の範囲内にある剤を同定するために本明細書に記述されるアッセイにより特定のペプチドの存在若しくは非存在を検出することのような「生化学的アッセイ」を包含する。

【0172】

サイレンスした細胞を生成させるため、いかなるDNAベクター若しくは送達ベヒクルも、所望のsiRNAポリヌクレオチドを免疫細胞にin vitro若しくはin vivoで移入するために利用し得る。ウイルス以外の送達系を利用する場合には、好ましい送達ベヒクルはリポソームである。前述の送達系およびプロトコルは、Gene Targeting Protocols、第2版、pp 1-35 (2002)およびGene Transfer and Expression Protocols、Vol. 7、Murray編、pp 81-89 (1991)に見出し得る。

【0173】

脂質製剤の使用を、本発明のサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターの宿主細胞中への導入（in vitro、ex vivo若しくはin vivo）に企図している。本発明の特定の一態様において、インヒビターは脂質と会合させうる。脂質と会合したインヒビターは、リポソームの水性の内部に被包化されうるか、リポソームの脂質二重層内に散在されうるか、リポソームおよびオリゴヌクレオチド双方と会合する連結分子を介してリポソームに結合されうるか、リポソーム中に捕捉されうるか、リポソームと複合体形成されうるか、脂質を含有する溶液中に分散されうるか、脂質と混合されうるか、脂質と結合されうるか、懸濁剤として脂質中に含有されうるか、ミセルを含有しうるか若しくはそれと複合体形成されうるか、または別の方法で脂質と会合されうる。本発明の脂質、脂質/siRNA若しくは脂質/発現ベクター会合組成物は溶液中のいずれか特定の構造に制限されない。例えば、それらは二層構造中に、ミセルとして、若しくは「崩壊した」構造を伴い存在しうる。それらはまた、単純に溶液中に散在されて、おそらく大きさ若しくは形状いずれかが均一でない凝集物も形成しうる。

【0174】

脂質は、天然に存在するか若しくは合成の脂質でありうる脂肪性物質である。例えば、脂質は、細胞質中に天然に存在する脂肪の液滴、ならびに、長鎖脂肪族炭化水素ならびに脂肪酸、アルコール、アミン、アミノアルコールおよびアルデヒドのようなそれらの誘導体を含有する当業者に公知である化合物の分類を包含する。

【0175】

リン脂質は、本発明のリポソームを調製するために使用することができ、そして正味の正、負若しくは中性の電荷を運搬しうる。リン酸ジアセチルを使用してリポソームに負の電荷を賦与し得、また、ステアリルアミンを使用してリポソームに正の電荷を賦与し得る。リポソームは1種若しくはそれ以上のリン脂質から作成し得る。

10

20

30

40

50

【0176】

中性に荷電した脂質は、電荷をもたない脂質、実質的に荷電していない脂質、若しくは等数の正および負の電荷をもつ脂質混合物を含み得る。適するリン脂質は、ホスファチジルコリンおよび当業者に公知である他者を包含する。

【0177】

本発明の使用に適する脂質は商業的供給源から得ることができる。例えば、ジミリスチルホスファチジルコリン(「DMPC」)はSigma, St. Louis, MO Chemical Co. から得ることができ、リン酸ジセチル(「DCP」)はK & K Laboratories (ニューヨーク州プレインビュー) から得られ; コレステロール(「Chol」)はChalbiochem - Behring から得られ; ジミリスチルホスファチジルグリセロール(「DMPG」)および他の脂質はAvanti Polar Lipids, Inc. (アラバマ州バーミングム) から得ることができる。クロロホルム若しくはクロロホルム/メタノール中の脂質のストック溶液は約 - 20 で保存し得る。好ましくは、クロロホルムはメタノールより容易に蒸発されるため、それを唯一の溶媒として使用する。

10

【0178】

卵若しくはダイズホスファチジルコリン、脳ホスファチジン酸、脳若しくは植物のホスファチジルイノシトール、心カルジオリピンおよび植物若しくは細菌のホスファチジルエタノールアミンのような天然の供給源からのリン脂質は、好ましくは、生じるリポソームの不安定性および漏出性のため、主ホスファチド(すなわち総ホスファチド組成の50%若しくはそれ以上を構成する)として使用されない。

20

【0179】

「リポソーム」は、封入された脂質二重層若しくは凝集物の生成により形成される多様な単および多層脂質ベヒクルを包含する包括的な用語である。リポソームは、リン脂質二重層膜および内的水性媒体をもつ小胞構造を有することを特徴としうる。多層リポソームは水性媒体により分離される複数の脂質層を有する。それらは、リン脂質が過剰の水性溶液中に懸濁される場合に自発的に生じる。脂質成分は、閉鎖構造の形成前に自己再配列を受け、そして脂質二重層間に水および溶解された溶質を捕捉する(GhoshとBachhawat, 1991)。しかしながら、本発明は、通常の小胞構造と異なる溶液中の構造を有する組成物もまた包含する。例えば、脂質は、ミセル構造をとりうるか、若しくは単に脂質分子の不均一な凝集物として存在しうる。リポフェクタミン-核酸複合体もまた企図している。

30

【0180】

リン脂質は、水に対する脂質のモル比に依存して、水中に分散された場合にリポソーム以外の多様な構造を形成し得る。低い比ではリポソームは好ましい構造である。リポソームの物理的特徴は、pH、イオン強度および/若しくは二価陽イオンの存在に依存する。リポソームはイオン性および/若しくは極性物質に対し低浸透性を示し得るが、しかし、上昇された温度では、それらの浸透性を顕著に変える相転移を受ける。相転移は、ゲル状態として知られる緊密に充填された秩序正しい構造から、液体状態として知られるゆるく充填されたより少なく秩序だった構造への変化を伴う。これは、特徴的相転移温度で起こりかつ/またはイオン、糖および/若しくは薬物に対する浸透性の増大をもたらす。

40

【0181】

リポソームは、4種の異なる機構、すなわち、マクロファージおよび/若しくは好中球のような細網内皮系の食細胞によるエンドサイトーシス; 非特異的な弱い疎水性および/若しくは静電力、ならびに/または細胞表面の成分との特異的相互作用のいずれかによる細胞表面への吸着; リポソーム内容の細胞質中への同時の放出を伴う、リポソームの脂質二重層の形質膜への挿入による形質細胞膜との融合; ならびに/あるいはリポソーム内容物のいかなる会合も伴わない細胞および/若しくは細胞内膜へのリポソーム脂質の移行、ならびに/またはその逆による形質細胞膜との融合、を介して細胞と相互作用する。リポソームの処方を変動させることは、どの機構が作動するかを変え得るとは言え、1種以上

50

が同時に作動しうる。

【0182】

リポソーム媒介性のオリゴヌクレオチド送達および *in vitro* での外来DNAの発現は非常に成功裏であった。Wongら(1980)は、培養ニワトリ胚、HeLaおよび肝腫細胞における外来DNAのリポソーム媒介性の送達および発現の実現可能性を示した。Nicolaouら(1987)は静脈内注入後のラットにおける成功裏のリポソーム媒介性の遺伝子移入を達成した。

【0183】

本発明のある態様において、脂質は血球凝集性ウイルス(HVJ)と会合しうる。これは、細胞膜との融合を容易にしかつリポソームで被包化したDNAの細胞進入を促進することが示された(Kanedaら、1989)。他の態様において、脂質は核非ヒストン染色体タンパク質(HMG-1)と複合体形成しうるか、若しくはそれとともに使用しうる(Katoら、1991)。なおさらなる態様において、脂質はHVJおよびHMG-1双方と複合体形成しうるか、若しくはそれとともに使用しうる。こうした発現ベクターが *in vitro* および *in vivo* でのオリゴヌクレオチドの移入および発現で成功裏に使用されたため、その結果それらは本発明に 응용可能である。細菌のプロモーターをDNA構築物中で使用する場合、適切な細菌のポリメラーゼをリポソーム内に包含することもまた望ましいことができる。

【0184】

本発明で使用されるリポソームは多様な方法により作成し得る。リポソームの大きさは合成方法に依存して変動する。水性溶液中に懸濁されたりポソームは、一般に、脂質二重層分子の1個若しくはそれ以上の同心円状の層を有する球状小胞の形状にある。各層は式XYにより表される分子の平行な列よりなり、式中Xは親水性部分でありかつYは疎水性部分である。水性懸濁液中では、親水性部分が水層と接触して留まる傾向がありかつ疎水性領域が自己会合する傾向があるような同心円状の層が配置される。例えば、水層がリポソーム内およびリポソームを伴わずの双方で存在する場合、脂質分子は、配置XY-YXのラメラとして知られる二層を形成しうる。脂質の凝集物は、1個以上の脂質分子の親水性および疎水性部分が相互と会合したようになる場合に生じうる。これらの凝集物の大きさおよび形状は、溶媒の性質および溶液中の他の化合物の存在のような多くの異なる変数に依存することができる。

【0185】

本発明の範囲内のリポソームは既知の実験室技術に従って製造し得る。好ましい一態様において、リポソームは、容器、例えばガラス製ナス形フラスコ中でリポソーム脂質を溶媒中に混合することにより製造する。容器はリポソームの期待される懸濁液の容量より10倍より大きい容量を有すべきである。ロータリーエバポレーターを使用して、溶媒を陰圧下およそ40で除去する。溶媒は通常、リポソームの所望の容量に依存して約5分ないし2時間以内に除去される。組成物を真空下にデシケーター中でさらに乾燥し得る。乾燥した脂質は、一般に、時間とともに劣化する傾向のため、約1週後に廃棄する。

【0186】

乾燥した脂質は、全部の脂質薄膜が再懸濁されるまで振とうすることにより、滅菌の発熱性物質を含まない水中およそ25~50mMのリン脂質で水和し得る。水性リポソームをその後アリコートに分離し、それぞれをバイアルに入れ、真空下で凍結乾燥かつ封止し得る。

【0187】

代替において、リポソームは他の既知の実験室手順、すなわち、Banghamら(1965)(その内容は引用することにより本明細書に組み込まれる)の方法; Drug Carriers in Biology and Medicine、G. Gregoriadis編(1979)pp. 287-341(その内容は引用することにより本明細書に組み込まれる)に記述されるところのGregoriadisの方法; DeamerとUster、1983(その内容は引用することにより組み込まれる)の方法; およ

10

20

30

40

50

び Szoka と Papahadjopoulos、1978により記述されるところの逆相蒸発法に従って製造し得る。前述の方法は、水性物質を捕捉するそれらのそれぞれの能力およびそれらのそれぞれの水性空間対脂質比が異なる。

【0188】

上述されたとおり製造した乾燥した脂質若しくは凍結乾燥したリポソームを脱水し、そして阻害性ペプチドの溶液中で再構成し、かつ、適する溶媒、例えばDPBSで適切な濃度に希釈しうる。混合物をその後ボルテックス混合機で活発に振とうする。被包化されない核酸を、29,000×gでの遠心分離により除去し、そしてリポソームペレットを洗浄する。洗浄したリポソームを、適切な総リン脂質濃度、例えば約50~200mMで再懸濁する。被包化された核酸の量を標準的方法により測定し得る。リポソーム製剤に被包化された核酸の量の測定後に、リポソームを適切な濃度に希釈し、そして使用まで4で保存しうる。

10

【0189】

活性化(パルス)免疫細胞の生成

本発明は、抗原で曝露若しくは別の方法で「パルスし」かつ抗原におよび活性化した細胞を包含する。例えば、APCは、例えば抗原の存在下での*ex vivo*の培養により*in vitro*で、若しくは抗原への曝露により*in vivo*で抗原を負荷されたようになりうる。

【0190】

当業者は、APCが、APCの表面上のその抗原の提示を促進するのに十分な時間、APCを抗原に曝露する様式で「パルスし」得ることもまた容易に理解するであろう。例えば、APCは、抗原ペプチドとして知られる小型のペプチドフラグメントの形態の抗原に曝露させ得、APCの外側で直接「パルス」されるか(Mehra-Damaniら、1994)；または、APCはその後APCにより摂取される全タンパク質若しくはタンパク質粒子とともにインキュベートし得る。これらの全タンパク質はAPCにより小型のペプチドフラグメントに消化され、そしてついにはAPC表面上に運搬かつ提示される(Cohenら、1994)。ペプチドの形態の抗原は、本明細書に記述される標準的な「パルス」技術により細胞に曝露させうる。

20

【0191】

いずれかの特定の論理により束縛されることを願わないが、外来若しくは自己抗原の形態の抗原は、該抗原の免疫原性の形態を保持するために本発明のAPCによりプロセッシングされる。免疫原性の形態の抗原は、免疫細胞、例えばT細胞により認識かつそれらを刺激し得る抗原の形態を生じさせるための断片化による抗原のプロセッシングを暗示する。好ましくは、こうした外来若しくは自己抗原はAPCによりペプチドにプロセッシングされるタンパク質である。APCにより産生される関連ペプチドを、免疫原性組成物としての使用のため抽出かつ精製しうる。APCによりプロセッシングされたペプチドは、APCによりプロセッシングされたタンパク質に対する免疫寛容を誘導するのにもまた使用しうる。

30

【0192】

自己免疫疾患は、別名自己抗原として知られる「自己タンパク質」、すなわち個体中に存在すなわち内因性である自己抗原に向けられる免疫応答から生じると考えられる。自己免疫応答では、これらの「自己タンパク質」がT細胞に提示され、T細胞を「自己反応性」にさせる。本発明の方法により、APCを抗原でパルスして関連する「自己ペプチド」を産生させる。関連する自己ペプチドは各個体について異なる。MHC産物は高度に多形であり、そして各個々のMHC分子が多様なペプチドフラグメントを結合しうるからである。「自己ペプチド」およびサイトカインシグナル伝達のインヒビターのアゴニストをその後使用して、競合するペプチドを設計し得るか、若しくは処置の必要な個体における自己タンパク質に対する免疫寛容を誘導し得る。

40

【0193】

別名本発明の「パルスAPC」として知られる、抗原で活性化したAPCは、*in vitro*若しくは*in vivo*いずれかでの抗原へのAPCの曝露により製造する。A

50

PCを *in vitro* でパルスする場合、APCを培養皿にプレーティングし、そして十分な量の抗原にかつ抗原をAPCに結合させるのに十分な時間、曝露する。APCへの抗原の結合を達成するのに必要な量および時間は、当該技術分野で既知の、若しくは本明細書に別の方法で開示される方法を使用することにより決定しうる。当業者に既知の他の方法、例えばイムノアッセイ若しくは結合アッセイを使用して、抗原への曝露後のAPC上での抗原の提示を検出しうる。

【0194】

本発明のさらなる一態様において、APCを、該APCによる特定のタンパク質の発現を見込むベクターでトランスフェクトしうる。APCにより発現されるタンパク質はその後プロセッシングされかつMHC受容体上で細胞表面上に提示されうる。トランスフェクトしたAPCは、その後、ベクターによりコードされるタンパク質に対する免疫応答を生じさせるための免疫原性組成物として使用しうる。

10

【0195】

本明細書の別の場所で論考されるとおり、ベクターは、それに対する免疫原性応答が望ましいタンパク質をコードかつ発現する特定のポリヌクレオチドを包含するように製造しうる。好ましくは、細胞を感染させるのにレトロウイルスベクターを使用する。より好ましくは、細胞を感染させるのにアデノウイルスベクターを使用する。

【0196】

本発明の別の態様において、ベクターは、APC上の受容体により認識されるタンパク質若しくはその部分をコードするようにウイルスベクターを改変することにより、APCを標的とすることができ、それにより、該ベクターによるAPC受容体の占有が、該ウイルスベクターの核酸によりコードされる抗原のプロセッシングおよび提示を見込むベクターのエンドサイトーシスを開始することができる。該ウイルスにより送達される核酸は、APC上で発現される場合に、その後プロセッシングされかつAPC上のMHC受容体に提示されるウイルスタンパク質をコードするウイルスにとって天然でありうる。

20

【0197】

本明細書の別の場所で論考されるとおり、多様な方法を、宿主細胞中にポリヌクレオチドをトランスフェクトするために使用し得る。該方法は、限定されるものでないがリン酸カルシウム沈殿、リポフェクション、粒子照射、微小注入、電気穿孔、コロイド分散系（すなわち巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、ならびに水中油型乳剤、ミセル、混合ミセルおよびリポソームを包含する脂質に基づく系）を挙げることができる。

30

【0198】

別の局面において、抗原をコードするポリヌクレオチドを発現ベクターにクローン化し得、そして該ベクターをAPCに導入して活性化したAPCを別の方法で生成させ得る。細胞中に核酸を導入する多様な型のベクターおよび方法が本明細書の別の場所で論考されている。例えば、抗原をコードするベクターは、当該技術分野のいずれの方法により宿主細胞に導入してもよい。例えば、発現ベクターは、物理的、化学的若しくは生物学的手段により宿主細胞に移入し得る。例えば、Sambrookら（2001、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*、Cold Spring Harbor Laboratory、ニューヨーク）およびAusubelら（1997、*Current Protocols in Molecular Biology*、John Wiley & Sons、ニューヨーク）中を参照されたい。抗原をコードするポリヌクレオチドを含んでなる発現ベクターの導入がパルスした細胞を生じることが容易に理解される。

40

【0199】

本発明は、限定されるものでないが、タンパク質、cDNA若しくはmRNAの形態の全抗原をAPCに負荷することを挙げることができる、APCの多様なパルス方法を包含する。しかしながら、本発明は、APCをパルスするのに使用される特定の形態の抗原に制限されると解釈されるべきでない。むしろ、本発明は、抗原負荷APCを生成させるた

50

めの当該技術分野で既知の他の方法を包含する。好ましくは、A P Cを定義された抗原をコードするm R N Aでトランスフェクトする。その配列が既知である遺伝子産物に対応するm R N Aは、適切なプライマー、および転写反応と組み合わせた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(R T - P C R)を使用して*i n v i t r o*で迅速に生成し得る。m R N AでのA P Cのトランスフェクションは、パルスしたA P Cを生成させるための他の抗原負荷技術を上回る利点を提供する。例えば、微量の組織、例えば腫瘍組織からのR N Aを増幅する能力は、ワクチン接種のためのA P Cの使用を多数の患者に拡大する。

【0200】

抗原はウイルス、真菌若しくは細菌由来でありうる。抗原は自己抗原、若しくは感染性疾患、癌、自己免疫疾患よりなる群から選択される疾患と関連する抗原でありうる。

10

【0201】

ワクチンとして有用であるべき抗原組成物について、抗原組成物は細胞、組織若しくは哺乳動物(例えばヒト)において該抗原に対する免疫応答を誘導しなければならない。本明細書で使用される「免疫学的組成物」は、抗原(例えばペプチド若しくはポリペプチド)、抗原をコードする核酸(例えば抗原発現ベクター)、抗原若しくは細胞成分を発現若しくは提示する細胞を含みうる。特定の態様において、抗原組成物は、本明細書に記述されるいずれかの抗原の全部若しくは一部、またはその免疫学的機能的同等物を含んでなるか、若しくはコードする。他の態様において、抗原組成物は、付加的な免疫刺激剤若しくはこうした剤をコードする核酸を含んでなる混合物にある。免疫刺激剤は、限定されるものでないが、付加的な抗原、免疫調節物質、抗原提示細胞若しくはアジュバントを挙げることができる。他の態様において、付加的な抗原(1種若しくは複数)の1種若しくはそれ以上を、いずれかの組合せの抗原若しくは免疫刺激剤に共有結合する。ある態様において、抗原組成物はH L Aアンカーモチーフアミノ酸に複合されるか、若しくはそれらを含んでなる。

20

【0202】

本発明のワクチンは、核酸および/若しくは細胞成分のその組成が変動しうる。制限しない一例において、抗原をコードする核酸はアジュバントとともにもまた処方しうる。もちろん、本明細書に記述される多様な組成物が付加的な成分をさらに含みうるということが理解されるであろう。例えば、1種若しくはそれ以上のワクチン成分を脂質若しくはリポソーム中に含みうる。別の制限しない例において、ワクチンは1種若しくはそれ以上のアジュバントを含みうる。本発明のワクチンおよびその多様な成分は、本明細書に開示されるか若しくは本開示に照らして当業者に既知であろうところのいずれの方法により製造かつ/若しくは投与してもよい。

30

【0203】

本発明の抗原組成物は、限定されるものでないが固相合成による化学合成、およびH P L Cによる化学反応の他の産物からの精製、または*i n v i t r o*翻訳系若しくは生存細胞中での本発明の抗原を含んでなるペプチド若しくはポリペプチドをコードする核酸配列(例えばD N A配列)の発現による産生を挙げることができる、当該技術分野で公知である方法により作成しうるということが理解される。加えて、抗原組成物は生物学的サンプルから単離された細胞成分を含み得る。好ましくは、抗原組成物は、単離かつ1種若しくはそれ以上の望ましくない小分子量の分子を除去するために徹底的に透析され、かつ/または所望のベヒクルへのより容易な処方のため凍結乾燥される。付加的なアミノ酸、突然変異、化学修飾、およびワクチン成分中で作成されるこうした同様のもの(あれば)は、好ましくはエピトープ配列の抗体認識を実質的に妨害しないことができることがさらに理解される。

40

【0204】

本発明の1個若しくはそれ以上の抗原決定子に対応するペプチド若しくはポリペプチドは、一般に長さ最低5若しくは6アミノ酸残基であるべきであり、そして、約10、約15、約20、約25、約30、約35、約40、約45若しくは約50残基などまで含有しうる。ペプチド配列は、例えば、A p p l i e d B i o s y s t e m s , I n c . ,

50

Foster City, CA (カリフォルニア州フォスターシティ) から入手可能なもののような自動ペプチド合成機を使用するペプチド合成のような、当業者に既知の方法により合成しうる。

【0205】

より長いペプチド若しくはポリペプチドは、例えば組換え手段によってもまた製造しうる。ある態様において、本明細書に記述される抗原組成物および/若しくは成分をコードする核酸を使用して、例えば本発明の多様な組成物および方法のため *in vitro* 若しくは *in vivo* で抗原組成物を製造しうる。例えば、ある態様において、抗原をコードする核酸は、例えば組換え細胞中のベクターに含まれる。該核酸を発現させ、抗原の配列を含んでなるペプチド若しくはポリペプチドを産生させうる。該ペプチド若しくはポリペプチドは細胞から分泌されうるか、または細胞の一部として若しくはそれ内に含まれうる。

10

【0206】

ある態様において、免疫応答は、抗原をコードする核酸で哺乳動物をトランスフェクト若しくはそれを接種することにより促進しうる。標的哺乳動物内に含まれる1個若しくはそれ以上の細胞は、その場合、該哺乳動物への核酸の投与後に該核酸によりコードされる配列を発現する。ワクチンは、例えば抗原のペプチド若しくはポリペプチド配列の全部若しくは一部をコードする核酸(例えば cDNA 若しくは RNA)の形態にもまたありうる。該核酸による *in vivo* での発現は、例えば、プラスミド型ベクター、ウイルスベクター、若しくはウイルス/プラスミド構築物ベクターによることができる。

20

好ましい局面において、核酸は、適切な抗原若しくはその免疫学的機能的同等物をコードする配列の全部若しくは一部をコードするコーディング領域を含んでなる。もちろん、該核酸は、限定されるものでないが1種若しくはそれ以上の免疫調節物質若しくはアジュバントを含んでなるものを挙げることもできる付加的な配列を含むことができかつ/若しくはコードしうる。

【0207】

腫瘍関連抗原

本発明の状況において、「腫瘍抗原」若しくは「過剰増殖性障害抗原」若しくは「過剰増殖性障害と関連する抗原」は、特定の過剰増殖性障害に共通である抗原を指す。ある局面において、本発明の過剰増殖性障害抗原は、限定されるものでないが原発性若しくは転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、子宮頸癌、膀胱癌、腎癌、ならびに乳癌、前立腺癌、卵巣癌、膵癌などのような腺癌を挙げることもできる癌由来である。

30

【0208】

一態様において、本発明の腫瘍抗原は、哺乳動物の癌腫瘍由来の腫瘍浸潤性リンパ球(TIL)により免疫学的に認識される1種若しくはそれ以上の抗原性癌エピトープを含んでなる。

【0209】

悪性腫瘍は、免疫攻撃の標的抗原としてはたらき得る多数のタンパク質を発現する。これらの分子は、限定されるものでないが、黒色腫における MART-1、チロシナーゼおよび GP 100、ならびに前立腺癌における前立腺酸性ホスファターゼ(PAP)および前立腺特異的抗原(PSA)のような組織特異的抗原を挙げることもできる。他の標的分子は、癌遺伝子 HER-2/Neu/Erbb-2 のような形質転換関連分子の群に属する。標的抗原のなお別の群は、癌胎児性抗原(CEA)のような癌胎児性抗原である。B細胞リンパ腫において、腫瘍特異的イディオタイプ免疫グロブリンが、個々の腫瘍に独特である真に腫瘍特異的な免疫グロブリン抗原を構成する。CD19、CD20およびCD37のようなB細胞分化抗原はB細胞リンパ腫における標的抗原の他の候補である。これらの抗原の数種(CEA、HER-2、CD19、CD20、イディオタイプ)は、制限された成功を伴い、モノクローナル抗体での受動免疫療法の標的として使用されている。

40

50

【0210】

腫瘍抗原およびその抗原性癌エピトープは、初代臨床単離物、細胞株などのような天然の供給源から精製かつ単離しうる。癌ペプチドおよびそれらの抗原エピトープは、当該技術分野で既知の化学合成若しくは組換えDNA技術によってもまた得ることができる。化学合成の技術は、Stewardら(1969); Bodanskyら(1976); Meienhofer(1983); およびSchroederら(1965)に記述されている。さらに、Renkvistら(2001)に記述されるとおり、当該技術分野で既知の多数の抗原が存在する。以下の表は、腫瘍抗原によりコードされるT細胞で規定される(T-cell defined)エピトープを記述し、そしてT細胞(細胞傷害性CD8+若しくはヘルパーCD4+のいずれか)により認識される腫瘍抗原のみを列挙する。アナログ若しくは人工的に改変したエピトープは列挙されないとは言え、当業者は当該技術分野の標準的な手段によりそれらを得る若しくは生成させる方法を認識している。抗体により同定されかつSereX技術(Sahinら(1997)およびChenら(2000)を参照されたい)により検出されるところの他の抗原は、ルートヴィヒ癌研究所(Ludwig Institute for Cancer Research)のデータベースで同定される。

10

【0211】

微生物抗原

微生物抗原は起源がウイルス、細菌若しくは真菌でありうる。感染性ウイルスの例は：レトロウイルス科(例えばHIV-1(HTLV-II、LAV若しくはHTLV-II/LAV、またはHIV-IIともまた称される)のようなヒト免疫不全ウイルス; およびHIV-LPのような他の単離物：ピコルナウイルス科(例えばポリオウイルス、A型肝炎ウイルス; エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、エコーウイルス); カリシウイルス科(例えば胃腸炎を引き起こす株); トガウイルス科(例えばウマ脳炎ウイルス、風疹ウイルス); フラビウイルス科(例えばデングウイルス、脳炎ウイルス、黄熱病ウイルス); コロナウイルス科(例えばコロナウイルス); ラブドウイルス科(例えば水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス); フィロウイルス科(例えばエボラウイルス); パラミクソウイルス科(例えばパラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、RSウイルス); オルトミクソウイルス科(例えばインフルエンザウイルス); プニヤウイルス科(例えばハンターウイルス、プニヤウイルス、フレボウイルスおよびナイロウイルス); アレナウイルス科(出血熱ウイルス); レオウイルス科(例えばレオウイルス、オルビウイルスおよびロタウイルス); ビルナウイルス科; ヘパドナウイルス科(B型肝炎ウイルス); パルボウイルス科(パルボウイルス); パポーバウイルス科(パピローマウイルス、ポリオーマウイルス); アデノウイルス科(大部分のアデノウイルス); ヘルペスウイルス科(単純疱疹ウイルス(HSV)1および2、水痘帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、ヘルペスウイルス); ポックスウイルス科(痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス); ならびにイリドウイルス科(例えばアフリカ豚コレラウイルス); ならびに未分類のウイルス(例えば海綿状脳症の病因病原体、D型肝炎の病原体(B型肝炎ウイルスの欠損サテライトであると考えられる)、非A非B肝炎の病原体(クラス1=内的感染する; クラス2=非経口感染する(すなわちC型肝炎); ノーウォークおよび関連ウイルス、ならびにアストロウイルス)を包含する。

20

30

40

【0212】

感染性細菌の例は：ヘリコバクターピロリ(Helicobacter pylori)、ボレリアブルグドルフェリ(Borelia burgdorferi)、レジオネラ・ニューモフィラ菌(Legionella pneumophilia)、ミコプラズマ・スピーシーズ(例えばヒト結核菌(M.tuberculosis)、トリ結核菌(M.avium)、M.イントラセルラーレ(M.intracellulare)、M.カンサシイ(M.kansasii)、M.ゴルドネ(M.gordonae))、黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)、淋菌(N

50

eisseria gonorrhoeae)、髄膜炎菌(Neisseria meningitidis)、リステリア菌(Listeria monocytogenes)、化膿性連鎖球菌(Streptococcus pyogenes)(A群連鎖球菌)、ストレプトコッカス アガラクチエ(Streptococcus agalactiae)(B群連鎖球菌)、連鎖球菌属(ヴィリダンス群)、糞便連鎖球菌(Streptococcus faecalis)、ストレプトコッカス ボビス(Streptococcus bovis)、連鎖球菌属(嫌気性スピーシーズ)、肺炎連鎖球菌(Streptococcus pneumoniae)、病原性カンピロバクター属(Campylobacter)スピーシーズ、エンテロコッカス属(Enterococcus)スピーシーズ、インフルエンザ菌(Haemophilus influenza)、炭疽菌(Bacillus anthracis)、ジフテリア菌(Corynebacterium diphtheriae)、コリネバクテリウム属(Corynebacterium)スピーシーズ、豚丹毒菌(Erysipelothrix rhusiopathiae)、ウェルシュ菌(Clostridium perfringens)、破傷風菌(Clostridium tetani)、エンテロバクター アエロゲネス(Enterobacter aerogenes)、肺炎桿菌(Klebsiella pneumoniae)、パストレラ ムルトシダ(Pasturella multocida)、バクテロイデス属(Bacteroides)スピーシーズ、フゾバクテリウム ヌクレアタム(Fusobacterium nucleatum)、ストレプトバシラス モニリフォルミス(Streptobacillus moniliformis)、トレポネマ属(Treponema)、フランベジアトレポネマ(Treponema pertenuis)、レプトスピラ属(Leptospira)およびイスラエル放線菌(Actinomyces israelii)を包含する。

10

20

30

40

50

【0213】

感染性真菌の例は：クリプトコッカス ネオフォルマンズ(Cryptococcus neoformans)、ヒストプラズマ カプスラーツム(Histoplasma capsulatum)、コクシジオイデス イミティス(Coccidioides immitis)、ブラストミセス デルマティティディス(Blastomyces dermatitidis)、トラコーマクラミジア(Chlamydia trachomatis)、カンジダ アルビカンス(Candida albicans)を包含する。熱帯熱マラリア原虫(Plasmodium falciparum)およびトキソプラズマ(Toxoplasma gondii)を包含する他の感染性生物体(すなわち原生動物)も挙げられる。

【0214】

サイレンスかつパルスした免疫細胞

別の態様において、細胞を培養物、組織、器官若しくは生物体から単離しかつ細胞ワクチンとして哺乳動物に投与しうる。従って、本発明は「細胞ワクチン」を企図している。もちろん、該細胞は、免疫調節物質若しくはアジュバントのような1種若しくはそれ以上の付加的なワクチン成分もまた発現しうる。該ワクチンは細胞の全部若しくは一部を含みうる。好ましい一態様において、本発明の細胞ワクチンはヒトAPCを含んでなり、また、より好ましい一態様において、APCはDCである。

【0215】

細胞ワクチンは、その免疫能を高めるように本発明によりサイレンスしたAPCから構成され得る。サイレンスしたAPCをその後、抗原をコードする核酸とともにトランスフェクトして抗原負荷細胞を生成させ得る。別の局面において、サイレンスしたAPCは、抗原を含んでなる免疫刺激性タンパク質でパルスして抗原負荷細胞を生成させ得る。本開示に基づき、サイレンスしたAPCをいずれかの型の抗原を使用するいずれかの方法によりパルスして抗原を負荷し得る。加えて、APCは、本発明のインヒビターでのAPCのサイレンシング前、それと同時に若しくは後に、いずれかの方法によりパルスし得る。

【0216】

本明細書の別の場所に開示されるとおり、細胞は多様な方法を使用して抗原でパルスし得る。本発明の抗原は最低1個のエピトープを含有し、前記エピトープは哺乳動物において免疫応答を導き出すことが可能である。一態様において、抗原は発現ベクターにより発現される。別の態様において、抗原は単離されたポリペプチドである。好ましくは、抗原は、感染性疾患、癌および自己免疫疾患よりなる群から選択される疾患と関連する。本発明の細胞をパルスするのに有用な多数の好ましい抗原を本明細書の別の場所に開示する。抗原は以下、すなわち腫瘍ライセート、タンパク質、ペプチド、mRNA、DNA、ベクターから発現された、リポソームなどの最低1種若しくはそれ以上の形態であり得る。

【0217】

サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターでサイレンスしたAPCは、強調された免疫能を有し、そして従って高められた免疫応答、すなわち抗原を提示しかつそれに対する免疫応答を活性化する高められた能力を導き出す。本発明によりサイレンスかつパルスしたAPCは、エフェクターT細胞を刺激し、そしてサイレンスしていないそれ以外は同一のAPCに比較してそれに対する抗原に対する改良された免疫応答を導き出すことが可能である。

【0218】

治療上の応用

本発明は、APCのような免疫細胞の免疫能を高めるのに有用な組成物を包含する。APCにより提示される抗原に対する応答は、当該技術分野で公知の方法を使用して、細胞傷害性T細胞応答、ヘルパーT細胞応答、および/若しくは抗原に対する抗体応答の誘導をモニターすることにより測定しうる。

【0219】

本発明は、抗原組成物と1個若しくはそれ以上のリンパ球を接触させる段階を含んでなる、哺乳動物における免疫応答を高める方法を包含し、該抗原はAPCのような免疫細胞により提示される。本開示に基づき、APCをサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターへの曝露によりサイレンスし得、その際にインヒビターへの曝露は該APCの免疫能を高める。APCは、APCを別の方法でパルスするための抗原組成物とのAPCの曝露の前、それと同時に若しくは後に、本明細書に開示される方法を使用してサイレンスし得る。

【0220】

高められた免疫応答は能動若しくは受動免疫応答でありうる。該応答は、樹状細胞、B細胞若しくは単球/マクロファージのようなAPCを哺乳動物(例えば患者)から得、その後抗原組成物を含んでなる組成物でパルスし(免疫細胞を別の方法でサイレンスするためのサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターへの細胞の曝露の前、それと同時に若しくは後に)、そしてその後該APCをその必要な患者に投与する、養子免疫療法アプローチの一部となりうる。

【0221】

該組成物は以下、すなわちサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビター、抗原、サイレンスした免疫細胞、パルスした細胞、および抗原でもまたパルスされるサイレンスした免疫細胞の最低1種若しくはそれ以上のいかなる組合せも包含する。該組成物は、哺乳動物における*ex vivo*免疫化および/若しくは*in vivo*治療のためのワクチンでありうる。好ましくは、哺乳動物はヒトである。

【0222】

*ex vivo*免疫化に関して、以下、すなわちi)細胞のサイレンシング、ii)細胞のパルス、若しくはiii)細胞のサイレンシングおよびパルスの最低1種が、該細胞を哺乳動物に投与する前に*in vitro*で発生する。本発明の免疫細胞(すなわちAPC)を、該免疫細胞をパルスするための抗原でのAPCの処理の前、それと同時に若しくは後に、本明細書の別の場所に開示される方法を使用してサイレンスし得ることが認識されるべきである。

【0223】

10

20

30

40

50

別の態様において、サイレンスしたAPCは、抗原への事前の*in vitro*曝露を伴わずに、それを必要とする患者に投与し得る。すなわち、本発明は、細胞のパルスが患者中で*in vivo*で起こる、患者へのサイレンスしたAPCの投与を包含する。

【0224】

なお別の態様において、パルスしたAPCは、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターへの細胞の事前の*in vitro*曝露を伴わずに、その必要な患者に投与し得る。すなわち、本発明は、細胞のサイレンシングが患者中で*in vivo*で起こる、患者へのパルスしたAPCの投与を包含する。

【0225】

*ex vivo*処置は当該技術分野で公知であり、そして下により完全に論考する。簡潔には、細胞を哺乳動物（好ましくはヒト）から単離し、そして、本明細書に開示されるサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを発現するベクター若しくはいずれかの他の形態のサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビター（すなわち化学合成した*siRNA*）でサイレンス（すなわち*in vitro*で形質導入若しくはトランスフェクト）する。サイレンスした細胞を哺乳動物レシピエントに投与して治療上の利益を提供し得る。哺乳動物レシピエントはヒトであることができ、また、そのようにサイレンスした細胞はレシピエントに関して自己であり得る。あるいは、細胞はレシピエントに関して同種異系、同系若しくは異種であり得る。

10

【0226】

造血幹および前駆細胞の*ex vivo*増殖の手順は米国特許第5,199,942号明細書（引用することにより本明細書に組み込まれる）に記述されており、本発明の細胞に適用し得る。他の適する方法が当該技術分野で既知であり、従って、本発明は細胞のいずれかの特定の*ex vivo*増殖方法に制限されない。簡潔には、DCの*ex vivo*培養および増殖は：（1）末梢血収集物若しくは骨髓外植体から、哺乳動物からのCD34+造血幹および前駆細胞を収集すること；ならびに（2）こうした細胞を*ex vivo*で増殖させることを含んでなる。米国特許第5,199,942号明細書に記述される細胞増殖因子に加え、*flt3-L*、*IL-1*、*IL-3*および*c-kit*リガンドのような他の因子を該細胞の培養および増殖に使用し得る。

20

【0227】

細胞の集団からCD34+造血幹若しくは前駆細胞を同定かつ分離するための多様な細胞選択技術が既知である。例えば、モノクローナル抗体（若しくは他の特定の細胞結合タンパク質）を、幹若しくは前駆細胞上で見出されるマーカータンパク質若しくは表面抗原タンパク質に結合させるのに使用し得る。造血幹細胞の数種のこうしたマーカー若しくは表面抗原（すなわち*flt-3*、CD34、*My-10*および*Thy-1*）が当該技術分野で既知である。

30

【0228】

収集したCD34+細胞を適するサイトカインとともに培養する。CD34+細胞をその後分化させ、そして樹状系統の細胞に委任させる（*commit*）。これらの細胞は、CD1a、HLA-DR、CD80および/若しくはCD86のような樹状細胞に特徴的なマーカーを使用して、フローサイトメトリー若しくは類似の手段によりさらに精製する。DCの培養物の単離後、細胞を本発明の方法により改変し得る。あるいは、前駆細胞を、DC様細胞に分化される前に改変し得る。

40

【0229】

*ex vivo*免疫化に関して細胞に基づくワクチンを使用することに加え、本発明は、患者中の抗原に向けられた免疫応答を導き出すための*in vivo*免疫化のための組成物および方法もまた提供する。

【0230】

*in vivo*免疫化に関して、本発明は、APC中の決定的な制御点を不能にすることによるワクチンの効力を高めるための包括的な手段としてサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターの使用を提供する。であるから、*in vivo*免疫化に有用なワ

50

クチンは最低 1 種のインヒビター成分を含んでなり、該インヒビター成分はサイトカインシグナル伝達調節物質を阻害することが可能である。別の局面において、該ワクチンはインヒビター成分および抗原成分の双方を含んでなり、該抗原成分は哺乳動物で免疫応答を導き出すことが可能である。

【0231】

in vivo 免疫化に関して、患者から得られる細胞を、*in vivo* でトランスフェクト若しくは形質導入して、別の方法でサイレンスした細胞を生成させる。細胞はサイトカイン調節物質のインヒビターを発現するベクターで *in vivo* でサイレンスする。あるいは、細胞は、いずれかの他の形態の、ベクターにより発現されない本明細書に開示されるサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビター（すなわち化学合成した *siRNA*）を使用してサイレンスする。*in vivo* でのサイレンスした細胞の生成方法は本明細書の別の場所に論考する。

10

【0232】

ワクチンの別の局面は、*in vivo* で細胞をパルスするのに有用な抗原成分を包含する。いかなる抗原も、本発明のサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターとともに投与し得る。細胞は、インヒビターを含んでなるワクチンでの細胞のサイレンシングの前、それと同時に若しくはその後に、本明細書の別の場所で論考されるところのいかなる方法を使用してもパルスし得る。細胞が同時にパルスかつサイレンスされるべきである場合には、哺乳動物をインヒビターおよび抗原双方を含んでなる単一のワクチンで免疫し得ることが容易に認識される。あるいは、哺乳動物は 2 種の別個のワクチン（一方はインヒビターを含んでなりかつ第二のワクチンは抗原を含んでなる）で免疫し得る。

