

(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2010-525797

(P2010-525797A)

(43) 公表日 平成22年7月29日 (2010.7.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0784 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 M	4 B O 6 5
C O 7 K 14/52 (2006.01)	C O 7 K 14/52	4 C O 8 4
C O 7 K 14/56 (2006.01)	C O 7 K 14/56	4 C O 8 5
C 1 2 N 7/00 (2006.01)	C 1 2 N 7/00	4 C O 8 6
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-504559 (P2010-504559)	(71) 出願人	509296443 バヴァリアン・ノルディック・アクティー ゼルスカブ
(86) (22) 出願日	平成20年4月25日 (2008.4.25)		
(85) 翻訳文提出日	平成21年12月11日 (2009.12.11)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/003366		デンマーク国、3490 クヴィストゴー ド、ヘイレスコフヴェイ、10アエ
(87) 国際公開番号	W02008/131926	(74) 代理人	100069556 弁理士 江崎 光史
(87) 国際公開日	平成20年11月6日 (2008.11.6)	(74) 代理人	100111486 弁理士 鍛冶澤 實
(31) 優先権主張番号	11/790,798	(74) 代理人	100139527 弁理士 上西 克礼
(32) 優先日	平成19年4月27日 (2007.4.27)	(74) 代理人	100164781 弁理士 虎山 一郎
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	07008785.3		
(32) 優先日	平成19年4月30日 (2007.4.30)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 マクロファージ-コロニー刺激因子 (M-CSF) による樹状細胞発生の誘導

(57) 【要約】

マクロファージ-コロニー刺激因子を投与することによって樹状細胞 (DC) 発生を誘導する方法を提供する。M-CSFはサブタイプ (例えば形質細胞様DCおよび通常型DC) に分化するようにDCを誘導する。前記分化は、Fms様チロシンキナーゼ3リガンド (FL) および/または顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子 (GM-CSF) に依存しない。M-CSFによる誘導は骨髓細胞などの造血前駆体からインビトロで達成するか、またはインビボで達成することができる。インビトロではM-CSF誘導DCを使って、サイトカインを産生させ、他の免疫応答細胞を刺激することができる。M-CSFは、動物から取り出された前駆体細胞を、DCへと発生するように誘導するためにも使用することができる。また、これらの単離されたDCを抗原にばく露して、動物に再導入された時に特異的免疫応答を刺激することもできる。本発明では、急性骨髓性白血病などのがん、および全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患の処置も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

インビトロで樹状細胞（DC）を増加させる方法であって、

- (A) 造血前駆体細胞を培養すること；
 - (B) DCの数を定量すること；
 - (C) マクロファージ-コロニー刺激因子（M-CSF）を投与すること；
 - (D) M-CSFの投与後に存在する樹状細胞の数を定量すること
- を含み、M-CSF投与後のDCの数がM-CSF投与前のDCの数より増加する方法。

【請求項 2】

前駆体細胞が骨髄細胞である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

DCが形質細胞様樹状細胞（pDC）である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

pDCの数が少なくとも一つの細胞表面マーカーのレベルを測定することによって定量される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

少なくとも一つの細胞表面マーカーがCD11c、CD45R、CD45RA、PDCA-1、CCR9、Ly49Q、Ly6C、Siglec-H、HLA-DR、CD4、CD123、BDCA-2、またはBDCA-4である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

樹状細胞が通常型樹状細胞（cDC）である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

cDCの数が少なくとも一つの細胞表面マーカーのレベルを測定することによって定量される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

少なくとも一つの細胞表面マーカーがCD11c、CD11b、CD4、CD8、Sirp-アルファ、DEC-205、MHCII、33D1、HLA-DR、またはBDCA-1である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

M-CSFがボックスウイルスベクターに入れて投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

ボックスウイルスベクターが修飾ワクシニアウイルス・アンカラ（Modified Vaccinia virus Ankara: MVA）ベクターである、請求項 9 に記載の方法。

30

【請求項 11】

DCを少なくとも一つの刺激剤にばく露することによってDCを刺激することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

少なくとも一つの刺激剤がIFN- α 、IFN- β 、IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 、TLRアゴニスト、ウイルス、細菌、真菌、植物またはその一部である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

動物から前駆体細胞を取り出すこと、および収集した樹状細胞をその動物に再導入することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 14】

動物中で樹状細胞（DC）を増加させる方法であって、その動物にM-CSFを抗原と同時投与することを含み、その同時投与がその動物におけるDCの数の増加をもたらす方法。

【請求項 15】

抗原が腫瘍、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、植物、軟体動物、節足動物、または脊椎動物毒素に由来する、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

動物がマウスである、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 17】

50

- 樹状細胞（DC）を生産する方法であって、
 (A) 造血前駆体細胞を培養すること；
 (B) その培養細胞にM-CSFを投与すること；
 (C) DCを生成させること；および
 (D) そのDCを収集すること

を含む方法。

【請求項 18】

DCを抗原にばく露することをさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

抗原が腫瘍、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、植物、軟体動物、節足動物、
 または脊椎動物毒素に由来する、請求項 18 に記載の方法。 10

【請求項 20】

動物から前駆細胞を取り出すこと、および収集された樹状細胞をその動物に再導入する
 ことをさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 21】

動物がヒトである、請求項 14 または請求項 17 のいずれか一項の方法。

【請求項 22】

樹状細胞がpDCである、請求項 14 または 17 のいずれか一項の方法。

【請求項 23】

樹状細胞がcDCである、請求項 14 または 17 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 24】

M-CSFが培養細胞にポリペプチドとして投与されるか、培養細胞中で発現される核酸と
 して投与される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

核酸がDNAまたはRNAである、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 26】

M-CSFがボックスウイルスベクターに入れて培養細胞に投与される、請求項 17 に記載
 の方法。

【請求項 27】

ボックスウイルスベクターが修飾ワクシニアウイルス・アンカラ（MVA）ベクターであ
 る、請求項 26 に記載の方法。 30

【請求項 28】

動物中で抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、

- (A) 動物から造血前駆体細胞を取り出すこと；
 (B) その前駆体細胞を培養すること；
 (C) その培養細胞にM-CSFを投与すること；
 (D) 樹状細胞（DC）を生成させること；
 (E) そのDCを抗原にばく露すること；
 (F) ばく露されたDCを収集すること；および
 (G) 収集されたDCをその動物に再導入すること

を含む方法。 40

【請求項 29】

抗原が腫瘍、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、植物、軟体動物、節足動物に
 由来するか、または脊椎動物毒素に由来する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