20

【0233】

本発明は癌および感染性疾患のための *in vivo* 免疫化を包含する。一態様において、障害若しくは疾患は、単独の、若しくは患者で抗原に対する免疫応答を生成させるための抗原とともに *siRNA* の *in vivo* 投与により処置し得る。本開示に基づけば、抗原性製剤とともに *siRNA* のサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターの投与は、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターの使用を伴わないそれ以外は同一のワクチン接種プロトコルの効力を高める。いずれかの特定の論理により束縛されることを願わないが、患者での抗原に対する免疫応答は（1）投与される *siRNA* 組成物、（2）投与の期間、用量および頻度、（3）患者の全身状態、ならびに適切な場合は（4）投与される抗原組成物に依存する。

30

【0234】

一態様において、哺乳動物は、腫瘍特異的抗原を発現するある型の癌を有する。本発明により、腫瘍特異的抗原配列成分を含んでなる免疫刺激タンパク質を作成し得る。こうした場合、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを、免疫刺激タンパク質とともにその必要な患者に投与して、例えば該腫瘍特異的抗原を発現する癌細胞若しくは充実性腫瘍の増殖の遅延若しくは減少、または癌細胞の総数若しくは総腫瘍量の減少により明示される、該患者にとって改良された治療転帰をもたらす。

【0235】

関連する一態様 *Niote*、患者は、特定の一抗原、例えばウイルス抗原の発現と関連づけられる、ウイルス、細菌、真菌若しくは他の型の感染症を有すると診断された。本発明により、該抗原、例えば HIV 特異的抗原よりなる配列成分を含んでなる免疫刺激タンパク質を作成しうる。こうした場合、サイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターを、該免疫刺激タンパク質とともにその必要な患者に投与して、患者内の原因となる感染性病原体の増殖の遅延、および/若しくは特定の感染性疾患と典型的に関連づけられる検出可能な症状の減少若しくはその排除により明示されるところの、該患者にとって改良された治療転帰をもたらす。

40

【0236】

いずれの状況でも、障害若しくは疾患を、その必要な患者への抗原とともに *siRNA* のサイトカインシグナル伝達調節物質のインヒビターの投与により処置し得る。本発明は、患者で

50

の抗原に対する保護的なDCに誘導される免疫応答を生成させるための手段を提供する。本開示に基づけば、当業者は、炎症前サイトカイン（すなわちIL-12、TNF、IFN、IFN、IFNなど）を、サイトカインシグナル伝達調節物質ワクチンのインヒビターの効力を増大させるために、本明細書に開示される処置レジメンに追加し得ることを認識するであろう。

【0237】

投薬量および製剤（製薬学的組成物）

本発明は、治療薬、例えばsiRNAの投与により、哺乳物における疾患、例えばHIV感染症、癌などを処置することを予見する。本発明の治療薬の投与は、例えばレシピエントの生理学的状態、投与の目的が治療的であるか若しくは予防的であるか、および当業者に既知の他の要因に依存して、連続的であっても間欠的であってもよい。本発明の剤の投与は、予め選択された期間にわたり本質的に連続的であっても、若しくは、一連の間隔を空けられた用量であってもよい。局所および全身双方の投与を企図している。投与される量は、限定されるものでないが、選ばれた組成物、特定の疾患、哺乳動物の重量、身体状態および年齢、ならびに予防が達成されるべきであるか若しくは治療が達成されるべきであるかを挙げるができる多様な要因に依存して変動することができる。こうした要因は、当該技術分野で公知である動物モデル若しくは他の試験系を使用して、臨床家により容易に決定され得る。

10

【0238】

siRNAの投与は、siRNAをコードする核酸分子の投与により達成しうる（例えば、Felgnerら、米国特許第5,580,859号明細書、Pardollら、1995；Stevensonら 1995；Molling 1997；Donnellyら 1995；Yangら II；Abdallahら 1995を参照されたい）。核酸の製薬学的製剤、投薬量および投与経路は、全般として、例えばFelgnerら、上記に開示されている。

20

【0239】

下で論考されるとおり場合によっては持続放出のために処方しうる本発明の治療薬（1種若しくは複数）を有する1種若しくはそれ以上の適する単位投薬形態物（例えば微小被包化を使用する、第WO 94/07529号明細書および米国特許第4,962,091号明細書（それらの開示は引用することにより本明細書に組み込まれる）を参照されたい）は、静脈内および筋肉内経路、ならびに疾患に罹った組織への直接注入によるを包含する非経口を包含する多様な経路により投与し得る。例えば治療薬は腫瘍中に直接注入しうる。製剤は、適切な場合は別個の単位投薬形態物で便宜的に提示することができ、また、薬学に公知の方法のいずれにより製造してもよい。こうした方法は、治療薬を液体担体、固体マトリックス、半固形担体、微粉化した固体担体若しくはそれらの組合せとの連合にもたらず段階、およびその後、必要な場合は生成物を所望の送達系に導入若しくは造形する段階を包含しうる。

30

【0240】

本発明の治療薬を投与のため調製する場合、それらは、好ましくは、製薬学的製剤若しくは単位投薬形態物を形成するように、製薬学的に許容できる担体、希釈剤若しくは賦形剤と組合せる。こうした製剤中の総有効成分は該製剤の0.1から99.9重量%までを包含する。「製薬学的に許容できるもの」は、製剤の他の成分と適合性でありかつそのレシピエントに対し有害でない担体、希釈剤、賦形剤および/若しくは塩である。投与のための有効成分は、散剤若しくは顆粒剤；溶液、懸濁剤若しくは乳剤として存在しうる。

40

【0241】

本発明の治療薬を含有する製薬学的製剤は、公知かつ容易に入手可能な成分を使用して、当該技術分野で既知の手順により製造し得る。本発明の治療薬はまた、例えば筋肉内、皮下若しくは静脈内経路による非経口投与に適切な溶液としても処方し得る。

【0242】

本発明の有効成分の製薬学的製剤はまた、水性若しくは無水の溶液若しくは分散剤の形

50

態、または、あるいは、乳剤若しくは懸濁剤の形態も取り得る。

【0243】

従って、治療薬は（例えば注入、例えばボラス注入（injection）若しくは連続注入（infusion）による）非経口投与のため処方することができ、また、アンプル、充填済みシリンジ、小容量の注入容器若しくは添加された保存剤を含む多用量容器中の単位投薬形態物で提示しうる。有効成分は、油性若しくは水性ベヒクル中の懸濁剤、溶液若しくは乳剤のような形態をとることができ、そして、懸濁化剤、安定剤および/若しくは分散助剤のような処方剤を含有しうる。あるいは、有効成分は、使用前に適するベヒクル、例えば滅菌の発熱性物質を含まない水での構成のため、無菌固体の無菌単離、若しくは溶液からの凍結乾燥により得られる粉末の形態にありうる。

10

【0244】

各投薬形態物の個々のエアゾル用量に含有される有効成分（1種若しくは複数）の単位含有量は、それ自体が特定の適応症若しくは疾患を処置するための有効量を構成する必要がないことが認識されるであろう。必要な有効量は複数の投薬量単位の投与により達成され得るためである。さらに、有効量は、投薬形態物中の用量未満を個別に若しくは一連の投与のいずれかで使用して達成しうる。

【0245】

本発明の製薬学的製剤は、任意の成分として、当該技術分野で公知である型の製薬学的に許容できる担体、希釈剤、可溶化剤若しくは乳化剤および塩を包含しうる。本発明の製薬学的製剤で有用である担体および/若しくは希釈剤の特定の制限しない例は、水、およびリン酸緩衝生理的食塩水溶液 pH 7.0 ~ 8.0 のような、生理学的に許容できる緩衝生理的食塩水溶液である。

20

【0246】

本発明の発現ベクター、形質導入した細胞、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド（有効成分）は、生物体の身体中の該剤の作用部位との有効成分の接触を生じさせるいずれかの手段により、多様な疾患状態を処置するため処方かつ投与し得る。それらは、個々の治療的有效成分若しくは治療的有效成分の組合せのいずれかとして、医薬品とともにの使用に利用可能ないずれかの慣習的手段により投与し得る。それらは単独で投与し得るが、しかし、一般には、選ばれた投与経路および標準的な製薬学的実務に基づき選択される製薬学的担体とともに投与される。

30

【0247】

一般に、水、適する油、生理的食塩水、水性デキストロース（ブドウ糖）および関連する糖溶液、ならびにプロピレングリコール若しくはポリエチレングリコールのようなグリコールが、非経口溶液の適する担体である。非経口投与のための溶液は、有効成分、適する安定剤、および必要な場合は緩衝物質を含有する。単独若しくは組合せのいずれかの硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム若しくはアスコルビン酸のような抗酸化剤が適する安定剤である。クエン酸およびその塩、ならびにエチレンジアミン四酢酸ナトリウム（EDTA）もまた使用される。加えて、非経口溶液は、塩化ベンザルコニウム、メチル若しくはプロピルパラベンおよびクロロブタノールのような保存剤を含有し得る。適する製薬学的担体は、この分野の標準的参照教科書、Remington's Pharmaceutical Sciences に記述されている。

40

【0248】

本発明の有効成分は、哺乳動物、およびとりわけヒトでの使用に適する製薬学的に許容できる組成物に懸濁されるように処方しうる。こうした製剤は、米国特許第 4,082,735 号；同第 4,082,736 号；同第 4,101,536 号；同第 4,185,089 号；同第 4,235,771 号；および同第 4,406,890 号明細書に記述されるムラミルジペプチド誘導體（MDP）若しくはアナログのようなアジュバントの使用を包含する。有用である他のアジュバントは、ミョウバン（Pierce Chemical Co.）、リピド A、トレハロースジミコレートおよび臭化ジメチルジオクタデシルアンモニウム（DDA）、フロイントのアジュバントならびに IL-12 を包含する。他

50

の成分は、非イオン性界面活性剤ポリオキシプロピレン - ポリオキシエチレンブロックポリマー (Pluronic[®])、およびスクアレンのような代謝可能な油 (米国特許第4,606,918号明細書) を包含しうる。

【0249】

加えて、標準的な製薬学的方法を使用して作用の持続時間を制御し得る。これらは当該技術分野で公知であり、そして制御放出製剤を包含し、また、適切な巨大分子、例えばポリマー、ポリエステル、ポリアミノ酸、ポリビニル、ピロリドン、エチレンビニルアセテート、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース若しくはプロタミン硫酸を包含し得る。巨大分子の濃度ならびに取り込みの方法を、放出を制御するために調節し得る。加えて、剤を、ポリエステル、ポリアミノ酸、ヒドロゲル、ポリ(乳酸)若しくはエチレンビニルアセテートコポリマーのようなポリマー物質の粒子中に取り込み得る。取り込まれることに加え、これらの剤はまた、化合物をマイクロカプセル中に捕捉するのにも使用し得る。

10

【0250】

従って、本発明の製薬学的組成物は、特定の効果を達成するために、哺乳動物の身体中で多様な経路を介してかつ多様な部位に送達しうる (例えば Rosenfeldら、1991; Rosenfeldら、1991a; Jaffeら、上記; Berkner、上記を参照されたい)。当業者は、1種以上の経路を投与に使用し得るとは言え、特定の経路が別の経路より即時かつより効果的な反応を提供し得ることを認識するであろう。局所若しくは全身送達は、体腔中への製剤の塗布若しくは滴下、エアゾルの吸入 (inhalation) 若しくは吸入 (insufflation)、または筋肉内、静脈内、腹腔、皮下、皮内ならびに局所投与を含んでなる非経口導入を含んでなる投与により達成し得る。

20

【0251】

本発明の有効成分は単位投薬形態物で提供し得、各投薬単位、例えば茶さじ一杯、錠剤、溶液若しくは坐剤は、単独若しくは他の有効成分との適切な組合せの予め決められた量の組成物を含有する。本明細書で使用されるところの「単位投薬形態物」という用語は、ヒトおよび哺乳動物被験体の単位投薬量として適する物理的に別個の単位を指し、各単位は、適切な場合は製薬学的に許容できる希釈剤、単体若しくはベヒクルとともに所望の効果を生じさせるのに十分な量で計算された、予め決められた量の単独若しくは他の有効成分と組合せの本発明の組成物を含有する。本発明の単位投薬形態物の仕様は、達成されるべき特定の効果、および特定宿主中での製薬学的組成物と関連する特定の薬動力学に依存する。

30

【0252】

本明細書に記述されるこれらの方法は決して包括的でなく、そして、特定の応用へのさらなる適合方法が当業者に明らかであろう。さらに、組成物の有効量は、所望の効果を発揮することが既知の化合物への類似によりさらに近似させ得る。

【0253】

遺伝子治療の投与

当業者は、細胞中にベクターを投与するのに多様な送達方法を利用しうることを認識している。例は：(1)電気穿孔法(電気)、遺伝子銃(物理的力)のような物理的手段を利用するか若しくは大量の液体を適用する(圧)方法;および(2)前記ベクターをリポソーム、凝集タンパク質若しくは輸送分子のような別の実体と複合体形成させる方法を包含する。

40

【0254】

さらに、実際の用量およびスケジュールは、該組成物が他の製薬学的組成物とともに投与されるかどうかによって依存して、若しくは、薬物動態、薬物の体内動態および代謝の個体間の差違に依存して変動し得る。同様に、量は、利用される特定の細胞株に依存して(例えば細胞表面上に存在するベクター受容体の数、若しくは遺伝子移入に使用される特定のベクターのその細胞株中で複製する能力に基づき) *in vitro* の応用で変動し得る。

50

さらに、細胞あたりに添加されるべきベクターの量は、ベクターに挿入される治療的遺伝子の長さおよび安定性、ならびにまた配列の性質とともに変動することがありそうであることができ、そしてとりわけ、経験的に決定される必要があるパラメータであり、かつ、本発明の方法に固有でない要因（例えば合成に伴う費用）により変わり得る。当業者は、特定の状況の要件に従っていかなる必要な調節も容易に行い得る。

【0255】

治療薬を含有する細胞は、自殺遺伝子、すなわち細胞を破壊するのに使用し得る産物をコードする遺伝子もまた含有しうる。多くの遺伝子治療の状況において、宿主の細胞中で治療目的上遺伝子を発現することが可能であるがしかしまた随意に宿主細胞を破壊する能力も有することが望ましい。治療薬は、その発現が活性化物質化合物の非存在下で活性化されない自殺遺伝子に連結し得る。剤および自殺遺伝子双方が導入された細胞の死が望ましい場合に、活性化物質化合物を細胞に投与し、それにより自殺遺伝子の発現を活性化しかつ該細胞を死滅させる。使用しうる自殺遺伝子/プロドラッグの組合せの例は、単純疱疹ウイルス-チミジンキナーゼ(HSV-tk)およびガンシクロビル、アシクロビル；酸化還元酵素およびシクロヘキシミド；シトシンデアミナーゼおよび5-フルオロシトシン；チミジンキナーゼチミジレートキナーゼ(Tdk::Tmk)およびAZT；ならびにデオキシチジンキナーゼおよびシトシンアラビノシドである。

10

【0256】

本明細書に記述されるこれらの方法は決して包括的でなく、そして特定の応用へのさらなる適合方法が当業者に明らかであろう。さらに、組成物の有効量は、所望の効果を発揮することが既知の化合物への類似によりさらに近似させ得る。

20

【0257】

〔実施例〕

本発明は、今や以下の実施例に関して記述される。これらの実施例は具体的説明の目的上のみ提供され、そして、本発明はこれらの実施例に制限されず、しかしむしろ本明細書に提供される教示の結果として明らかである全部の変形物を包含する。

【0258】

本明細書に開示される実験は、多様な癌および感染性病原体に対する有効なワクチンの開発のためにDCを活用するため、DCによる抗原提示の調節を探求するために実施した。本明細書に開示される結果は、免疫細胞における阻害物質を阻害するとして別の方法で既知の負の調節経路を妨害することが、その免疫刺激能力を高めることを示す。細胞の免疫能を強化するため阻害物質を阻害するという概念は、より効果的なワクチンの新規開発方法としてはたらく。

30

【0259】

本明細書に開示される実験で使用した材料および方法を今や記述する。

siRNAオリゴによるDCのトランスフェクション

骨髄DCは、製造元のプロトコル(Genlantis、カリフォルニア州サンディエゴ)に従ってGenePorterを使用して、21塩基対のsiRNAオリゴヌクレオチド(5'-CTACCTGAGTTCCTTCCCTT-3'；配列番号3)でもまたトランスフェクトした。簡潔には、20μMのオリゴヌクレオチドの溶液3μlを、3μlのGenePorter試薬および94μlの無血清RPMI1640に添加した。混合物を25で30分間インキュベートし、その後100μlのGenePorter/オリゴヌクレオチド混合物を骨髄DCの各ウェルに添加し、そして37で4時間インキュベートした。インキュベーション後に、20%FBSを補充した500μl/ウェルのRPMI1640を骨髄DCに添加した。

40

【0260】

レンチウイルスベクターでの骨髄由来DCの形質導入

マウス骨髄由来DCを、当該技術分野で既知の方法を使用して調製した。簡潔には、マウス骨髄を肋骨から洗い流し、ナイロンメッシュを通過させ、そして塩化アンモニウムで赤血球を枯渇させた。RPMI-1640で徹底的に洗浄した後に、細胞を、10%FBS

50

S、mGM-CSF/ml (20 ng/ml) および組換えマウスIL-4 (20 ng/ml; PeproTech, Inc., ニュージャージー州ロッキーヒル) を補充した2.5 mlのRPMI-1640とともに培養した。培養第2および4日に上清を除去し、そして20 ng/mlのrmGM-CSFおよび20 ng/mlのrmIL-4を含有する新鮮培地と交換した。全部の培養物は5%加湿CO₂中37℃でインキュベートした。非接着顆粒球を培養48時間後に除去しかつ新鮮培地を添加した。培養7日後、80%超の細胞が、FACSにより決定されるとおり、特徴的なDC特異的マーカーを発現した。マウス骨髄由来DC (培養第5ないし7日) の形質導入は、5 μg/mlのPolybrene (Sigma、ミズーリ州セントルイス) の添加を伴い24ウェルプレートで実施した。DCを洗浄し、そして400 μlの無血清RPMI 1640中2 × 10⁵細胞/ウェルの濃度で24ウェルプレート中にプレATINGした。細胞は、5 × 10⁵細胞/mlの細胞密度で、多様な感染多重度(MOI)を伴うレンチウイルスベクターに曝露させた。形質導入8時間後に細胞をPBSで洗浄し、そして新鮮な組織培地中でさらにインキュベートした。

10

【0261】

サイトカインおよびウエスタンブロットING

多様なサイトカインのレベルを、製造元の説明書に従ってELISA分析(BD Biosciences、ニュージャージー州リンカーンパーク)を使用し、細胞培養物の上清を使用し定量した。ウエスタンブロット分析のため、293T細胞を、10:1の比のマウスSOCS1-siRNA若しくは無関係なGFP-siRNAを発現するpSUPERベクター、およびFLAG標識SOCS1ベクターでコトランスフェクトした。細胞を48時間後に収集しかつSDS-PAGEにかけた。Hybond-Pメンブレン(Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ)への転写後に、サンプルを、抗Flag (Sigma、ミズーリ州セントルイス)若しくはアクチン(Santa Cruz Biotechnology, Inc. カリフォルニア州サンタクルズ)抗体でのウエスタンブロットING、次いでECL-Plus試薬(Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ)での検出により分析した。フィルムをデンシトメーターSIで走査し、そしてSOCS-1/アクチンのバンドをImageQuantソフトウェア(Molecular Dynamics、ニュージャージー州ピスカタウェイ)で定量した。SOCS1バンドの強度を - アクチンのバンドの強度に対し正規化した。

20

30

【0262】

SOCS1の定量的RT-PCR分析

トランスフェクトしたマウスBM-DC中でのSOCS1の相対的発現を、定量的リアルタイムPCRにより評価した。全RNAを、Trizol試薬(Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)を使用して、3.5 ~ 5 × 10⁵のBM-DCから抽出した。各サンプルについて1.0 μgの全RNAを、ランダムヘキサマープライマーおよびSuperScript第一鎖合成キット(First-Strand Synthesis Kit) (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)を用いて逆転写した。リアルタイム5'-ヌクレアーゼ蛍光発生性PCR分析を、鋳型として反応あたり5 ngの出発RNA原料の同等物を用いる20 μlの四重の反応で、ABI 7900HT配列決定装置(Applied Biosystems, Inc., カリフォルニア州フォスターシティ)で実施した。マウスSOCS1 (6FAM) および18Sリボソーム対照(VIC)の予め開発された(pre-developed)プライマー/プローブ組をApplied Biosystems, Inc., カリフォルニア州フォスターシティから購入した(SOCS1のプライマー、5'-ACCTTCTTGTTGCGCGAC-3'; 配列番号12、および5'-AAGCCATCTTCACGCTGAGC-3'; 配列番号13、ならびにハイブリダイゼーションプローブ、6FAM-TCGCCAACGGAACTGCTTCTTCG-TAMRA; 配列番号14)。PCRパラメータは、TaqManユニバーサルPCRマスターミックスキット(Applied Biosystems, Inc., カリフォルニア州フォスターシティ)について

40

50

推奨されたとおりであり、SOCS1および18Sの反応は別個のチューブで実施した。SOCS1レベルを18S rRNAに対し正規化した。擬似トランスフェクトしかつ刺激したBM-DCの対照値に関するSOCS1の発現を、Comparative Ct法(Livakら、2001、Methods 25:402-408)を使用して計算した。

【0263】

OT-I細胞のin vitroアッセイ

脾をOT-Iマウスから収集し、プールしかつ破壊して単細胞懸濁液を得た。CD8⁺ OT-I T細胞を、MACS CD8⁺ T細胞単離キット(Miltenyi Biotec Inc.、カリフォルニア州オーバーン)を使用する陰性染色により収集した。簡潔には、細胞を、CD4(L3T4)、CD45R(B220)、DX5、CD11b(Mac-1)およびTer-119に特異的なビオチン標識抗体で被覆した。抗ビオチン磁性MicroBeads(Miltenyi Biotec Inc.、カリフォルニア州オーバーン)を細胞に添加し、それをMACS磁石に取付けた分離カラムに渡した。カラムに結合しなかった細胞を収集し、そしてFACSにより決定されたとおり95%超がCD8⁺であった。合計 5×10^4 の精製CD8⁺ OT-I T細胞および 3×10^3 の未熟DCを、10%FCS、4mM L-グルタミン、1mMピルビン酸ナトリウム、100U/mlペニシリンおよびストレプトマイシン、10mM HEPESならびに5μM 2-MEを補充した200μlのRPMI 1640培地中で、丸底96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに入れた。増殖を、培養の最後の8時間のウェルあたり1μCiの[³H]TdRの添加により2日後に測定した。三重の測定を行い、そして三重の実験を代表する。OT-I/DC共培養物中のサイトカイン分泌を、指定されたサイトカインについてのELISA分析(BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼ)を使用して測定した。

【0264】

フローサイトメトリー分析

細胞を、FC受容体を前阻害した後に、0.1%NaN₃および2%FCSを含有するPBS中で、FITC、PE、アロフィコシアニン(APC)若しくはPerCp結合mAbで染色した。マウスCD4(RM4-5)、CD8(53-6.7)、CD11c(HL3)、CD40(3/23)、CD80(16-10A1)、CD86(GL1)に特異的なラットmAb、およびマッチさせたアイソタイプ対照を、BD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼから購入した。染色した細胞を、FACS Calibur(Becton Dickinson、ニュージャージー州リンカーンパーク)フローサイトメーターおよびCELLQuestソフトウェアで分析した。

【0265】

四量体染色

H2-K^b/卵アルブミン四量体アッセイを使用して、卵アルブミン特異的CD8⁺ T細胞を検出した。免疫したマウスからの脾細胞若しくはT細胞を、DC免疫化後異なる日に、抗CD8-FITCおよびH2-K^b/卵アルブミン(SIINFEL)-PE四量体;配列番号11(Beckman Coulter Immunomics、カリフォルニア州サンディエゴ)で二重染色した。四量体染色は、製造元の説明書に従い、10⁶細胞あたり1μgの抗CD8 および10μlの卵アルブミン四量体を用いて、4で1時間行った。

【0266】

エリスポット(ELISPOT)

CTLペプチドをCD8⁺ T細胞刺激に使用した。ヒトCD20分子からの無関係のペプチドもまた陰性対照として使用した。CD8⁺ T細胞を、MACS CD4(L3T4)若しくはMACS CD8(Ly-2)MicroBeads(Miltenyi Biotec Inc.、カリフォルニア州オーバーン)を使用することにより脾細胞から単離した。

10

20

30

40

50

【0267】

CTLおよびNKアッセイ

CD8⁺ CTL応答を、*in vitro*で再刺激した脾細胞の標的細胞を溶解する能力を測定する標準的なクロム放出アッセイで評価した。免疫したマウスからプールした脾細胞を、ペプチドを含有するRPMI-1640中*in vitro*で4~6日間再刺激した。標的細胞および対照細胞を⁵¹Crクロム酸ナトリウム溶液で90分間標識した。多様な数のエフェクター細胞を、96ウェルV字型底プレート(200μl/ウェル)中で一定数の標的細胞(1×10⁴/ウェル)とともに37℃で3時間インキュベートした。三重の培養物からの上清(100μl)を収集した。溶解パーセントを、(実験放出 - 自発的放出) / (最大放出 - 自発的放出) × 100として計算した。NK細胞は、1×10⁶細胞/mlを500U/mlの組換えマウスIL-2とともに培養することにより、マウスの脾細胞から生成させた。NK細胞による溶解に高度に感受性であるYAC-1細胞を⁵¹Crとともに37℃で1時間インキュベートし、洗浄し、そして10⁵細胞/mlで再懸濁した。NK細胞を、多様なE:T細胞比を得るように三重で標的細胞に添加した。インキュベーション後にプレートを遠心分離し、そして、上清液体中の放射活性をガンマカウンター(Beckman Coulter, Inc., カリフォルニア州フラートン)でカウントした。

10

【0268】

DC免疫化および腫瘍モデル

骨髄由来DC(第5日の骨髄培養物)を、5のMOIのLV-SCOS1-siRNA若しくはLV-GFP-siRNAで形質導入した。DCをその後、卵アルブミンタンパク質若しくはTRP2ペプチドで8時間パルスし、PBSで3回洗浄し、そして培養物中で追加の36時間後に免疫化に使用した。いくつかの実験については、抗原パルスDCをLPS(100ng/ml, Sigma, ミズーリ州セントルイス)で24時間刺激し、PBSで洗浄し、そしてその後C57BL/6マウス(Jackson Laboratory)に足蹠を介して注入した。治療モデルにおいて、EG7若しくはB16腫瘍細胞(2.5ないし5×10⁵)を、同系のC57BL/6マウスの右脇腹に皮下で(s.c.)注入した。腫瘍接種後多様な日にマウスを群に無作為に分割し、そして50μlの抗原でパルスし形質導入したDC若しくはPBS対照を注入した。数匹のマウスで、ワクチン接種後指定された日にLPSを腹腔内で(i.p.)投与した。腫瘍体積を週2若しくは3回、カリパスを用いて測定した。

20

30

【0269】

統計学的解析

統計学的解析のため、Studentのt検定を使用し、また、95%信頼限界を、p < 0.05と定義される有意であるために採用した。結果は典型的に平均±標準誤差として提示する。

【0270】

本実施例に提示される実験の結果を今や記述する。

【実施例1】

【0271】

ネズミのSOC-1 siRNAの同定および分析

コンピュータプログラムを使用して、マウスSOC-1を標的とするsiRNA配列、すなわちSOC-1-siRNA1(CCTTCGCTCCCACTCCGA; 配列番号1)、SOC-1-siRNA2(CAGTCGCCAACGGAAGTGC; 配列番号2)およびSOC-1-siRNA3(CTACCTGAGTTCCTTCCCTT; 配列番号3)を選択した。全部の標的配列をNCBI Blastのクエリにかけて、他の既知の遺伝子に対する相同性の欠如を確認した。フォワードおよびリバースオリゴを、9ntのスペーサーにより分離されるセンスおよびアンチセンスの19ntの標的配列をコードするように設計した。この中核的siRNA配列を、H1 RNA転写開始および5'Tターミネーター配列により隣接させ、また、アニーリングに際して5'のBglI

40

50

Iおよび3'のHindIII適合性のオーバーハングを組み込んだ。DNAに基づくsiRNA発現ベクターpSUPER(Brummelkampら、2002、Science 296:550-553)は、siRNAのde novo合成を指図するのにH1-RNAプロモーターを使用する。合成しかつアニーリングしたオリゴヌクレオチド対を、BglII/HindIIIで消化したpSUPERベクターにクローン化した。陽性のクローンを制限消化により同定し、そしてDNA配列決定により確認した。

【0272】

マウスSOCS1-siRNAのためのレンチウイルスベクターの生成および製造

この研究で使用したHIV移入ベクターはpTRIP U3 CMV eGFPであり、内的サイトメガロウイルス(CMV)プロモーターを含んでなり、また、転写活性の配列を除去する3'末端反復配列(LTR)のU3領域中の400bpの欠失で自己不活性化する(SINベクター)。レンチウイルス移入ベクターpTRIP U3 CMV GFPは、元のpHR'バックボーンのユニークなClaI部位に中央のポリプリン区域(tract)(cPPT)および中央の終止配列(CTS)を包含する178bpのフラグメントを含有する。pTRIP U3 CMV GFPを、H1 RNAプロモーターからのsiRNAの発現、およびニシストロン性のプラストサイジン抵抗性/eYFP選択マーカの共発現のため改変した。クローニングに適合させかつ天然のCMVプロモーターを除去するために、pTRIPベクターの中央ポリプリン区域/中央終止配列(cPPT/CTS)を、プライマー(5'-GATCGAATTCACAAATGGC-3'; 配列番号4および5'-CTAGGGATCCATCGCCCAAGTGG-3'; 配列番号5)を使用してPCR増幅して、クローニングのための5'-EcoRIおよび3'-BamHI部位を挿入した。cPPT-CTS PCR産物をその後EcoRI/BamHIで消化し、そしてEcoRI/BamHIで消化したpTRIP U3 CMV GFPベクターに再挿入した。マーモット転写後調節エレメント(wPRE)配列を、プライマー(5'-GATCCTCGAGGTCGACAAATCAACCTCTGGA-3'; 配列番号6および5'-GATCGGTACCCAGGCGGGGAGG-3'; 配列番号7)を使用してpBS-SK-WPREからPCR増幅して、5'-XhoI/SalIおよび3'KpnI部位を付加した。WPREフラグメントをその後XhoI/KpnIで消化し、そして改変したpTRIP U3 CMV GFPバックボーンに挿入してpTRIP-Wを生成させた。siRNAおよびニシストロン性選択マーカのカセットを、pTRIP-Wへの移入のため最初にpSUPERバックボーンで集成した。ニシストロン性選択マーカ-CMV-Blasti^R-IRES-eYFP(BY)を、プライマー(5'-CAGTATCGATTTAATTAATCAATATTGGCCATTAG-3'; 配列番号8および5'-CAGTGTCTGACTTAATTAAGTGGCCGCTTTACTTG-3'; 配列番号9)を使用してプラスミドPYAP6からPCR増幅して、5'-ClaIおよび3'-SalI部位を組み込んだ。PCR産物をClaIおよびSalIで消化し、その後、ClaI/SalIで消化したpSUPERベクターに連結して、H1-RNAプロモーターおよびpSUPER MCSの3'端にBYマーカを付加し、pSUPER-BYを生成させた。pSUPER-BYをその後BamHI/SalI消化し、そしてpTRIP-Wバックボーンに連結してpTRIP-H1-BY-Wを生成させた。

【0273】

hrGFP若しくはSOCS1(3) siRNAヘアピン配列を含有するその後のpSUPERベクターを、pTRIP-H1-BY-W中への挿入のためBstBIおよびClaIで消化して、pTRIP-hrGFP-siRNA-BY-W(GFP-siRNA)およびpTRIP-SOCS1-siRNA-BY-W(SOCS1-siRNA)を生成させた。最終的な390bpのスペーサーフラグメントを最終のベクターのClaI部位に挿入して、siRNAの終止配列にCMVプロモーターの開始から間隔をあげた。全部のベクターをDNA配列決定(Lone Star Labs、米国テキサス州ヒューストン)により確認した。

10

20

30

40

50

【0274】

組換えのシュードタイピングしたレンチウイルスベクターを、293T細胞中への3種のプラスミドのコトランスフェクションにより生成した。HIV由来のパッケージング構築物pCMV R8.9はHIV-1 gag、およびpol前駆体、ならびに調節タンパク質tatおよびrevをコードする。水疱性口内炎ウイルスの糖タンパク質G(VSV-G)をプラスミドpMD.Gから発現させた。シュードタイピングしたレンチウイルスは、pCMV R8.9、pMD.GおよびレンチウイルスpTRIP siRNA移入ベクターでの293T細胞の一過性リン酸カルシウムコトランスフェクションにより生じさせた。トランスフェクションの60ないし72時間後に、4で2時間の50,000×gでの超遠心により上清を濃縮した。ウイルスペレットをRPMIに再懸濁し、そして将来の研究のため-80で凍結させた。ウイルス力価は、293T細胞を、濃縮したウイルスの連続希釈および8μg/mlのPolybreneとともに6時間インキュベートすること、次いで72ないし96時間後のeYFP陽性細胞を決定するための蛍光標示式細胞分種(FACS)分析により測定した。ベクターの力価は後に続くとおり、すなわち力価 = $F \times 2 \times C_0 / V \times D$ (式中、Dはウイルス希釈係数であり、Vは接種物の容量であり、FはeYFP陽性293T細胞の頻度であり、そしてC₀は接種時点での標的細胞の数である)計算した。

10

【実施例2】

【0275】

GenePorterを用いてのSOCS1 siRNAでのネズミBM-DCのトランスフェクションおよびSOCS1 mRNAの下方制御

20

DCによる抗原提示のDOCS1調節を検討するため、SOCS1を特異的に下方制御する小分子緩衝RNA(siRNA)を、下述されるとおり最初に同定した。

【0276】

合成siRNAオリゴ二重鎖を、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)およびIL-4の存在下でGenePorterにより83%のトランスフェクション効率でマウス骨髄細胞由来DCにex vivoで効率的にトランスフェクトした。簡潔には、骨髄DCを、製造元のプロトコルに従いGenePorterを使用して、21塩基対のsiRNAオリゴヌクレオチド(5'-CTACCTGAGTTCCTTCCCTT-3';配列番号3)でトランスフェクトした。3μlの20μMオリゴヌクレオチドを、3μlのGenePorter試薬および94μlの無血清RPMI1640に添加し、そして25で30分間インキュベートし、その後、100μlのGenePorter/オリゴヌクレオチド混合物を骨髄DCの各ウェルに添加しかつ37で4時間インキュベートした。インキュベーション後に、500μl/ウェルの20%FBSを補充したRPMI1640を骨髄DCに添加した。本開示に基づき、合成siRNAリゴは、生理学的に許容できる担体の状況で細胞に送達され得る。許容できる担体の一例はリボソームである。

30

【0277】

図1Aは、SOCS1が、SOCS1-siRNAを発現するベクターで形質導入した細胞中で下方制御されることを示す。簡潔には、293T細胞を、10:1の比のマウスSOCS1-siRNA若しくは無関係なGFP-siRNAを発現するpSUPER(pSUP)ベクター、およびFLAG標識mSOCS1発現ベクターで、GenePorterを使用してコトランスフェクトし、そして48時間後にウエスタンブロッティングにかけた。SOCS1のバンドの強度を-アクチンのバンドのものに対して正規化し、そして相対強度(比)を示す。SOCS1-siRNAと呼称されるSOCS1-siRNA3(5'-CTACCTGAGTTCCTTCCCTT-3';配列番号3)をその後の研究で使用した。

40

【0278】

定量的RT-PCRアッセイにより確認されるとおり、SOCS1 siRNAでトランスフェクトした全DC集団におけるSOCS1 mRNAのレベルは、SOCS1を下

50

方制御し得ないSOCS1 siRNA変異体でトランスフェクトしたDC中のレベルと比較しておよそ60%、特異的に低下した(図1B)。加えて、SOCS1発現はin vitroでの骨髄DC培養の間および成熟後により高かったことが観察された。

【0279】

SOCS1 siRNAでトランスフェクトしたDCが、IL-6およびTNF- α のような炎症前サイトカインの高められた分泌(図2)、ならびに刺激に際してのSTAT1、I- κ BおよびJNKの高められたリン酸化により示されるとおり、siRNA変異体を用いたDCがそうであったよりもLPS若しくはIFN- γ に対しより応答性であったこともまた観察された。図1Bは、3回の独立した実験の1つからの24時間のLPS(100ng/ml)若しくはIFN- γ (10ng/ml)に应答してsiRNAオリゴ若しくは擬似トランスフェクトしたDCにより分泌されたサイトカインのレベルを描く。該siRNA変異体(5'-ACTATCTAAGTTACTACCCCTT-3'; 配列番号10)はSOCS1 siRNA3配列中に4個の突然変異を含有する。

10

【0280】

これらのデータは、JAK/STAT経路およびTLR/NF- κ B経路の調節におけるSOCS1の報告された関与(Hanadaら 2003、Immunity 19:437-450; Chongら、2003、Immunity 18:475-487)と一致する。SOCS1 siRNAでトランスフェクトしたDCは、IFN- γ およびLPS刺激の前若しくは後のいずれかに、siRNA-DC変異体が生じたよりもわずかにより成熟した表現型を示した。双方のトランスフェクトしたDCは擬似トランスフェクトしたDCよりも成熟しており、siRNAによるIFN遺伝子の非特異的活性化の影響を反映しうる。

20

【実施例3】

【0281】

ウイルスベクターでのネズミBM-DCのトランスフェクション

SOCS1がin vivoでDCの抗原提示を負に調節するかどうかを評価するため、SOCS1 siRNA若しくは対照の緑色蛍光タンパク質(GFP) siRNAを、DCを安定にトランスフェクトすることが可能であり(Rubinsonら、2003、Nat. Genet. 33:401-406; Schroersら、2004、Methods Mol. Biol. 246:451-459)、その結果SOCS1サイレンシングの効果をより確実に評価し得るレンチウイルスベクター(LV)にクローン化した。2種の構築物、LV-SOCS1-siRNAおよびLV-GFP-siRNAを生成し、双方は本明細書の別の場所に記述される方法により黄色蛍光タンパク質(YFP)マーカー(図3)を含有する。LV-SOCS1-siRNA若しくはLV-GFP-siRNAベクターいずれかでの骨髄由来DC(80%超がCD11c⁺)の形質導入は、58~63%のYFPについて陽性の培養細胞を慣例に生じた。siRNAオリゴでトランスフェクトしたDCでの以前の観察結果と一致して、全形質導入DC集団でより低レベルのSOCS1 mRNA、およびLV-GFP-siRNA-DCと比較してのLV-SOCS1-siRNA-DCの刺激に際しての炎症前サイトカインの高められた分泌が観察された。形質導入したDCでのSOCS1 mRNAのレベルを測定するため、YFP⁺で形質導入したDCを、蛍光標示式細胞分取(FACS)を使用して単離し、そしてSOCS1 mRNAの相対的発現をその後、リアルタイム定量的PCRにより測定した。YFP⁺のLV-SOCS1-siRNA-DC集団でのSOCS1 mRNAのレベルは、擬似形質導入したDCでのレベルと比較して約90%より低かったことが観察された。LPS刺激を伴い若しくは伴わずのいずれかでLV-SOCS1-siRNAおよびLV-GFP-siRNAで形質導入したDCは、匹敵するレベルのCD86およびCD40発現を示した。いずれかの特定の論理により束縛されることを願わないが、LV-GFP-siRNA-DCが擬似DCよりも高レベルのCD86およびCD40をもたらしたといい観察結果は、siRNAおよびレンチウイルス形質導入による非特異的活性化の影響によることがありそうであると考えられる。

30

40

50

【実施例 4】

【0282】

マウス SOCS1 siRNA DC により誘導される OVA 特異的 CTL および抗腫瘍活性

次の一連の実験は、抗原特異的細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) の DC 刺激が SOCS1 により調節されるかどうかを試験するために実施した。未熟 SOCS1-siRNA-DC、若しくは成熟させるためさらに刺激されていない siRNA 変異体 DC を、卵アルブミン-I ペプチド (SIINFEKL; 配列番号 11) でパルスし、そして卵アルブミン特異的 TCR T 細胞 (OT-I) と共培養した場合、OT-I 細胞は、siRNA-DC 変異体共培養物中よりも SOCS1-siRNA-DC 共培養物中でより増殖した (図 4A)。これらのデータと一致して、より高レベルの炎症前サイトカインが SOCS1-siRNA-DC 共培養物中で分泌された (図 4B)。加えて、これらの細胞を示す CTL アッセイは、SOCS1-siRNA-DC との共培養後に卵アルブミン⁺ 同系 EG7 細胞に対するより活発な細胞傷害性を示し、SOCS1 が抗原特異的 T 細胞の DC 刺激の調節に寄与することを示した。