抗原を動物に投与することをさらに含む、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 31】

動物が全身性エリテマトーデス（SLE）を患っているヒト患者であり、抗原がSLE関連自
 己抗体の抗イディオタイプまたは相補性決定領域（CDR）に由来するペプチドである、請
 求項 28 に記載の方法。 50

【請求項 3 2】

動物が急性骨髄性白血病（AML）を患っているヒト患者であり、抗原が患者の突然変異したもしくは重複したFlt3受容体、または突然変異したc-kit受容体に由来する新規ペプチドを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 3】

動物がヒトである、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 4】

インビトロでサイトカインを産生する方法であって、

(A) 造血前駆体細胞を培養すること；

(B) その培養細胞にM-CSFを投与すること；および

(C) 産生されたサイトカインを集めること

を含む方法。

【請求項 3 5】

産生されるサイトカインが、IFN- α 、IFN- β 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、IL-27、IL-28、IL-29、TNF- α 、TNF- β およびケモカインを含む群から選択される、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

産生されるサイトカインがインターフェロン- α （IFN- α ）である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 7】

増殖性障害を患っている患者を処置する方法であって、前記患者にM-CSFを投与することによって前記患者におけるDCの数を増加させることを含む方法。

【請求項 3 8】

増殖性障害を患っている患者を処置するための医薬組成物を製造するためのM-CSFの使用であって、前記患者へのM-CSFの投与が前記患者におけるDCの数を増加させる使用。

【請求項 3 9】

前記増殖性疾患が、急性骨髄性白血病（AML）および急性リンパ芽球性白血病（ALL）を含む群より選択されるがんである、請求項 3 7 または 3 8 に記載の方法または使用。

【請求項 4 0】

自己免疫疾患を患っている患者を処置する方法であって、前記患者にM-CSFを投与することによって前記患者におけるDCの数を増加させることを含む方法。

【請求項 4 1】

自己免疫疾患を患っている患者を処置するための医薬組成物を製造するためのM-CSFの使用であって、前記患者へのM-CSFの投与が前記患者におけるDCの数を増加させる使用。

【請求項 4 2】

前記自己免疫疾患が全身性エリテマトーデス（SLE）である、請求項 4 0 および 4 1 に記載の方法または使用。

【請求項 4 3】

免疫応答を刺激する方法であって、

(A) 造血前駆体細胞を培養すること；

(B) その培養細胞にM-CSFを投与すること；

(C) 樹状細胞（DC）を生成させること；および

(D) そのDCを免疫細胞にばく露すること

を含み、その免疫細胞が刺激されて免疫応答を生じる方法。

【請求項 4 4】

免疫細胞がT細胞、ヘルパーT細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、またはマクロファージである、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

T細胞が調節性T細胞、サプレッサーT細胞、またはキラーT細胞である、請求項 4 3 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 6】

ヘルパーT細胞がTh1、Th2、またはTh17細胞である、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

DCがインビトロで免疫細胞にばく露される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 8】

DCがインビボで免疫細胞にばく露される、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 9】

免疫応答が抗アレルギー免疫応答、抗敗血症免疫応答、抗移植片免疫応答、抗腫瘍免疫応答、抗自己免疫応答、寛容誘発性免疫応答、抗病原体免疫応答、または調節性免疫応答である、請求項 4 3 に記載の方法。

10

【請求項 5 0】

造血前駆体細胞から前記前駆体細胞のM-CSF刺激によって生成される樹状細胞。

【請求項 5 1】

前記前駆体細胞が骨髓細胞である、請求項 5 0 に記載の樹状細胞。

【請求項 5 2】

M-CSFをコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルス。

【請求項 5 3】

前記ボックスウイルスが修飾ワクシニアウイルス・アンカラ（MVA）である、請求項 5 2 に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 5 4】

20

前記MVAが、以下の性質を少なくとも一つは持つことを特徴とする、請求項 5 2 に記載の組換えボックスウイルス：

(i) ニワトリ胚線維芽細胞（CEF）ではインビトロで増殖的複製能を持つが、ヒトケラチノサイト細胞株（HaCaT）、ヒト胎児腎臓細胞株（293）、ヒト骨骨肉腫細胞株（143B）、およびヒト子宮頸部腺癌細胞株（HeLa）では増殖的複製能を持たない、

(ii) 成熟BおよびT細胞を産生する能力を持たず、したがって重度の免疫欠陥を持ち、複製ウイルスに対する感受性が高いマウスモデルにおいて、複製することができない、および

(iii) DNAプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンと比較して、少なくとも同じレベルの特異的免疫応答を、ワクシニアウイルスプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンで誘導する。

30

【請求項 5 5】

上記の有利な性質を少なくとも二つは持つ、請求項 5 4 に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 5 6】

上記の有利な性質を三つとも持つ、請求項 5 4 に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 5 7】

前記MVAがソールズベリー（英国）のEuropean Collection of Cell Cultures（ECACC）に番号V00083008として寄託されているMVAワクシニアウイルスおよびその派生株である、請求項 5 4 に記載の組換えボックスウイルス。

40

【請求項 5 8】

少なくとも一つの抗原および/または抗原エピトープをコードする配列から選択される異種核酸配列をさらに含む、請求項 5 2～5 7 のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 5 9】

ワクチンまたは医薬品としての請求項 5 2～5 8 のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 6 0】

増殖性および/または自己免疫疾患を処置するための請求項 5 2～5 8 のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルス。

50

【請求項 6 1】

増殖性および/または自己免疫疾患を処置するための医薬組成物を製造するための請求項 5 2～5 8 のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスの使用。

【請求項 6 2】

請求項 5 2～5 8 のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスと薬学的に許容できる担体、希釈剤および/または添加剤とを含む医薬組成物またはワクチン。

【請求項 6 3】

ワクチンまたは医薬品を製造するための請求項 5 2～5 8 のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスの使用。

【請求項 6 4】

造血前駆体細胞から樹状細胞 (DC) を生成させるための請求項 5 2～5 8 のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスまたは請求項 6 2 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 6 5】

動物中で抗原に対する免疫応答を誘導するためのキットであって、請求項 5 2～5 8 のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスを第1バイアル中に含み、抗原を第2バイアル中に含むキット。

【請求項 6 6】

組換えボックスウイルスを含む前記第1バイアルが、樹状細胞 (DC) を生成させかつ/または増加させるために動物に投与され、次いで、DCが生成されかつ/または増加した後に、前記抗原を含む前記第2バイアルが前記動物に投与される、請求項 6 5 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、樹状細胞形成を誘導する方法および誘導された樹状細胞を治療剤として使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

樹状細胞 (DC) は免疫系における重要な意思決定因子である。例えばDCは抗体産生やキラー細胞形成などの適応免疫応答を惹起する。DCは免疫応答の量および質も指示し、例えばアレルギー性、炎症性、または寛容誘発性免疫応答が開始されるべきかどうかを決定する。

【0003】

DCには表現型および機能が明確に異なるサブセットが数多く存在する (1)。血中および免疫器官中には稀であるが、DCには二つの主要サブグループ、すなわち形質細胞様DC (pDC) と通常型DC (cDC) とが含まれる (2)。マウスにおけるcDCには、 $CD4^-CD8^+$ 、 $CD4^+CD8^-$ および $CD4^-CD8^-$ という少なくとも3つのサブセットが含まれる。 $CD8^+cDC$ は表面マーカー $CD8\alpha\alpha$ を発現させ、ウイルス感染に対するキラー細胞誘導を可能にする抗原の交差提示にとって、最も重要な細胞である。 $CD8^+cDC$ は、炎症性免疫応答にとって不可欠なサイトカインであるインターロイキン12を多量に産生することもできる。 $CD8^-cDC$ 集団は、多量のケモカインを産生すること、およびT細胞への抗原のMHCII提示により適していることが知られている。pDCは、ウイルスDNAまたはウイルスRNAに応答して多量の抗ウイルス性および免疫保護性サイトカイン、例えばI型インターフェロン (IFN-I) を産生する抗ウイルス細胞である。

【0004】

他の免疫細胞と同じように、DCは増殖因子およびサイトカインの影響を受けて造血幹細胞および後期前駆体から発生する。顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子 (GM-CSF) は、造血前駆体細胞および単球を、GM-DCと呼ばれるDCが発生するように誘導する (3～5)。ただし、GM-CSFまたはGM-CSF受容体が欠損しているマウスはDC数にそれほど大きな減少を示さないので、GM-DCはリンパ器官における定常状態DCサブセットの大部分というわ

10

20

30

40

50

けではない(6)。しかし、マウスに安定化GM-CSFをインビボ適用すると、CD8⁺cDCのレベルは増加するが、pDCのレベルは増加しない(10)。そのうえ、GM-CSFはpDCの生成をインビトロで遮断することが示されている(7)。

【0005】

Fms様チロシンキナーゼ3リガンド(FL)も、cDCとpDCの両方を含むDCの、骨髄(BM)前駆体細胞からの発生を(8, 9)、インビトロとインビボの両方で誘導する(10~13)。DC(FL-DCと呼ばれるもの)の発生におけるFLの役割は、FL欠損マウス(FLK0)のリンパ器官においてpDC(9)とcDC(14)の数がどちらも激しく減少することにより、決定的に証明されている。

【0006】

エクスピボ単離pDCまたはFL生成pDCは、Toll様受容体(TLR)7および9ならびにそれらの各リガンドRNAおよびDNAを介した直接刺激に、高レベルのインターフェロン-アルファ(IFN- α)を産生することによって応答する。cDCを含む他の細胞タイプも、活性ウイルスまたはトランスフェクトされたDNAもしくはRNAに応答して、IFN- α を産生するように誘導されうる。しかし、cDCによるIFN- α 産生は、PKR、RIG-I、MDA5およびTLR-3を含むTLR7およびTLR9非依存的経路、ならびに今のところ未同定の細胞質DNA認識複合体によって媒介される(15~17)。このようにpDCは、IFN- α の高レベル産生にTLR7およびTLR 9を利用する唯一の細胞である。さらにまた、例えばCpGモチーフ含有オリゴヌクレオチド(CpG-ODN A型)などの一定の核酸分子は、極めて高レベルのIFN- α をもつばらpDCでのみ誘導する(18)。したがって、A型CpG-ODNに応答して起こるIFN- α 産生は、混合細胞集団におけるpDCの存在に関する機能試験である(17)。

【0007】

マクロファージコロニー刺激因子(M-CSF; CSF-1とも呼ばれる)に対する受容体の下流にコードされたGFPを利用する研究から、pDCサブセットとcDCサブセットの分化中に、M-CSF受容体が転写されることは明らかである(26)。また、M-CSF欠損マウス(op/opマウス)はDCサブセットの数が減少しているという報告がある(26)。さらにまた、DCとマクロファージは、共通の前駆細胞から発生しうる(41)。別の報告は、一部のDC(ただしpDCではない)がM-CSFを含む増殖因子の組合せの影響を受けて発生することを示している(42)。それでもなお、GM-CSFおよびFLはDCの発生を誘導することが示されているのに対し、M-CSFは、DCではなく、単球の発生およびマクロファージの分化を誘導すると、常に考

【0008】

例えば侵襲性真菌感染症の処置など、限定された状況においてではあるものの、治療的処置としてのM-CSFの作用は以前に調べられている(39)。M-CSFで処置された患者が、患者のDCに何らかの変化を示したかどうかはわからない。

【0009】

DCの数の増加は、一定の状況では、治癒効果を持ちうる。例えば、新生児個体では、DCが多いほど感染症との戦いに役立つだろう。同様に、HIV感染、一定のがん、アレルギーを患っている個体、移植を受けた個体、放射線療法もしくは化学療法のせいで、または一定の薬を服用しているために、免疫力が低下している個体は、DCの数が減少している場合がある。これらの個体では、pDCおよびcDCを含むDCの数を増加させることが望ましいだろう。このように、当技術分野では、インビトロまたはインビボでのDCの誘導および生成方法が必要とされている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明はM-CSFによる前駆体造血細胞からのDCの誘導を提供する。具体的に述べると、前記誘導は、FLによる誘導には依存しない。既に上で概説したように、Flt3リガンド(FL)は、造血系の細胞に制限されるFlt3受容体に結合する可溶性増殖因子である。本発明の方法によって誘導されるDCは、例えばIFN-Iなどの抗ウイルス性サイトカインを産生する

10

20

30

40

50

ことなどによって、免疫応答を調節することができる。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、M-CSFがCpGに応答してIFN- α を産生するようにBM培養物を誘導するという予想外の知見に基づく。事実、これらのM-CSF誘導BM細胞は、表現型および機能が、pDCおよびcDCに似ており、pDCおよびcDCと呼ばれる。