10

【0283】

in vivo で抗原特異的応答を刺激する SOCS1 をサイレンスした DC の能力を、ex vivo 成熟の非存在下に卵アルブミンでパルスし形質導入した DC でマウスを直接免疫することにより、次に試験した。四量体染色は、全 CD8⁺ T 細胞の 2.3% が、それぞれ LV-GFP-siRNA-DC 若しくは擬似 DC で免疫したマウスでのわずか 0.64% および 0.43% と比較して、LV-SOCS1-siRNA-DC で免疫したマウスで、卵アルブミン四量体について陽性であったことを示した (図 5A)。LV-SOCS1-siRNA-DC 若しくは LV-GFP-siRNA-DC の間の表面成熟マーカーには小さな差違しか存在しないため、これらのデータは、増大した DC 成熟が LV-SOCS1-siRNA-DC の機能的効力に寄与する単独の要因でなかったことを示唆する。免疫したマウスでの CD8⁺ T 細胞の機能の状態を、インターフェロン- γ (IFN γ) ELISPOT アッセイを使用してさらに評価した。未熟 LV-SOCS1-siRNA-DC で免疫したマウスは、それぞれ未熟な擬似 DC 若しくは LV-GFP-siRNA-DC を与えたものの 1 および 18 個のスポットと比較して、 2×10^5 の CD8⁺ T 細胞あたり 68 個の IFN γ スポットを有した (図 5B)。これらの結果は、未熟 LV-SOCS1-siRNA-DC を与えたマウスからの脾細胞の卵アルブミン⁺ 標的細胞に対するより強力な細胞傷害性を示す CTL アッセイと一致した (図 5C)。未熟 LV-SOCS1-siRNA-DC での免疫化は、観察可能な強力な抗原特異的 CD4⁺ T ヘルパー応答もまた誘導した。従って、SOCS1 サイレncing は、未熟な抗原提示 DC が、in vivo で抗原特異的 CD8⁺ CTL 応答を刺激することが可能な免疫原性状態を獲得することを可能にした。いずれかの特定の論理により束縛されることを願わないが、SOCS1 をサイレンスした DC は前もっての成熟を伴わずに適応免疫を刺激するため、SOCS1 は DC の免疫寛容誘発状態の維持において調節的役割を演じていると考えられる。

20

30

【0284】

in vivo での成熟 DC の SOCS1 媒介性の調節

以下の実験は、SOCS1 をサイレンスした DC による CTL 応答の予備刺激が、前もっての成熟を伴わずに内因性の環境刺激に反応しての DC の高められた成熟に由来したかどうかを検討するために実施した。卵アルブミンでパルスした LV-SOCS1-siRNA-DC を ex vivo で LPS で 24 時間最初に成熟させ、そしてその後マウスにそれらを投与する前に 3 回洗浄した。LPS で成熟させた LV-SOCS1-siRNA-DC は、成熟させた LV-GFP-siRNA-DC のものに匹敵する成熟表現型を示し、そして、双方の DC は ex vivo 成熟の非存在下で DC より強力に CTL を刺激した。しかしながら、成熟 LV-SOCS1-siRNA-DC は、卵アルブミン四量体染色により示されるとおり、抗原特異的 CTL の誘導において、成熟させた LV-GFP

40

50

- siRNA - DCよりなお明瞭に優れていた(図5A)。IFN - ELISPOTアッセイもまた、LV - SOCS1 - siRNA - DCマウスでの高められた卵アルブミン特異的CD8⁺ T細胞応答を示し(図5B)、SOCS1サイレンシングが、内因性の環境刺激に対する成熟させたDCのより大きな応答性を可能にし、高められたCTL応答に至ることを示唆した。

【0285】

さらなる*in vivo*試験において、1日前に未熟LV - SOCS1 - siRNA - DCで免疫したマウスにLPSを1回注入した。この刺激は、未熟LV - SOCS1 - siRNA - DCマウスでCTL応答を有意に($P < 0.01$)後押しした(CD8⁺ T細胞中で7.87%の卵アルブミン四量体⁺)¹⁰が、しかし未熟DC - GFP - siRNAマウスでより少なく効果的であった(CD8⁺ T細胞中で0.64%の卵アルブミン四量体⁺)¹⁰(図6A)。*in vivo* LPS刺激後の未熟LV - SOCS1 - siRNA - DCマウスでの高められた卵アルブミン特異的CTL応答が、IFN - ELISPOTアッセイにより確認された(図6B)。

【0286】

環境刺激に応答しての成熟させたDCのシグナル伝達がT細胞予備刺激においてある役割を演じているかどうかを試験するため、*ex vivo*で成熟させたLV - SOCS1 - siRNA - DCで1日前に免疫したマウスに、LPSを1回若しくは反復して注入した。LPS注入は、成熟させたLV - SOCS1 - siRNA - DCマウスでのCTL応答を有意に($P < 0.01$)後押しし、T細胞応答を刺激するための成熟させたDCのシグナル伝達の重要性を示した(図6Cおよび6D)²⁰。さらに、LPS注入は、成熟させたLV - SOCS1 - siRNA - DCで免疫したマウスでの卵アルブミン特異的CTL応答を後押しするのにより効果的であった。

【0287】

反復LPS刺激に対するDC - SOCS1 - siRNAの応答性を直接検査するため、*in vitro*で内毒素免疫寛容を発生させるSOCS1 - siRNA - DCおよびGFP - siRNA - DCの能力を評価した。SOCS1 - siRNA - DCは、高レベルの炎症前サイトカインを産生することにより反復LPS刺激になお強く応答したが、しかしGFP - siRNA - DCはせず、SOCS1をサイレンスしたDCが刺激に継続的に応答することを示唆した。加えて、天然の危険分子として機能する熱ショックタンパク質(HSP)のような内因性刺激に対するDC応答性の閾値が、SOCS1サイレンシングにより低下した。³⁰

【0288】

一緒にすれば、これらのデータは、DC中のSOCS1のサイレンシングがDC応答性の閾値を低下させかつ未熟および成熟させた抗原提示DCが内因性刺激に継続的に応答することを可能にして、高められた抗原特異的CTL応答をもたらすことがありそうであることを示す。この機構は、成熟させたDCによる抗原提示の程度、およびこれゆえに適応免疫の大きさの制御におけるSOCS1の決定的な役割を強調する。

SOCS1をサイレンスしたDC免疫化の*in vivo*刺激による増強

サイトカイン若しくはToll様受容体(TLR)アゴニストでの*in vivo*刺激がSOCS1をサイレンスしたDCの効力をさらに高める得かどうかを検討するため、OVAでパルスしたDC - LV - SOCS1 - siRNAで免疫したマウスに、LPS(30 μg/マウス)、CpG(60 μg/マウス)、ポリI:C(50 μg/マウス)、抗CD40(100 μg/マウス)、若しくはIFN - g(1 μg/マウス)を*i.p.*で1日1回3連続日注入した。これらの刺激がDC - LV - SOCS1 - siRNAマウスにより誘導されるCTL応答を優先的に後押ししたことが観察された(図6E)⁴⁰。これらの結果は、多くの刺激が、LPSに加え、SOCS1をサイレンスしたDCの免疫化の効力をさらに高め得ることを示す。

【0289】

DC中のSOCS1サイレンシングによる抗腫瘍免疫の増強

10

20

30

40

50

DC抗原提示におけるSOCS1の観察された調節的役割は、SOCS1をサイレンスしたDCが、より強力な抗原特異的抗腫瘍免疫を誘導して、予め確立された腫瘍増殖の制御に至りうるかどうかの検討を促した。ex vivo成熟の非存在下での卵アルブミンでパルスしたLV-SOCS1-siRNA-DCでの免疫化は、ex vivo成熟の非存在下の卵アルブミンでパルスしたLV-GFP-siRNA-DC若しくは擬似DCを与えたマウスでの腫瘍増殖の穏やかな低下と対照的に、試験した全部のマウスで、予め確立された卵アルブミン⁺EG7腫瘍の増殖を完全に阻害した(図7A)。in vivo抗体ブロッキング実験は、抗CD8抗体ブロッキングが、卵アルブミンでパルスしたLV-SOCS1-siRNA-DCにより誘導された抗腫瘍活性を消失させ(図7B)、抗腫瘍応答におけるCD8⁺CTLの決定的な役割を示したが、しかし抗CD4はしなかつたことを示した。

10

【0290】

SOCS1-siRNAオリゴ二重鎖でトランスフェクトしたDCが高められた抗腫瘍活性を有するかどうかを試験するため、DCをSOCS1-siRNAオリゴ二重鎖若しくは対照オリゴ二重鎖でトランスフェクトした。マウスの群をその後、OVA若しくはTC-1腫瘍ライセートでパルスした、トランスフェクトしたDCで免疫した。パルスしたDCでのマウスの免疫化後に、マウスをLPS(30μg/マウス)でin vivoで3回刺激した。DC免疫の2週後に、免疫したマウスをOVA+EG7腫瘍若しくはTC-1腫瘍で攻撃した。高められた抗腫瘍活性がEG7およびTC-1双方の腫瘍モデルで観察された(図7Cおよび7D)。さらに、IFN-ELISPOTアッセイは、TC-1腫瘍ライセートでパルスしたSOCS1-siRNAオリゴDCで免疫したマウスで、高められた腫瘍特異的CTL応答を示した(図7E)。

20

【0291】

SOCS1をサイレンスしたDCは自己腫瘍関連抗原に対する免疫応答を高め得るかどうかをさらに試験した。これらの実験のため、弱く免疫原性のB16黒色腫細胞中で天然に発現されるネズミのメラノサイト分化抗原、チロシナーゼ関連タンパク質(TRP)2を使用した。C56BL/6マウスにB16腫瘍細胞を接種し、そして3日後、ex vivoでLPSで刺激したTRP2ペプチドでパルスした成熟LV-SOCS1-siRNA-DC若しくはLV-GFP-siRNA-DCで1回処理した。成熟LV-SOCS1-siRNA-DCは、予め確立されたB16腫瘍の増殖を効果的に阻害した一方、成熟LV-GFP-siRNA-DCはいかなる阻害効果も有しなかつた(図8A)。高められた抗腫瘍活性は、IFN-ELISPOTアッセイおよびCTLアッセイにより検出されるとおり、LV-SOCS1-siRNA-DCマウスでの強力なTRP2特異的CTL応答と相関した(図8Bおよび8C)。活発なNK活性は成熟LV-SOCS1-siRNA-DCを与えたマウスでのみ検出された。卵アルブミン⁺のEG7腫瘍での結果と対照的に、未熟なTRP2パルスしたLV-SOCS1-siRNA-DCでの免疫化は、B16腫瘍に対する有意の(P>0.05)阻害効果を生じさせることに失敗し、DCの完全な成熟および成熟後の継続的シグナル伝達が効果的な抗腫瘍免疫を生成させるのに必要とされることを示唆した。外来抗原(卵アルブミン)に対するCTL応答に対するGFP-siRNA形質導入の非特異的刺激効果が一貫して観察された。しかしながら、該非特異的刺激効果は自己抗原(TRP2)に対するCTL応答を高めるのに不十分であった。

30

40

【0292】

LV-SOCS1-siRNA-DCでの免疫化により誘導される可能な有害な自己免疫の病状を検査した。TRP2でパルスした、SOCS1をサイレンスしたDCで免疫したマウスの色素脱失(白斑)が観察された。しかしながら、卵アルブミン若しくはTRP2でパルスしたLV-SOCS1-siRNA-DCで免疫した200以上のマウスで、免疫化後3か月まで、他の明らかな毒性は観察されなかつた。免疫したマウスの主要な器官および組織の組織学的分析は病理学的炎症を示さず、また、免疫組織化学的染色は腎におけるIgG若しくはIgM沈着を示さなかつた。IgG(IgG1、IgG2a

50

）および抗 dsDNA のレベルは LV-SOCS1-siRNA-DC および擬似 DC マウスで比較可能であった。これらのデータは、LV-SOCS1-siRNA-DC 免疫化がマウスで病理学的炎症を引き起こさないことを示唆する。いずれかの特定の論理により束縛されることを願わないが、SOCS1 をサイレンスした DC は、予め確立された弱く免疫原性の腫瘍の増殖を阻害することが可能な、効果的な抗原特異的抗腫瘍免疫を誘導する強く高められた能力を有すると考えられる。

【0293】

SOCS1 のサイレンシングは DC による抗原提示および抗原特異的抗腫瘍免疫を高める。本明細書に提示される結果は、DC の刺激能力および適応免疫の大きさが DC 中で SOCS1 により決定的に調節されることを示す。抗原提示 DC 中の SOCS1 をサイレンシングすることは抗原特異的抗腫瘍免疫を強く高める。SOCS1 は、DC による抗原提示および適応免疫の大きさを質的および量的に制御するための阻害機構を表す。

10

【0294】

本開示は、成熟させた DC による抗原提示の程度の調節における SOCS1 の決定的な役割を示し、これゆえに、適応免疫の大きさおよび持続時間を DC に制御させる調節機構を示す。DC の免疫寛容誘発状態の維持における SOCS1 の重要性は、野性型 CD と対照的に、SOCS1 をサイレンスした DC が、*ex vivo* 成熟の必要の非存在下に *in vivo* で T 細胞応答を刺激する刺激性抗原提示能力を与えられるため、本明細書で例示される。いずれかの特定の論理により束縛されることを願わないが、DC 中の SOCS1 が適応免疫の大きさを制御する正確な機構は、抗原ペプチド提示、共刺激 / 共阻害、ならびにサイトカイン、微生物産物およびおそらくまた細胞と細胞の接触での刺激に応答してのサイトカイン産生に関しての成熟 DC のシグナル伝達および出力の調節を必要とすると考えられる。

20

【0295】

成熟 DC は、一般に、制限された数の研究に基づき寿命が短いと考えられる。しかしながら、信頼できる遺伝子を使用する最近の研究は、成熟抗原提示 DC の寿命が以前に推測されたよりはるかに長く、*in vivo* で 2 週持続し、成熟 DC による抗原提示の程度の調節の必要性および重要性を裏付けることを示している。

【0296】

本発明は、DC 中の決定的な抑制機構を不能にすることにより腫瘍ワクチンの効力を高めるための包括的手段としての DC 中の SOCS1 サイレncing の新規原理に関する。SOCS1 をサイレンスした DC を用いるワクチン接種は、抗原特異的抗腫瘍免疫を強く高める。SOCS1 サイレncing が、抗原を提示する免疫原性 DC が *in vivo* で抗原特異的 T 細胞を持続的に刺激することを可能にするからである。SOCS1 をサイレンスした DC は、DC 成熟、および制御性 T 細胞抑制を阻害する IL-6 のような炎症前サイトカインの産生を高めることにより、制御性 T 細胞のスイッチを切ることが可能である。

30

【0297】

T 細胞上の CTLA-4 の阻害は免疫寛容を効果的に破壊しかつ腫瘍ワクチンの効力を高めるが、しかし、患者において重度の非特異的自己免疫性炎症を引き起こす。抗原提示レベルで DC 中の SOCS1 を標的とすることにより、より抗原特異的な抗腫瘍応答を達成し得る。第一に、腫瘍関連抗原が豊富に負荷されている、SOCS1 をサイレンスした DC での免疫化は、エフェクター CTL への CTLA-4 のターゲティング（生存正常組織に対し自己反応性 T 細胞を不可避免的に活性化するアプローチ）と対照的に、抗原特異的免疫を誘導しうる。第二に、残余の SOCS1 レベルを伴う部分的に SOCS1 をサイレンスした DC の使用は、重度の自己免疫性炎症を引き起こさないかもしれない。ヘテロ接合性の SOCS1^{+/+} マウスは自己免疫性の炎症の兆候を示さないか、若しくは軽度のみ示すからである。加えて、SOCS1^{-/-} マウスで見られる重度の自己免疫性炎症は、DC でのみならず、しかしまた T および NK T 細胞のような免疫細胞の他の系統でも SOCS1 の完全な欠乏を必要とする。本明細書に提示される結果は、抗原提示および

40

50

適応免疫の量的および質的な調節を理解するためのみならず、しかしまたDCの刺激性の潜在能力を高めることによる癌および感染性疾患に対する効果的なワクチンの開発のための洞察も提供する。

【実施例5】

【0298】

マウスSOCS1 siRNA DCにより誘導されるTRP2特異的CTLおよび抗腫瘍活性

本開示は、成熟DC中でSOCS1 siRNAで低下させたSOCS1発現を発現するレンチウイルスベクターが、自己抗原特異的CTL応答の大きさを増大させ得ることを示す。マウスメラノサイト分化抗原、チロシナーゼ関連タンパク質2 (TRP2) を、この研究のモデル自己抗原として使用した。TRP2は、それが正常なメラノサイトおよび弱く免疫原性のB16黒色腫細胞の双方で天然に発現され、かつ、複数のMHCクラスIエピトープがTRP2中で同定されている (van Elsasら、2001、J. Exp. Med. 194: 481-9) ために使用した。

【0299】

本実施例に提示される実験で使用した材料および方法を今や記述する。

マウス/動物モデル

4ないし6週齢の雌性C57BL/6、CD4 KO、CD8 KO若しくはp35 (IL-12) KOマウスをJackson Laboratories (米国メイン州ペンハーバー) から購入し、そして、ベイラー医科大学 (Baylor College of Medicine) (米国テキサス州ヒューストン) の無菌マウス施設で施設のガイドラインに従い維持した。

【0300】

ペプチド

H2-K^b拘束性TRP2a (VYDFFWWL; 配列番号15) およびTRP2b (SVYDFFWWL; 配列番号16) (van Elsasら、2001、J. Exp. Med. 194: 481-9)、ならびに対照H2-K^b拘束性OVA-I (SIINF EKL; 配列番号11) は、Genemed Synthesis Inc. (米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ) により合成かつHPLCにより>95%純度まで精製した。全部のペプチドは、無エンドトキシンPBS (Sigma、ミズーリ州セントルイス) での最終希釈前にDMSOに溶解した。

【0301】

レンチウイルスベクターでのBM由来DCの形質導入

組換えレンチウイルスベクター (LV-SOCS1-siRNAおよびLV-GFP-siRNA) は、本明細書の別の場所に記述されるとおり製造し、滴定し、そしてDCを形質導入するのに使用した。

【0302】

サイトカインELISAおよびエリスロット (ELISPOT) アッセイ

多様な炎症前サイトカインのレベルを、ELISA分析のためのDC培養物の上清 (BD Biosciences、ニュージャージー州リンカーンパーク) を使用し、製造元の説明書に従って、指定された時間点および指定された刺激を伴い、定量した。単離したCD4⁺若しくはCD8⁺ T細胞のELISPOTアッセイは、Huangら、2003、Cancer Res. 63: 7321-9に記述されたとおり実施した。H2-K^b/TRP2クラスIペプチドをマウスCD8⁺ T細胞刺激に使用した。OVAからの無関係なペプチドもまた陰性対照として使用した。CD8⁺ T細胞を、MACS CD8 (Ly-2) MicroBeads (Miltenyi Biotec Inc.、カリフォルニア州オーバーン) を使用することにより脾細胞から単離した。

【0303】

フローサイトメトリー分析

細胞は、0.1% NaN₃ および2% FCSを含有するPBS中でFITC若しくはP

10

20

30

40

50

E m A bで染色した。マウスCD8 (53-6.7)、CD11c (HL3)、CD40 (3/23)、CD80 (16-10A1)、CD86 (GL1)、OX40L (RM134L)若しくはPDL1 (MIH5)に特異的な抗体、およびマッチさせたアイソタイプ対照は、BD Pharmingen (ニュージャージー州フランクリンレイクス)若しくはeBioscience (カリフォルニア州サンディエゴ)から購入した。染色した細胞を、FACSCalibur (Becton Dickinson、ニュージャージー州リンカーンパーク、ニュージャージー州フランクリンレイクス)フローサイトメーターで分析した。

【0304】

四量体染色

H2-K^b/TRP2-PE四量体アッセイを使用して、TRP2特異的マウスCD8+ T細胞を検出した。TRP2-四量体は、ベイラー医科大学 (Baylor College of Medicine)のTetramer Core Facility (米国テキサス州ヒューストン)で合成した。免疫したマウスからの脾細胞を、抗CD8-FITC/抗CD3-PerCPおよびH2-K^b/TRP2-PEで共染色した。四量体染色は、製造元の説明書に従い、10⁶細胞あたり1μgの抗CD8-FitcおよびTRP2-PE四量体の100倍希釈を用いて4で1時間行った。

【0305】

DC免疫化および腫瘍マウス試験

BM由来DC (第4~5日のBM培養物)を、本明細書の別の場所に記述されるとおり、5のMOIのSOCS1-siRNA若しくはGFP-siRNAで形質導入した。簡潔には、DCをペプチドで20時間パルスし、PBSで3回洗浄し、LPS (100ng/ml、Sigma、ミズーリ州セントルイス)若しくはTNF (500ng/ml、R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス)で24時間刺激し、PBSで3回洗浄し、そしてその後、C57BL/6、CD8 KO、CD4 KO若しくはp35 KOマウスに後足蹠を介して注入した。治療モデルにおいては、B16腫瘍細胞 (2.5 × 10⁵)を同系マウスの右脇腹に皮下で (s.c.)注入して腫瘍モデルを確立した。腫瘍接種後3日に、マウスを群に無作為に分割し、そして、30μlのペプチドでパルスし (50μg/ml)形質導入したDC (1.5 × 10⁶)若しくはPBS対照を注入した。若干のマウスでは、LPS (30μg/マウス)若しくは組換えのネズミIL-12タンパク質 (1μg/マウス、Peprotech、ニュージャージー州ロッキーヒル)を、DCワクチン接種後指定された日に腹腔内に (i.p.)投与した。腫瘍体積は、実験が完了するまで2日おきにカリパスで測定した。

【0306】

CTLアッセイ

CD8+ CTL応答を、in vitroで再刺激した脾細胞の標的細胞を溶解する能力を測定する標準的クロム放出アッセイ (Huangら、2003、Cancer Res. 63:7321-9)で評価した。2~3回免疫したマウスからプールした脾細胞を、H2-K^b/TRP2ペプチドを含有するRPMI-1640中でin vitroで4~6日間再刺激した。TRP2+の標的B16細胞 (H2-K^b)および対照EG.7細胞 (ATCC、バージニア州マナサス)を、⁵¹Crクロム酸ナトリウム溶液で37で振とうしながら90分間標識した。多様な数のエフェクター細胞を、一定数の標的細胞 (5 × 10⁴/ウェル)とともに96ウェルU字型底プレート (200μl/ウェル)中37で4時間インキュベートした。三重の培養物からの上清を収集しかつ分析した。溶解パーセントを、(実験放出 - 自発的放出) / (最大放出 - 自発的放出) × 100として計算した。

【0307】

統計学的解析

統計学的解析にはStudentのt検定を使用し、また、95%信頼限界を、p < 0.05と定義される有意であるために採用した。結果は典型的に平均 ± 標準誤差 (SE)

10

20

30

40

50

として提示する。

【0308】

本実施例で提示される実験の結果を今や記述する。

SOCS1により拘束される成熟DC中でのシグナル伝達は、自己抗原特異的CTL応答および免疫寛容の大きさを制御する。

【0309】

C57BL/6マウスを、*ex vivo*でLPSで成熟させた、TRP2ペプチドでパルスし形質導入したDCで免疫した。免疫したマウスをその後、LPSの存在若しくは非存在下で*in vivo*で1若しくは3回刺激し、そしてTRP2特異的CTL応答を、四量体分析を使用して測定した。LPSは、それが誘導する炎症前サイトカインの大きな数(その多くはSOCS1により調節される)ならびにNF- κ B(p65)シグナル伝達の直接調節におけるSOCS1の報告された役割(Ryora, 2003, Mol. Cell. 12:1413-26)のため、*in vivo*刺激に選んだ。*in vivo*でのLPS刺激の非存在下で、全CD8+ T細胞の5.1%が、GFP-siRNA DCで免疫したマウスでのわずか3.1%と比較して、SOCS1-siRNA DCで免疫したマウスでTRP2-四量体について陽性であった(図9A)。1若しくは3回の*in vivo* LPS刺激で、TRP2-四量体について陽性のCD8+ T細胞の比率は、SOCS1-siRNA DCで免疫したマウスで実質的に増大した(それぞれ9.7%および19.4%)が、しかし、GFP-siRNA DCで免疫したマウスでは概して不変であった(それぞれ3.0%および4.0%)(図9A)。一致して、CTLアッセイ(図9C)およびインターフェロン-(IFN) γ ELISPOTが類似の結果を示した。さらに、白斑(外被の白化、色素脱失および/若しくは脱毛)が、LPSと共注入した、TRP2ペプチドでパルスしたSOCS1-siRNA DCで免疫したマウスの大部分で免疫化後3か月に明らかであり(図9B)、宿主メラノサイト中で通常発現されるTRP2に対する自己寛容の破綻を示す。対照的に、白斑は、反復した*in vivo* LPS投与を伴ってさえ、GFP-siRNA DCで免疫したマウスのいずれでも観察されず、自己抗原に対する免疫寛容を維持するためのDCにおけるSOCS1の決定的な役割を示唆した。これらの結果は、成熟抗原提示DCでのシグナル伝達がCTL応答の大きさおよび自己寛容を制御すること、ならびに成熟DCのシグナル伝達がSOCS1により厳密に拘束されることを示す。

10

20

30

【0310】

SOCS1拘束性シグナル伝達は、自己寛容を破壊しかつ効果的な抗腫瘍免疫を誘導するDCの能力を制御する

腫瘍ワクチン接種の主目的は、腫瘍細胞上で優先的に発現される自己抗原に対する強い適応免疫応答を誘導することにより自己寛容を破壊することである。自己抗原特異的CTL応答の大きさおよび自己寛容の調節におけるSOCS1の観察された役割は、効果的な抗腫瘍免疫を誘導する成熟DCの能力がSOCS1発現により制御されるかどうかの検討を促した。これを試験するため、C57BL/6マウスにB16腫瘍細胞を皮下に接種し、そして3日後、LPSで*ex vivo*で成熟させたTRP2でパルスし形質導入したDCで1回免疫した。図10Aは、SOCS1-siRNA DC免疫化単独が、GFP-siRNA DC免疫化と比較してB16腫瘍の増殖を有意に阻害することが可能であった($P < 0.01$)ことを示す。しかしながら、SOCS1-siRNA DCで免疫したマウスの50%が、腫瘍接種30日後に $> 1,500 \text{ mm}^3$ の腫瘍量のため最終的に死亡した。炎症前シグナルを高めることによりSOCS1-siRNA DCで免疫したマウスでマウスの生存が向上され得るかどうかを決定するため、マウスをDC免疫化1日後にLPSで*in vivo*で1回刺激した。免疫化プロトコルへのLPS刺激の追加は、SOCS1-siRNA DCで免疫したマウスでB16腫瘍の増殖を実質的に阻害した(図10B)。これは、LPSで刺激しないマウスと比較して腫瘍量の低下を示さなかった、GFP-siRNA DCおよび擬似形質導入したDC対照と対照的であった(図10Aおよび10Bを比較されたい)。SOCS1-siRNA DC免疫化およびLP

40

50

S 攻撃の組合せはまた、マウス生存を 60 日超の間 100% に劇的に増大させた (図 10 C)。高められた抗腫瘍活性は、SOCS1-siRNA DC で免疫したマウスでの強力な TRP2 特異的 CTL 活性と相関した (図 10 D)。CD4 および CD8 ノックアウト (KO) マウスを SOCS1-siRNA DC で免疫することにより、抗腫瘍活性が CD8+ および CD4+ 双方の細胞を必要とすることがさらに示されたが、とは言え弱い抗腫瘍活性が免疫した CD4 KO マウスで観察された (図 10 b ~ 10 D)。集合的に、これらの結果は、成熟 DC における SOCS1 拘束性のシグナル伝達が、免疫寛容を破壊しかつ効果的な抗腫瘍免疫を誘導するそれらの能力を制御すること、および、通常 SOCS1 により調節される付加的な炎症前シグナルが、予め確立された腫瘍量を制御する誘導された抗腫瘍免疫応答の能力をさらに増大させ得ることを示す。

10

【0311】

自己寛容および抗腫瘍免疫の制御における SOCS1 拘束性シグナル 3 の決定的な役割

SOCS1 が、抗原ペプチド / MHC の提示、共刺激ならびに / 若しくはサイトカインのシグナル伝達および分泌を調節することにより成熟 DC のシグナル伝達および出力に影響することがありそうである。以下の実験は、これら 3 種のシグナル (1 種若しくは複数) のいずれが、自己抗原特異的 CTL 応答および抗腫瘍免疫の制御のために SOCS1 により主に調節されるかを検討するために着手した。

【0312】

SOCS1 サイレンシングが共刺激分子 (シグナル 2) の発現に影響するかどうかを最初に試験した。フローサイトメトリーアッセイにより、LPS で誘導される成熟の前および後双方で、SOCS1-siRNA DC 上に、GFP-siRNA DC 上でのものと比較して、検出不可能な若しくはわずかにのみ高められた表面レベルの共刺激 / 阻害分子 (B7.1、B7.2、OX40L、CD40 若しくは PDL 1) が存在したことが一貫して観察された (図 11 A)。比較可能なレベルの MHC-I および II 分子は、SOCS1-siRNA DC および GFP-siRNA DC 上でもまた検出された。

20

【0313】

抗腫瘍免疫の誘導における CD8+ T 細胞の重要性を考え、MHC-I 拘束性ペプチドの免疫原性 (TCR 親和性) が *in vivo* で SOCS1 拘束性の抗原提示で重要な役割を演じているかどうかをさらに検討した。高親和性の形態 (TRP2 b) および低親和性の形態 (TRP2 a) の TRP2 CTL ペプチドが以前に同定された (van Elslandら、2001、J. Exp. Med. 194: 481-9) ため、双方の TRP2 ペプチドを使用して、シグナル 1 の強度が、形質導入した DC の抗腫瘍免疫応答を誘導する能力に影響し得るかどうかを試験した。図 11 B は、TRP2 b ペプチドを負荷した GFP-siRNA DC はわずかな抗腫瘍活性 (統計学的に有意でない) を示したとは言え、低 (TRP2 a) 若しくは高親和性 (TRP2 b) いずれかのペプチドを負荷した成熟 GFP-siRNA DC は、*in vivo* LPS 刺激で B16 腫瘍退縮を誘導することが不可能であったことを示す。対照的に、低若しくは高いいずれかの親和性の TRP2 ペプチドを負荷した双方の SOCS1-siRNA DC 群が腫瘍増殖を効果的に阻害した。免疫したマウスでの TRP2 特異的 CTL 活性を、IFN ELISPOT アッセイを使用してもまた検討した。図 11 C は、高親和性ペプチドを負荷した GFP-siRNA DC が、低親和性ペプチドを負荷した GFP-siRNA DC が誘導したよりも強い IFN 応答を誘導したことを示す。しかしながら、低若しくは高いいずれかの親和性のペプチドを負荷した双方の SOCS1-siRNA DC 群は、高親和性ペプチドを負荷した GFP-siRNA DC よりはるかに強い IFN 応答を誘導し ($P < 0.01$)、それは観察された抗腫瘍活性と一致する (図 11 B)。加えて、低若しくは高親和性のペプチドを負荷した SOCS1-siRNA DC は同様の IFN 応答を誘導した (図 11 C)。

30

40

【0314】

これらの実験の結果は、SOCS1 サイレンシングが、成熟の存在若しくは非存在下で DC 上の共刺激 / 阻害分子 (シグナル 2) ならびに MHC-I および II 分子の発現に対

50

し有意の影響を有さず；また、高若しくは低いずれかの親和性のTRP2ペプチド（シグナル1）を負荷した成熟DCは、SOC S1がサイレンスされない限り強力なIFN 応答および抗腫瘍免疫の誘導において無効であることを示す。

【実施例6】

【0315】

マウスSOC S1 siRNA DCにより誘導されるCTLおよび抗腫瘍活性のin vivoでのIL-12増強

樹状細胞（DC）による細胞傷害性T細胞（CTL）応答の開始は十分に研究されているとは言え、自己寛容の維持若しくは破綻の調節の機構は乏しく定義されているままである。本実施例において、成熟野性型DCではなく、サイトカインシグナル伝達のサブレッサー（SOC S1）をサイレンスした成熟DCが、とりわけ微生物産物若しくはIL-12でin vivo刺激される場合に自己寛容の破壊において有効であることを示す。本明細書に開示される実験は、抗原提示DCにより提供される、抗原親和性（シグナル1）および共刺激分子のレベル（シグナル2）ではなくSOC S1拘束性のシグナル3（IL-12）が自己寛容を厳密に制御することを示す。さらに、本開示は、SOC S1をサイレンスしたDCが自己抗原に対する強力な免疫応答を誘導して、予め確立されたB16腫瘍の増殖を阻害することを示す。さらに、ヒトのSOC S1をサイレンスしたDCは、溶解性エフェクター機能をもつ自己抗原特異的ヒトCTLを完全に活性化する優れた能力を有し、このSOC S1サイレンシングのアプローチの橋渡しの（translational）な可能性を暗示している。

【0316】

自己抗原特異的CTLの活性化および免疫寛容の制御におけるSOC S1拘束性シグナル3のありそうな重要性は、成熟DC中でSOC S1により調節される重要なサイトカイン（1種若しくは複数）の同定を促した。CTL活性化に影響することが既知の数種の候補炎症前サイトカインの重要性は、最初に、SOC S1サイレンシングとともにDCワクチン接種に多様な遺伝子的にホモ接合性のKOマウス由来のDCを使用することにより試験した。IL-12（p35^{-/-}）KOマウスからのDCを免疫化に使用した場合、TRP2ペプチドを負荷したp35^{-/-} SOC S1-siRNA DCは、B16腫瘍の増殖をほぼ阻害しないことが観察され（図12A～12B）、腫瘍退縮に対するSOC S1拘束性DCの機能におけるIL-12の役割を示唆した。SOC S1拘束性DCの機能におけるIL-12の役割をさらに決定するため、p35^{-/-} SOC S1-siRNA DCにより誘導されるCTL応答を評価した。IFN ELISPOTおよびCTLアッセイを使用して、p35^{-/-} SOC S1-siRNA DCが、野性型SOC S1-siRNA DCと比較して、TRP2特異的CTL応答を誘発する有意に低下された能力を有したことが観察された（図12Cおよび12D）。加えて、LPSでのin vivo刺激は、TRP2-四量体分析により測定されるとおり、p35^{-/-} SOC S1-siRNA DCにより誘導されるCTL応答を後押しするのに失敗した（図9A）。興味深いことに、抗原提示DCにより産生されるIL-12の不可欠な役割と対照的に、野性型SOC S1-siRNA DCで免疫したIL-12（p35^{-/-}）KOマウスは、活発な抗腫瘍免疫およびCTL応答もまた誘導することが観察され、常在宿主細胞により産生されるIL-12が自己抗原特異的CTL応答の誘導に必要とされないことを示した（図12A～12D）。一緒にすれば、これらの結果は、抗原提示DCにより産生されるSOC S1拘束性のIL-12が、強力なTRP2特異的CTL応答およびB16腫瘍根絶を誘導するのに重要であることを示す。

【0317】

wt DCによる一過性かつ低産生に対するSOC S1をサイレンスしたDCによるIL-12およびIL-12に誘導されるサイトカインの持続性かつ高められた産生

DCは、LPSのような微生物産物およびCD40連結に反応して有意の量のIL-12を産生する（Schulzら、2000、Immunity 13:453-62）。DCによるIL-12産生は、成熟の誘導後の短い時間（8～16時間）に厳密に制限さ

10

20

30

40

50

れ (Langenkampら、2000、Nat. Immunol. 1: 311-6)、そしてSOCS1により調節される (Eylessら、2002、J. Biol. Chem. 277: 43735-40)。適応免疫の調節におけるSOCS1拘束性のIL-12の同定された重要な役割を考え、免疫寛容を破壊しかつTRP2に対する効果的な抗腫瘍免疫応答を誘導するSOCS1-siRNA DCの能力に緊密に関係しうるDCによるIL-12産生の強さおよび持続時間に対するSOCS1サイレンシングの影響を検査した。

【0318】

図13Aは、有意に増大されたレベルのIL-12 (p70) が、GFP-siRNA DCおよび擬似形質導入したDCと比較して、LPSおよび抗CD40 mAbでの連続刺激に应答してSOCS1-siRNA DCにより72時間にわたり産生されたことを示す。元の刺激の除去にもかかわらずIL-12レベルを維持するSOCS1-siRNA DCの能力を、その後、それらをLPS/抗CD40で24時間刺激すること、およびその後、LPSを含有しなかった新鮮培地中でDCを新たな培養プレートに移すことにより検査した。図13Bは、GFP-siRNA DCおよび擬似形質導入したDCが刺激に際して一過性にのみIL-12を産生した一方、SOCS1-siRNA DCは刺激の除去にもかかわらず有意により高レベルのIL-12を持続的に産生したことを示す。いずれかの特定の論理により束縛されることを願わないが、LPS/抗CD40の除去後のSOCS1-siRNA DCによるIL-12の持続性かつ高められた産生は、元の刺激および/またはおそらくIL-12若しくは他のDCに分泌される炎症前サイトカインによるオートクリン/パラクリン刺激により誘導されるシグナル伝達経路の持続的活性化によるとみられる。これらの結果は、SOCS1サイレンシングが、DCが刺激に应答して持続的かつ増大したレベルのIL-12を産生することを可能にすることを示し、それは、免疫寛容を破壊しかつ予め確立された腫瘍を根絶するSOCS1をサイレンスしたDCの能力の責任を負うとみられる。

【0319】

SOCS1は、IL-12および他のサイトカインのシグナル伝達を媒介するJak/Stat経路の決定的な調節物質である (Kuboら、2003、Nat. Immunol. 4: 1169-76; Alexanderら、2004、Annu. Rev. Immunol. 22: 503-29) ため、次の一組の実験は、DCでのSOCS1サイレンシングが、それら自身とおそらく他の近隣のDCの間のサイトカインフィードバックループの発生によりサイトカイン産生を増大させるのかどうかを試験するために着手した。これを取り扱うため、SOCS1-siRNA DCによる腫瘍壊死因子 (TNF) およびIL-6の産生を測定した。(TNF) およびIL-6は、これらのサイトカインがIL-12刺激により誘導されることが既知であるために試験した (Trinchieriら、2003、Nat. Rev. Immunol. 3: 133-46)。

【0320】

図13Cは、SOCS1-siRNA DCが、低レベルのTNF およびIL-6を一過性にのみ産生したGFP-siRNA DCおよび擬似形質導入したDCと対照的に、元の刺激の除去後により高レベルのTNF およびIL-6を持続的に産生したことを示す。フィードバックループの発生のためのIL-12の重要性をさらに決定するため、p35^{-/-} SOCS1-siRNA DCおよびwt SOCS1-siRNA DCによるTNF およびIL-6産生を比較した。図13Dは、p35^{-/-} SOCS1-siRNA DCが増大されかつ持続的な量のTNF およびIL-6を産生することがもはや可能でなかったことを示し、IL-12のフィードバックがSOCS1-siRNA DCによるTNF およびIL-6産生の重要な誘導因子であることを示す。これらのデータは、SOCS1サイレンシングが、DC中の決定的なシグナル伝達の抑制機構を無効にし、従って、それらがIL-12のみならず、しかしまた高められたフィードバックループを介してIL-12に誘導される炎症前サイトカインに連続的に应答しかつそれらを産生することを可能にすることを示す。本明細書に開示される結果は、白斑、お

10

20

30

40

50

よび B 1 6 腫瘍細胞に対する効果的な抗腫瘍免疫の双方を誘導する T R P 2 を負荷した S O C S 1 - s i R N A D C の能力を説明するありそうな機構を提供する。

【 0 3 2 1 】

自己寛容を破壊する D C の能力を制御するための S O C S 1 拘束性 I L - 1 2 シグナル伝達の重要性

自己腫瘍関連抗原に対する強力な C T L 応答を誘導する S O C S 1 - s i R N A D C の能力は、S O C S 1 シグナル伝達戦略の治療的応用を示唆する。患者での刺激としての L P S の臨床使用は毒性でありすぎるため、そのシグナル伝達が S O C S 1 により調節される I L - 1 2 が S O C S 1 - s i R N A D C の効力の増強においてもまた有効であるかどうかを評価した。

10

【 0 3 2 2 】

C 5 7 B L / 6 マウスに B 1 6 腫瘍細胞を接種し、そして 3 日後、組換えマウス T N F で *ex vivo* で成熟させた、T R P 2 でパルスし形質導入した D C でマウスを 1 回免疫した。D C 免疫化後に、レシピエントマウスを低用量の組換えマウス I L - 1 2 (1 μ g / マウス) で 3 回 *in vivo* 刺激した。図 1 4 A は、S O C S 1 - s i R N A D C で免疫したマウスでの B 1 6 腫瘍の増殖が効率的に阻害されたことを示す。対照的に、I L - 1 2 を用いる *in vivo* 投与での G F P - s i R N A D C 免疫化は、P B S 対照と比較して、腫瘍増殖に対する影響をほとんど有しなかった。抗腫瘍活性は、I F N E L I S P O T アッセイにより示されるとおり、S O C S 1 - s i R N A D C で免疫したマウスでの増大した T R P 2 特異的 C T L 活性と相関した (図 1 4 B)。以前の観察結果 (図 1 0 A) と一致して、*in vivo* I L - 1 2 刺激の非存在下での T P R 2 でパルスし T N F で成熟させた S O C S 1 - s i R N A D C での免疫化は、G F P - s i R N A D C 対照と比較して増大した抗腫瘍活性もまた示した。