【0012】

FLとM-CSFの受容体（それぞれFlt3およびc-fms）はグループIII受容体チロシンキナーゼであり、構造の同一性を共有している。しかし、FL受容体またはM-CSF受容体のどちらかを阻害した実験によって証明されるように、M-CSFによるDC分化の誘導はFL受容体との交差反応を伴わない。さらにまた、pDC集団とcDC集団の両方が、FLノックアウトマウス（FLKO）由来のM-CSF BM培養物中で発生したことから、これらの細胞のM-CSF誘導が内在性FLの間接的貢献を必要とする可能性は排除される。最後に、野生型マウスまたはFLKOマウスをM-CSFで処置したところ、インビボでpDCおよびcDCが発生した。

【0013】

これらの結果は、M-CSFはpDCおよびcDCの発生を誘導することができ、その誘導がFLによる誘導には依存しないことを示している。自然界のインビボ環境では、FLとM-CSFの両方が一緒になって、正常なDCホメオスタシスを誘導し調節するように働く可能性がある。これは、DCを強化する感染およびDCレベルの増加または減少をもたらす免疫状態が、しばしば、循環FLレベルの増加と関連し、これと同じ状態の一部が、循環M-CSFレベルを強化すると報告されているからである。例えば、ランゲルハンス細胞組織球症は患者の血清中に増加したFLおよびM-CSFを示し（28）、循環FLを増加させることが示されたウイルス感染はM-CSFも増加させ（29～32）、全身性エリテマトーデス（SLE）患者の血清ではFLが増加しており（33）、SLEの動物モデルはM-CSFレベルの上昇を示す（34）。しかし、本明細書で示すように、M-CSFは明らかにFLに依存せずに作用してDC発生を誘導することができる。M-CSFは誘導されるがFLは誘導されないという条件またはその逆の条件が存在する可能性がある。このように、いくつかの条件において、他の増殖因子の影響を受けることなくM-CSFまたはFLに由来するDCが誘導されうる。

【0014】

本発明の方法は、個体へのインビボ適用後に、pDCおよびcDCのレベルを増加させることを可能にする。これらの細胞は感染に対する防御に使用することができ、免疫応答を開始または指示することができる。また本発明は、csf-1突然変異を伴わないがん、例えば限定するわけではないが、M-CSF処置に対してまだ応答性であるタイプの急性骨髄性白血病（AML、急性骨髄性白血病とも呼ばれる）や、過剰に活性なFlt3に対する治療を受けている患者を含む、増殖性障害に対する治療的および予防的処置にもなる。本発明は、医薬品として使用するためのM-CSFも包含する。さらにまた本発明は、SLEなどの自己免疫疾患に対する治療的および予防的処置にも及ぶ。また本発明は、がんなどの増殖性疾患およびSLEなどの自己免疫疾患を処置するためのM-CSFにも向けられる。

【0015】

本発明の一実施形態では、造血前駆体細胞をM-CSFの存在下で培養することにより、DCをインビトロで産生することができる。誘導されうる造血前駆体細胞は、限定するわけではないが、例えば骨髄細胞である。好ましい一実施形態では、前記DCの産生がFLに依存しない。

【0016】

さらにもう一つの実施形態では、M-CSFによりインビトロで誘導されたDCを使って、サイトカインを産生させることができる。産生されるこれらのサイトカインには、IFN-I（例えばIFN- α およびIFN- β ）、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、IL-27、IL-28、IL-29、TNF- α 、TNF- β およびケモカインが含まれるが、これに限るわけではない。好ましい一実施形態では、産生されるサイトカインがインターフェロン- α （IFN- α ）である。サイトカインはインビトロで産生させるか、またはM-CSF誘導

DCを動物に導入した後にインビボで産生させることができる。インビボでは、誘導されたDCが自然免疫応答または適応免疫応答を刺激する。

【0017】

本発明のさらに別の実施形態では、M-CSFによりインビトロで誘導されたDCを抗原にばく露して、特異的免疫応答を刺激することができる。

【0018】

本発明のさらなる実施形態では、M-CSFによって生成させたDCを使って、他の免疫細胞における免疫応答を刺激することができる。

【0019】

本発明は、インビトロで樹状細胞（DC）を増加させる方法であって、造血前駆体細胞を培養すること；DCの数を定量するか、またはその骨髓内のDCを全て排除すること；マクロファージ-コロニー刺激因子（M-CSF）を投与すること；M-CSFの投与後に存在する樹状細胞の数を定量することを含み、M-CSF投与後のDCの数がM-CSF投与前のDCの数よりも増加する方法を包含する。好ましい一実施形態では、前記増加がFLに依存しない。本発明の実施形態では、前駆体細胞が骨髓細胞である。本発明の別の実施形態では、DCが形質細胞様樹状細胞（pDC）であり、少なくとも一つの細胞表面マーカー（CD11c、CD45R、CD45RA、PDC A-1、CCR9、Ly49Q、Ly6C、Siglec-H、HLA-DR、CD4、CD123、BDCA-2、BDCA-4を含むが、これらに限るわけではない）のレベルを測定することによってpDCの数が定量される。本発明の別の実施形態では、DCが、少なくとも一つの細胞表面マーカー（CD11c、CD11b、CD4、CD8、Sirp-アルファ、DEC-205、MHCII、33D1、HLA-DR、およびBDCA-1を含むが、これらに限るわけではない）のレベルを測定することによって定量される通常型樹状細胞（cDC）である。本発明の別の実施形態では、M-CSFがボックスウイルスベクター（MVAベクターを含むが、これに限るわけではない）に入れて投与される。本発明の別の実施形態では、M-CSFが別のウイルスベクターに入れて投与される。本発明のさらに別の実施形態では、DCを増加させる方法が、DCを刺激剤にばく露することによってDCを刺激することをさらに含み、その刺激剤には、TLRアゴニスト、ウイルス、細菌、真菌、植物、もしくはその一部、またはサイトカイン（IFN-I、IL-10、IL-12、IL-6、およびTNF- α を含むが、これらに限るわけではない）が含まれるが、これらに限るわけではない。本発明の実施形態は、収集された樹状細胞を動物中に再導入するステップも含む。本発明のさらに別の実施形態において、DCはpDCもしくはcDCまたはその両方であることができる。

【0020】

本発明のもう一つの実施形態は、動物中で樹状細胞を増加させる方法であって、その動物にM-CSFを抗原と同時に投与することを含み、その同時投与がその動物におけるDCの数の増加をもたらす方法である。好ましい一実施形態では、前記増加がFLに依存しない。本発明のさらなる実施形態は、腫瘍、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、植物、軟体動物、節足動物、または脊椎動物毒素に由来する抗原を含む。本発明の別の実施形態では、動物がマウスまたはヒトである。本発明は、pDCまたはcDCであるDCを包含する。本発明の別の実施形態では、M-CSFがボックスウイルスベクター（MVAベクターを含むが、これに限るわけではない）に入れて投与される。本発明の別の実施形態では、M-CSFが別のウイルスベクターに入れて投与される。本発明のさらにもう一つの実施形態では、M-CSFがプラスミドに入れて投与されるか、RNAによって投与される。

【0021】

本発明のさらにもう一つの実施形態は、樹状細胞を産生する方法であって、造血前駆体細胞を培養すること、その培養細胞にM-CSFを投与すること、樹状細胞を生成させること、およびその樹状細胞を収集することを含む方法である。前記生産はFLに依存しない。本発明の実施形態において、本方法は、その樹状細胞を抗原にばく露することを、さらに含むことができる。本発明は、限定するわけではないが、腫瘍、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、植物、軟体動物、節足動物、または脊椎動物毒素に由来する抗原を含む抗原を包含する。本発明の実施形態は、動物から前駆体細胞を取り出すこと、および収集された樹状細胞をその動物に再導入することを含む。本発明のさらに別の実施形態におい

て、DCはpDCまたはcDCであることができる。本発明は、M-CSFが培養細胞にポリペプチドとして投与されるか、または培養細胞中で発現される核酸（この場合、核酸はDNAまたはRNAである）として投与される実施形態も包含する。本発明は、M-CSFがポックスウイルスベクター（修飾ワクシニアウイルス・アンカラ（MVA）ウイルスベクターを含むが、これに限るわけではない）に入れて培養細胞に投与される方法も包含する。

【0022】

本発明のさらにもう一つの実施形態は、動物中で一つ以上の抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、動物から造血前駆体細胞を取り出すこと、その前駆体細胞を培養すること、その培養細胞にM-CSFを投与すること、樹状細胞を生成させること、その樹状細胞を抗原にばく露すること、感作樹状細胞（primed dendritic cells）を収集すること、およびその感作樹状細胞をその動物に再導入することを含む方法を包含する。本発明において、抗原は、腫瘍、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、植物、軟体動物、節足動物、または脊椎動物に由来する（毒素を含む）。本発明の実施形態は、その動物に対して腫瘍抗原を投与することを含む。本発明のさらに別の実施形態では、動物が全身性エリテマトーデス（SLE）を患っているヒト患者であり、抗原がSLE関連自己抗体の抗イディオタイプまたは相補性決定領域（CDR）に基づくペプチドを含む（45、46）。

10

【0023】

本発明の実施形態は、Flt3またはc-kitを阻害するための化学療法を受けている、急性骨髄性白血病（AML）またはALLに罹患したヒト患者である動物も包含し、抗原は、その患者の突然変異したまたは重複したFlt3またはc-kitに由来する、正常型のそれら受容体中には存在しない新規ペプチドを含みうる（47）。

20

【0024】

本発明のもう一つの実施形態は、インターフェロン- α （IFN- α ）を産生する方法であって、造血前駆体細胞を培養すること、培養細胞にM-CSFを投与すること、およびIFN- α を集めることを含む方法である。

【0025】

本発明のさらにもう一つの実施形態は、AMLを患っている患者を処置する方法であって、AMLを患っているその患者にM-CSFを投与すること、およびその患者におけるDCの数を増加させることを含む方法である。

【0026】

本発明のさらにもう一つの実施形態は、SLEを患っている患者を処置する方法であって、SLEを患っているその患者にM-CSFを投与すること、およびその患者におけるDCの数を増加させることを含む方法である。

30

【0027】

本発明は、医薬品として使用するためのM-CSFも包含する。具体的に述べると、本発明は、がんもしくは白血病（特にAML）などの増殖性疾患を処置するための、および/またはSLEなどの自己免疫疾患を処置するためのM-CSFに向けられる。

【0028】

本発明のさらにもう一つの実施形態は、免疫応答を刺激する方法であって、造血前駆体細胞を培養すること、培養細胞にM-CSFを投与すること、DCを生成させること、そのDCを免疫細胞にばく露することを含み、その免疫細胞が刺激されて免疫応答を生じる方法である。免疫細胞はT細胞（調節性T細胞、サプレッサーT細胞、キラーT細胞を含むが、これらに限るわけではない）、ヘルパーT細胞（調節性T細胞、サプレッサーT細胞、またはキラーT細胞を含むが、これらに限るわけではない）、B細胞、ナチュラルキラー細胞、またはマクロファージであることができる。免疫応答の刺激はインビトロまたはインビボで達成することができる。さらにまた、免疫応答は抗アレルギー免疫応答、抗敗血症（anti-septic）免疫応答、抗移植片（anti-graft）免疫応答、抗腫瘍免疫応答、抗自己免疫応答、寛容誘発性免疫応答、抗病原体免疫応答、または調節性免疫応答であることができる。

40

【0029】

本発明のもう一つの実施形態は、造血前駆体細胞から前記前駆体細胞のM-CSF刺激によ

50

って生成される樹状細胞に関する。

【0030】

本発明のさらにもう一つの実施形態は、M-CSFをコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルスに関する。具体的に述べると、前記核酸配列は前記ボックスウイルスのウイルスゲノム中に含まれる。前記ボックスウイルスには修飾ワクシニアウイルス・アンカラ(MVA)が含まれるが、これに限るわけではない。

【0031】

好ましい一実施形態では、前記MVAが以下の性質の少なくとも一つを持つことを特徴とする：

(i) ニワトリ胚線維芽細胞(CEF)ではインビトロで増殖的複製(reproductive replication)能を持つが、ヒトケラチノサイト細胞株(HaCaT)、ヒト胎児腎臓細胞株(293)、ヒト骨骨肉腫細胞株(143B)、およびヒト子宮頸部腺癌細胞株(HeLa)では増殖的複製能を持たない、

(ii) 成熟BおよびT細胞を産生する能力を持たず、したがって重度の免疫欠陥を持ち、複製ウイルスに対する感受性が高いマウスモデルにおいて、複製することができない、および

(iii) DNAプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンと比較して、少なくとも同じレベルの特異的免疫応答を、ワクシニアウイルスプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンで誘導する。

【0032】

本発明のさらなる実施形態によれば、MVAは、上述の有利な性質のうち少なくとも二つまたは三つ全てを持つことを特徴とする。

【0033】

特に好ましい一実施形態では、MVAが、ソールズベリー(英国)のEuropean Collection of Cell Cultures(ECACC)に番号V00083008として寄託されているMVAワクシニアウイルスおよびその派生株である。この寄託されたウイルスを以下、MVA-BNともいう。