20

【 0 3 2 3 】

これらの結果は、I L - 1 2 の *in vivo* 投与が、ありそうには I L - 1 2 および I L - 1 2 に誘導されるサイトカインの高められたシグナル伝達により、S O C S 1 をサイレンスした D C の免疫刺激能力を有意に高めるが、しかし野性型 D C はしないことを示す。これらの結果は、I L - 1 2 のようなサイトカインの全身濃度でなく、抗原提示 D C 中の S O C S 1 拘束性のサイトカインシグナル伝達が、自己腫瘍関連抗原に対する効果的な抗腫瘍免疫を誘導するために重要であることをさらに暗示する。

30

【 0 3 2 4 】

白斑以外の明らかな毒性は、免疫化 6 か月後まで、L P S 若しくは I L - 1 2 いずれかと共注入した、T R P 2 でパルスした S O C S 1 - s i R N A D C マウスで観察されなかった。免疫したマウスの全部の主要な器官および組織の組織学的分析は、病理学的炎症を示さなかった。I g G および抗 d s D N A のレベルは、S O C S 1 - s i R N A - D C および擬似 D C マウス中で比較可能であった。これらのデータは、T R P 2 でパルスした S O C S 1 - s i R N A - D C 免疫化がマウスで病理学的炎症を引き起こさないことを示唆する。

【 0 3 2 5 】

S O C S 1 拘束性のシグナル 3 の強さは C T L の活性化、免疫寛容および抗腫瘍免疫を制御する。

40

本明細書に開示される結果は、腫瘍ワクチンの開発のための意義深い意味を有するはずである、成熟 D C による C T L 応答の調節への新たな洞察を提供する。成熟は未熟な免疫寛容誘発状態から、成熟した免疫原性状態への D C の移行の制御点であることが既知である (B a n c h e r e a u ら、1 9 9 8、N a t u r e 3 9 2 : 2 4 5 - 5 2 ; S t e i n m a n ら、2 0 0 3、A n n u . R e v . I m m u n o l . 2 1 : 6 8 5 - 7 1 1)。抗原提示 D C と T 細胞の間の最初の接触 (シグナル 1 および 2) の強さが C T L 応答の大きさおよび運命を決定すると考えられている。成熟 D C は、制限された数の研究 (P o r g a d o r ら、1 9 9 8、J o u r n a l o f E x p e r i m e n t a l M e d i c i n e 1 8 8 : 1 0 7 5 - 8 2 ; I n g u l l i ら、1 9 9 7、J . E x p . M e

50

d. 185 : 2133 - 41 ; Ruedlら、2000、J. Immunol. 165 : 4910 - 6) に基づけば短命であると考えられるためである。しかしながら、信頼できる遺伝子の方法を使用するより最近の研究は、成熟抗原提示DCの寿命が以前に推定されたよりはるかに長く、in vivoで2週持続することを示し(Gargら、2003、Nat. Immunol. 4 : 907 - 12)、T細胞での初期活性化(engagement)後の成熟DCの可能な調節性の役割を示唆した。

【0326】

本結果は、SOCS1によりしっかりと拘束される成熟DC中での炎症前シグナル伝達が自己抗原特異的CTL応答の大きさを決定的に制御することを示す。これは、CTL応答が少なくとも2つのレベル、すなわちCTL応答の開始に必要とされるDC成熟、ならびに、その大きさがSOCS1発現により調節される、成熟させたDCのそれら自身およびCTLとの進行中のサイトカインシグナル伝達でDCにより制御されることを示す。本結果は、さらに、DCおよび多様な免疫細胞のそれらの周囲の環境と、サイトカインおよび微生物産物の組成/濃度の間の動的な相互作用をさらに暗示し、この相互作用は、自己寛容の維持若しくは破綻、および従って自己抗原特異的CTL応答の運命を集合的に決定する。

10

【0327】

本明細書に開示される結果は、自己寛容の維持若しくは破綻の新規調節機構を示す。DCにより提供される、ペプチド親和性および共刺激分子のレベルではなく、SOCS1拘束性のシグナル3(IL-12)が、自己寛容を決定的に制御することが見出された。T細胞のDC媒介性の活性化若しくは過剰活性化に対するサイトカインの重要性は、自己免疫疾患(Bancheureauら、2004、Immunity 20 : 539 - 50) および他のモデル(Curtsingerら、2003、J. Exp. Med. 197 : 1141 - 51 ; Valenzuelaら、2002、J. Immunol. 169 : 6842 - 9) の多数の研究で暗示されている。

20

【0328】

wt DCによるIL-12のようなサイトカインの産生は一過性であり、そして本明細書および他者の研究(Langenkampら、2000、Nat. Immunol. 1 : 311 - 6) が示すとおり、刺激に際してSOCS1により阻害される。wt DCと対照的に、SOCS1をサイレンスしたDCが、DC中のJak/Statシグナル伝達経路の誘導可能なフィードバック阻害物質を無効にした後にこの経路により複雑なオートクリン(およびおそらく同様にパラクリン) シグナル伝達ループを形成することにより、初期刺激に応答して有意に高められたIL-12およびIL-12に誘導されるサイトカインレベルを連続的に生じさせ得ることが観察された。一致して、低用量のIL-12を用いるin vivo投与は、wt DCではなくSOCS1をサイレンスしたDCの自己寛容を破壊する能力を効果的に高めることが見出された。

30

【0329】

集合的に、これらの結果は、SOCS1をサイレンスしたDCにより産生されるIL-12およびIL-12に誘導されるサイトカインの連続的かつ高められた産生およびシグナル伝達が、自己寛容の破壊および高められた抗腫瘍CTL応答において重要な役割を演じていることがありそうであることを示す。本結果は、DC中でのSOCS1による刺激性シグナル伝達の細胞内阻害が自己寛容の維持に寄与することをさらに示唆する。SOCS1は、そのSOCSボックス領域によりユビキチン媒介性のタンパク質分解にp65タンパク質の標的を定めることによりNF- κ Bシグナル伝達を直接阻害することが見出された(Ryoら、2003、Mol. Cell. 12 : 1413 - 26) とは言え、Gingrasらは、SOCS1が、タイプI IFNのシグナル伝達を阻害することにより、LPS誘発性の毒性についてマクロファージでのTLRシグナル伝達を間接的に調節することを報告した(Gingrasら、2004、J. Biol. Chem. 279 : 54702 - 7)。タイプI IFNシグナル伝達によるLPS誘発性の毒性と異なり、本明細書の結果は、SOCS1をサイレンスしたDCにより誘導されるCTL応答がIL-

40

50

12により主に媒介されることを示す。本明細書の結果はまた、LPSに応答してのSOCS1をサイレンスしたDCによるTNF- α 、IL-6およびIL-12のような多様なサイトカインの高められた産生も示す。

【0330】

本研究は、自己腫瘍関連抗原に対する効果的な抗腫瘍免疫を誘導するためにDC中のSOCS1をサイレンシングする必要性を示す。DCワクチンは、近年1,000例超の患者が関与した98の公表されたDCワクチンの臨床試験で明示されたとおり(Rosenbergら、2004、Nat. Med. 10:909-15)、腫瘍ワクチン接種のための最も有望な戦略の1つと見られている。主として多様なアプローチによるDCの抗原提示および成熟を促進することを目的としたこれらの試みは、非常に低い客観的臨床奏功率を伴う、大きく失望させるものである(Rosenbergら、2004、Nat. Med. 10:909-15)。本明細書のデータは、高親和性ペプチドを負荷したwt DCが、LPS若しくはIL-12でのin vivo刺激後でもなお自己寛容を破壊することがなお不可能であったことを示す。本明細書の結果は、従って、現在記述されている腫瘍ワクチンの全般的無効性(Rosenbergら、2004、Nat. Med. 10:909-15)を説明するとみられ、また、DCの抗原提示および成熟を促進する現在の戦略とともにSOCS1のような決定的なシグナル伝達阻害物質をサイレンシングすることを介して、より効果的な腫瘍ワクチンを開発するための新たな途を提供しうる(Gilboa、2004、Nat. Rev. Cancer 4:401-11; Youら、2000、J. Immunol. 165:4581-4592; Soifferら、2003、J. Clin. Oncol. 21:3343-50; Pardoll、2002、Nat. Rev. Immunol. 2:227-38)。

【0331】

抗原負荷DCにより誘導される抗原特異的免疫応答を特異的に高める能力を伴う、本SOCS1サイレンシングのアプローチは、生存組織および器官に対するものを包含する自己反応性T細胞を無差別的に過剰活性化するエフェクターT細胞上のCTL4を系統的に阻害するというアプローチ(Hodiら、2003、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100:4712-7; Phanら、2003、Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 100:8372-7)より魅力的でもまたありうる。要約すれば、腫瘍ワクチンを高めるための集中的な努力が抗原親和性/用量および共刺激の改良を焦点としてきたことを考えれば、本研究で見出されたSOCS1をサイレンスしたDCの自己寛容および高められた免疫刺激能力を調節するための新たな機構は、腫瘍に対する自己寛容の拘束を破壊するための一般に許容できる新規ワクチン接種戦略を提供するはずである。

【実施例7】

【0332】

マウスSOCS1 siRNA DCにより誘導されるHIV特異的抗体およびCTL応答

本実施例は、宿主の天然の免疫阻害物質を阻害することにより抗HIV免疫応答を誘導するための代替の一戦略を示す。本研究は、DC中のJAK/STAT経路の負の調節物質SOCS1が、HIV特異的な細胞傷害性Tリンパ球(CTL)のみならずしかした抗体の応答も制御することを示す。SOCS1をサイレンスしたDCはHIVエンベロープ媒介性の抑制に対し抵抗性であり、かつ、均衡の取れたメモリーHIVエンベロープ特異的抗体およびCTL応答をマウスで効果的に誘導する。本開示は、宿主の免疫阻害物質を阻害することによりHIV特異的抗体およびCTL応答を導き出すための最初の試みを表す。

【0333】

本実施例に提示される実験で使用する材料および方法を今や記述する。

レンチウイルスベクターでのBM由来DCの形質導入

組換えレンチウイルスベクター、LV-SOCS1-siRNAおよびLV-GFP-

s i R N A は、本明細書の別の場所に記述されるとおり製造し、滴定し、そしてDCを形質導入するのに使用した。

【0334】

サイトカインおよび抗体のELISAアッセイ

細胞培養物上清中のサイトカインレベルは、製造元の説明書に従ってELISA分析(BD Biosciences、ニュージャージー州リンカーンパーク)により定量した。gp120特異的抗体およびサブクラスの力価を決定するため、gp120タンパク質(炭酸緩衝液[pH9.6]中5 μ g/ml)を4で一夜被覆し、ウェルにPBS-5%FBS中の血清の12倍連続希釈を室温で1時間添加した。8回の洗浄後に、ビオチニル化抗マウス抗体(抗マウスIgM、IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b若しくはIgG3)をウェルに室温で1時間添加した。ストレプトアビジン-HRPをペルオキシダーゼ基質として使用した。反応を50 μ lの2M H₂SO₄の添加により停止した。光学密度をBio Assay Reader上で450nmで読み取った。結果は、y軸上の光学密度(OD)値およびx軸上の希釈-1(dilution-1)を伴う散乱プロットから決定される終点力価の逆数(reciprocal endpoint titer)として表し、x軸の目盛りは対数であった。データをプロットした後に、対数曲線の当てはめを各個々の一連の希釈に適用し、そして曲線の当てはめが正負のカットオフ値と交差する点を決定した。該カットオフ値は、対照マウス血清からの全希釈の平均(+3SD)として各抗体アイソタイプについて計算した。各実験で試験した全サンプルは同時にアッセイした。

10

20

【0335】

T細胞エリスポット(ELISPOT)アッセイ

単離したCD4+若しくはCD8+ T細胞のELISPOTアッセイは、本明細書の別の場所に記述されるとおり実施した。

【0336】

B細胞単離およびgp120抗体産生B細胞のELISPOTアッセイ

完全RPMI 1640培地中の脾から調製した単細胞懸濁液を、プラスチック皿上で5%CO₂中37で1時間プレATINGして接着性マクロファージを除去した。非接着細胞を抗Thy1.2およびウサギ補体で37で45分間処理してT細胞を溶解した。残存するB細胞の純度は通常90%を超えた。B細胞ELISPOTアッセイは、以前に記述された変法(Le Bonら、2001、Immunity 14:461-7023)により実施した。簡潔には、96ウェルのニトロセルロース製プレート(Millipore Multiscreen PI)をPBS中gp120で一夜被覆した。プレートをPBSで6回洗浄し、そして10%FBSを含有するRPMI 1640で37で2時間ブロッキングした。単離したB細胞をウェルに接種し(5 \times 10⁵細胞/ウェル)、そして5%CO₂中37で20時間インキュベートした。細胞をその後、PBS 0.5%Tween 20(Sigma、ミズーリ州セントルイス)での6回の洗浄により除去した。0.5%FBSを含有するPBSで1 μ g/mlに希釈したビオチニル化抗マウスIgG(BD Pharmgen)を添加し、そして混合物を37で2時間インキュベートした。アビジン:ビオチニル化酵素複合体(ABC、Vector Laboratories, Inc. カリフォルニア州バーリングゲーム)を追加の1時間添加した。抗gp120 IgGを、AEC(3-アミノ-9-エチルカルバゾール; Sigma、ミズーリ州セントルイス)との4分の反応後に検出した。結果は、KS ELISPOT 4.3ソフトウェアを使用して、自動化ELISPOT読み取り装置(Carl Zeiss, Inc. ニューヨーク州ソーンウッド)を用い、ZellNet Consulting Inc. (ニューヨーク州ニューヨーク)により評価された。

30

40

【0337】

BAFFおよびAPRILの定量的RT-PCR分析

トランスフェクトしたマウスBM-DC中のSOCS1の相対的発現を定量的リアルタイムPCRにより評価した。全RNAを、Trizol試薬(Invitrogen、カ

50

リフォルニア州カールズバッド)を使用してDCから抽出し、そして各サンプルについて1.0 μgの全RNAを、ランダムヘキサマープライマーおよびSuperScript第一鎖合成キット(Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)を用いて逆転写した。リアルタイム5'-ヌクレアーゼ蛍光発生PCR分析を、鑄型として反応あたり5 ngの出発RNA原料の同等物を用いる20 μlの四重の反応で、ABI 7900 HT配列検出装置(Applied Biosystems, Inc., カリフォルニア州フォスターシティ)で実施した。以下のプライマーをBAFFおよびAPRILに使用した: BAFF、センス5'-TGCTATGGGTCATGTCATCCA-3' (配列番号17)およびアンチセンス5'-GGCAGTGT TTTGGGCATATTC-3' (配列番号18); APRIL、センス5'-TCACAATGGGTCAGGTGGTATC-3' (配列番号19)およびアンチセンス5'-TGTA AATGAAA GACACCTGC ACTGT-3' (配列番号20)。18SのTaqManプロープ、フォワードおよびリバースプライマーはTaqmanげっ歯類18S対照試薬(Applied Biosystems, Inc., カリフォルニア州フォスターシティ)から得た。PCRパラメータは、TaqManユニバーサルPCRマスターミックスキット(Applied Biosystems, Inc., カリフォルニア州フォスターシティ)について推奨されたものであり、BAFF、APRILおよび18Sの反応は個別のチューブで実施した。BAFFおよびAPRILレベルを18S rRNAに対して正規化した一方、BAFF若しくはAPRIL発現(擬似トランスフェクトし刺激したDCの対照値に関して)はComparative Ct法(Livakら、2001、Methods 25: 402-8)により計算した。

【0338】

CTLアッセイ

CD8+ CTL応答は、標的細胞を溶解するin vitroで再刺激した脾細胞の能力を測定する、本明細書の別の場所に記述されることの標準的クロム放出アッセイで評価した。免疫したマウスからプールした脾細胞を、gp120タンパク質(20 μg/ml)を含有するRPMI-1640中、in vitroで4~6日間再刺激した。20 μg/mlのgp120タンパク質で一夜パルスした標的細胞を、⁵¹Crクロム酸ナトリウム溶液で90分間標識した。異なる数のエフェクター細胞を、96ウェルV字型底プレート(200 μl/ウェル)中で一定数の標的細胞(1 × 10⁴/ウェル)とともに37 °Cで3時間インキュベートした。三重の培養物からの上清(100 μl)を収集した。細胞溶解パーセントを、(実験放出 - 自発的放出) / (最大放出 - 自発的放出) × 100として計算した。

【0339】

TおよびB細胞増殖アッセイ

本明細書の別の場所に記述されるとおり単離したCD4+若しくはCD8+ T細胞(ウェルあたり1 × 10⁶)およびB細胞(ウェルあたり1 × 10⁵)を、96ウェルプレートの三重のウェルで完全培地中で多様な刺激の存在若しくは非存在下に培養した。培養第4日に、ウェルを1 μCiの[³H]-チミジンで16時間パルスした。プレートをその後収集し、そして、取り込まれた[³H]-チミジンをMicroBetaシンチレーションカウンター(TopCount NXT, Packard)を使用して測定した。

【0340】

DC免疫化

骨髄由来DC(第5日のBM培養物)を、本明細書の別の場所に記述されるとおり、5のMOIのLV-SOCS1-siRNA若しくはLV-GFP-siRNAで形質導入した。

【0341】

本実施例で提示される実験の結果を今や記述する。

DC中のSOCS1サイレンシングはHIV Env特異的抗体応答を高める

抗HIV抗体応答を誘導するDCの能力に対するSOCS1サイレンシングの影響を最

10

20

30

40

50

初に検討した。HIV Envは細胞性および中和抗体双方の応答を誘導し得るため、この試験でそれを使用した。トランスフェクトした細胞中で約90%のSOCS1 mRNAを下方制御する能力をもつSOCS1 siRNAを発現する組換えレンチウイルスベクター(LV-SOCS1-siRNA)および対照ベクター(LV-GFP-siRNA)を、本明細書の別の場所に記述されるとおり生成させた。マウス骨髄(BM)由来DCを、LV-SOCS1-siRNA若しくはLV-GFP-siRNAで形質導入し、組換えHIV gp120タンパク質を負荷し、そしてex vivoでLPSで成熟させた。マウスの群をその後、形質導入したDCで1週間隔で2回免疫し、次いで各DC免疫化後にin vivoでLPS刺激した。in vivo刺激は、それが、本明細書の別の場所で開示されるとおり、SOCS1をサイレンスしたDCにより誘導される腫瘍関連抗原に対するCTL応答をさらに高め得るといふ観察結果に基づいて使用した。図15Aは、LV-SOCS1-siRNA-DCが、対照のLV-GFP-siRNA-DCが導き出したよりも有意により確実なgp120特異的IgMおよびIgG応答を導き出したことを示す。

10

20

30

40

50

【0342】

そのプロファイルが独特な免疫学的状態を表す多様な抗体サブクラスの産生は、CD4+ Tヘルパー(Th)1およびTh2分極性サイトカインならびにTh細胞機能に依存する(Allenら、1997、Immunol. Today 18:387-92)。図15Bは、LV-GFP-siRNA-DCマウスの対応するサブクラスに比較して、LV-SOCS1-siRNA-DCで免疫したマウスでの全部のIgGサブクラスのHIV Env特異的抗体力価の劇的な増大を示す。Env特異的抗体サブクラスのプロファイルは、Th2応答の産物IgG1、およびTh1応答と関連するサブクラスIgG2aの混合した応答を示し、Th1およびTh2に依存する免疫応答の双方がLV-SOCS1-siRNA-DCにより誘導されたことを示した。類似の結果が反復実験で得られた。中和アッセイは、マウスがHIV中和活性の信頼できる試験に適切な種でない(Burtonら、2004、Nat. Immunol. 5:233-6)ため、実施しなかった。SOCS1サイレンシングが、他の株のHIV Envタンパク質および卵アルブミン(OVA)のような抗原に対する抗体応答を高めたことがさらに観察された。これらの結果は、全IgGサブクラスを包含するHIV Env特異的抗体応答がDC中のSOCS1のサイレンシングにより劇的に高められ、抗原特異的抗体応答の制御におけるDC中のSOCS1の決定的な役割を暗示することを示す。

【0343】

DC中のSOCS1のサイレンシングはHIV gp120特異的CTL応答を高める
以下の実験は、SOCS1サイレンシングがHIV Env特異的CTL応答を高め得るかどうかを評価するために実施した。IFN ELISPOT、細胞内サイトカイン染色およびCTLアッセイを使用して、免疫したマウスでのCD8+ T細胞の機能の状態を試験した。LV-SOCS1-siRNA-DCマウスでのgp120でパルスした標的細胞に対するCTL活性は、LV-GFP-siRNA-DCマウスでのものより有意により強力であった($P < 0.01$) (図15C)。これらのアッセイで検出されたCTL活性はgp120特異的であった。LV-SOCS1-siRNA-DCマウスからの脾細胞は、gp120でパルスしていない標的細胞に対するいかなる明らかなCTL活性も欠いていたからである。一致して、LV-SOCS1-siRNA-DCで免疫したマウスで、それぞれ、LV-GFP-siRNA-DCマウスでの191個のスポットと比較して、 5×10^5 のCD8+ T細胞あたり363個のIFN+のスポットが検出された(図15D)。IFN+での脾細胞の細胞内染色も、LV-SOCS1-siRNA-DCマウスでのIFN+ T細胞のより高い比率を示した。一緒にすれば、これらの結果はSOCS1をサイレンスしたDCで免疫したマウスでのHIV Envに対する均衡がとれかつ高められた抗体およびCTL応答を示し、DC中のSOCS1が体液性および細胞性双方の免疫を決定的に調節していることを示唆する。

【0344】

S O C S 1 をサイレンスした D C により誘導される混合した高められた T h 1 および T h 2 応答

いずれかの特定の論理により束縛されることを願わないが、T h 1 対 T h 2 応答のプログラミングにおけるサイトカインの役割 (M a c D o n a l d ら、2002、J . I m m u n o l . 168 : 3127 - 30 ; G o r ら、2003、N a t . I m m u n o l . 4 : 503 - 5) を考えれば、S O C S 1 サイレンシングが D C によるサイトカインの産生を調節することにより C T L および抗体応答に影響を及ぼしうることが考えられる。図 16 A は、L P S での刺激後の G F P - s i R N A - D C と比較した L V - S O C S 1 - s i R N A - D C により産生される T h 1 に分極した応答を促進する I L - 12、I F N - および T N F のレベルの有意の増大を示す。興味深いことに、T h 2 に分極した応答を促進する I L - 4、I L - 6 および I L - 10 の有意の増大もまた、S O C S 1 をサイレンスした D C で見られた (P < 0 . 01)。S O C S 1 をサイレンスした D C により産生される T h 1 および T h 2 を促進するサイトカイン双方のより高いレベルは、H I V E n v 特異的 C T L および抗体応答の双方を誘導する、S O C S 1 をサイレンスした D C の高められた能力を説明しうる。

10

【0345】

本結果に基づけば、D C 中の S O C S 1 サイレンシングは抗体および C T L 応答を明瞭に促進した。以下の実験は、抗体および C T L 応答の誘導に緊密に関与する H I V E n v 特異的 C D 4 + T h 応答もまた S O C S 1 サイレンシングにより高められるかどうかを扱う。C D 4 + T 細胞を、免疫したマウスから C D 4 + マイクロビーズを使用して単離し、そして多様なアッセイを使用して分析した。図 16 B に描かれるとおり、g p 120 特異的 C D 4 + T 細胞の頻度は、L V - G F P - s i R N A - D C マウスでよりも L V - S O C S 1 - s i R N A - D C マウスで有意により高かった。³H - チミジン取り込みアッセイは、L V - S O C S 1 - s i R N A - D C マウスからの C D 4 + T 細胞が、g p 120 でパルスした D C での刺激に応答して、L V - G F P - s i R N A - D C マウスからのものよりも活発に増殖したことを示した (図 16 C)。g p 120 でパルスした D C での刺激後に L V - S O C S 1 - s i R N A - D C マウスから単離した C D 4 + T 細胞により産生されたサイトカインプロファイルの分析は、T h 1 分極性 (I F N - 、 I L - 2 および T N F) ならびに T h 2 分極性 (I L - 4 および I L - 10) 双方のサイトカインの増大されたレベルを示した (図 16 D)。これらの結果は、S O C S 1 をサイレンスした D C が、H I V E n v に対する高められた混合した T h 1 および T h 2 応答を誘導することを示し、それは図 15 B の混合した g p 120 特異的 I g G サブクラスのプロファイルと矛盾しない。

20

30

【0346】

S O C S 1 をサイレンスした D C による高められた g p 120 特異的 B 細胞活性化

D C は、T N F スーパーファミリーのメンバー、A P R I L (増殖誘導性リガンド) および B A F F (B リンパ球刺激物質、B L y S としてもまた知られる) を産生することにより B 細胞の増殖、成熟およびクラススイッチ組換えを直接誘発することが示されている (B a l a z s ら、2002、I m m u n i t y 17 : 341 - 52 ; L i t i n s k i y ら、2002、N a t . I m m u n o l . 3 : 822 - 9 ; M a c L e n n a n ら、2002、I m m u n i t y 17 : 235 - 8)。従って、リアルタイム R T - P C R を使用する D C による A P R I L および B A F F の産生に対する S O C S 1 サイレンシングの影響を評価した。L V - S O C S 1 - s i R N A - D C は、S O C S 1 - / - D C 中の B A F F および A P R I L の増大された発現 (H a n a d a ら、2003、I m m u n i t y 19 : 437 - 50) と一致して、L V - G F P - s i R N A - D C が発現したよりも高レベルの A P R I L および B A F F m R N A を、L P S 刺激に際して発現した。

40

【0347】

g p 120 特異的 B 細胞の活性化を高める S O C S 1 をサイレンスした D C の能力を試験するため、抗 g p 120 I g G 特異的 B 細胞 E l i s p o t アッセイを使用して、免

50

疫したマウスでの抗 gp 120 I g G 産生 B 細胞の頻度を直接検査した。抗 gp 120 I g G 産生 B 細胞の頻度は、LV - GFP - siRNA - DC マウスでより LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスで有意により高かった ($P < 0.01$) (図 17 B)。LV - GFP - siRNA - DC マウスからの B 細胞と比較してより高い比率の B 細胞が、LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスで高レベルの CD 69、CD 40 および CD 86 を特徴とする活性化表現型を表した。加えて、免疫したマウスの脾からの B 細胞を精製しかつ多様な刺激で刺激した。図 17 C は、LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスからの B 細胞が、抗 CD 40 および IL - 4 で共刺激した場合に、LV - GFP - siRNA - DC マウスからの B 細胞が増殖したよりも活発に増殖したことを示す。興味深いことに、LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスからの B 細胞は IL - 4 若しくは抗 CD 40 のみに強く応答したがしかし LV - GFP - siRNA - DC マウスからのものはせず、増大した数の B 細胞が LV - SOCS 1 - siRNA - DC での免疫化により *in vivo* ですでに活性化されたことを示唆した。LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスからの B 細胞が、多様な刺激に応答して、より高レベルの IL - 6、IL - 2 および TNF - α を包含する多様なサイトカインを産生したこともまた観察された (図 17 D)。集合的に、これらの結果は、SOCS 1 をサイレンスした DC が高められたレベルの B リンパ球刺激物質 (BAFF および APRIL) ならびに Th 2 分極性サイトカインを産生し、HIV Env 特異的 B 細胞および Th 細胞のより効果的な活性化に至ることを示唆する。

【0348】

SOCS 1 をサイレンスした DC により誘導される長期の HIV Env 特異的 CTL および抗体応答

DC 中の SOCS 1 サイレンシングが一次 HIV Env 特異的 CTL および抗体応答を高めることを示したため、SOCS 1 をサイレンスした DC がメモリー HIV 特異的 CTL および抗体応答を誘導しうるかどうかをさらに評価した。図 18 A は、LV - GFP - siRNA - DC で免疫したマウスが、免疫化後 6 か月に非常に低レベルの gp 120 特異的抗体を有した一方、LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスはそれらの血清中の gp 120 特異的 I g G 1 および I g G 2 抗体の有意の力価をなお保持したことを示す。追加免疫後 1 週に、LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスは、 2×10^5 の抗 gp 120 I g G 1 および 1×10^5 の抗 gp 120 I g G 2 の平均力価を伴う強い復活 (recall) 抗体応答を示した一方、LV - GFP - siRNA - DC マウスは、 3×10^3 の I g G 1 および 4×10^2 の I g G 2 の平均力価を伴う不十分な復活抗体応答を示した。これらのデータは、SOCS 1 をサイレンスした DC が、GFP - siRNA - DC に比較して、I g G 1 および I g G 2 a 抗体の力価のそれぞれ約 64 および 255 倍の増大を表すことを示す。

【0349】

メモリー HIV 特異的 CTL および Th の維持を、IFN - γ ELISPOT アッセイを用いて、gp 120 特異的 CD 8⁺ および CD 4⁺ T 細胞応答を検査することにより評価した。図 18 B は、免疫化後 6 か月に、強い gp 120 特異的 CTL 応答が LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスで検出されたが、しかし LV - GFP - siRNA - DC マウスでされなかったことを示す (LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスで 5×10^5 の CD 8⁺ T 細胞あたり 249 の IFN スポット対 LV - GFP - siRNA - DC マウスで 3 の IFN スポット)。活発な gp 120 特異的 CTL 応答が、LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスで追加免疫により迅速に誘導されたが、しかし LV - GFP - siRNA - DC マウスではされなかった (追加免疫後第 7 日に、LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスで 5×10^5 の CD 8⁺ T 細胞あたり 446 の IFN スポット対 LV - GFP - siRNA - DC マウスで 16 の IFN スポット) (図 18 B)。CD 8⁺ T 細胞の細胞内 IFN - γ および表面 CD 44 メモリーマーカーの共染色もまた、免疫化後 6 か月に、LV - GFP - siRNA - DC マウスと比較して LV - SOCS 1 - siRNA - DC マウスでより高い比率の CD 44^{hi} および IFN

+ CD8+ T細胞を示した(図18C)。同様に、gp120特異的CD4+ Th応答は、免疫化後6か月にLV-SOCS1-siRNA-DCマウスで維持かつ迅速に誘導された(追加免疫7日後に、LV-SOCS1-siRNA-DCマウスで 5×10^5 のCD4+ T細胞あたり391のIFNスポット対LV-GFP-siRNA-DCマウスで37のIFNスポット)(図18D)。従って、SOCS1をサイレンスしたDCでの免疫化は、長期のHIV Env特異的CTL、Thおよび抗体応答を効果的に誘導する。

【0350】

明らかな毒性は、gp120でパルスしたLV-SOCS1-siRNA-DCで免疫化したマウスで、免疫化後7か月まで観察されなかった。免疫したマウスの全部の主要な器官および組織の組織学的分析は病理学的炎症を示さなかった。IgGおよび抗dsDNAのレベルはDC-LV-SOCS1-siRNAおよび擬似DCマウスで比較可能であった。これらのデータは、gp120でパルスしたLV-SOCS1-siRNA-DC免疫化がマウスで病理学的炎症を引き起こさないことを示唆する。

10

【0351】

HIV Env媒介性の免疫抑制に対するSOCS1をサイレンスしたDCの抵抗性
gp120タンパク質を包含するHIVウイルスは、炎症前サイトカインを産生しかつT細胞を刺激するDCの能力を抑制し得る(Fantuzziら、2004、J. Virol. 78:9763-72; Granelli-Pipernoら、2004、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101:7669-74; Barronら、2003、J. Infect. Dis. 187:26-37; Pacanowskiら、2001、Blood 98:3016-21)。以下の実験は、SOCS1サイレンシングによるDCの高められた活性化が、DCのサイトカイン産生および免疫刺激能力に対するgp120タンパク質の阻害効果を克服しうるかどうかを評価するために着手した。DC由来IL-12が二重の役割、すなわち、Th1発生を駆動すること、ならびに体液性応答を発生させるためにB細胞に直接シグナル伝達すること、を演じることが見出された(Duboisら、1998、J. Immunol. 161:2223-31; Duboisら、1997、J. Exp. Med. 185:941-51; Skokら、1999、J. Immunol. 163:4284-91)ために、IL-12をこれらの実験の代表的サイトカインとして選択した。

20

30

【0352】

図19Aに示されるとおり、LV-SOCS1-siRNA-DCは、gp120タンパク質の存在下でLPSに应答する能力を保持した。対照的に、LPS刺激に対するLV-GFP-siRNA-DCの应答はgp120タンパク質の存在により激しく損なわれた。gp120媒介性の抑制に対するSOCS1をサイレンスしたDCの感受性をin vivoでさらに検討した。マウスを、ex vivoでのgp120タンパク質の前処理を伴い若しくは伴わず、OVAでパルスし形質導入したDCで免疫した。gp120タンパク質への前曝露は、OVA特異的抗体応答を誘導するLV-SOCS1-siRNA-DCの能力に対する明らかな影響を有さず(図19Bおよび19C)、また、それはLV-SOCS1-siRNA-DCにより誘導されるOVA特異的CD8+ CTLおよびCD4+ Th応答も損なわなかった($P > 0.05$)(図19Dおよび19E)。しかしながら、こうした前処理は、OVA特異的抗体およびCTL応答を誘導するLV-GFP-siRNA-DCの能力を有意に低下させた($P < 0.05$)(図19Bから19E)。これらの結果は、SOCS1サイレンシングが、ありそうにはSOCS1をサイレンスしたDCの高められたサイトカイン産生および過剰活性化状態により(Hanadaら、2003、Immunity 19:437-50)、HIV gp120媒介性の抑制に対しDCを抵抗性にするを示す。

40

【実施例8】

【0353】

HIV特異的抗体およびCTL応答を高めるためのin vivo DNAワクチン接種

50

本実施例は、HIV DNAワクチン接種の効力がSOCS1 siRNA発現体 (expressor) DNAとの共免疫化により有意に高められることを示す。本研究は、より効果的なHIVワクチンを開発するための新たな途を提示する、宿主の免疫阻害物質を阻害することによりHIV特異的抗体およびCTL応答を導き出すための最初の試みを表す。

【0354】

本実施例で提示される実験で使用する材料および方法を今や記述する。

DNAワクチン接種

pSuper-SOCS1-siRNA発現ベクターを本明細書の別の場所に以前に記述されたとおり生成させた。HIV Envレトロゲン (retrogen) 発現ベクターを生成させるため、gp140CFプラスミドを、HIV Envの分泌を助長するためにHIV gp160 (コドン使用頻度を至適化したJFRL) のgp120/gp41切断部位およびgp41の融合ドメインを欠失させることにより最初に構築した。結果として生じるpCMV/R-gp140CF-Fcレトロゲンベクターは、CMVプロモーターの制御下にIgG Fcフラグメントに融合されたgp140CF遺伝子を含む。組換えgp120 (JFRL) タンパク質をCHO細胞から産生し、そしてNIH AIDS研究・参照プログラム (NIH AIDS Research and Reference Program) により提供された。無エンドトキシンDNAをQiagenキットを用いて調製し、1 µg/µlの最終濃度で無エンドトキシンPBS (Sigma、ミズーリ州セントルイス-Aldrich Corp.、ミズーリ州セントルイス) に再懸濁し、そして注入に使用するまで-20 で保存した。ワクチン接種予定日に、50 µgのgp140CF-Fc DNA若しくは200 µgのgp140CF-Fc DNA (50 µg) およびpSuper-SOCS1-siRNA発現体DNA (150 µg) の混合物を、各マウスの四頭筋にi.m. 注入した (Hauserら、2004、Gene Ther. 11:924-32; Youら、2001、Cancer Research 61:3704-11)。免疫したマウスをその後、各DNA免疫化後第1、3および5日にLPS (30 µg/マウス) (IP) で3回処理した。

【0355】

本実施例に提示される実験の結果を今や記述する。

【0356】

SOCS1 siRNA DNAとの共免疫化により高められるHIV DNAワクチンの効力

HIV Env特異的CTLおよび抗体応答双方を高める、SOCS1をサイレンスしたDCの能力は、本SOCS1サイレンシングのアプローチがHIV DNAワクチン接種の効力の向上において有用でありうることを示唆した。抗原のDCターゲティングおよびMHC提示を高めるのに受容体媒介性のエンドサイトーシスを使用する「レトロゲン」免疫化戦略を、Hauserら、2004、Gene Ther. 11:924-32 およびYouら、2001、Cancer Research 61:3704-11に従って使用した。簡潔には、gp140CFレトロゲンを、gp120/gp41切断部位およびgp41の融合ドメインを欠失したgp140CF遺伝子にIgG Fcフラグメントをインフレームで融合することにより生成させた。結果として生じるgp140CF-Fc融合タンパク質が、gp140CF-Fcベクターでトランスフェクトした細胞から発現かつ分泌された。

【0357】

DNAワクチン接種に対するSOCS1 siRNAの効果を試験するために、マウスに、gp140CF-Fc DNAのみ、若しくはgp140CF-Fc DNAおよびpSuper-SOCS1-siRNA発現体DNAの混合物を週1回3週注入し、そしてその後、HIV Env特異的免疫応答について1週後にマウスをモニターした。高められたHIV Env特異的抗体力価が、pSuper-SOCS1-siRNA DNAで共免疫したマウスで明らかであった (図20A)。HIV Env特異的CTL応答

は、CTLおよびELISPOTアッセイにより示されるとおり、pSuper-SOCS1-siRNA DNAの共注入により有意に高められた(図20Bおよび20C)。さらに、HIV Env特異的CD4+ Th応答が、SOCS1-siRNA DNAの共注入により高められた(図20D)。サイトカインでの細胞内染色もまた、pSuper-SOCS1-siRNA DNAで共免疫したマウスでの高められたgp120特異的CD4+ T細胞応答を示した。これらの結果は、pSuper-SOCS1-siRNA DNAの共免疫化が、免疫したマウスでのコトランスフェクトした抗原提示細胞の高められた免疫刺激能力によりHIV DNAワクチン接種の効力を高めることを示す。従って、本明細書に提示されるSOCS1サイレンシングの戦略は、*ex vivo*のDCに基づくおよび*in vivo*のワクチン接種の設定に応用可能である。

10

【0358】

DC中の天然の免疫阻害物質の阻害に基づく代替のかつ効果的なHIVワクチン接種の一アプローチ

本開示は、DC中の負のシグナル伝達調節物質SOCS1のサイレンシングがマウスでHIV Env特異的抗体およびCTL応答双方の劇的な増強をもたらすことを示す。SOCS1をサイレンスしたDCにより誘導されるHIV Env特異的抗体およびCTL応答双方が長期間持続することが観察された。加えて、該結果は、SOCS1-siRNA DNAでの共免疫化がHIV DNAワクチン接種の効力を有意に高めることを示した。従って、HIVに対する均衡の取れたメモリー体液性および細胞性応答を、SOCS1をサイレンスしたDCで誘導し得、そしてこのSOCS1サイレンシングの戦略は治療的および予防的双方のHIVワクチン接種の設定に応用可能である。

20

【0359】

体液性応答の誘導におけるDCの役割は、伝統的に、T細胞とB細胞の間の同族の相互作用を刺激するCD4+ Thの結果として見られていた。しかしながら、体液性応答の刺激におけるDCの直接の役割が*in vitro*および*in vivo*で報告されている(Duboisら、1997、*J. Exp. Med.* 185:941-5138; Inabaら、1983、*Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 80:6041-5)。注目すべきことに、DCはCD40で活性化したB細胞の増殖および抗体産生双方を強く高めることが見出された(Duboisら、1997、*J. Exp. Med.* 185:941-51)。抗原を負荷したDCでの免疫化は保護的体液性応答を誘導し得る(Flamandら、1994、*Eur. J. Immunol.* 24:605-10)。本明細書の結果は、SOCS1をサイレンスしたDCが、Th2分極性サイトカイン、ならびに、SOCS1をサイレンスしたDCで免疫したマウスで見られる高められたThおよびB細胞活性化の原因であることがありそうであるBリンパ球刺激性サイトカイン(BAFFおよびAPRIL)の産生を高めることを示す。本知見は、SOCS1-/- DCがB細胞の異常な増殖および自己反応性抗体産生を誘導するという以前の報告(Hanadaら、2003、*Immunity* 19:437-50)により裏付けられる。これゆえに、本研究は、HIV特異的抗体応答の制御におけるDC中のSOCS1の決定的な役割を示し、かつ、SOCS1のサイレンシングをHIV Env以外の抗原に対する抗体応答を後押しするのに包括的に使用し得ることを暗示する。

30

40

【0360】

本研究の重要な一知見は、SOCS1をサイレンスしたDCが、HIV感染を予防若しくは制御するために望ましいとみられる(Burtonら、2004、*Nat. Immunol.* 5:233-6; McMichaelら、2003、*Nat. Med.* 9:874-80; Nabel、2001、*Nature* 410:1002-7; Letvinら、2002、*Annu. Rev. Immunol.* 20:73-99; Zolla-Pazner、2004、*Nat. Rev. Immunol.* 4:199-210; Imaiら、2002、*J. Virol.* 76:9011-23; Letvinら、2003、*Nat. Med.* 9:861-6)均衡の取れたメモリーHIV-Env特異的抗体およびCTL応答を誘導することである。いずれかの特定の論理により束縛されることを願

50

わないが、SOCS1サイレンシングが均衡の取れたメモリー体液性および細胞性応答を誘導する機構（1種若しくは複数）は、SOCS1をサイレンスしたDCおよびgp120特異的CD4+ T細胞によるTh1およびTh2分極性サイトカインの混合したパターンの産生を伴いうる。これらの結果は、ウイルスのような多くの病原体に対し天然に生成される混合した抗体およびCTL応答と矛盾せず（Allenら、1997、*Immunol. Today* 18:387-92）、Th1およびTh2分極が相互に排他的でないことを示す（Gorら、2003、*Nat. Immunol.* 4:503-5；Colonna、2001、*Nat. Immunol.* 2:899-900）。

【0361】

JAK/STATシグナル伝達経路のフィードバック阻害物質としてのSOCS1の機能は多様なサイトカインにより使用され、また、TLRシグナル伝達経路の調節に直接若しくは間接的に関与する（Baetzら、2004、*J. Biol. Chem.* 279:54708-15；Gingrasら、2004、*J. Biol. Chem.* 279:54702-7）。本明細書の結果は、LPSに反応してのSOCS1をサイレンスしたDCによるTNF- α 、IL-6およびIL-12のような多様なサイトカインの高められた産生を一貫して示した。LPS-TLRシグナル伝達は、オートクリンおよびパラクリン様式で機能し得る多くの炎症サイトカインを包含する多彩なNF- κ B応答性遺伝子を活性化する（Baetzら、2004、*J. Biol. Chem.* 279:54708-15；Grohmannら、1998、*Immunity* 9:315-23；Panら、2004、*Immunol. Lett.* 94:141-51）。SOCS1がTLRシグナル伝達の減弱に間接的に関与するという事実を鑑みれば、JAK/STAT経路の決定的な抑制機構を無効化することは、サイトカインがオートクリン若しくは/およびパラクリン刺激ループを確立することを可能にして、サイトカイン産生の低下でなく増強に至るはずである。サイトカインおよびサイトカイン受容体ノックアウトマウスの使用を伴う本明細書に開示される結果は、オートクリンサイトカイン刺激ループが、SOCS1をサイレンスしたDCによるサイトカインの過剰産生に寄与することを示唆する。

【0362】

DCの機能的欠陥および枯渇はHIVに感染した個体で一般的であり、ありそうには進行性の免疫不全に寄与する。HIV gp120タンパク質は、炎症前サイトカインを産生しかつT細胞を刺激するDCの能力を抑制し得る（Fantuzziら、2004、*J. Virol.* 78:9763-72；Carbonneilら、2004、*J. Immunol.* 172:7832-40）。SOCS1をサイレンスしたDCは、炎症前サイトカインの高められた産生およびSOCS1をサイレンスしたDCの過剰活性化状態により（Hanadaら、2003、*Immunity* 19:437-50）HIV gp120媒介性の抑制に抗することが示された。この知見は、免疫抑制されたHIVに感染した個体で使用しうる治療的HIVワクチンの開発にとりわけ関連する（Luら、2004、*Nat. Med.* 10:1359-1365）。

【0363】

ここで記述されるワクチン接種戦略は、DC中の宿主の免疫阻害物質を阻害することにより抗HIV免疫応答を高めるための最初の努力を表す。自然免疫はHIV-1感染の制御において無効であるため、宿主の免疫阻害物質を無効にすることは、効果的な抗HIV免疫応答を生成させるのに決定的に重要でありうる。しかしながら、HIV特異的免疫応答の単なる増強は保護的HIV抗体およびCTL応答の誘導に至らないことがある。この点に関して、本戦略は、DNAワクチンおよびSOCS1 siRNA DNAの共免疫化により示されるところの現在利用可能なワクチンとの組み合わせ免疫化のための機会を提供する。改良されたHIV免疫原および送達系（Burtonら、2004、*Nat. Immunol.* 5:233-6；Yangら、2002、*J. Virol.* 76:4634-42）とともに使用される場合に、このワクチン接種のアプローチは、ドミナントのエピトープに対してのみならずしかしまた弱く免疫原性すなわち潜在性のそれでもなお保護的エピトープに対しての弱い保護的免疫応答を高めるか、若しくはより広範かつより

10

20

30

40

50

強い応答を生成させるための新たな途を提供しうる。要約すれば、本開示は、HIV特異的抗体およびCTL応答双方を高めるためのDC中の宿主のシグナル伝達阻害物質を阻害するという原理を示し、保護的抗HIV応答をサルおよび究極的にヒトで本戦略により誘導し得るかどうかを決定するためのさらなる検討を要請する。加えて、このSOCS1サイレンシングの戦略は、他の病原体に対する免疫応答を高めるのにも使用し得る。

【実施例9】

【0364】

ヒトSOCS1 siRNAの同定および分析

コンピュータプログラムを使用して、ヒトSOCS1を標的とするsiRNA配列、すなわちhSOCS1-siRNA1(CACGCACUUC CGCACAUUC .dT .dT ; 配列番号21)、hSOCS1-siRNA2(UUC CGUUC GCACGCC GAUU .dT .dT ; 配列番号22)およびhSOCS1-siRNA3(GAGCUUCGACUGCCUCUUC .dT .dT ; 配列番号23)を選択した。全部の標的配列をNCBI Blastクエリにかけて、他の既知の遺伝子に対する相同性の欠如を確認した。「.dT .dT」という呼称はsiRNA標的配列のすぐ下流のポリdT配列を指す。

10

【実施例10】

【0365】

ヒト単球DCのGenePorterでのトランスフェクション

ヒトDCの調節におけるヒトSOCS1の役割を検討するため、ヒトSOCS1を特異的に下方制御する能力をもつ小分子干渉RNA(siRNA)を最初に同定した。コンピュータプログラムを使用して、ヒトSOCS1および293T細胞を標的とするsiRNA配列を選択した。各合成ヒトSOCS1-siRNAオリゴヌクレオチド二重鎖をその後、flag標識ヒトSOCS1発現とともに10:1の比でGenePorterトランスフェクション試薬を使用して293T細胞にコトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に細胞を収集し、そして本明細書の別の場所に記述されるところのウエスタンブロッティングにより分析した。

20

【0366】

図21Aは、ヒトSOCS1 siRNA1がヒトSOCS1発現を効率的に下方制御したことを示す。siRNAによるヒトSOCS1 mRNAの下方制御の特異性を、スクランブル型siRNA1オリゴヌクレオチド二重鎖のSOCS1 mRNAを下方制御することの不能により確認した。ヒトSOCS1 siRNA1を、従ってさらなる研究に選択した。合成siRNA二重鎖を、ヒト単球由来のDCにGenePorterにより85.5%のトランスフェクション効率を伴いトランスフェクトした(図21B)。定量的RT-PCRアッセイにより確認されるとおり、hSOCS1 siRNA1二重鎖でトランスフェクトした全DC集団のhSOCS1 mRNAのレベルは、擬似トランスフェクトしたDCでのレベルと比較しておよそ60%特異的に低下した(図21C、 $p < 0.01$)。該siRNAの効率およびSOCS1 RNAの減少は、全マウス骨髄由来DC集団中のマウスSOCS1を標的とした合成siRNA二重鎖を使用する実験で観察されたものと同様である。

30

40

【0367】

ヒトDC中のヒトSOCS1の相対的発現を本明細書の別の場所に記述されるところの定量的リアルタイムRT-PCRにより評価した。Applied Biosystems, Inc.、カリフォルニア州フォスターシティからのヒトSOCS1の予め開発されたプライマー/プローブ組(プライマー、5'-TTTTTCGCCCTTAGCGGGAA-3'; 配列番号24および5'-CTGCCATCCAGGTGAAAGC-3'; 配列番号25、ならびにプローブ、6FAM-ATGGCCTCGGGACCCACGAG-TAMRA; 配列番号26)を使用した。

【0368】

ヒトのSOCS1をサイレンスしたDCの特徴付け

50

次の一組の実験は、ヒトSOCS1がDC上の共刺激分子の発現を調節しているかどうかをフローサイトメトリー分析により評価するために実施した。ヒトSOCS1のフローサイトメトリー分析は、本明細書の別の場所に記述されるところのネズミのSOCS1の評価において使用したものに從って後に続いた。hSOCS1-siRNAでトランスフェクトしたDCおよび対照のhSOCS1-siRNA変異体でトランスフェクトしたDCが、ネズミのDCでの観察結果と一致して、LPSで誘導した成熟前および後に代表的共刺激分子のそれらの発現のわずかな差違のみ示したことが観察された(図22A)。比較可能なレベルのMHC-IおよびII分子もまた、hSOCS1-siRNA DCおよび変異体siRNA DC上で検出された。対照的に、hSOCS1-siRNAでトランスフェクトしたDCは、IL-12、IL-6およびTNF- α のような炎症前サイトカインの劇的に高められた分泌により示されるとおり、siRNA変異体でトランスフェクトしたヒトDCがそうであったよりも、LPSでの刺激に対しより応答性であったことが観察された(図22Bおよび22C)。

10

20

30

40

50

【0369】

ヒトSOCS1-siRNAを発現する組換えアデノウイルスベクターの生成

AdEasy系(E1およびE3欠失Ad(5); Quantum Biotechnologies Inc.、カリフォルニア州パロアルト)を使用して、複製欠損アデノウイルスを構築かつ生成した。シャトルベクターAd-hSOCS1-siRNAを、H1-ヒトSOCS1-siRNA DNAフラグメントをAdEasyベクターに挿入することにより構築した(図28)。ヒトSOCS1-siRNAの挿入をDNA配列決定により確認した。組換えアデノウイルスAd-hSOCS1-siRNAをその後、製造元の説明書(Quantum Biotechnologies Inc.、カリフォルニア州パロアルト)に從って生成した。組換えアデノウイルスを、製造元の説明書(Quantum Biotechnologies Inc.、カリフォルニア州パロアルト)に從って293細胞中で産生かつ滴定した。組換えAd(5)ウイルスがヒト単球由来DCをトランスフェクトすることが可能であったことが観察された。

【実施例11】

【0370】

ヒトSOCS1-siRNA DCにより刺激されるMAGE3特異的CTL応答

以下の実験は、ヒトDCの免疫刺激能力の調節におけるヒトSOCS1の役割を検討するために着手した。本実施例で提示される結果は、ヒトのSOCS1をサイレンスしたDCが微生物産物での刺激に対し機能亢進性でありかつ自己抗原特異的ヒト細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を刺激する高められた刺激能力を有することを示す。重要なことには、ヒトのSOCS1をサイレンスしたDCは、天然の抗原を発現するヒト腫瘍細胞に対する活発な溶解活性を有するCTLを完全に活性化することが可能であるが、しかし野性型DCは可能でない。また、CTLを刺激するヒトのSOCS1をサイレンスしたDCの能力はIL-12産生およびシグナル伝達のSOCS1拘束により制御されることがありそうであると考えられる。これらの結果は、負に調節するヒトDC中でのヒトSOCS1の決定的な役割を示し、かつ、ヒト患者のためのより効果的な腫瘍ワクチンを開発するための本SOCS1サイレンシングのアプローチの橋渡しの可能性を暗示する。

【0371】

本明細書に開示される実験で使用する材料および方法を今や記述する。

ペプチド

HLA-A2拘束性MAGE3 CTLペプチド(FLWGPRALV; 配列番号27)(van der Bruggenら、1994、European Journal of Immunology 24:3038-43)および対照のH-2K^b拘束性OVA-1(SIINFEEKL; 配列番号11)は、Genemed Synthesis Inc(米国カリフォルニア州サウスサンフランシスコ)により合成かつHPLCにより>95%純度まで精製された。ペプチドを、無エンドトキシンPBS(Sigma、ミズーリ州セントルイス)での最終希釈前にDMSOに溶解した。

ヒトSOCS1発現のウエスタンブロット分析

293T細胞を、本明細書の別の場所で論考されるとおり、10:1の比の合成ヒトSOCS-1-siRNAオリゴヌクレオチド二重鎖(21bp)若しくは無関係のオリゴ二重鎖、およびflag標識ヒトSOCS1発現ベクター(pCMV-hSOCS1)で、GenePorter試薬を使用してコトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後に細胞を収集し、そしてSDS-PAGEにかけた。Hybond-Pメンブレン(Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ)への転写後に、サンプルを抗Flag(Sigma、ミズーリ州セントルイス)若しくはアクチン(Santa Cruz Biotechnology, Inc. カリフォルニア州サンタクルズ)抗体を用いるウエスタンブロットティングにより分析し、次いでECL-Plus試薬(Amersham、イリノイ州アーリントンハイツ)で検出した。フィルムをデンシトメーターSIで走査し、そしてSOCS-1/アクチンのバンドをImageQuantソフトウェア(Molecular Dynamics、ニュージャージー州ピスカタウェイ)で定量化した。SOCS1のバンドの強度を - アクチンのバンドの強度に対し正規化した。

10

【0372】

ヒトSOCS1発現の定量的RT-PCR分析

ヒトDC中のヒトSOCS1の相対的発現を、本明細書の別の場所で論考されるところの定量的リアルタイムRT-PCRにより評価した。

ヒト単球由来DCのトランスフェクションおよびヒトT細胞のin vitro予備刺激

PBMC由来のヒトDCは、Schroersら、2003、Clinical Can. Res. 9:4743-4755; およびSchroersら、2004、Methods Mol. Biol. 246:451-9に記述されるとおり生成かつ培養した。ヘパリン処置血をHLA-A2+の健康志願者から収集した。HLAタイピングはPCR-SSP-DNAに基づく手順(The Methodist Hospital、テキサス州ヒューストン)により実施した。PBMCを無血清DC培地(CellGenix、イリノイ州アンティオキア)に再懸濁し、そして加湿5%CO₂中37℃でインキュベートした。プラスチックに接着する細胞画分を、1000IU/mlの組換えヒトGM-CSF(rhGM-CSF; R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス)および1000IU/mlのrhIL-4(R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス)を含む無血清DC培地中で培養した。第5若しくは6日に、製造元の説明書に従ってGenePorterを使用して120nMのsiRNAオリゴヌクレオチドで単球由来DCをトランスフェクトした。トランスフェクトしたDCをその後MAGE3ペプチド(20µg/ml)で一晩パルスした。24ウェルプレートのウェルあたり合計1×10⁶のヒトT細胞を、5%ABヒト血清、rhIL-2(50U/ml)およびTNF(10ng/ml、R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス)を補充した0.5mlのRPMI-1640中で、5×10⁴のMAGE3でパルスしたトランスフェクトしたDCと共培養した(20:1)。共培養したT細胞を、共培養の第7日に、自己MAGE3でパルスしたトランスフェクトしたDCで1回再刺激した。いくつかの実験については、抗ヒトIL-12(p70)抗体(20µg/ml、R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス)をDCおよびT細胞の共培養物に3日ごとに添加した。共培養の2週後に、T細胞を免疫アッセイに使用した。

20

30

40

【0373】

サイトカインのELISAおよびエリスロット(ELISPOT)アッセイ

多様な炎症前サイトカインのレベルを、指定された時間点にかつ指定された刺激を伴い、製造元の説明書に従って、ELISA分析(BD Biosciences、ニュージャージー州リンカーンパーク)のためのDC培養物の上清を使用して定量した。ヒト末梢リンパ球のELISPOTアッセイは、本明細書の別の場所に記述されるとおり実施した。

【0374】

フローサイトメトリー分析

50

細胞を、0.1% NaN_3 および2% FCSを含有するPBS中のFITC若しくはPE mAbで染色した。ヒトCD40、CD80およびCD86に特異的な抗体およびマッチさせたアイソタイプ対照はBD Biosciences、カリフォルニア州サンノゼから購入した。染色された細胞をFACSCalibur (Becton Dickinson、ニュージャージー州リンカーンパーク) フローサイトメーターで分析した。

【0375】

四量体染色

ヒトMAGE3/HLA-A2四量体は、ベイラー医科大学 (Baylor College of Medicine) の Tetramer Core Facility (米国テキサス州ヒューストン) で合成した。ヒト末梢血リンパ球若しくは共培養物中のリンパ球を、抗hCD8-FITC/抗hCD3-PerCPおよびMAGE3-PE四量体で共染色した。四量体染色は、製造元の説明書に従い、 10^6 細胞あたり $1\mu\text{g}$ の抗CD8、およびMAGE3-PE四量体の100倍希釈を用い4で1時間行った。

10

【0376】

HLA-A2トランスジェニックマウスのDC免疫化

4ないし6週齢の雌性HLA-A2.1トランスジェニックマウスはJackson Laboratory (米国メイン州) から購入し、そしてベイラー医科大学 (Baylor College of Medicine) (米国テキサス州ヒューストン) の無菌マウス施設で施設のガイドラインに従って維持した。マウスBM由来DCをHLA-A2.1トランスジェニックマウスから調製し、そして本明細書の別の場所に記述されるとおり、5のMOIの組換えレンチウイルスベクターLV-SOCS1-siRNA若しくはLV-GFP-siRNAで形質導入した。DCをその後MAGE3ペプチドで20時間パルスし、PBSで3回洗浄し、そしてTNF (500 ng/ml、R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス) で24時間刺激した。DCをその後、後足蹠を介してHLA-A2トランスジェニックマウスに注入した。若干のマウスでは、DCワクチン接種後の指定された日に、LPS (30 μg /マウス) 若しくは組換えネズミIL-12 (1 μg /マウス、Peprotech, Inc.、ニュージャージー州ロッキンヒル) を腹腔内に (i.p.) 投与した。

20

【0377】

CTLアッセイ

CD8+ CTL応答は、本明細書の別の場所に開示されるところの標的細胞を溶解するin vitroで再刺激した脾細胞の能力を測定する標準的クロム放出アッセイで評価した (Huangら、2003、Cancer Res. 63:7321-9)。2~3匹の免疫したマウスからプールした脾細胞を、MAGE3ペプチドを含有するRPMI-1640中、in vitroで4~6日間再刺激した。ヒトMAGE3+、HLA-A2+ 黒色腫細胞 (SK-Mel-37) および対照のヒトMAGE3+、HLA-A2- 黒色腫細胞 (NA-6-Mel) を 5×10^4 Crクロム酸ナトリウム溶液で37で90日間標識した。多様な数のエフェクター細胞を、96ウェルU字型底プレート (200 μl /ウェル) 中一定数の標的細胞 (5 $\times 10^4$ /ウェル) と37で4時間インキュベートした。三重の培養物からの上清を収集しかつ分析した。溶解パーセントは (実験放出 - 自発的放出) / (最大放出 - 自発的放出) $\times 100$ として計算した。

30

40

【0378】

本実施例に提示される実験の結果を今や記述する。

【0379】

ヒトのSOCS1をサイレンスしたDCの、抗原特異的CTL応答を刺激する高められた免疫刺激能力

次の一組の実験は、サイレンスしたヒトSOCS1が自己抗原特異的CTLの予備刺激においてヒトDCの刺激能力を高め得るかどうかを評価するために着手した。成人ヒト精巢および黒色腫細胞で発現されることが既知の胎児性腫瘍抗原、ヒトMAGE3由来のHLA-A2拘束性ペプチド (van der Bruggenら、1994、Europ

50

ean Journal of Immunology 24:3038-43) をモデルヒト自己抗原として使用した。HLA-A2+ の健康志願者からのヒト単球由来 DC を hSOCS1 siRNA オリゴヌクレオチドでトランスフェクトし、そしてその後 MAGE3 ペプチド (20 µg/ml) で一夜パルスした。ウェルあたり合計 1×10^6 の自己ヒト T 細胞を、TNF (成熟刺激) (10 ng/ml、R&D Systems Inc.、ミネソタ州ミネアポリス) の存在下で、 5×10^4 の MAGE3 でパルスしたトランスフェクトした DC と共培養した (20:1)。共培養した T 細胞を、共培養の第 7 日に、自己 MAGE3 でパルスしたトランスフェクトした DC で 1 回再刺激した。共培養の 2 週後に、T 細胞を免疫アッセイに使用した。MAGE3 ペプチドでパルスした hSOCS1 siRNA でトランスフェクトした DC との共培養物中で、CD8+ T 細胞の 13.9% が、MAGE3 でパルスした mut-siRNA DC 若しくは擬似 DC との共培養物中でのそれぞれわずか 5.4% および 4.3% と比較して、MAGE3-四量体について陽性であった (図 23A)。同一ドナーからのナイーブな (未刺激) 初代ヒトリンパ球の四量体染色は、低レベルの陽性 MAGE3 四量体染色を示した (CD8+ T 細胞の 0.5%)。一致して、細胞内 IFN 染色 (図 23B) は、hSOCS1-siRNA DC が、MAGE3 ペプチドでパルスした mut-siRNA DC (IFN + CD8+ T 細胞の 6.9%) 若しくは擬似 DC (IFN + CD8+ T 細胞の 5.7%) と比較して、MAGE3 特異的 CTL 応答を実質的に改善した (IFN + CD8+ T 細胞の 11.18%) ことを示した。さらに、IFN ELISPOT アッセイ (図 23C) は、増大した数の MAGE3 特異的 CTL が hSOCS1-siRNA DC により活性化されたことを示した。HLA-A2+ ドナーからの反復実験は同様の結果を示した。初代ヒト T 細胞の大部分は、抗原でパルスされない DC との 2 週の共培養後に死亡した。集合的に、これらの結果は、ヒトの SOCS1 をサイレンスした DC が自己抗原特異的 CTL を刺激する高められた免疫刺激能力を有することを示す。

【0380】

CTL 予備刺激における SOCS1 拘束性の IL-12 の決定的な役割

SOCS1 をサイレンスした DC は、微生物産物での刺激に应答して、高められた量の IL-12 (CTL 応答の活性化で重要なサイトカイン) を産生する (Trinchieri、2003、Nat. Rev. Immunol. 3:133-46) ため、また、IL-12 シグナル伝達は SOCS1 により拘束される (Eyles ら、2002、J. Biol. Chem. 277:43735-40) ため、ヒトの SOCS1 をサイレンスした DC による CTL の刺激における IL-12 の役割を検査した。従って、抗ヒト IL-12 抗体を、T 細胞および MAGE3 でパルスしたトランスフェクトした DC の共培養物に 3 日ごとに添加した。図 23A から 23C は、抗 IL-12 (p70) 抗体を使用する IL-12 の阻害が、四量体染色、細胞内 IFN 染色および ELISPOT アッセイにより示されるとおり、MAGE3 特異的 CTL を刺激する hSOCS1-siRNA DC の高められた能力を無効にしたことを示す。

【0381】

ヒト化 HLA-A2.1 トランスジェニックマウスを使用して、SOCS1 をサイレンスした DC により誘導される高められた CTL 応答における IL-12 の役割をさらに試験した。HLA-A2.1 トランスジェニックマウスの BM 由来 DC を、ネズミの SOCS1 siRNA を発現する組換えレンチウイルスベクター (LV-mSOCS1 siRNA) 若しくは対照ベクター LV-GFP siRNA で形質導入し、そして A2 拘束性 MAGE3 ペプチドでパルスした。TNF での成熟後に、形質導入した DC を、HLA-A2.1 トランスジェニックマウスに足蹠を介して 1 週間隔で 2 回投与した。各 DC 免疫化後に、マウスを LPS 若しくは低用量の組換え IL-12 サイトカインのいずれかで *in vivo* で 3 回刺激した。LPS は、それが誘導する多数の炎症前サイトカイン (それらの多くは SOCS1 により調節される) のため、および NF- κ B (p65) シグナル伝達の調節における SOCS1 の可能な直接的な役割 (Ryo ら、2003、Mol. Cell 12:1413-26) のために使用した。*in vivo* IL-12

刺激で、 2×10^5 の T 細胞あたり 239 の IFN + のスポットが、MAGE3 でパルスした GFP - siRNA DC で免疫したマウスでの 2×10^5 の T 細胞あたりわずか 10 の IFN + スポットと比較して、MAGE3 でパルスした SOCS1 - siRNA DC で免疫したマウスで検出された (図 24)。in vivo LPS 刺激はまた、SOCS1 - siRNA DC により誘導される CTL 応答も優先的に高めた (SOCS1 - siRNA - DC マウスでの 2×10^5 の T 細胞あたり 63 の IFN + スポット対 GFP - siRNA - DC マウスで 2×10^5 の T 細胞あたり 24 の IFN + スポット) (図 24)。しかしながら、IL - 12 刺激は、SOCS1 - siRNA - DC で免疫したマウスで MAGE3 特異的 CTL 応答を後押しするために LPS 刺激より効果的であった ($P < 0.01$)。IL - 12 のこの優れた刺激能力は、Jak / Stat 経路により IL - 12 刺激を直接調節する SOCS1 の能力、ならびに SOCS1 - siRNA DC で免疫したマウスで活性化された CTL に対する IL - 12 の直接の効果 (Trinchieri, 2003, Nat. Rev. Immunol. 3: 133 - 46) によることありそうである。一緒にすれば、これらの結果は、SOCS1 が抗原提示細胞中の IL - 12 のシグナル伝達を拘束するというさらなる証拠を提供する。これらの結果はまた、サイトカインに基づく腫瘍療法の有効性の決定におけるサイトカインシグナル伝達的重要性も強調する。

ヒトの SOCS1 をサイレンスした DC により活性化したヒト CTL は腫瘍溶解性エフェクター機能を有するが、しかし野性型 DC により活性化した CTL は有しない。

【0382】

自己腫瘍関連抗原 MAGE3 に特異的な活性化した T 細胞が腫瘍溶解性エフェクター機能を有するかどうかを決定するため、天然の MAGE3 + ヒト腫瘍細胞を CTL アッセイの標的細胞として使用した。MAGE3 でパルスした SOCS1 - siRNA DC 若しくは mut - siRNA DC により活性化したヒト T 細胞は、MAGE3 ペプチドでパルスした MAGE3 + HLA - A2 + 黒色腫細胞 (SK - Mel - 37) を容易に死滅させた。しかしながら、MAGE3 でパルスした mut - siRNA DC により活性化したヒト T 細胞は、MAGE3 でパルスしていない天然の SK - Mel - 37 細胞に対する弱い細胞溶解活性のみを示した (図 25)。対照的に、MAGE3 でパルスした SOCS1 - siRNA DC により活性化した T 細胞は、MAGE3 でパルスしていない天然の SK - Mel - 37 細胞に対する強い細胞溶解活性をなお有した (図 25)。hSOCS1 - siRNA DC との共培養物中の T 細胞の腫瘍溶解活性は、抗 hIL - 12 抗体処理により有意に損なわれた。MAGE3 でパルスした SOCS1 - siRNA DC により活性化したヒト T 細胞は、HLA - A2 陰性の MAGE3 + 黒色腫細胞 (NA - 6 - Mel) に対しバックグラウンドの細胞溶解活性を有したのみであったため、該腫瘍溶解活性は CTL により特異的に媒介された。多様なドナーからの反復実験は同様の結果を示した。

【0383】

上の観察結果を確認するために、MAGE3 でパルスした SOCS1 - siRNA DC 若しくは GFP - siRNA DC で免疫した HLA - A2.1 トランスジェニックマウスからの T 細胞の腫瘍溶解活性を試験した。図 26 は、MAGE3 でパルスした mSOCS1 - siRNA DC で免疫したトランスジェニックマウスからの T 細胞が、天然の MAGE3 + HLA - A2 陽性黒色腫細胞 SK - Mel - 37 に対する活発な細胞溶解活性を有したことを示す。対照的に、MAGE3 でパルスした GFP - siRNA DC で免疫したトランスジェニックマウスからの T 細胞は、図 25 で示される結果と一致して、天然の黒色腫細胞に対する弱い細胞溶解活性を有したのみであった。さらに、低用量の組換え IL - 12 での in vivo 刺激が、SOCS1 - siRNA DC により誘導される CTL 応答を有意に高めたが、しかし GFP - siRNA DC により誘導される CTL 応答は高めなかったことが観察された (図 26)。一緒にすれば、本明細書の結果は、ヒトの SOCS1 をサイレンスした DC が、ありそうには抗原提示細胞による IL - 12 の高められた産生およびシグナル伝達により、天然の腫瘍細胞に対する活発な溶解性

10

20

30

40

50

エフェクター機能を有するCTLを完全に活性化する独特の能力を有することを示す。

【0384】

ヒトのSOCSをサイレンスしたDCによる自己抗原特異的ヒトCTLの完全な活性化

本開示は、ヒトDC中のヒトSOCS1の調節性の役割を示し、かつ、JAK/STATシグナル伝達経路のインヒビターによりサイレンシングすることによるヒトDCの免疫刺激能力を高めるための代替の一戦略を提供する。本明細書に開示される結果は、抗原特異的CTLを刺激するヒトDCの免疫刺激能力の負の調節におけるヒトSOCS1の決定的な役割を示す。ヒトのSOCS1をサイレンスしたDCは、天然の抗原を発現する腫瘍細胞に対する確実な溶解機能を有するヒトCTLを完全に活性化する独特の能力を有する。ヒトのSOCS1をサイレンスしたDCのCTLを刺激する能力は、IL-12の産生およびシグナル伝達のSOCS1拘束により制御されることがありそうである。従って、本開示は、より有効な腫瘍ワクチンを開発するためのこの一般に応用可能なSOCS1サイレンシングのアプローチの橋渡しの可能性を示す。

10

【0385】

本発明のSOCS1サイレンシングのアプローチは、腫瘍関連抗原を負荷したDCにより誘導される抗原特異的免疫応答を高める能力を有する。過去10年間の腫瘍免疫学の大きな進歩は、多数のヒト腫瘍特異的若しくは関連抗原の同定および検証であった(Vanden Eyndeら、1997、Current Opinion in Immunology 9:684-93)。従って、腫瘍関連抗原を負荷した、SOCS1をサイレンスしたDCでのワクチン接種は、抗原特異的抗腫瘍応答を誘導するためのCTL上のCTLA4をブロックすることよりも魅力的であろう。SOCS1をサイレンスしたDCの免疫化の使用は、SOCS1をサイレンスしたDCが重篤な自己免疫性炎症を引き起こさないかもしれないために、付加的な治療上の利益を提供する。ヘテロ接合性のSOCS1⁺/マウスが自己免疫性炎症の兆候を示さないか若しくは軽度の兆候のみ示すからである。さらに、SOCS1⁻/マウスで見られる重篤な自己免疫性炎症は、DC中でのみならずしかしたTおよびNKT細胞のような免疫細胞の他の系統でのSOCS1の完全な欠乏を必要とする(Kubotaら、2003、Nat. Immunol. 4:1169-76; Alexanderら、2004、Annu. Rev. Immunol. 22:503-29; Metcalfeら、2003、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:8436-41; Chongら、2003、Immunity、18:475-87; Hanadaら、2003、Immunity 19:437-50; Kinjyoら、2002、Immunity 17:583-91)。

20

30

【0386】

腫瘍ワクチンの有効性を高めるための多数の努力は、腫瘍関連抗原の親和性/用量(シグナル1)および共刺激分子媒介性のシグナル2のレベルの改良に集中した(Gilboa、2004、Nat. Rev. Cancer 4:401-11; Rosenbergrら、2004、Nat. Med. 10:909-15)。本開示は、ヒトのSOCS1をサイレンスしたDCの抗原特異的CTLを刺激する優れた能力が、IL-12の高められた産生およびシグナル伝達(シグナル3)によることがありそうであることを示す。この結論は、以下の観察結果、すなわち1)ヒトのSOCS1をサイレンスしたDCは、微生物産物での刺激に応答して高められたレベルのIL-12を産生する; 2)IL-12の抗体ブロッキングはヒトのSOCS1をサイレンスしたDCの免疫刺激能力を損なう; および3)低用量のIL-12のin vivo投与は、SOCS1をサイレンスしたDCにより誘導される抗原特異的CTL応答を劇的に高めるが、しかし野性型DCにより誘導される応答はしない、に基づく。これらの結果は、Eyless, J. L.ら(Eylessら、2002、J. Biol. Chem. 277:43735-40)および本明細書の別の場所を開示される結果による、IL-12シグナル伝達のネズミのSOCS1の調節の知見により裏付けられる。

40

【0387】

サイトカインはCTLを活性化するためにDCにより提供される第三のシグナルとして

50

提案されている (Curttsingerら、2003、J. Exp. Med. 197: 1141-51)。サイトカイン産生およびシグナル伝達は、過剰の自己免疫活性化を制限しつつ、外来抗原に対する免疫応答を活性化するためにしっかりと調節される (Darnellら、1994、Science 264: 1415-21)。サイトカインは一般的にJAKを活性化し、それはその後サイトカイン受容体の細胞質ドメインをリン酸化して、転写のシグナル伝達物質および活性化物質 (STAT) のメンバーのドッキング部位を創製する (Alexanderら、2004、Annu. Rev. Immunol. 22: 503-29)。サイトカインはまた、フィードバックインヒビターとしてSOCS1の発現を上方制御し、それはその後DCによる炎症前サイトカインの産生およびシグナル伝達のスイッチを切り、従って進行中の免疫応答を減弱させかつ自己寛容を維持する (Alexanderら、2004、Annu. Rev. Immunol. 22: 503-29)。SOCS1は、そのSH2ドメインを介して擬似基質阻害物質としてJAK活性化ループに特異的に結合しかつJAK2の標的をユビキチン依存性のタンパク質分解に向けてることにより、STATを抑制する (Kuboら、2003、Nat. Immunol. 4: 1169-76; Alexanderら、2004、Annu. Rev. Immunol. 22: 503-29)。一緒にすれば、本明細書に開示される結果は、CTL応答の大きさの決定における、抗原提示細胞中でSOCS1により拘束されるIL-12の産生およびシグナル伝達の決定的な重要性を示す。

【0388】

この研究の重大な一知見は、ヒトのSOCS1をサイレンスしたDCが、活発な溶解性エフェクター機能を伴い自己反応性T細胞を完全に活性化する独特の能力を有することである。自己抗原特異的T細胞が、四量体染色およびELISPOTアッセイのような多様な免疫アッセイにより測定されるとおり、DCワクチン接種若しくは*in vitro*感作により活性化され得ることが、臨床試験および実験室の研究で頻繁に観察されている。しかしながら、こうした活性化したT細胞は、人工的抗原でパルスした腫瘍細胞若しくは自己抗原を発現するよう遺伝子的に改変した腫瘍細胞を効率的に死滅させ得るとは言え、それらは通常、現在の腫瘍ワクチンの乏しい有効性の主理由であると考えられている、天然の腫瘍細胞に対する弱い細胞溶解活性を示す (Zaksら、1998、Cancer Research 58: 4902-8; Yuら、2002、J. Clin. Invest. 110: 289-94)。本明細書に開示される結果は、SOCS1をサイレンスしたDCにより提供される持続性かつ高められた抗原提示/刺激が、自己反応性の低親和性T細胞を完全に活性化しかつそれらに天然の腫瘍細胞に対する活発な溶解性エフェクター機能を与えるために必要とされうことを示唆している。

【実施例12】

【0389】

SOCS1 siRNAオリゴ二重鎖はタンパク質免疫化を高める。
SOCS1 siRNAオリゴ二重鎖での*in vivo*免疫化がタンパク質免疫化を高め得るかどうかを試験するため、1) BCGを伴うOVAタンパク質での免疫化により誘導されるCTL応答を、2) SOCS1 siRNAオリゴ二重鎖リポソーム、およびBCGを伴うOVAタンパク質での共免疫化と比較した。マウスの群を、1週間隔で2回、足蹠を介して、OVAタンパク質およびBCGの混合物、SOCS1 siRNAオリゴ二重鎖リポソームならびにOVAタンパク質およびBCGの混合物で免疫したか、若しくはOVAタンパク質およびBCGならびにSOCS1 siRNAオリゴ二重鎖リポソームの混合物を共注入した。第二の免疫化の2週間後、細胞内サイトカイン染色およびELISPOTアッセイ (IFN γ) が、SOCS1 siRNAオリゴ二重鎖で共免疫したマウスでより強力なOVA特異的CTL応答が誘導されたことを示したことが観察された (図27Aおよび27B)。

【実施例13】

【0390】

SOCS1をサイレンスしたCTLは高められた細胞溶解活性を有する。

T細胞中のSOCS1がCTL活性の調節においてある役割を演じているかどうかを検討するため、OT-Iトランスジェニックマウス(Jackson Laboratory、メイン州バーハーバー)から単離した1個のOVAエピトープに特異的なトランスジェニックTCRを有するCD8⁺ OT-I細胞を、GenePorterを使用してSOCS1若しくは変異体siRNAオリゴでトランスフェクトした。トランスフェクトしたOT-I細胞を、さらなる刺激を伴わずにCTLアッセイに使用した。SOCS1-siRNAオリゴでトランスフェクトしたOT-Iは、変異体siRNAオリゴでトランスフェクトしたOT-I細胞と比較して、同系のOVA陽性EG7細胞に対する高められた細胞溶解活性を有したことが観察された(図29)。この結果は、T細胞中のSOCS1サイレンシングがそれらの細胞溶解活性を高めることを示す。

10

【0391】

本明細書で引用される各およびすべての特許、特許出願および公開の開示はここにそっくりそのまま引用することにより本明細書に組み込まれる。

【0392】

本発明は特定の態様に関して開示された一方、本発明の他の態様および変形物が、本発明の真の技術思想および範囲から離れることなく当業者により考案されることが明らかである。付属として付けられる請求の範囲は、全部のこうした態様および同等な変形物を包含すると解釈されることを意図している。

【図面の簡単な説明】

【0393】

本発明を具体的に説明する目的上、本発明のある態様を図面に描く。しかしながら、本発明は該図面に描かれる態様の正確な配置および手段に制限されない。

20

【図1】図1Aおよび1Bを含んでなる、SOCS1の発現がSOCS1-siRNAにより下方制御されることを示す一連の図である。図1AはマウスSOCS1 siRNAとともにコトランスフェクトした293T細胞のウエスタンブロットアッセイを描く。図1Bは、SOCS1 siRNAとともにオリゴでトランスフェクトしたDCの定量的RT-PCRアッセイを描く。

【図2】SOCS1 siRNAでトランスフェクトしたDCが、IL-6およびTNF- α のような炎症前サイトカインの高められた分泌により示されるとおり、siRNA変異体でトランスフェクトしたDCがそうであったよりLPS若しくはIFN- γ に対しより応答性であったことを示す図である。

30

【図3】組換えレンチウイルスベクター；LV-SOCS1-siRNAおよびLV-GFP-siRNAの図解である。

【図4】図4Aおよび4Bを含んでなる、SOCS1が抗原特異的CTLをin vitroで刺激するDCの能力を負に調節することを示す一連の図である。図4Aは、卵アルブミン特異的TCR T細胞(OT-I)が、siRNA-DC変異体共培養物中でよりもSOCS1-siRNA-DC共培養物中でより増殖したという事実を描く。これらのデータと矛盾せず、より高レベルの炎症前サイトカインがSOCS1-siRNA-DC共培養物中で分泌された(図4B)。

【図5】図5Aから5Cを含んでなる、SOCS1が抗原特異的T細胞応答をin vivoで刺激するDCの能力を負に調節することを示す一連の図である。図5Aは、全部のゲートしたCD8⁺ T細胞集団でのH2-K^b/卵アルブミン-PE四量体⁺T細胞の比率を示す。図5Bはインターフェロン- γ (IFN- γ)ELISPOTアッセイを描く。図5Cは、未熟LV-SOCS1-siRNA-DCを与えたマウスからの脾細胞の卵アルブミン⁺標的細胞に対するより強力な細胞傷害性を示すCTLアッセイを描く。

40

【図6】図6Aから6Eを含んでなる、in vivo LPS刺激がSOCS1をサイレンスしたDCにより誘導されるCTL応答を強く高めたことを示す一連の図である。図6AはゲートしたCD8⁺ T細胞中の卵アルブミン-PE四量体陽性T細胞の比率を描く。図6Bは、ex vivoでのLPS誘発性の成熟を伴わない卵アルブミンでパルスし形質導入したか若しくは擬似DCで免疫し、次いでin vivo LPS刺激したマ

50

ウスでのCD8⁺ T細胞のIFN- γ ELISPOT数を描く。図6Cおよび図6Dは、成熟させたDCで免疫し、次いで*in vivo* LPS刺激したマウスでのCD8⁺ T細胞のそれぞれ卵アルブミン-PE四量体⁺の比率およびIFN- γ ELISPOT数を描く。図6Eは、多様なサイトカインおよびTLRアゴニストでの*in vivo*刺激が、SOCS1をサイレンスしたDCによるCTL応答(ELISPOT)を高めることを示す。