【0034】

上に概説した組換えボックスウイルスは、少なくとも一つの抗原および/または抗原エпитープをコードする配列から選択される異種核酸配列をさらに含んでもよい。

【0035】

本発明は、そのような組換えボックスウイルスと薬学的に許容できる担体、希釈剤および/または添加剤とを含む医薬組成物またはワクチンにも関係する。

【0036】

さらにもう一つの実施形態において、本発明は、医薬品またはワクチンとして使用するための、M-CSFをコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルスに関する。さらにまた本発明は、増殖性疾患および/または自己免疫疾患を処置するための、本明細書に概説するM-CSFをコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルスも包含する。増殖性疾患は既に上で特定したものであり、がんおよび白血病を含むが、これらに限るわけではない。好ましい一実施形態では、前記白血病のタイプがAMLである。自己免疫疾患は本願において既に特定したものであり、SLEを含むが、これに限るわけではない。

【0037】

もう一つの実施形態において、本発明は、造血前駆体細胞から樹状細胞(DC)を生成させるための、上記組換えボックスウイルスおよび/または上記医薬組成物の使用に関する。

【0038】

本発明のさらにもう一つの実施形態は、動物中で抗原に対する免疫応答を誘導するためのキットであって、M-CSFをコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルスを第1バイアル中に含み、抗原を第2バイアル中に含むキットである。前記キットの好ましい一実施形態では、樹状細胞(DC)を生成および/または増加させるために組換えボックスウイルスが動物に投与され、次いで、DCが生成および/または誘導された後に、前記抗原が前記

動物に投与される。

【図面の簡単な説明】

【0039】

【図1】 M-CSFは、FLの非存在下でさえ、BM細胞からのpDCおよびcDC発生を引き出す。 A. B220⁺およびCD11c⁺細胞を枯渇させたC57BL/6 BM細胞の同型 (replicate) ウェルを、M-CSF (20ng/ml) (0日目に添加し、3日目に再び添加) と共に、またはFL (35ng/ml) (0日目にのみ添加) と共に、6日間インキュベートした。0~6日目のそれぞれにおいて、別々のウェルを、CpG-2216で終夜刺激するか、刺激せずに放置し、その上清をIFN- α についてアッセイした。B. B220⁺およびCD11c⁺細胞を枯渇させたC57BL/6 BM細胞を、M-CSF (20ng/ml) (0日目に添加し、3日目に再び添加) と共にインキュベートした。6日目に細胞を収集し、CD11cおよびCD435RA発現を検出するために、細胞を抗体で染色した。pDC集団およびcDC集団の表現型を持つ細胞を、左パネルに四角く囲んで示す。pDC集団とcDC集団のそれぞれにおける細胞の数を右パネルに示し、同様にB220⁺およびCD11c⁺細胞を枯渇させたBM細胞を使って6日目のFL生成DCまたは培地のみから得られた数と比較する。C. FLを欠くマウスから得たBM細胞から、同じように、B220⁺およびCD11c⁺細胞を枯渇させ、同型ウェル中でFL、M-CSF (3日目に追加供給) と共に0~6日間インキュベートした。0~6日目のそれぞれにおいて、別々のウェルをCpG-2216で終夜刺激するか、刺激せずに放置し、その上清をIFN- α についてアッセイした (左パネル)。FLKO培養物中に6日目に存在するpDC集団およびcDC集団を右パネルに示す。表示したデータは、複数時点に関する3回の類似する実験を代表する1実験 (A)、複数時点に関して行った1実験ならびに6日目および0日目時点に関する3回の追加実験 (C、左パネル)、6日目FL培養物の3実験を代表する1実験および6日目M-CSF培養物の5回を上回る実験 (B)、そして4回の実験を代表する1実験 (C、右パネル) から得たものである。BおよびC (右パネル) の培地のみ対照培養物では、検出可能なM-DCは存在しなかった。

【図2】 FL-pDCおよびエクスビボ単離脾臓pDCと比較したM-pDCの表面表現型。 6日目のM-CSF培養物 (中実のヒストグラム)、FL培養物 (灰色の中実ヒストグラム)、または新鮮単離脾臓DC (黒いヒストグラム) から得られる染色された細胞を、PI陰性細胞の中でCD11cおよびCD45RAまたはCD45Rの発現について選択することにより、pDCにゲートをかけた。pDC表面における一連の表面マーカーの発現を示す。明灰色ヒストグラムは、各染色内でのM-pDCのバックグラウンド染色を表す。また、全てのM-pDCはCD3、CD19、CD49bおよびNK1.1の発現を欠いていた。表示の表面表現型は、M-pDCに関する2~5回の実験、FL-pDCに関する2~3回の実験、および脾臓pDCに関する2回の実験を代表する1実験から得たものである。

【図3】 M-pDCは、TLR9刺激に応答して活性化され、IFN- α を産生し、TLR7刺激に応答して他のサイトカインを産生する。 高度に精製され選別されたM-pDCまたはFL-pDCを表示のTLRリガンドと共に18時間インキュベートした。pDCの表面表現型を解析した (AおよびB)。灰色のヒストグラムは培地のみで培養された細胞の表面発現レベルを示し、黒いヒストグラムは表示の刺激物質中で培養細胞の発現レベルを示す。上清を、IFN- α の存在 (C) についてELISAで、またはIL-6およびTNF- α の産生 (D) についてサイトメトリック・ビーズ・アッセイ (Cytometric Bead Assay: CBA) でアッセイした。IFN- γ 、IL-10、IL-12p70またはMCP-1は、CBAでは、M-pDC上清中に検出されなかった。表示のデータは、3回の実験 (AおよびB)、5回の実験 (C) ならびに3回の実験 (D) を代表する1実験から得たものである。エラーバーは重複試料の範囲を表す。

【図4】 M-DCの生成はc-FMSインヒビターによって阻害される。 同型M-CSFおよびFL培養を、ある範囲のA: cFMS受容体チロシンキナーゼインヒビター濃度またはB: Flt3インヒビター濃度の存在下または非存在下で、並行して行った。培養期間の最後に細胞を計数した。インヒビターなしの培養物から収集された細胞の数を100%に設定した。インヒビターを含有する培養物から得られる細胞を、インヒビターの非存在下で得られる細胞の百分率として表した。各パネルに表示するデータは、各インヒビターについて行った2回の実験を代表するそれぞれ1実験から得たものである。