【図7】図7Aから7Eを含んでなる、SOCS1をサイレンスしたDCにより誘導される高められた抗腫瘍免疫を示す一連の図である。図7Aは、卵アルブミンでパルスしたLV-SOCS1-siRNA-DCでの免疫化が、予め確立された卵アルブミン⁺EG7腫瘍の増殖を阻害したという事実を描く。図7Bは、抗CD8抗体が卵アルブミンでパルスしたLV-SOCS1-siRNA-DCにより誘導される抗腫瘍活性を消失させたが、しかし抗CD4抗体はしなかったという事実を描く。図7Cから7Eは、マウスでのSOCS1-siRNAオリゴ二重鎖でトランスフェクトしたDCによる高められた抗腫瘍活性を描く。

【図8】図8Aから8Cを含んでなる、SOCS1をサイレンスしたDCによる自己腫瘍関連抗原に対する高められたCTL応答を示す一連の図である。図8は、成熟LV-SOCS1-siRNA-DCが予め確立されたB16腫瘍の増殖を効果的に阻害した一方、成熟LV-GFP-siRNA-DCはいかなる観察可能な阻害効果も有しなかったという事実を描く。図8Bおよび図8Cは、LV-SOCS1-siRNA-DCマウスでの強力なTRP2特異的CTL応答のそれぞれIFN- γ ELISPOTおよびCTLアッセイを描く。

【図9】図9Aから9Cを含んでなる、SOCS1により拘束される成熟DCのシグナル伝達が自己抗原に対するCTL応答および抗腫瘍免疫を制御することを示す一連の画像である。図9Aは、免疫化2週後のマウスでの脾細胞のCD8⁺ T細胞中のH2-K^b-TRP2-PE四量体陽性T細胞の比率を描く。図9Bは、*in vivo* LPS刺激を1回若しくは3回受領する、TRP2aでパルスしたSOCS1-siRNA DCで免疫したマウスでの免疫化3か月後の代表的な白斑を描く。図9Cは、免疫したマウスの群からプールした脾細胞のTRP2⁺ B16(上図)、およびTRP2aペプチドでの*in vitro*再刺激後にSOCS1-siRNA DCで免疫した野性型マウスの脾細胞のTRP2⁻ EG7標的細胞(下図)に対する細胞傷害性を描く。

【図10】図10Aから10Dを含んでなる、SOCS1-siRNA DC免疫化による予め確立されたB16腫瘍の根絶を示す一連の図である。図10Aおよび10BはそれぞれLPSの*in vivo*刺激を伴わないおよび伴う野性型マウスでの腫瘍増殖曲線を描く。図10Cは、60日間モニターしたマウスの生存パーセントを描く。図10Dは、LPSを共注入しかつTRP2aペプチドの刺激にかけた免疫したマウスのプールした脾細胞から単離したCD8⁺ T細胞のIFN- γ ELISPOTアッセイを描く。

【図11】図11Aから11Cを含んでなる、低若しくは高親和性ペプチドいずれかでパルスしたSOCS1をサイレンスしたDCにより誘導される強力なCTL応答および抗腫瘍活性を示す一連の図である。図11Aは、LPS刺激を伴わない(図11A-1)若しくは伴う(図11A-2)形質導入したDC上の共刺激/阻害分子のフローサイトメトリック分析を描く。図11Bは、低若しくは高親和性ペプチドでパルスしたSOCS1-siRNA DCによる予め確立されたB16腫瘍の根絶を描く。図11Cは、TRP2a若しくはTRP2bペプチドで刺激した、IFN- γ ELISPOTアッセイにより測定されるところの抗原特異的CTL応答の比較を描く。

【図12】図12Aから12Dを含んでなる、IL-12 KO SOCS1-siRNA DCによる効果的な抗腫瘍応答の誘導の欠如を示す一連の図である。図12Aおよび図12Bはそれぞれ腫瘍体積および生存を描く。図12CはTRP2aペプチドでの*in vitro*刺激後のIFN- γ ELISPOTアッセイを描く。図12Dは、TRP2⁺ B16標的細胞を使用する、TRP2aペプチドでの*in vitro*刺激後のCTLアッセイを描く。

10

20

30

40

50

【図13】図13Aから13Dを含んでなる、SOCS1がDCによるIL-12およびIL-12に誘導されるサイトカイン産生を制御することを示す一連の図である。図13Aは、LPSおよびプレート被覆した抗CD40 mAbでの連続的刺激に应答してSOCS1 siRNA DCにより分泌されるIL-12のレベルを描く。図13Bは、最初の24時間の刺激後のこれらの刺激の除去が続くIL-12レベルを描く。図13Cは、24時間のLPSおよびプレート被覆した抗CD40 mAbでの刺激、次いで刺激の除去に应答してSOCS1 siRNA DCにより分泌されるTNF およびIL-6のそのレベルを描く。図13Dは、LPSおよびプレート被覆した抗CD40 mAbでの連続的刺激に应答してp35-/-若しくはwt SOCS1-siRNA DCにより分泌されるTNF およびIL-6のレベルを描く。

10

【図14】図14Aおよび14Bを含んでなる、in vivo IL-12投与がSOCS1をサイレンスしたDCの免疫化を高めることを示す一連の図である。図14Aはin vivo IL-12投与により高められる抗腫瘍活性を描く。図14BはIL-12による高められたTRP2特異的CTL応答を描く。

【図15】図15Aから15Dを含んでなる、DC中のSOCS1のサイレンシングによりgp120特異的抗体およびCTL応答が高められることを示す一連の図である。図15Aは、LV-SOCS1-siRNA-DCが、対照LV-GFP-siRNA-DCが導き出したよりも有意により確実なgp120特異的IgMおよびIgG応答を導き出したことを示す。図15Bは、LV-GFP siRNA-DCマウスでの対応するサブクラスと比較しての、LV-SOCS1-siRNA-DCで免疫したマウスでの全IgGサブクラスのHIV Env特異的抗体力価の劇的な増大を示す。図15Cは、LV-SOCS1-siRNA-DCマウスでのgp120でパルスした標的細胞に対するCTL活性が、LV-GFP-siRNA-DCマウスでのものより有意により強力であったことを示す。図15Dは、LV-SOCS1-siRNA-DCマウスでのIFN- γ T細胞のより高い比率を示す。

20

【図16】図16Aから16Dを含んでなる、SOCS1をサイレンスしたDCによるTh1およびTh2極性化サイトカイン双方の高められた産生を示す一連の図である。図16Aは、LPSでの刺激後のGFP-siRNA-DCと比較してのLV-SOCS1-siRNA-DCにより産生されたIL-12、IFN- γ およびTNF のレベルを描く。図16Bはgp120特異的CD4+ T細胞の頻度を描く。図16Cは、LV-SOCS1-siRNA-DCマウスからのCD4+ T細胞が、gp120でパルスしたDCでの刺激に应答して、LV-GFP-siRNA-DCからのものより活発に増殖したことを具体的に説明する。図16Dは、SOCS1をサイレンスしたDC中のTh1極性化(IFN- γ 、IL-2およびTNF)ならびにTh2極性化(IL-4およびIL-10)双方のサイトカインの増大されたレベルを示す。

30

【図17】図17Aから17Dを含んでなる、SOCS1をサイレンスしたDCによる高められたgp120特異的B細胞活性化を示す一連の図である。図17AはLPS刺激に際してのAPRILおよびBAFF mRNAの発現レベルを描く。図17Bは、LV-SOCS1-siRNA-DCおよびLV-GFP-siRNA-DCマウスでの抗gp120 IgG産生B細胞の頻度を描く。図17Cは、LV-SOCS1-siRNA-DCマウスからのB細胞が、抗CD40およびIL-4で共刺激した場合に、LV-GFP-siRNA-DCマウスからのB細胞が増殖したよりも活発に増殖したことを描く。図17Dは、LV-SOCS1-siRNA-DCマウスからのB細胞が、多様な刺激に应答して、より高レベルのIL-6、IL-2およびTNF- α を包含する多様なサイトカインを産生したことを描く。

40

【図18】図18Aから18Bを含んでなる、SOCS1をサイレンスしたDCにより誘導される長期のgp120特異的抗体およびCTL応答を示す一連の図である。図18Aは、LV-SOCS1-siRNA-DCで免疫したマウスと比較した、LV-GFP-siRNA-DCで免疫したマウスでのgp120特異的抗体を描く。図18Bは、LV-GFP-siRNA-DCマウスと比較した、LV-SOCS1-siRNA-DCマ

50

ウスでの gp120 特異的 CTL 応答を具体的に説明する。図 18C は、免疫化後 6 か月の、LV-GFP siRNA-DC マウスと比較した、LV-SOCS1-siRNA-DC マウスでの CD44hi および IFN γ + CD8 α ⁺ T 細胞の比率を具体的に説明する。図 18D は、gp120 特異的 CD4 α ⁺ Th 応答が、LV-SOCS1-siRNA-DC マウスで免疫化後 6 か月に維持されかつ迅速に誘導されたことを具体的に説明する。

【図 19】図 19A から 19E を含んでなる、HIV Env 媒介性の免疫抑制に対する SOCS1 をサイレンスした DC の抵抗性を示す一連の図である。図 19A は、LV-SOCS1 siRNA-DC が gp120 タンパク質の存在下で LPS に応答する能力を保持したことを具体的に説明する。gp120 タンパク質への前曝露は、OVA 特異的抗体応答を誘導する LV-SOCS1-siRNA-DC の能力に対する明らかな影響を有さず（図 19B および 19C）、また、それは LV-SOCS1-siRNA-DC により誘導される OVA 特異的 CD8 α ⁺ CTL および CD4 α ⁺ Th 応答も損なわなかった（図 19D および 19E）。

【図 20】図 20A から 20D を含んでなる、SOCS1 siRNA による HIV DNA ワクチンの増強を示す一連の図である。図 20A は、pSuper-SOCS1-siRNA DNA で共免疫したマウスでの HIV Env 特異的抗体力価の増強を描く。図 20B および 20C は、HIV Env 特異的 CTL 応答が、それぞれ CTL および ELISPOT アッセイにより示されるとおり、pSuper-SOCS1-siRNA DNA の共注入により有意に高められたことを具体的に説明する。図 20D は、HIV Env 特異的 CD4 α ⁺ Th 応答が、SOCS1-siRNA DNA の共注入により高められたという事実を描く。

【図 21】図 21A から 21C を含んでなる、ヒト単球由来 DC 中のヒト SOCS1 のサイレンシングを示す一連の図である。図 21A は、ヒト SOCS1 siRNA がヒト SOCS1 発現を効率的に下方制御したことを具体的に説明する。図 21B は、ヒト単球由来の DC への合成 siRNA 二重鎖のトランスフェクション効率を具体的に説明する。図 21C は、hSOCS1 siRNA 二重鎖でトランスフェクトした全 DC 集団の hSOCS1 mRNA のレベルを描く。

【図 22】図 22A から 22C を含んでなる、ヒトの SOCS1 をサイレンスした DC を特徴づける一連の図である。図 22A は示されたヒト SOCS1 のフローサイトメトリー分析を描く。図 22B および 22C は、siRNA 変異体でトランスフェクトしたヒト DC に比較しての、hSOCS1 siRNA でトランスフェクトしたヒト DC 中の IL-12、IL-6 および TNF- α のような炎症前サイトカインの分泌のレベルを具体的に説明する。

【図 23】図 23A から 23C を含んでなる、抗原特異的 CTL 応答を刺激するヒトの SOCS1 をサイレンスした DC の高められた免疫刺激能力を示す一連の図である。MAGE3-PE 四量体 + T 細胞の比率（図 23A）、ゲートした CD3 α ⁺ および CD8 α ⁺ T 細胞集団での細胞内 IFN γ + T 細胞の比率（図 23B）、ならびに IFN γ + ELISPOT 数（図 23C）を、異なる HLA-A2 + ドナーを使用する 4 回の独立の実験の 1 つから示す。

【図 24】ヒト化 HLA-A2.1 トランスジェニックマウスでの高められたヒト MAGE3 特異的 CTL 応答を描く図である。

【図 25】図 25A および 25B を含んでなる、ヒト SOCS1-siRNA-DC により活性化されたヒト CTL の腫瘍溶解活性を示す一連の図である。抗ヒト IL-12 抗体の非存在若しくは存在下に MAGE3 でパルスした hSOCS1-siRNA DC 若しくは対照 DC および自己 T 細胞の 2 週共培養後のヒト MAGE3 α ⁺、HLA-A2 α ⁺ 黒色腫細胞 (SK-Mel-37)（図 25A）および対照のヒト MAGE3 α ⁺、HLA-A2 α ⁺ 黒色腫細胞 (NA-6-Mel)（図 25B）に対する細胞溶解活性を、4 回の独立の実験の 1 つから示す。

【図 26】図 26A および 26B を含んでなる、免疫した HLA-A2.1 トランスジェ

10

20

30

40

50

ニックマウスの活性化されたCTLの腫瘍溶解活性を示す一連の図である。ヒトSK-Mel-37細胞(図26A)および対照のヒトHLA-A2-NA-6-Mel細胞(図26B)に対する細胞傷害性を、MAGE3ペプチドで5日間のin vitro再刺激後に測定し、そして3回の実験の1つから提示する。

【図27】図27Aおよび28Bを含んでなる、SOCS1 siRNAオリゴ二重鎖での共免疫化がin vivoタンパク質免疫化を増強することを示す一連の図である。

【図28】ヒトSOCS1 siRNAを発現する複製欠損アデノウイルスベクターの図解を描く図である。図28は、Ad-ヒトSOCS1 siRNAによるヒトDCのトランスフェクションもまた示す。

【図29】T細胞のSOCS1 siRNAオリゴ二重鎖トランスフェクションによる高められたCTL活性を描く図である。

【図30】siRNA候補の核酸配列を描く図である。

10

【図1A】

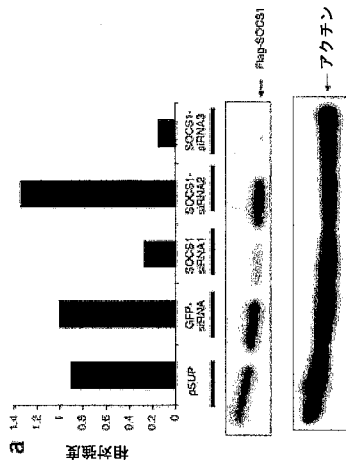


Fig. 1A

【図1B】

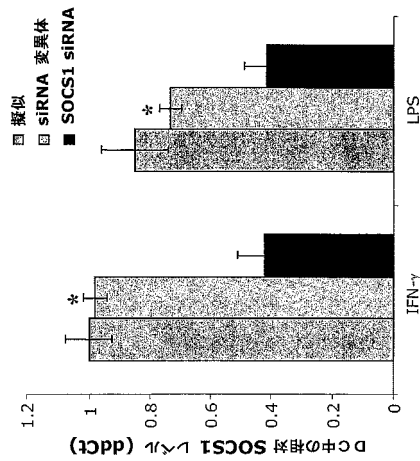


Fig. 1B

【 図 2 】

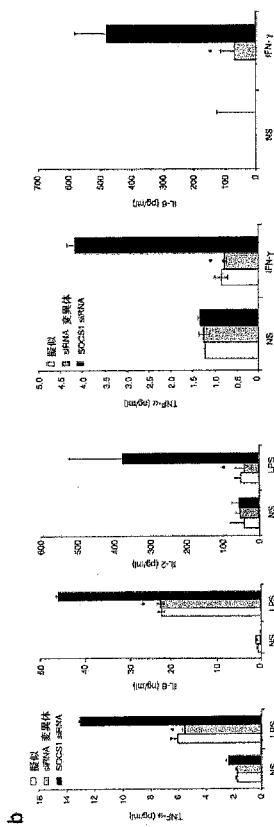


Fig. 2

【 図 3 】

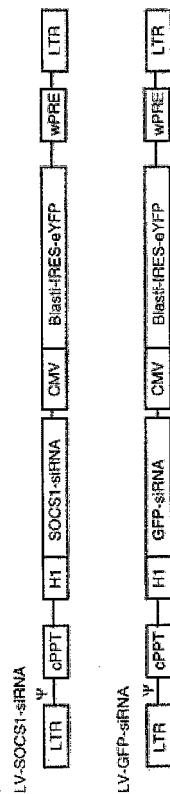


Fig. 3

【 図 4 A - 4 B 】

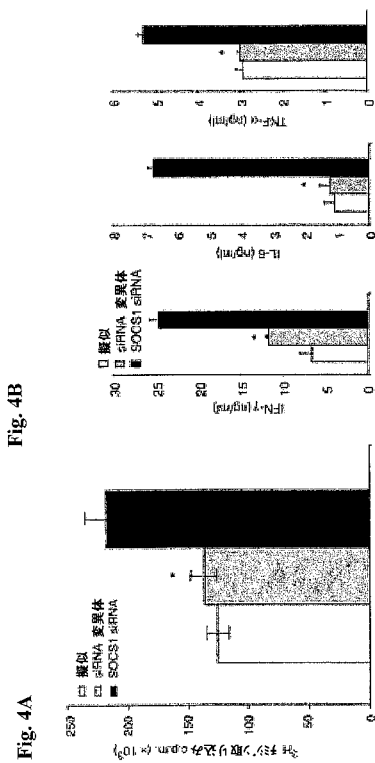


Fig. 4B

Fig. 4A

【 図 5 A 】

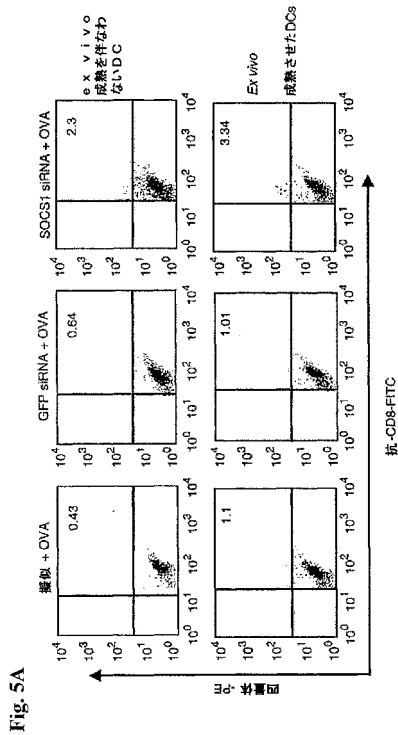
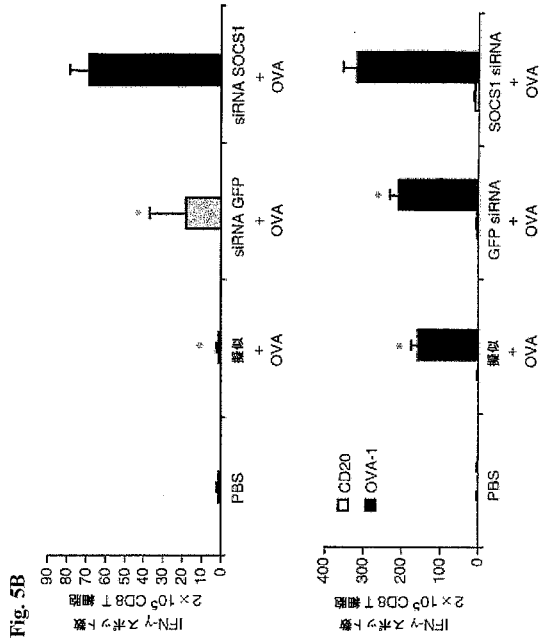
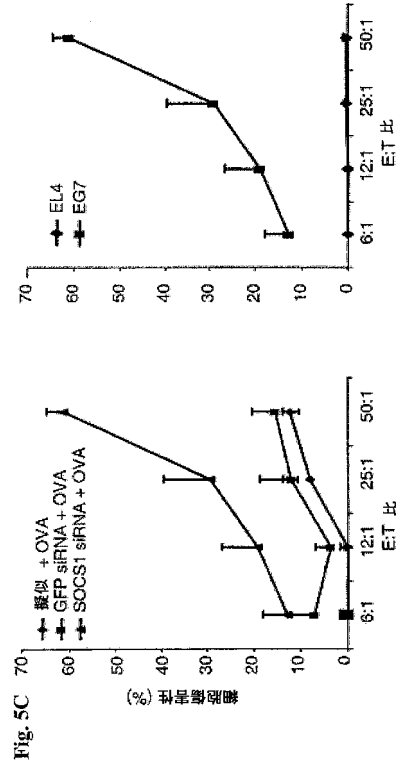


Fig. 5A

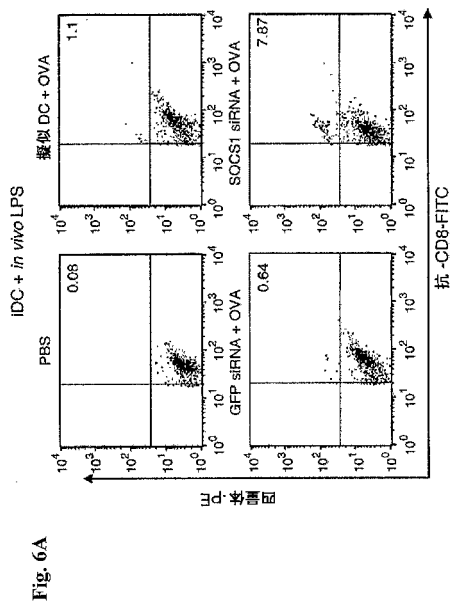
【 図 5 B 】



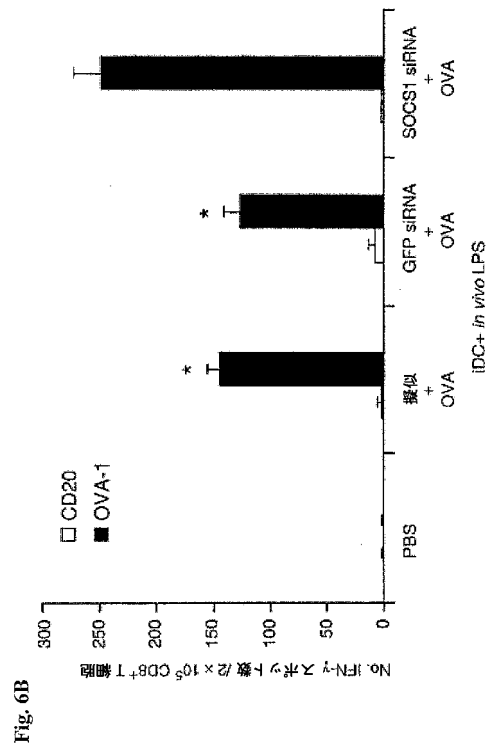
【 図 5 C 】



【 図 6 A 】



【 図 6 B 】



【 図 6 C 】

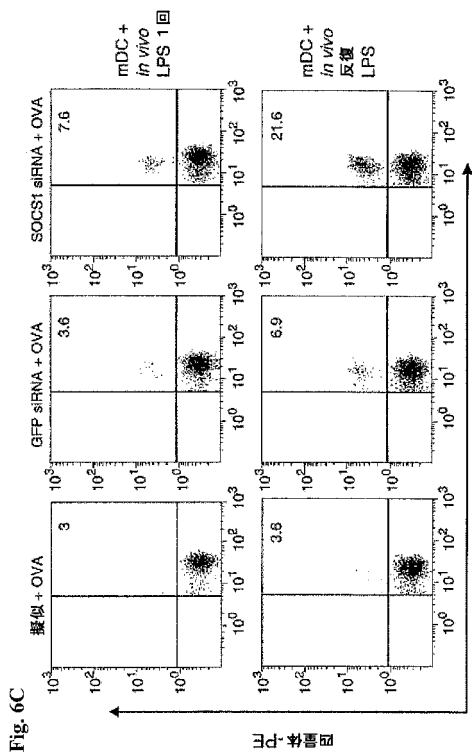


Fig. 6C

【 図 6 D 】

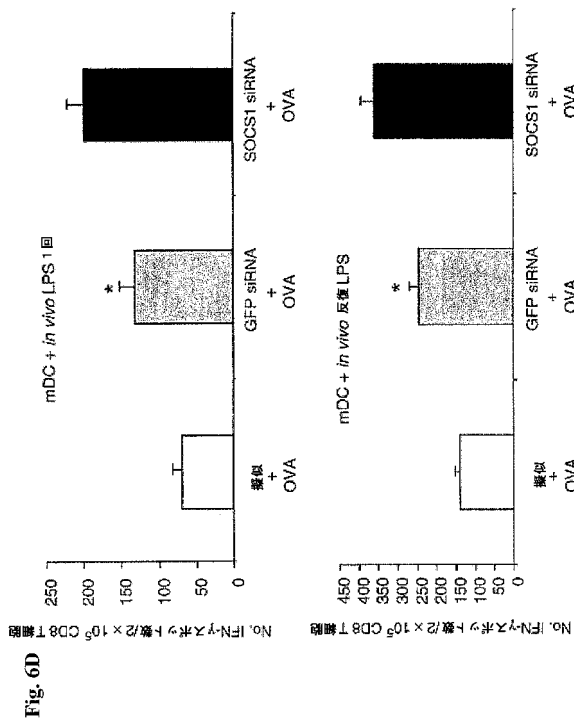


Fig. 6D

【 図 6 E 】

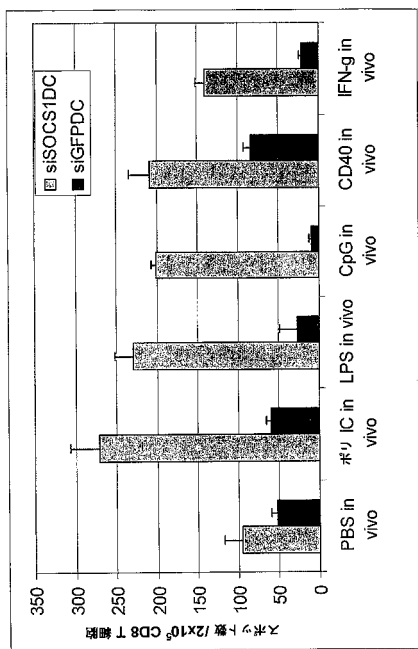


Fig. 6E

【 図 7 A 】

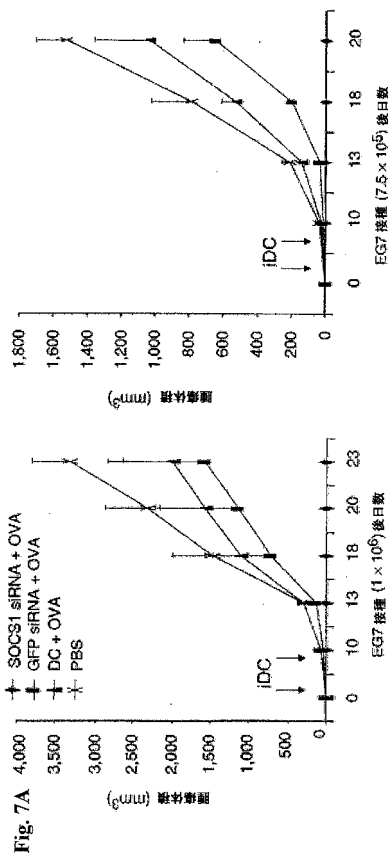
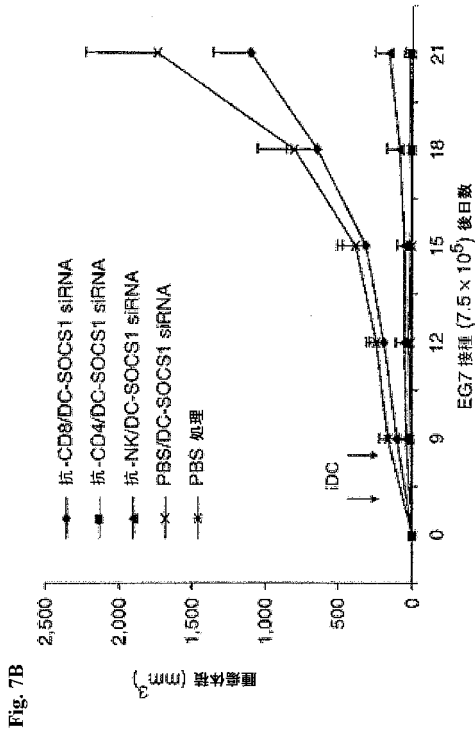
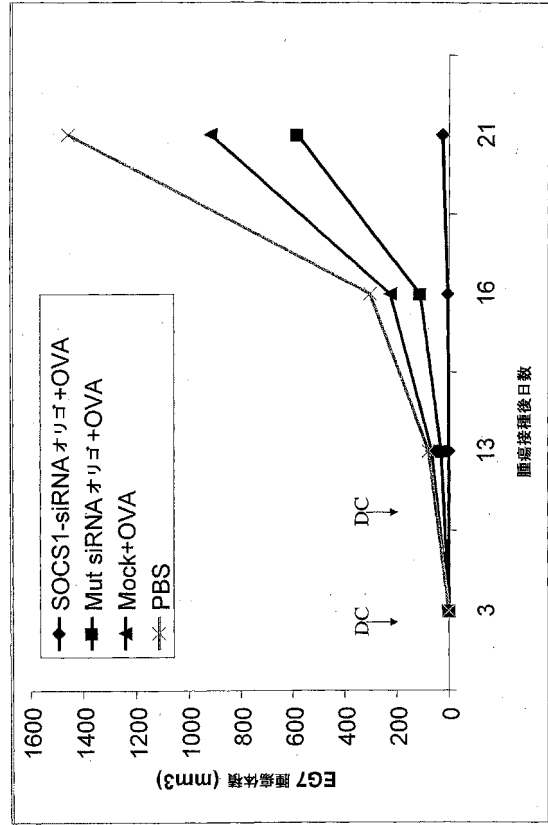


Fig. 7A

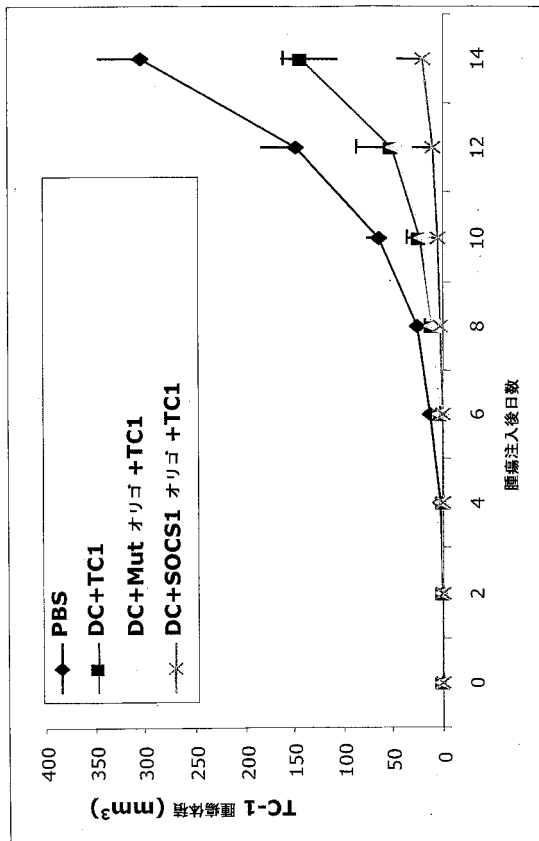
【 図 7 B 】



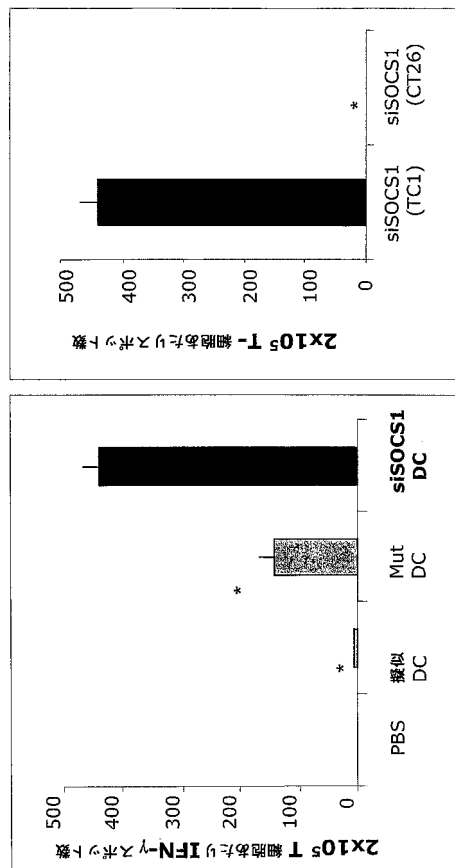
【 図 7 C 】



【 図 7 D 】



【 図 7 E 】



【 図 8 A 】

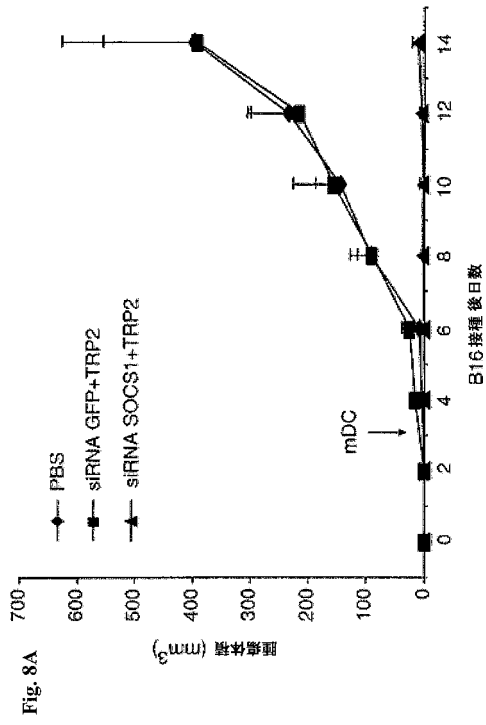


Fig. 8A

【 図 8 B 】

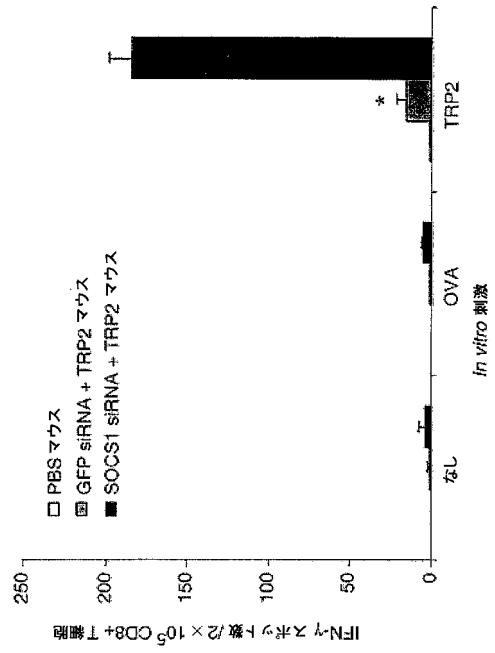


Fig. 8B

【 図 8 C 】

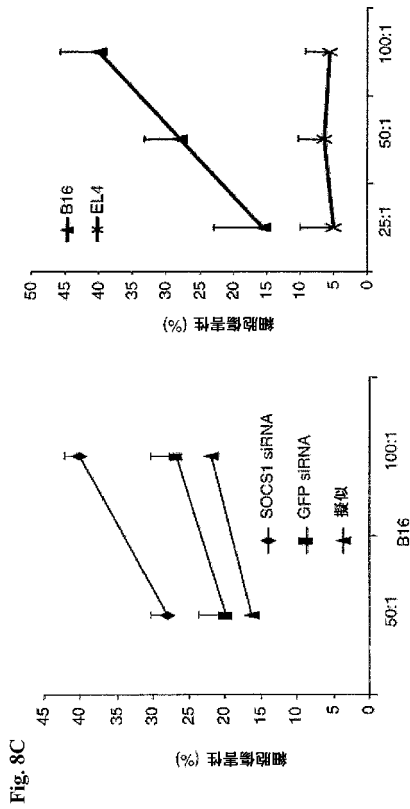


Fig. 8C

【 図 9 A 】

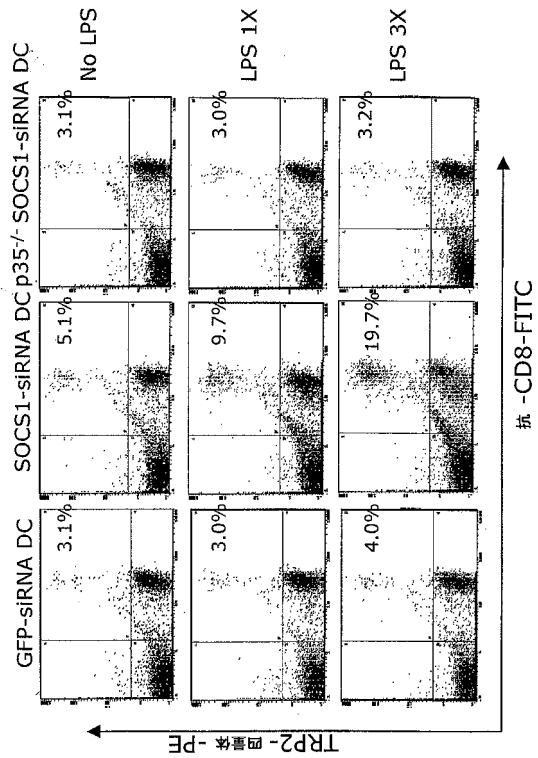


Fig. 9A

【 図 9 B 】

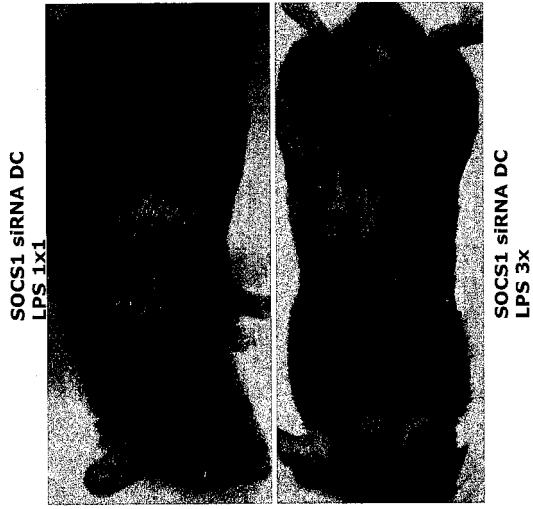


Fig. 9B

【 図 9 C 】

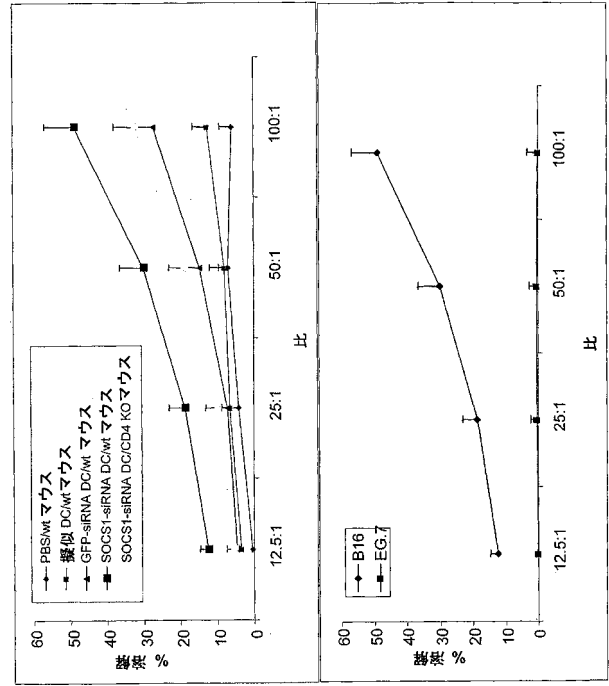


Fig. 9C

【 図 10 A 】

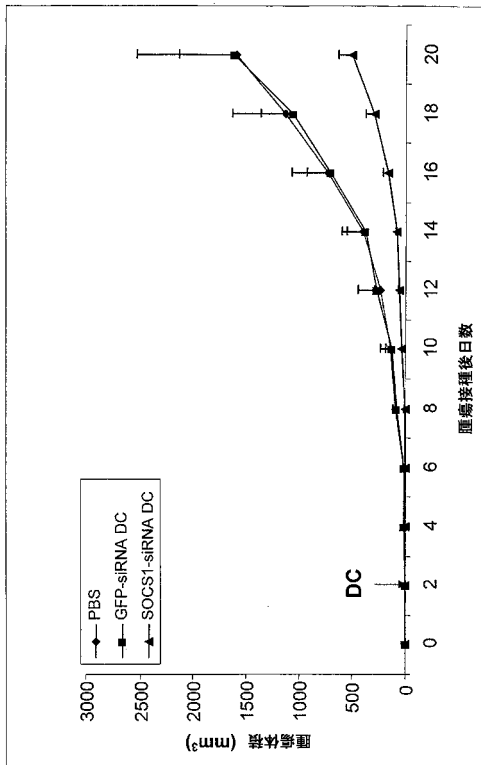


Fig. 10A

【 図 10 B 】

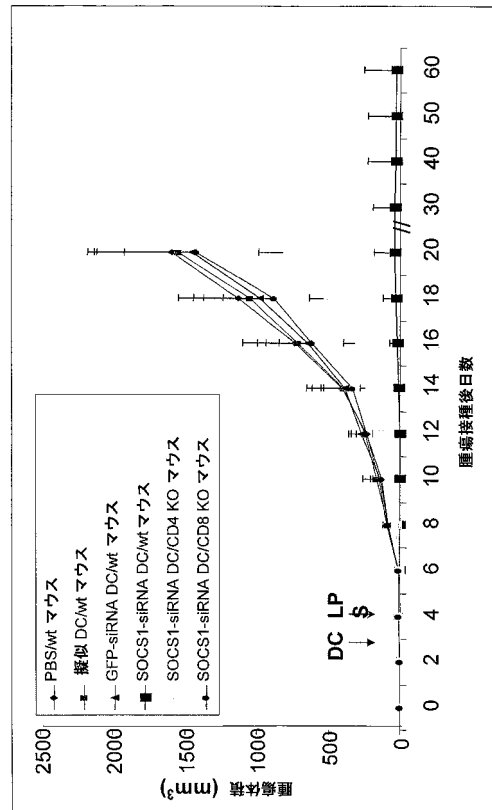


Fig. 10B

【 図 1 0 C 】

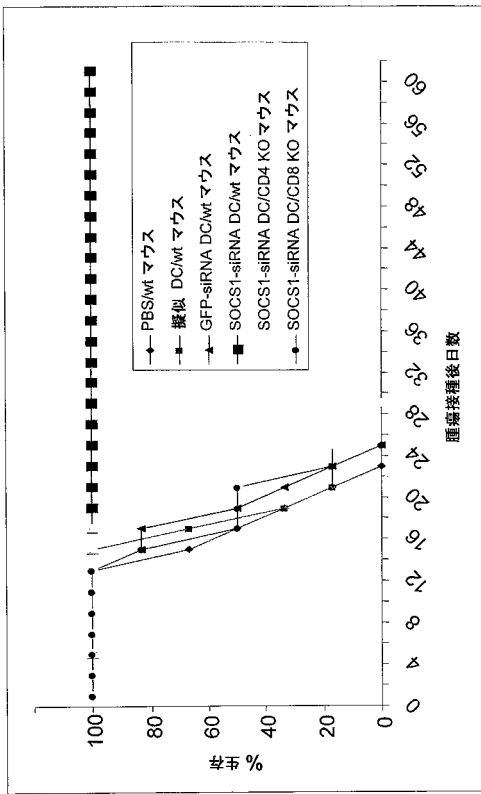


Fig. 10C

【 図 1 0 D 】

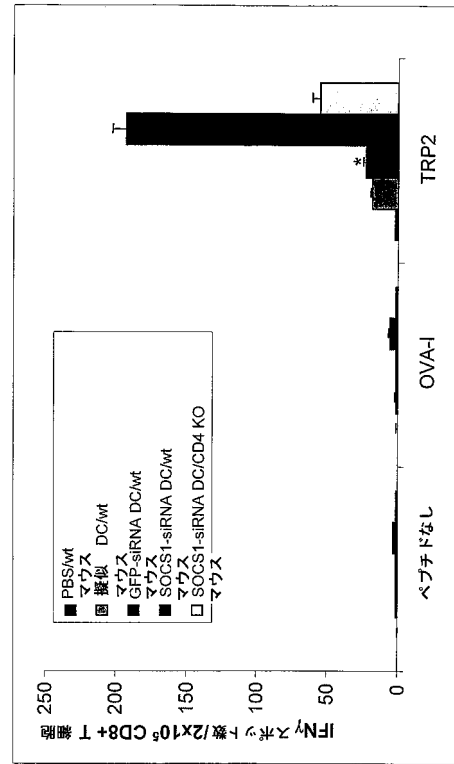


Fig. 10D

【 図 1 1 A - 1 】

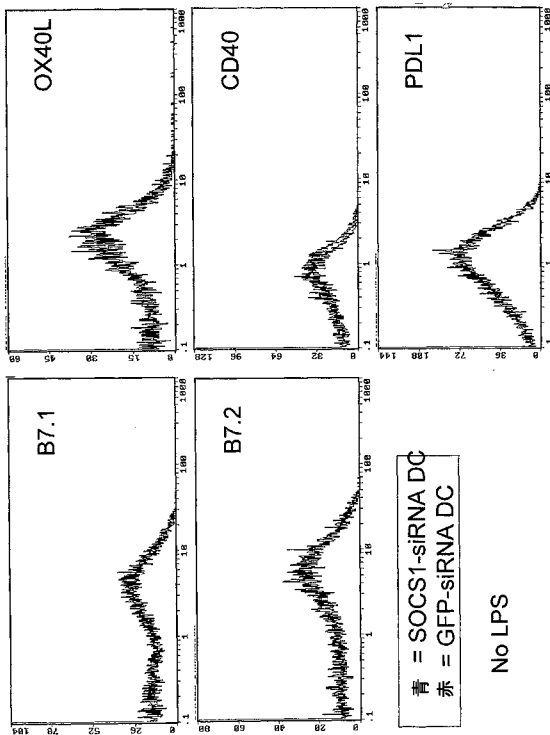


Fig. 11A-1

【 図 1 1 A - 2 】

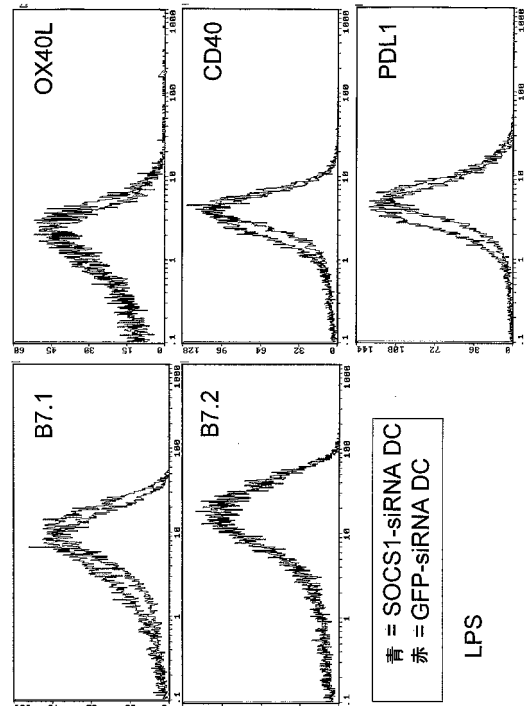


Fig. 11A-2

【 図 1 1 B 】

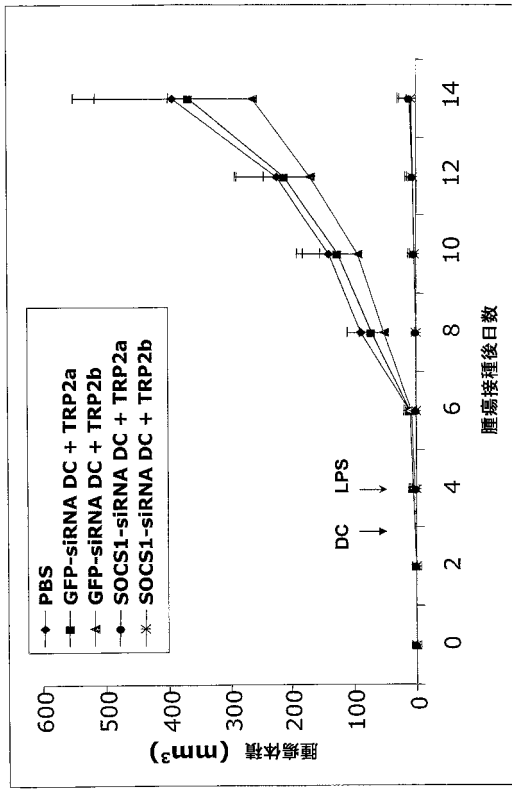


Fig. 11B

【 図 1 1 C 】

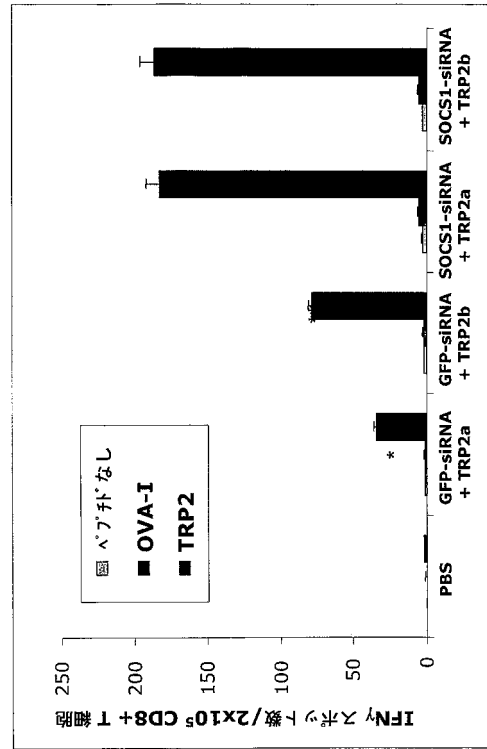


Fig. 11C

【 図 1 2 A 】

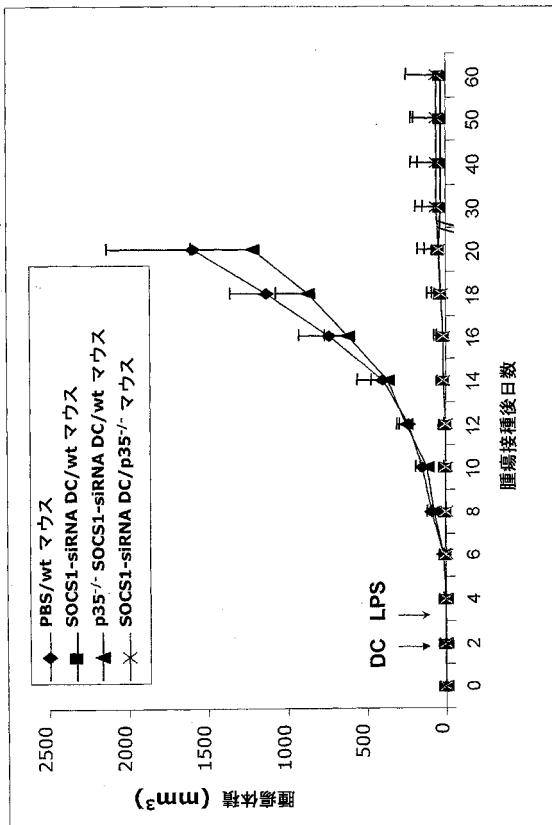


Fig. 12A

【 図 1 2 B 】

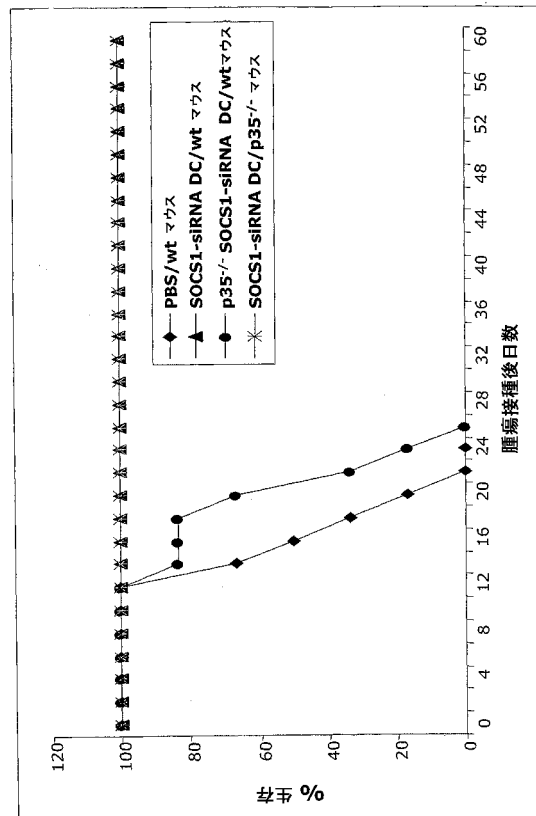


Fig. 12B

【 図 1 2 C 】

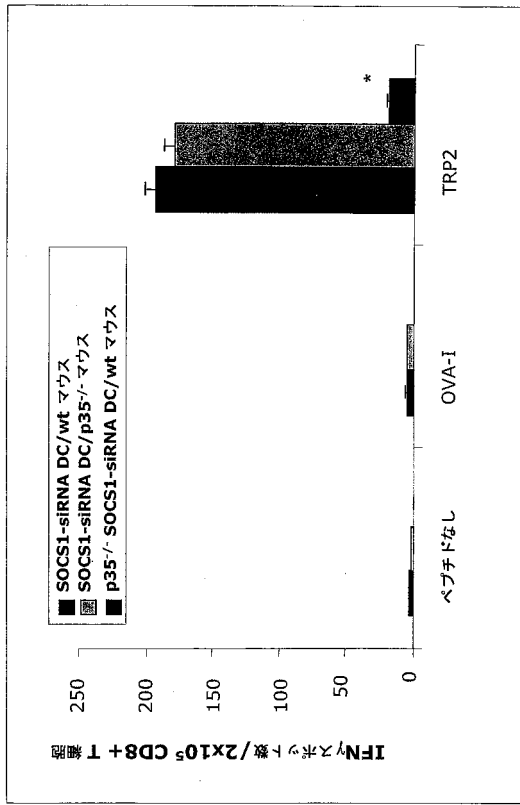


Fig. 12C

【 図 1 2 D 】

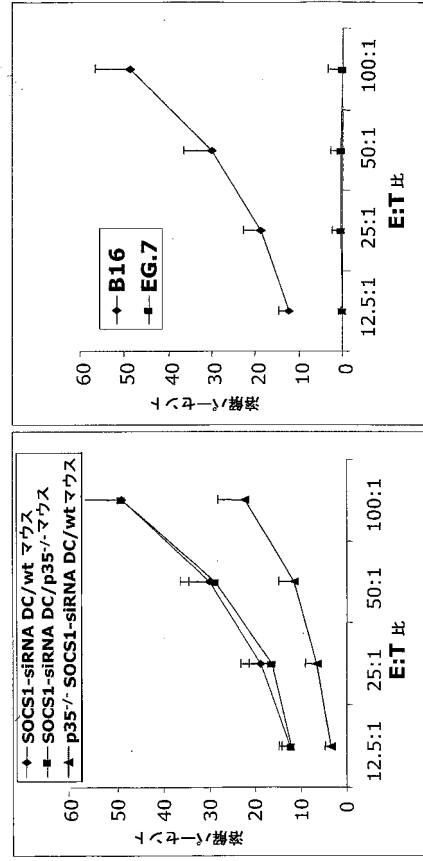


Fig. 12D

【 図 1 3 A 】

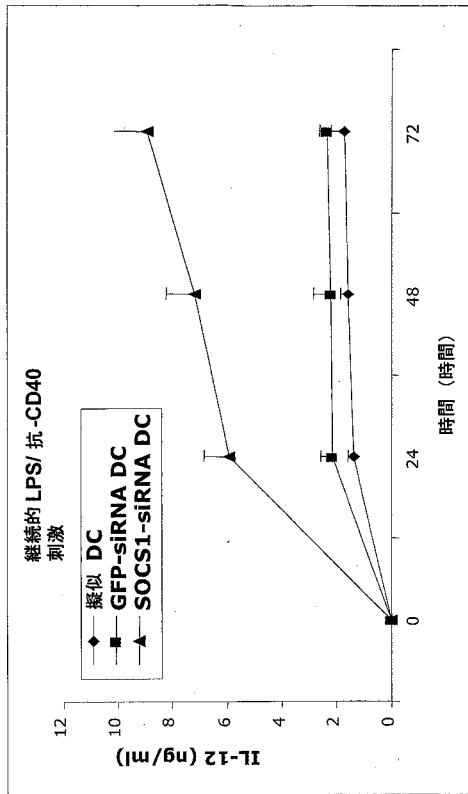


Fig. 13A

【 図 1 3 B 】

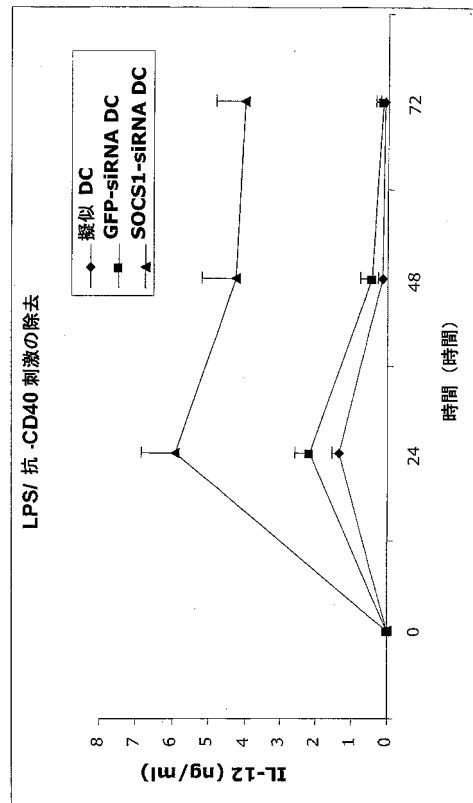


Fig. 13B

【 図 1 3 C 】

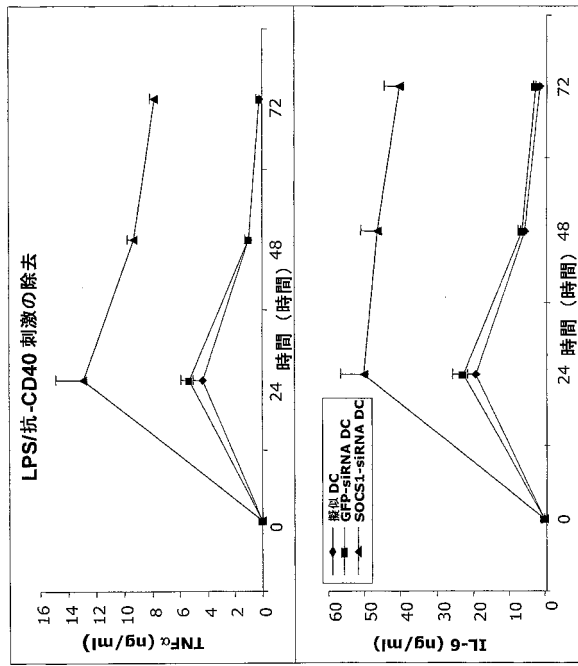


Fig. 13C

【 図 1 3 D 】

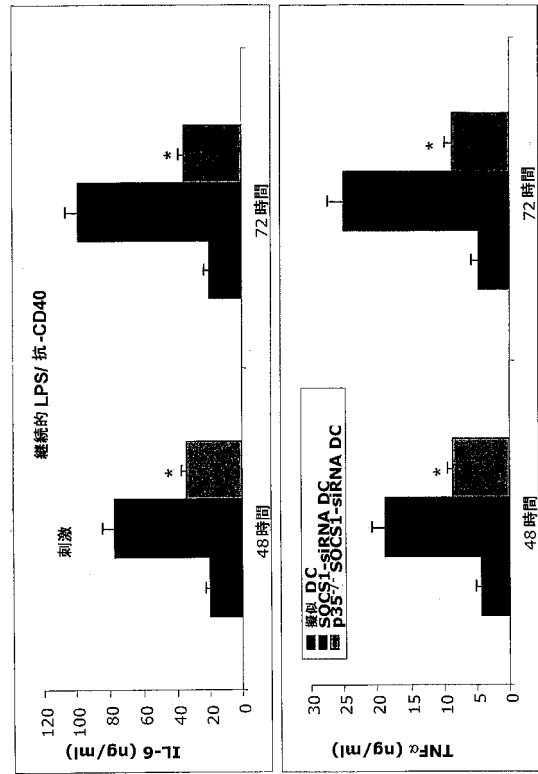


Fig. 13D

【 図 1 4 A 】

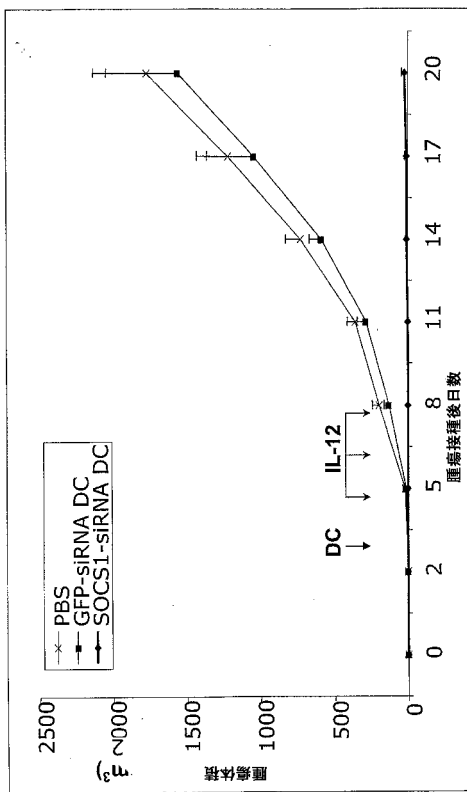


Fig. 14A

【 図 1 4 B 】

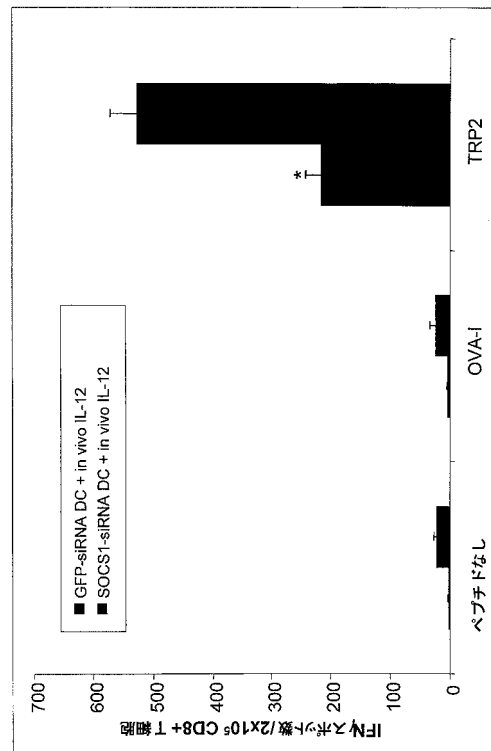


Fig. 14B

【 図 1 5 A 】

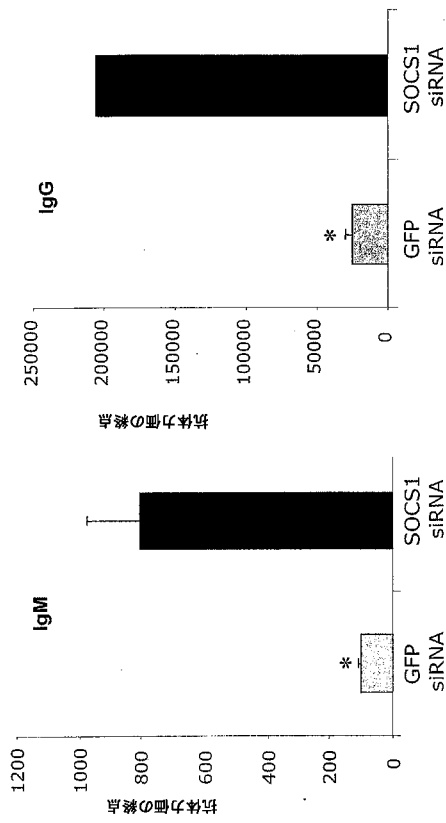


FIG. 15A

【 図 1 5 B 】

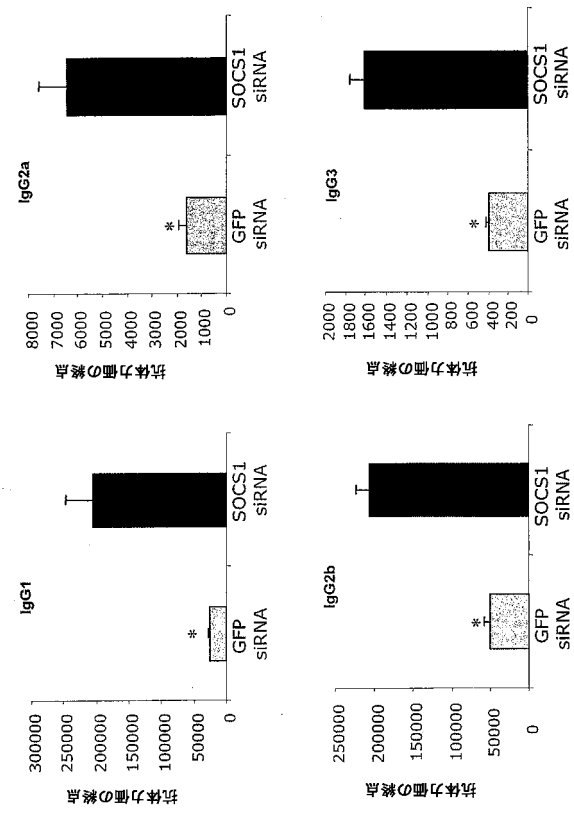


FIG. 15B

【 図 1 5 C 】

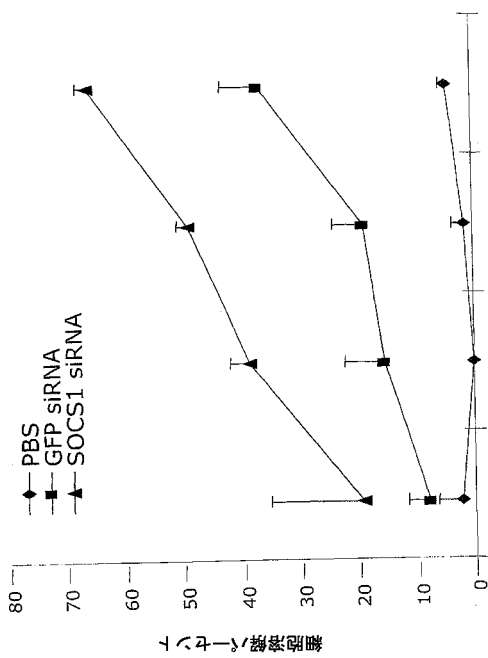


FIG. 15C

【 図 1 5 D 】

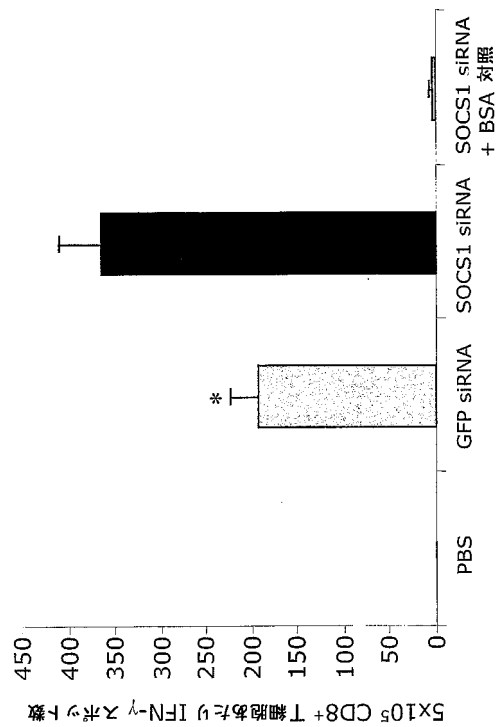
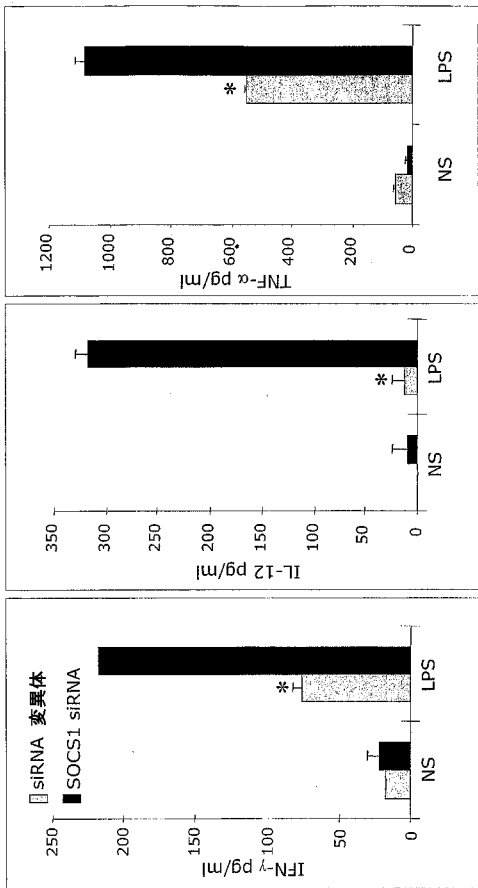


FIG. 15D

【 図 16 A - 1 】



【 図 16 B 】

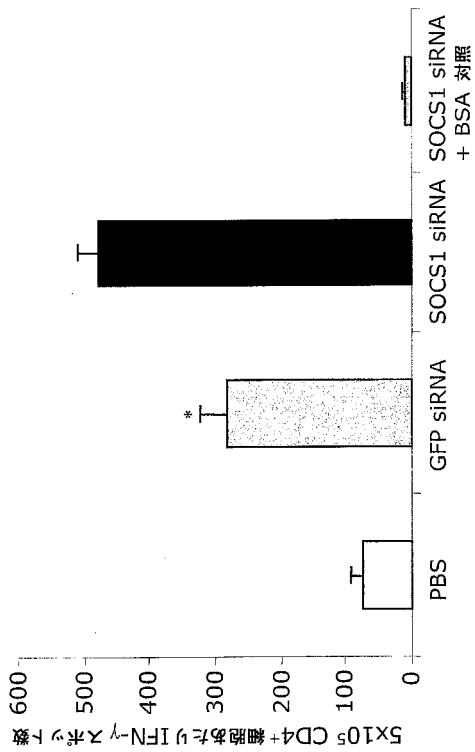


FIG. 16A-1

【 図 16 A - 2 】

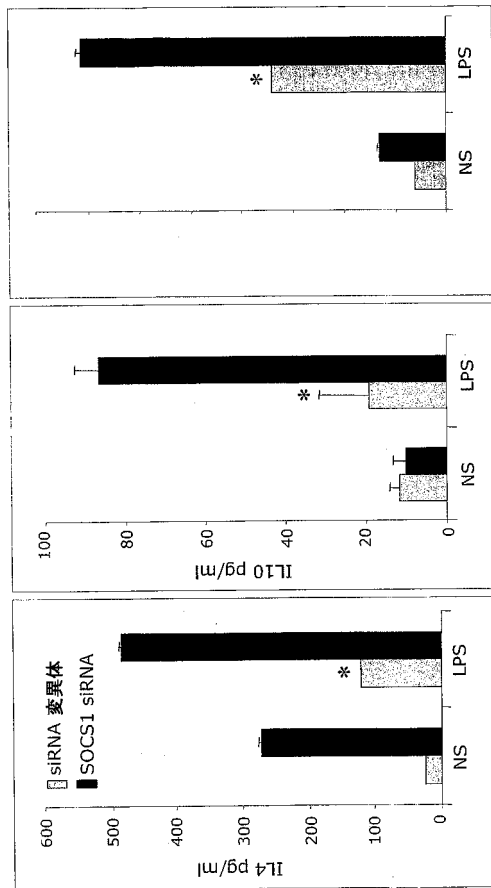


FIG. 16A-2

【 図 16 C 】

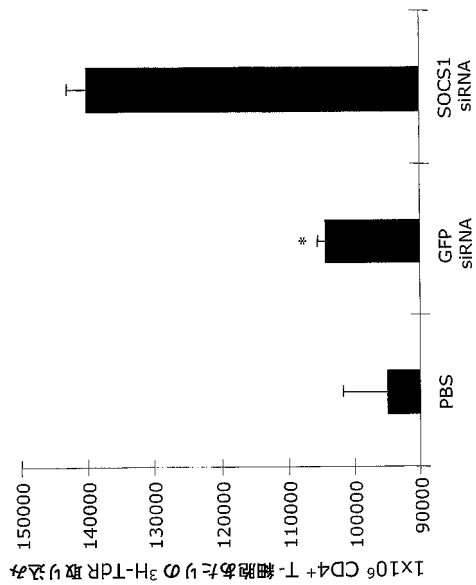


FIG. 16C

FIG. 16B

【 図 16 D 】

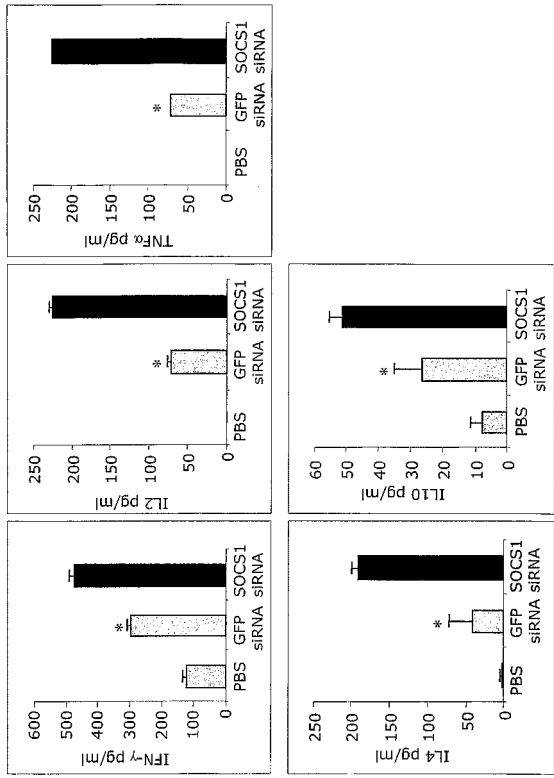


FIG. 16D

【 図 17 A 】

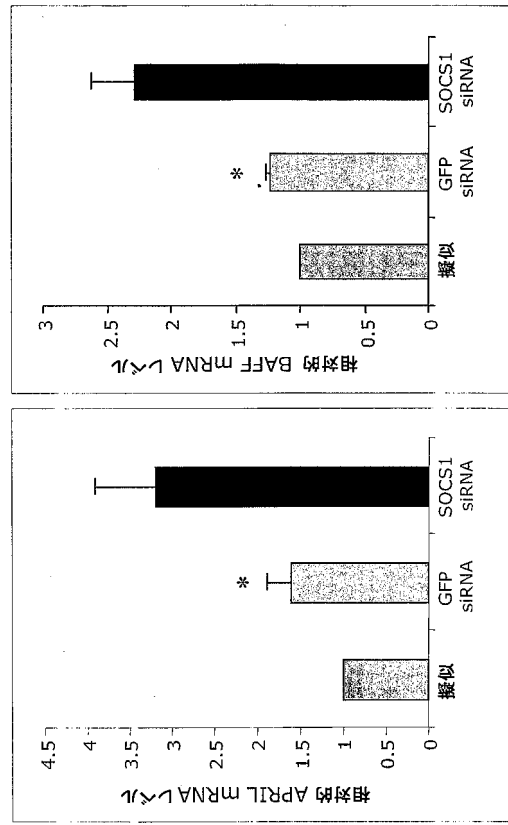


FIG. 17A

【 図 17 B 】

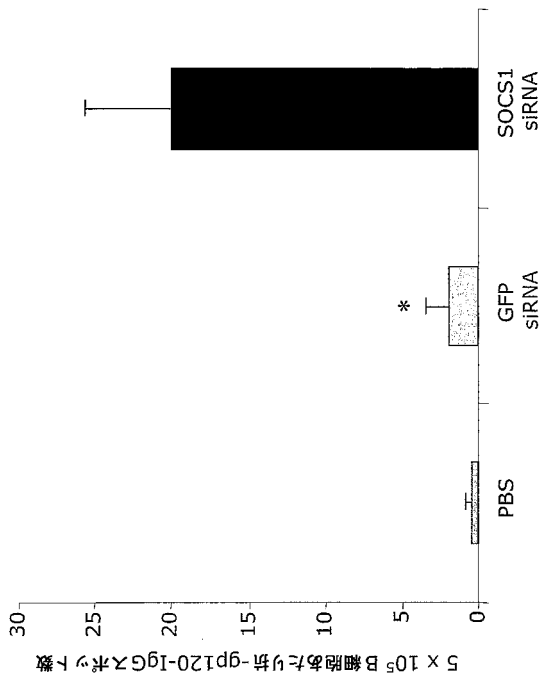


FIG. 17B

【 図 17 C 】

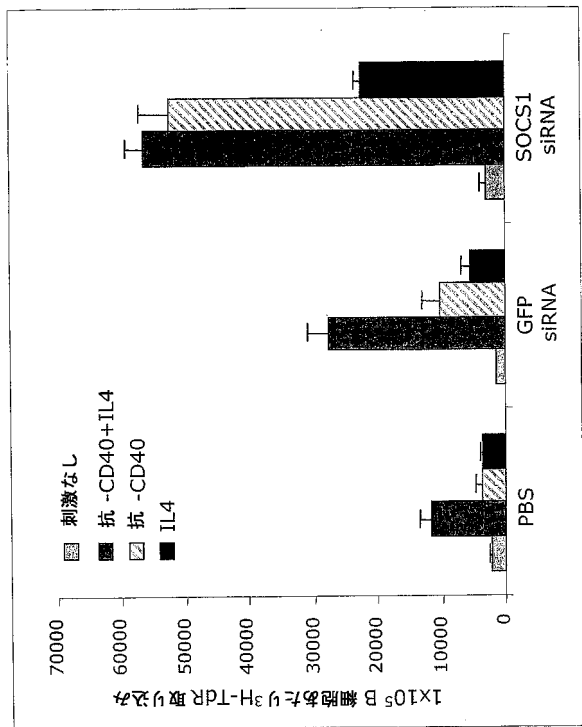
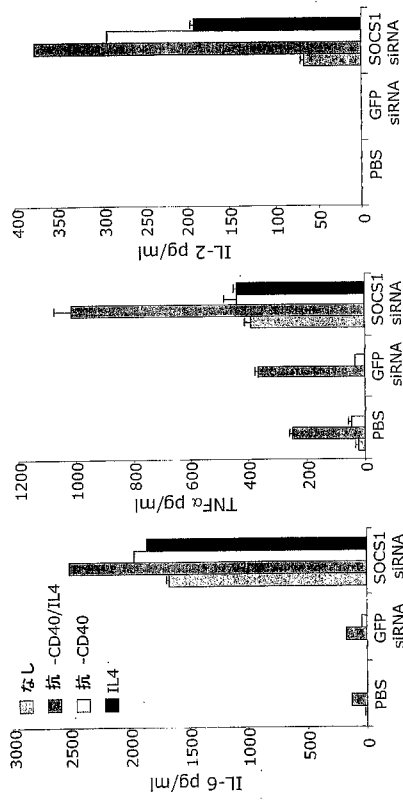


FIG. 17C

【 図 17 D 】



【 図 18 B 】

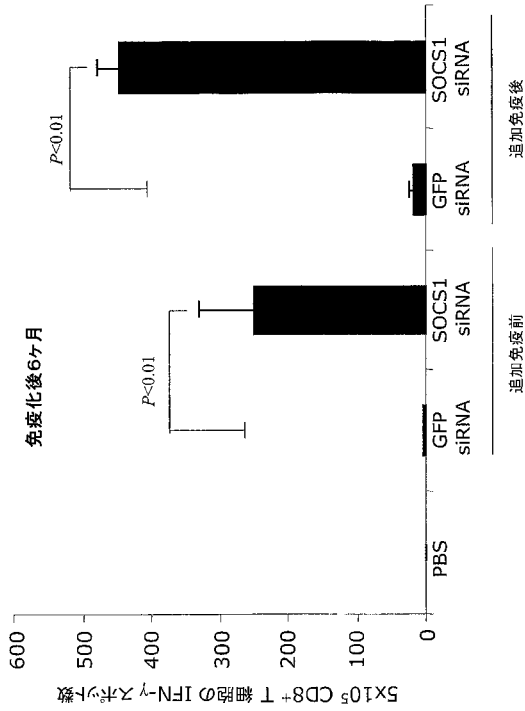
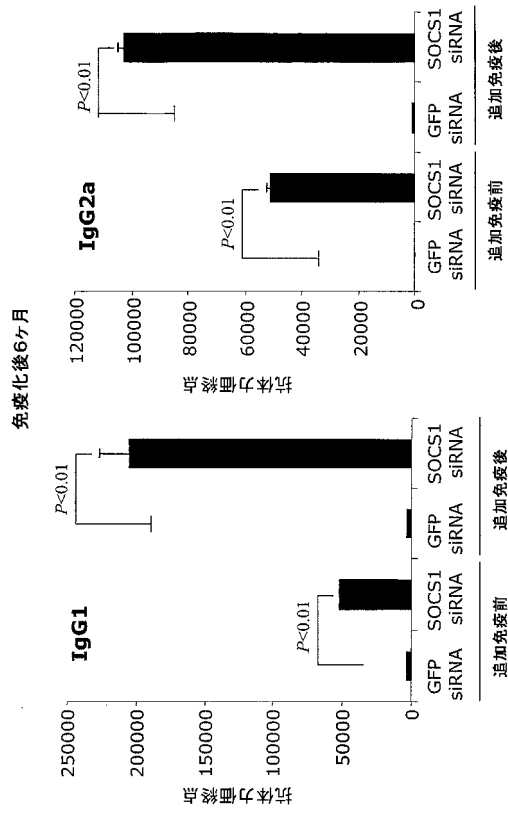