【図5】M-CSF処置はインビボでDC数を増加させる。FLKOマウスを、0.01%BSA/PBS中のM-CSF 10 µg/日または賦形剤のみ（対照）で、5日連続してip処置した。DCをFLKO脾臓から精製し、CD11cおよびCD45RAで染色し、ゲートをかけてAに示す。全脾細胞ならびにpDC集団およびcDC集団を数え上げ、賦形剤処置マウスと比較した増加倍率として示す（B）。データは、同じ日に解析した対照マウスと比較した2回の別個の実験内の3匹のマウス個体からプールした。

【図6】CLPはM-pDCの主要産生細胞であり、CMPは主としてM-cDCを産生する。UBC-GFP BM細胞だけを含有する対照M-CSF培養物では、全ての細胞が高レベルのGFPを発現させ、FITC（GFP）チャンネルで強く蛍光を発した（A、左パネル）。UBC-GFP BM培養物中にスパイクしたC57BL/6前駆細胞の子孫に、FITC/GFP^{neg}細胞としてゲートをかけた（A、右パネル）。CLP、CMPまたはGMPの段階希釈液（625～39細胞相当を図示している）を、1ml中のUBC-GFP BM細胞 1.0×10^6 個に加え、M-CSF培養を6日間行った。GFP^{neg}PI^{neg}細胞にゲートをかけ、CD45RAおよびCD11cで染色した。得られたM-DCプロットをBに示し、M-pDCおよびM-cDCを決定するために使用したゲートを左上の等高線に示す。Bの培養物中に得られたM-pDCおよびM-cDCの絶対数をCに示す。表示のデータは1回の実験から得たものである。同様の結果がもう一つの実験でも得られた。D. CLP上のCD115（M-CSFR）およびCD135（Flt3）の発現を示す。灰色のヒストグラムはPEコンジュゲートアイソタイプ対照で染色したCLPを表す。染色は、類似する結果を与えた2回の個別の実験（CD115）で行い、これらの実験の一方にはCD135染色も含めた。

【図7】FL誘導cDC（FL-cDC）およびエクスビボ単離脾臓cDCと比較したM-cDCの表面表現型。図7はM-CSF誘導cDC（M-cDC）の表面表現型を図示している。6日目のM-CSF培養物（中実のヒストグラム）、FL培養物（灰色の中実ヒストグラム）、または新鮮単離脾臓DC（黒いヒストグラム）から得られる染色された細胞を、PI陰性細胞の中でCD11cの発現およびCD45RAまたはCD45Rの欠如について選択することにより、cDCにゲートをかけた。cDC表面における一連の表面マーカーの発現を示す。明灰色のヒストグラムは、各染色内でのM-cDCのバックグラウンド染色を表す。また、全てのM-cDCはCD3、CD19、CD49bおよびNK1.1の発現を欠いていた。表示の表面表現型は、M-cDCに関する2～5回の実験、FL-cDCに関する2～3回の実験、および脾臓cDCに関する2回の実験を代表する1実験から得たものである。

【図8】M-DCの生成はc-FMSインヒビターによって阻害される。同型M-CSFおよびFL培養を、ある範囲のA：cFMS受容体チロシンキナーゼインヒビター濃度またはB：Flt3インヒビター濃度の存在下または非存在下で、並行して行った。培養期間の最後に細胞を計数した。インヒビターなしの培養物から収集された細胞の数を100%に設定した。インヒビターを含有する培養物から得られる細胞を、インヒビターの非存在下で得られる細胞の百分率として表した。各パネルに表示するデータは、各インヒビターについて行った2回の実験を代表するそれぞれ1実験から得たものである。 [好ましい実施形態の詳細な説明]

【0040】

本発明は、M-CSFが、FLの非存在下に、インビトロで、IFN-α産生（図1）ならびに造血前駆体細胞からのpDCおよびcDCの発生（図2）を誘導することを示す実験結果によって裏付けられる。これらのM-CSF誘導pDCおよびcDCは、FLによって誘導されるpDCおよびcDCまたはインビボで発生するものと表現型が同一であり（図3および5）、IFN-Iなどの抗ウイルス性サイトカインを産生する（図4）。さらにまた、M-CSF受容体の阻害は、M-CSF誘導活性が、FL受容体flt3との交差反応としてではなく、それ自身の受容体を介して起こることを証明している（図6）。最後に、M-CSFはインビボでpDCおよびcDCをFL非依存的経路で誘導することが明らかになった（図7）。

【0041】

本発明の実施形態の説明において、「誘導」という用語は、細胞の形態および/または生理機能の変化をもたらすシグナルの導入を指す。「発生」という用語は、遺伝的に決定された経路に沿った細胞の形態および生理機能の改変を指す。「分化」という用語は、ある前駆体細胞からより特殊化した細胞タイプへの細胞の発生を指す。「細胞表面マーカー

」という用語は、ある細胞の表面上にあって、他の任意の細胞またはその細胞の発生経路における他の細胞から見て、その細胞に特異的であるタンパク質または他の分子を指す。

「前駆体細胞」という用語は、何らかのシグナルによる誘導後に、より分化した細胞へと発生する能力を持つ、分化度の低い細胞を指す。造血前駆体細胞には骨髓細胞が含まれるが、これに限るわけではない。「FLに依存しない」または「FLの非存在下で」という用語は、本発明の方法では、使用する各培養培地にFLを添加することなく、DCが誘導され、増加し、かつ/または産生されることを示す。

【0042】

本発明の一実施形態では、DCがインビトロで産生される。例えば後述の実施例1に記載する手法をはじめとする（ただしこれに限るわけではない）当業者に知られる技法によって、造血前駆体細胞を培養し、DCを収集することができる。DCの数は直接的に定量することができる。例えばDCの数は、DC細胞表面抗原、例えばLy49Q、CD4、MHCII、B7H1、CD81、CD62L、およびCD11b、CD45RA、およびF4/80を、当業者に知られる技法で測定することによって、定量することができる。これらの技法には、例えば後述の実施例1に記載する方法による表面染色および蛍光活性化細胞選別（FACS）などが含まれるが、これらに限るわけではない。DCの数は間接的に定量することもできる。例えばDCの数は、サイトカイン産生量のDC特異的な増加を測定することによって定量することができる。サイトカイン産生量、IFN- γ 、IFN- α 、IL-12 p70、IL-6、TNF- α 、MCP-1およびIFN- γ の定量は、当業者に知られる技法で達成することができる。これらの技法には、後述の実施例1に記載するELISAが含まれるが、これに限るわけではない。サイトカイン産生量の増加倍率には、1.2倍以上、1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、または10倍以上を含めることができるが、これらに限るわけではない。

【0043】

本発明の実施形態では、M-CSFおよび/または抗原を培養細胞にタンパク質として投与することができる。M-CSFタンパク質は、当業者に知られる方法、例えば限定するわけではないが、インビトロ原核および真核発現系で、製造することができる。