FIG. 17D

【 図 18 A 】



【 図 18 C 】

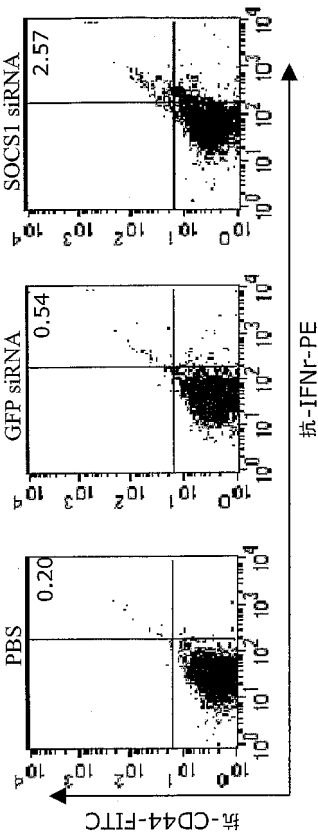
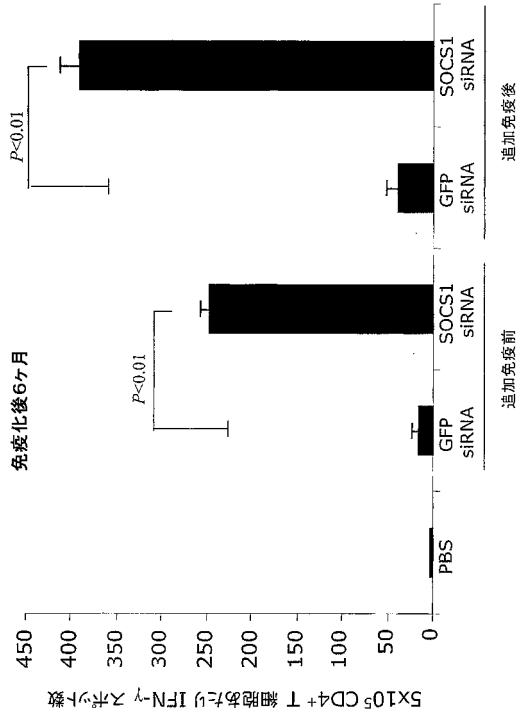


FIG. 18B

FIG. 18A

FIG. 18C

【 図 1 8 D 】



【 図 1 9 A 】

FIG. 18D

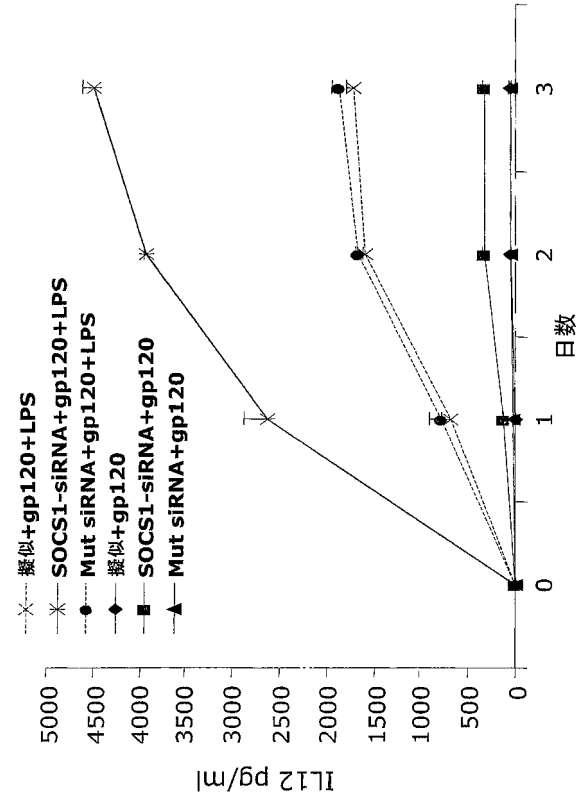


FIG. 19A

【 図 1 9 B 】

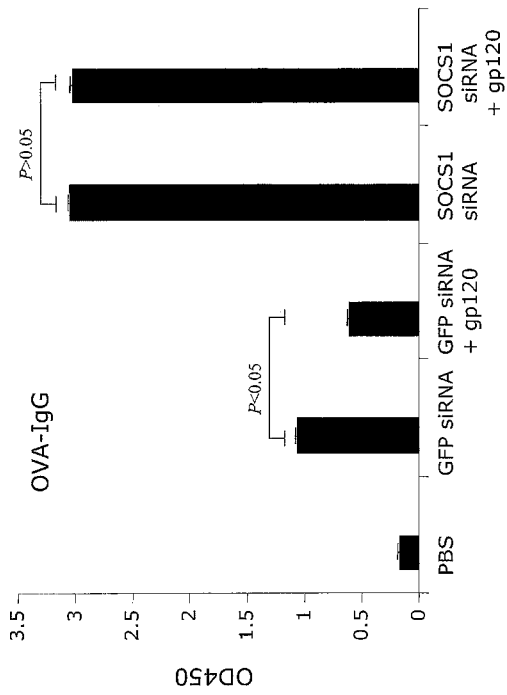


FIG. 19B

【 図 1 9 C 】

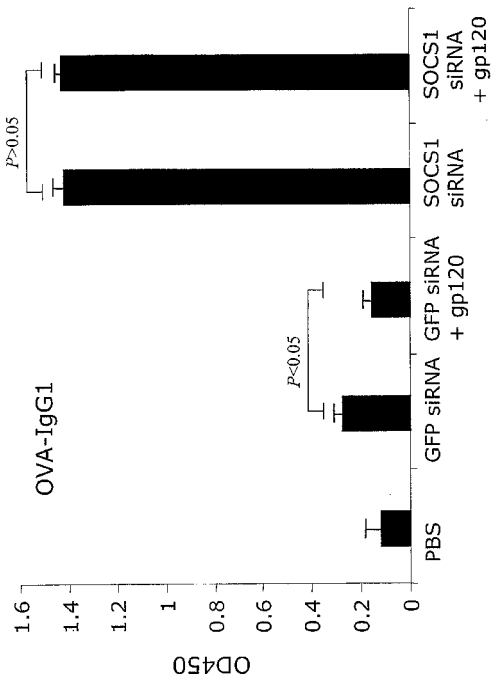


FIG. 19C

【 図 19 D 】

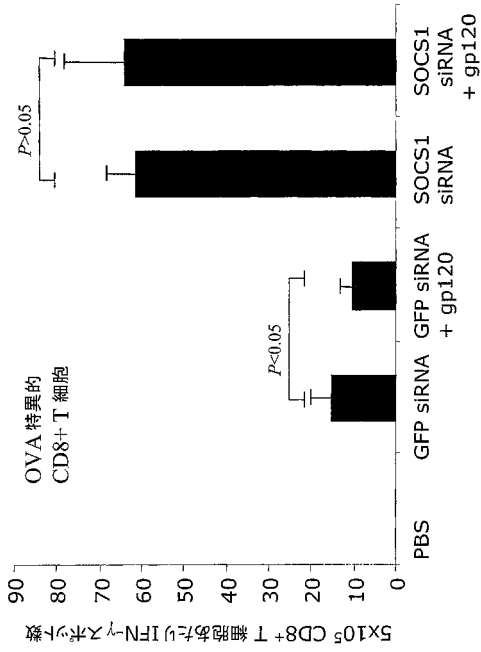


FIG. 19D

【 図 19 E 】

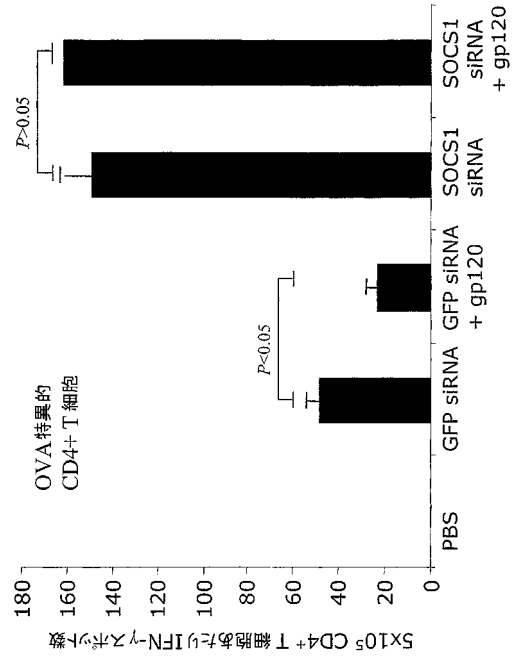


FIG. 19E

【 図 20 A 】

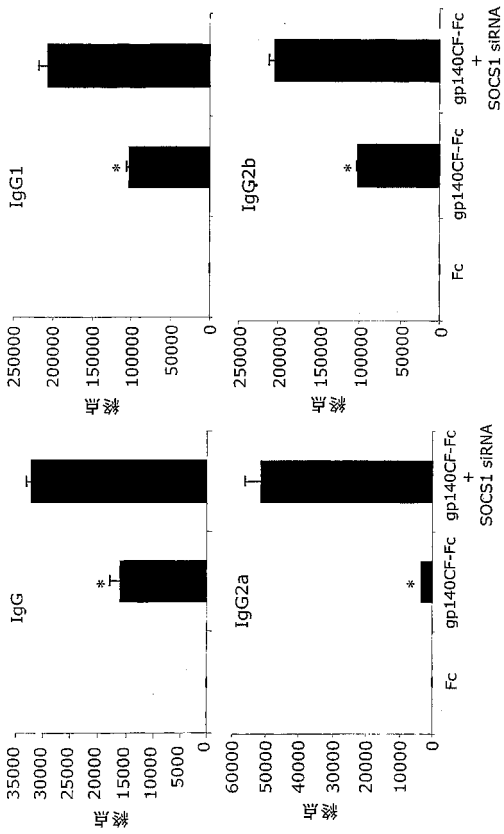


FIG. 20A

【 図 20 B 】

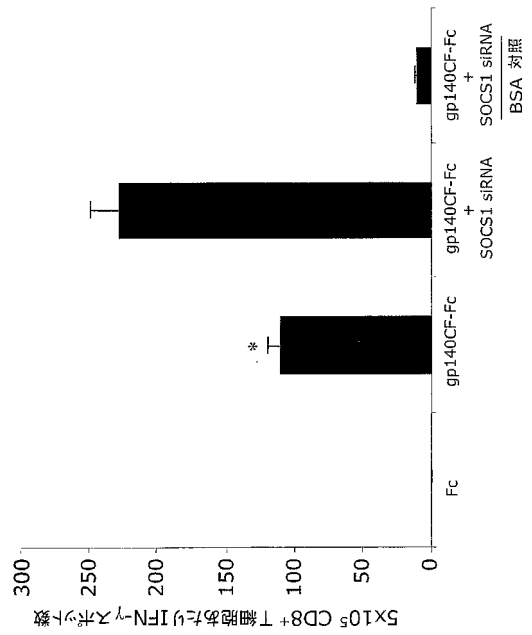
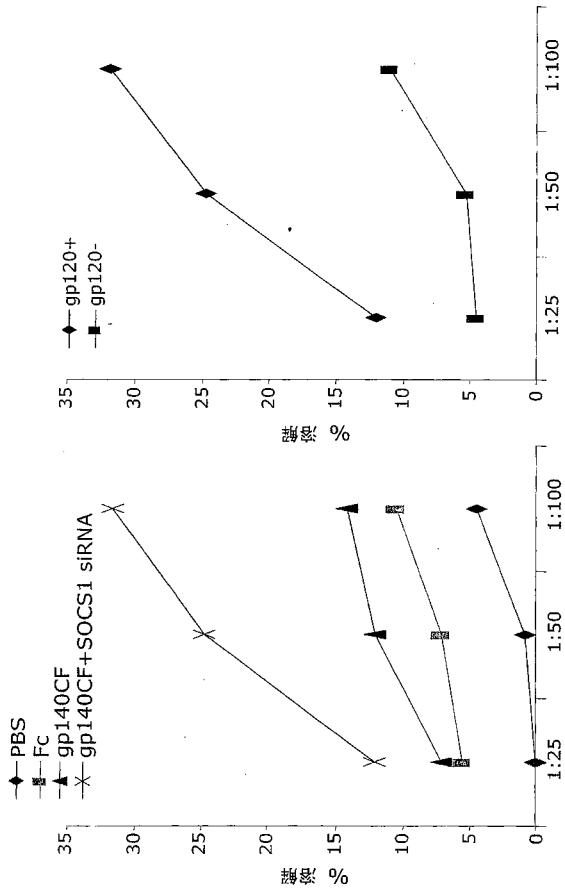


FIG. 20B

【 図 2 0 C 】



【 図 2 1 A 】

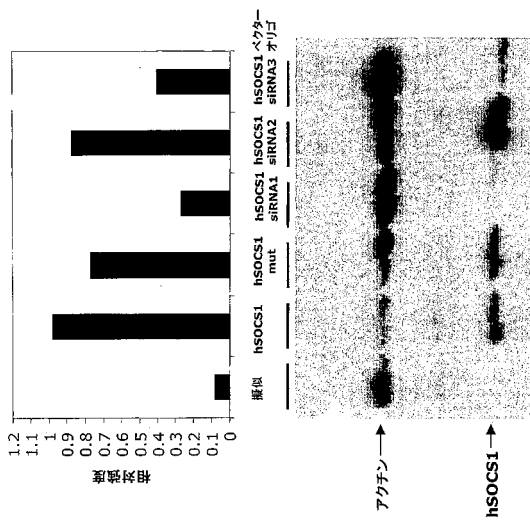


FIG. 21A

【 図 2 0 D 】

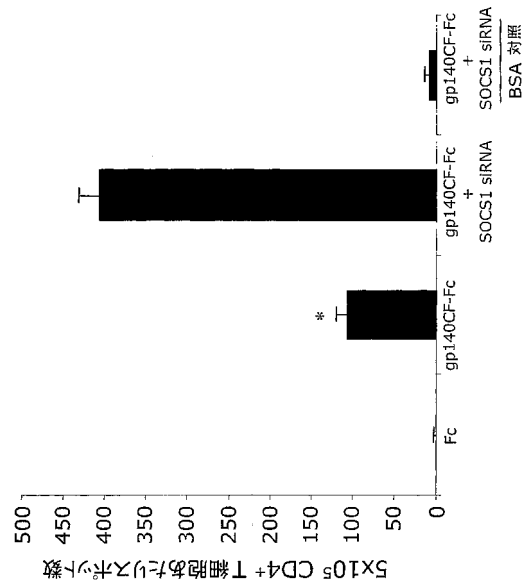


FIG. 20C

FIG. 20D

【 図 2 1 B 】

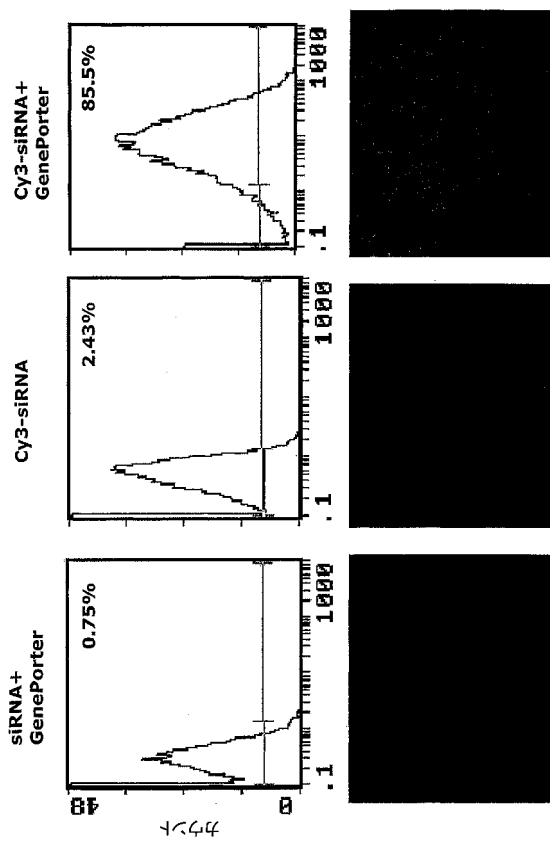


FIG. 21B

【 図 2 1 C 】

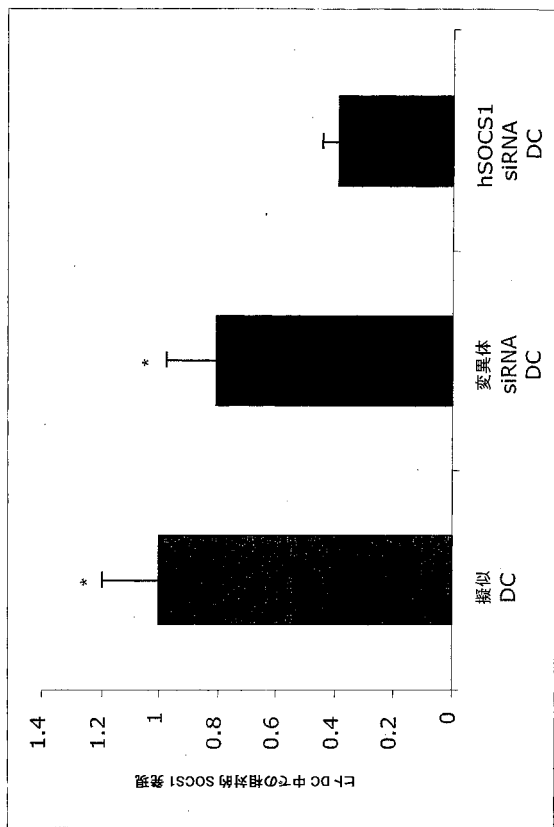


FIG. 21C

【 図 2 2 A 】

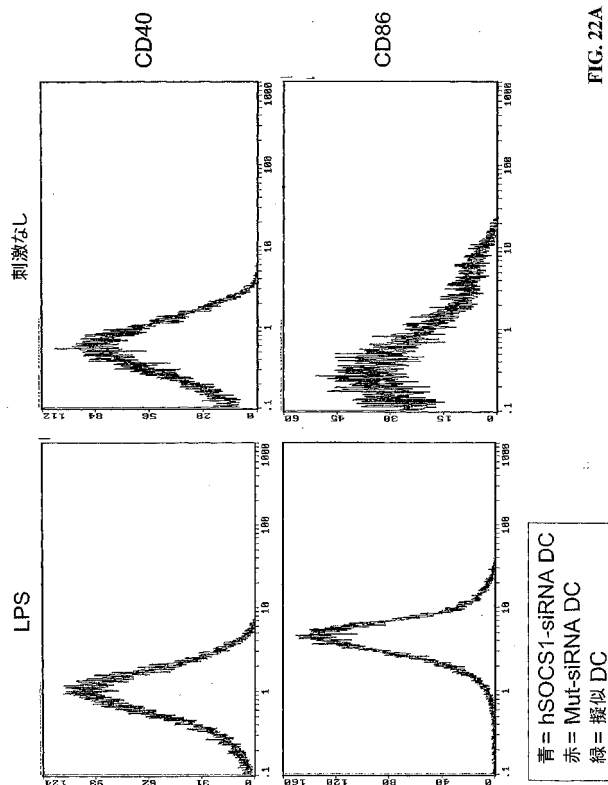


FIG. 22A

【 図 2 2 B 】

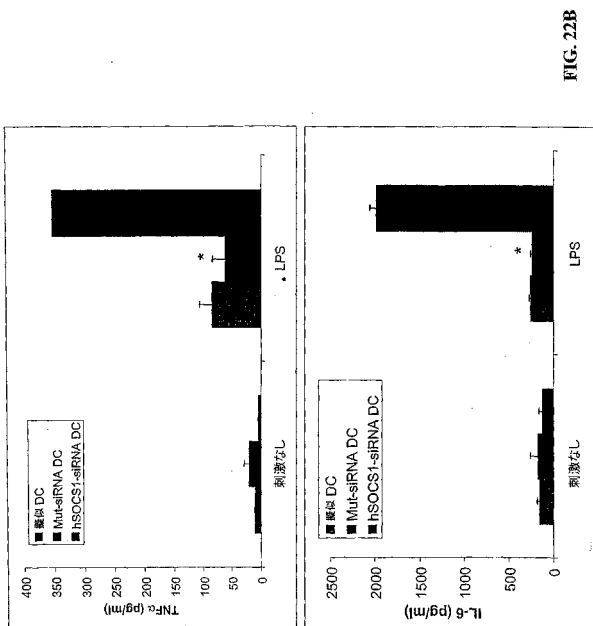


FIG. 22B

【 図 2 2 C 】

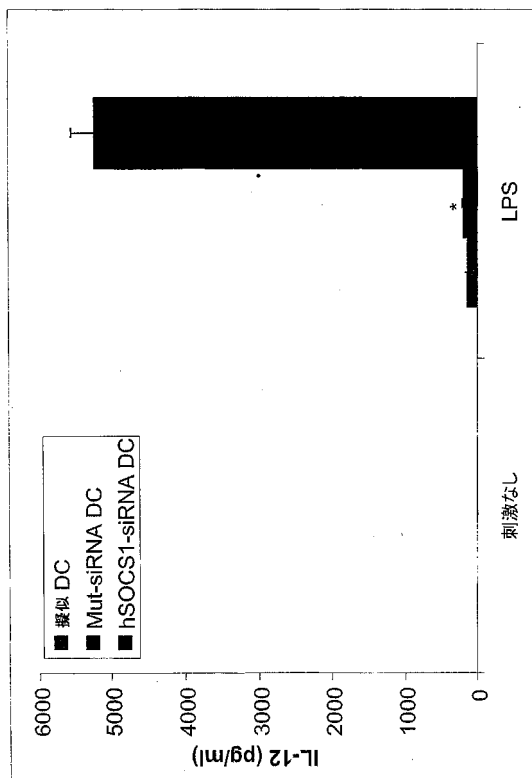


FIG. 22C

【 図 2 3 A 】

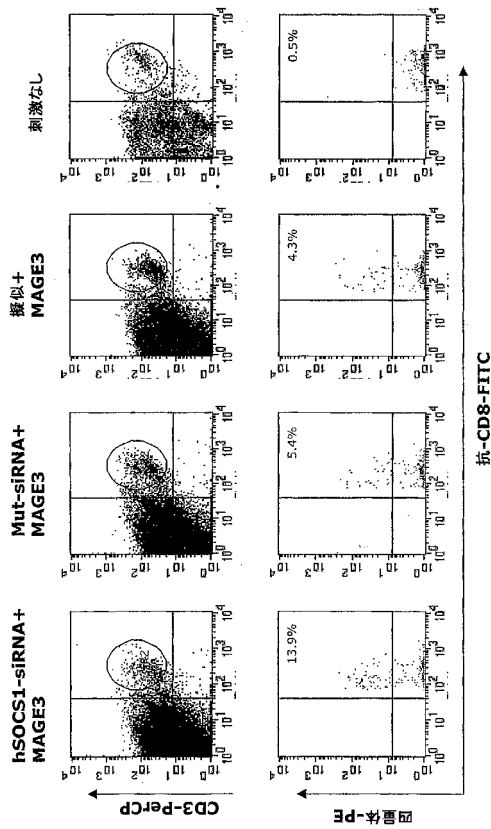


FIG. 23A

【 図 2 3 B 】

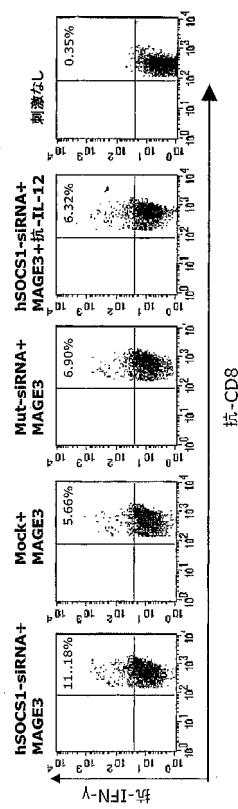


FIG. 23B

【 図 2 3 C 】

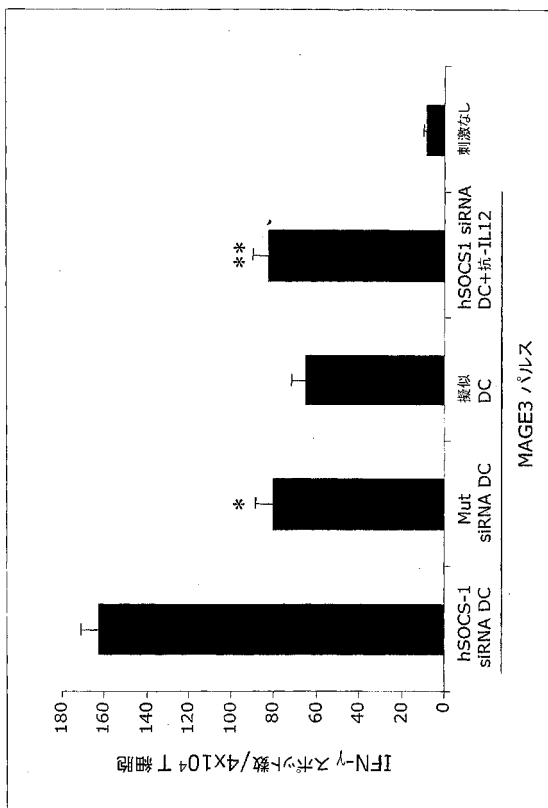


FIG. 23C

【 図 2 4 】

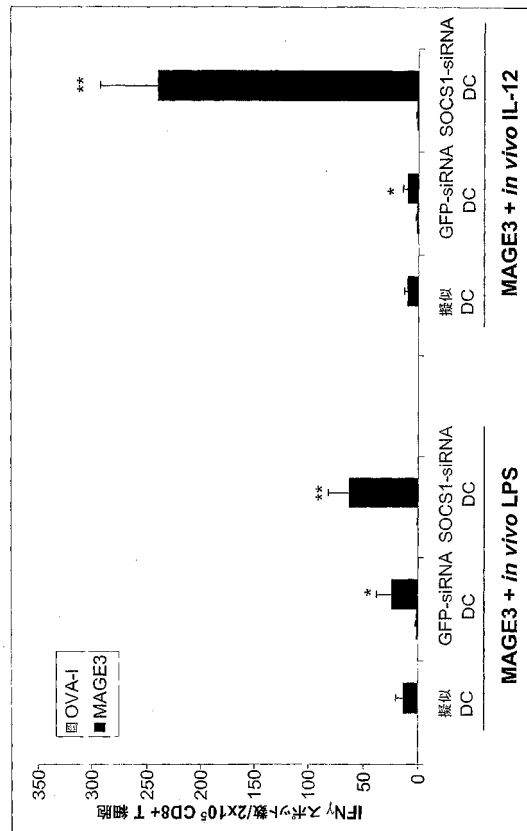


FIG. 24

【 図 2 5 A 】

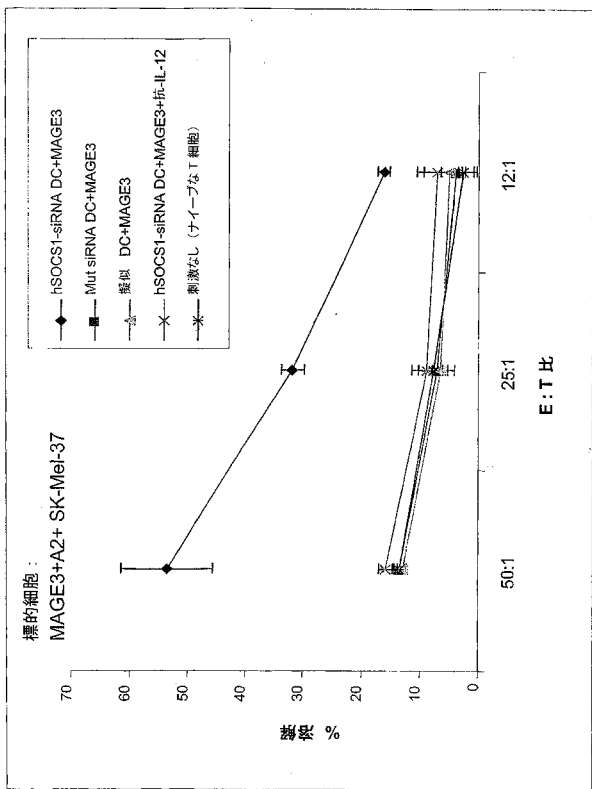


FIG. 25A

【 図 2 5 B 】

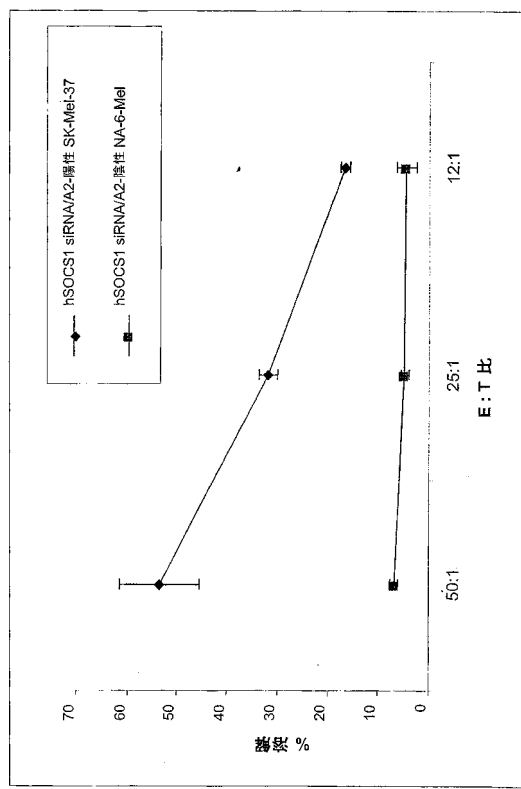


FIG. 25B

【 図 2 6 A 】

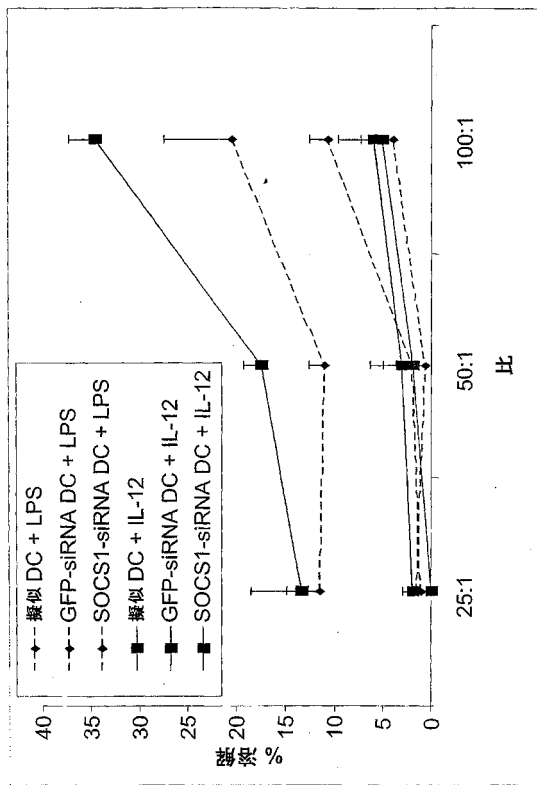


FIG. 26A

【 図 2 6 B 】

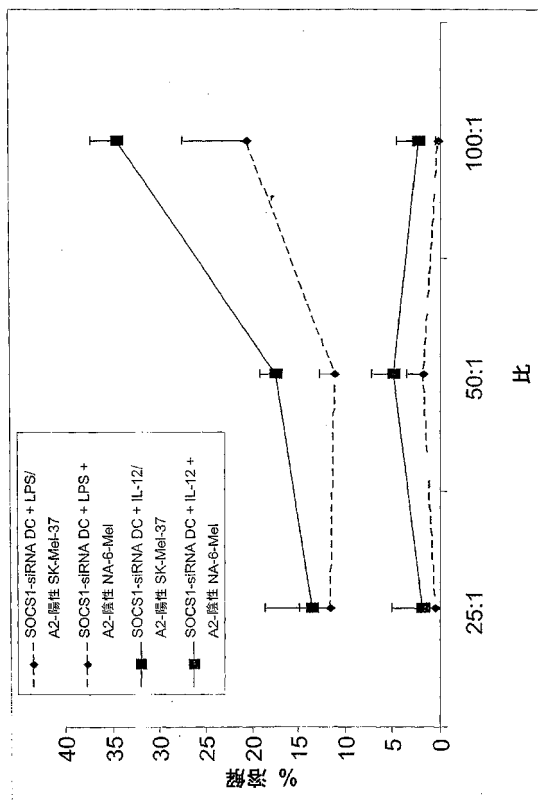


FIG. 26B

【 図 27 A 】

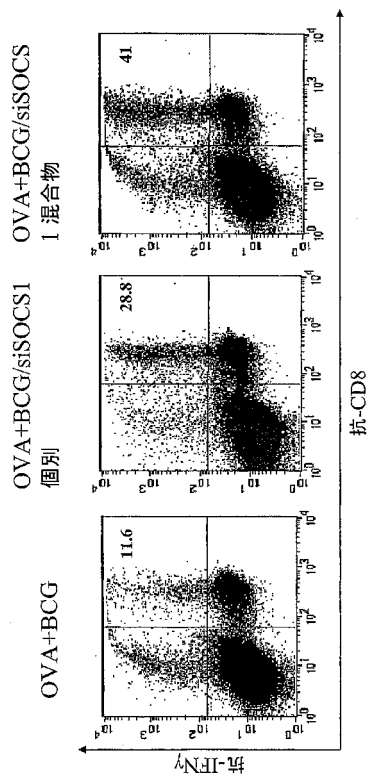


Figure 27A

【 図 27 B 】

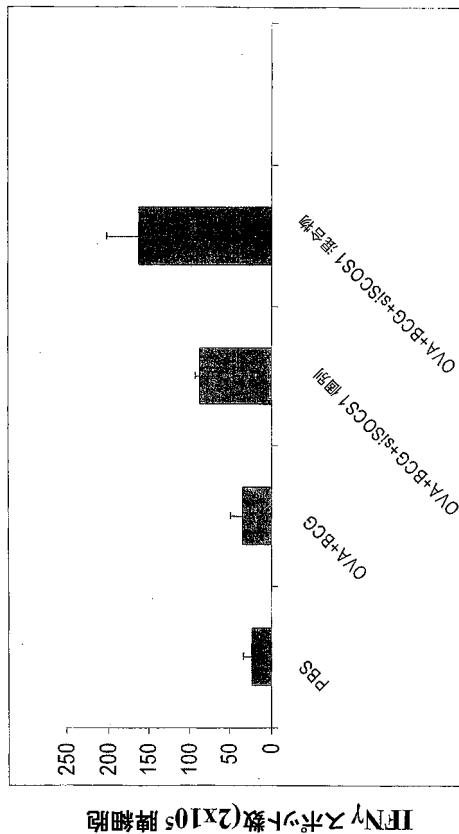


Figure 27B

【 図 28 】

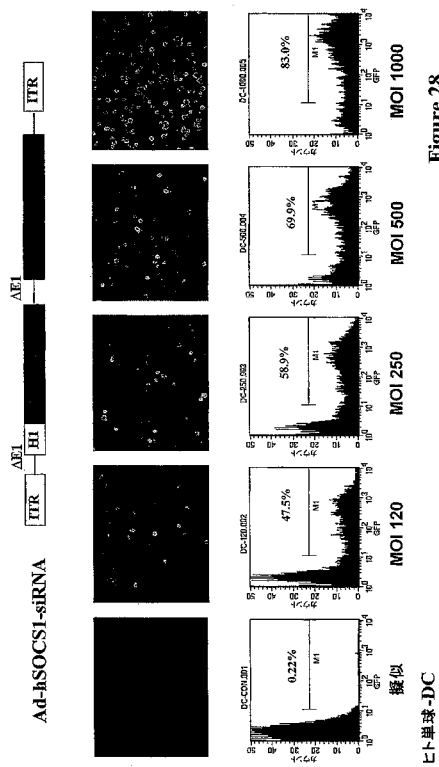


Figure 28

【 図 29 】

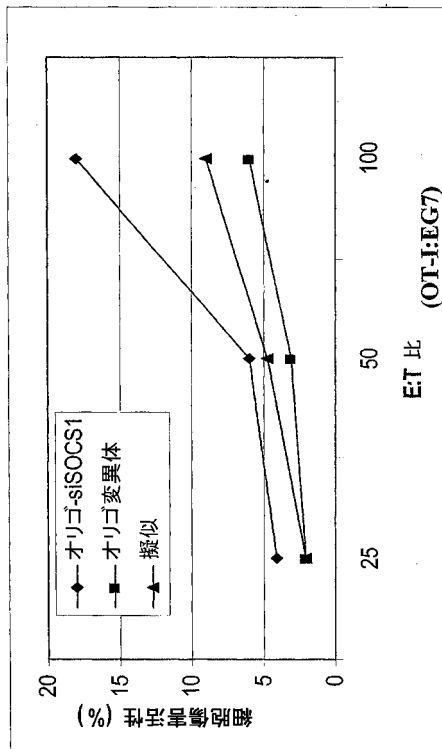


Figure 29

siRNA オリゴでトランスフェクトした未刺激の OT-I T 細胞

【 図 30 】

Figure 30

E₁-PIAS1	
SEQ ID NO:28	CCACCAGTCCTCAAATAAA
SEQ ID NO:29	TGATTGACCTAACCATAGA
SEQ ID NO:30	GACACAAGCTACATTAATA
SEQ ID NO:31	TGACGCAACTCTTTACATT
SEQ ID NO:32	CCAGCCGACCAATTAATAT
SEQ ID NO:33	TTACGACTTACAAGGATTA
E₁-PIAS3	
SEQ ID NO:34	AGAAGGTCGAAAGTTATTGA
SEQ ID NO:35	ATTACTCTTGTCTGTGTA
SEQ ID NO:36	AGATTGTGATGAGATCCAA
SEQ ID NO:37	TTTGAGGAAGCGCACTTTA
SEQ ID NO:38	AGCCGACATCCAAGGTTTA
SEQ ID NO:39	CGACATCCAAGGTTAGAT
E₁-PIASα	
SEQ ID NO:40	CCAGAGCACTAATTAAGA
SEQ ID NO:41	CCATGTTATTACAGAGATT
SEQ ID NO:42	GCTATTCCGCCTTCATTAA
SEQ ID NO:43	TATTCCGCCTTCATTAACA
SEQ ID NO:44	CCACCATACGCCAATATCA
SEQ ID NO:45	GCGCTGCATTTATTGAAGA
E₁-PIASγ	
SEQ ID NO:46	AGAATCTGTTACTCAGACA
SEQ ID NO:47	TCACTCACCTCATGTACCT
SEQ ID NO:48	TCTGTCCGCTGGTGAAGAT
SEQ ID NO:49	TCGCATTGACGCCAAGACA
SEQ ID NO:50	GCTCTACGGAAAGTACTTA
SEQ ID NO:51	CTACGGAAAGTACTTAAAC
E₁-SHP-1	
SEQ ID NO:52	CAAACAGCATCCAGATAGA
SEQ ID NO:53	TGATGTTCCAGACAATAAT
SEQ ID NO:54	TAAATGCGCCTGTGACTTA
SEQ ID NO:55	TCACAACACCTCAAACATA
SEQ ID NO:56	TCAGAAGTATTACGCAGAA
SEQ ID NO:57	GACAACCGGTCGAAAGAAA

【 配列表 】

2008522951000001.xml

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 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/711	(2006.01)	A 6 1 K 31/711	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/76	(2006.01)	A 6 1 K 35/76	
A 6 1 P 37/04	(2006.01)	A 6 1 P 37/04	
A 6 1 P 31/00	(2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 1/04	(2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 17/06	(2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02	(2006.01)	A 6 1 P 19/02	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

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

(72)発明者 エベル - カプラー, ケビン・シー

アメリカ合衆国テキサス州 7 7 5 8 3 ロシャロン・シヤデイホローコート 5 7 2 2

(72)発明者 フアング, スー・エフ

アメリカ合衆国テキサス州 7 7 5 8 4 ペアランド・アビーウツドドライブ 3 9 2 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA11 DA03 EA02 EA04 HA17
 4B065 AA93X AA95Y AB01 AC14 BA02 CA23 CA24 CA44
 4C076 AA19 AA95 BB11 CC29 FF63 FF68
 4C084 AA02 AA03 AA13 MA66 NA05 NA13 ZA022 ZA682 ZA892 ZA962
 ZB052 ZB072 ZB092 ZB152 ZB262 ZB322
 4C085 AA03 BB11 BB23 CC08 CC21 CC31 DD62 EE01 GG01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA65 NA05 NA13 ZA02 ZA68
 ZA89 ZA96 ZB05 ZB07 ZB09 ZB15 ZB26 ZB32
 4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 MA65 NA05 NA13 ZA02 ZA68 ZA89
 ZA96 ZB05 ZB07 ZB09 ZB26 ZB32