【0044】

本発明の実施形態では、M-CSFを、インビトロで培養細胞に、例えば限定するわけではないが1~100ng/ml、1~75ng/ml、1~50ng/ml、1~25ng/ml、1~10ng/ml、10~100ng/ml、10~75ng/ml、25~100ng/ml、50~100ng/ml、75~100ng/ml、25~75ng/ml、または50~75ng/mlなどのレベルで、好ましくは10~50ng/ml、最も好ましくは20ng/mlで、投与することができる。

【0045】

M-CSFおよび/または抗原は、M-CSFをコードし、培養細胞内でのその発現を指示するDNAまたはRNAの導入によって、培養細胞に投与することもできる。この投与方法のための技法には、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションおよび形質導入のための技法が含まれるが、これらに限るわけではない。M-CSFは、M-CSFを産生するための遺伝情報を保持するウイルスを使った感染によって細胞に投与することもできる。そのようなウイルスの限定でない例は、DISC-ヘルペスウイルスおよびボックスウイルス、例えば限定するわけではないが修飾ワクシニアウイルス・アンカラ（MVA）である。

【0046】

国際公開第02/42480号（この文献は特に参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、安全性が強化された新規MVA株が開発されている。これらの株は、次に挙げる有利な性質を少なくとも一つは持つことを特徴とする：

(i) ニワトリ胚線維芽細胞（CEF）ではインビトロで増殖的複製能を持つが、ヒト細胞株では、ヒトケラチノサイト細胞株HaCaT、ヒト胎児腎臓細胞株293、ヒト骨骨肉腫細胞株143B、およびヒト子宮頸部腺癌細胞株HeLaにおいてそうであるように、増殖的複製能を持たない；

(ii) 成熟BおよびT細胞を産生する能力を持たず、したがって重度の免疫欠陥を持ち、複製ウイルスに対する感受性が高いマウスモデルにおいて、複製することができない；およ

び

(iii) DNAプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンと比較して、少なくとも同じレベルの特異的免疫応答を、ワクシニアウイルスプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンで誘導する。

【0047】

開発された株の一つはEuropean Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) に受託番号V00083008として寄託されている。この株は、国際公開第02/42480号では全体を通して、「MVA-BN」と呼ばれている。

【0048】

「増殖的複製能を持たない」という用語は、そのウイルスが、細胞株293 (ECACC番号85120602)、143B (ECACC番号91112502)、HeLa (ATCC番号CCL-2) およびHaCat (Boukampら, *J. Cell Biol.* 106(3):761-71 (1988)) などのヒト細胞株において、いくつかの具体的MVA株について国際公開第02/42480号の実施例1で概説されているような条件下で、1未満の増幅比を示すことを意味する。

【0049】

国際公開第02/42480号によれば、「インビボで複製することができない」とは、ヒトおよび国際公開第02/42480号に記載のマウスモデルにおいて複製しないウイルスを指す。

【0050】

当業者はこれらの投与方法についてよく知っている。DCへのM-CSFまたは抗原の投与は、DCをM-CSFまたは抗原に「ばく露」させることになる。

【0051】

本発明の別の実施形態では、抗原をDCにM-CSFと同時投与することができる。これらの抗原には、ウイルス（限定でない例として、インフルエンザ、HIV、CMV、EBV、ヒトパピローマウイルス、アデノウイルス、HBV、HCVおよびワクシニア）、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、および腫瘍細胞（腫瘍抗原）上に存在する抗原、ならびにウイルス、細菌、真菌、寄生虫、軟体動物、節足動物、および脊椎動物に由来する毒素抗原が含まれるが、これらに限るわけではない。本発明の実施形態において、抗原は、自己抗体由来のペプチドであって、SLEを処置するための抗原になりうるもの、および突然変異型のFlt3またはc-kitに対応するペプチドであって、AMLを処置するための抗原になりうるものも含むことができる。

【0052】

「同時投与」という用語は、動物または培養細胞への二つ以上の物質の投与を指す。同時投与は同時に行うことも、逐次的に行う（一方の物質を投与した後に他方を投与する）こともできる。逐次的に投与される場合、2番目の物質は、限定するわけではないが、1分以内、2分以内、5分以内、10分以内、30分以内、1時間以内、2時間以内、8時間以内、12時間以内、24時間以内、2日以内、3日以内、7日以内、14日以内、または1ヶ月以内であることができる。本発明の実施形態では、M-CSFの投与によって生成されるDCが、抗原の同時投与によって、抗原にも「ばく露」される。

【0053】

「腫瘍抗原」という用語は、一定の腫瘍性疾患に関連する抗原を指す。腫瘍抗原は、ほとんどの場合、その腫瘍を発生させる宿主のゲノムによってコードされる抗原である。したがって厳密な意味では、腫瘍抗原は外来抗原ではない。しかし、腫瘍抗原は腫瘍中には有意な量で見出されるのに対して、正常組織中の腫瘍抗原の量はかなり少なく、ほとんどの場合、腫瘍抗原は正常組織には全く見出されない。腫瘍抗原の例には、黒色腫のgp75抗原、子宮頸がんのパピローマウイルスタンパク質、およびB細胞リンパ腫の腫瘍特異的イディオタイプタンパク質などがある。

【0054】

本発明のさらなる実施形態では、M-CSF生成DCを使って、インビボまたはインビトロで、他の免疫細胞における免疫応答を刺激する。これらの免疫細胞には、T細胞（限定するわけではないが、調節性またはサプレッサーT細胞、キラーT細胞 (CTL)、およびヘルパ

10

20

30

40

50

ーT細胞（限定するわけではないが、Th1、Th2、およびTh17を含む）を含む）、B細胞、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、およびマクロファージが含まれるが、これらに限るわけではない。刺激された細胞は、免疫応答を開始させるために、インビボで動物に導入することができる。そのような免疫応答には、抗アレルギー応答、抗敗血症応答、抗移植片拒絶応答、抗腫瘍応答、抗自己免疫疾患応答、寛容誘発性免疫応答、抗病原体免疫応答、および調節性免疫応答が含まれるが、これらに限るわけではない。

【0055】

M-CSF生成DCを刺激剤にばく露することもでき、その場合、「刺激剤」はDCからの特異的応答を誘導するタンパク質および他の分子である。本発明の刺激剤には、TLRアゴニスト、ウイルス、細菌、真菌、植物、寄生虫もしくはその一部、またはサイトカイン、例えば限定するわけではないが、IFN-I、IL-6、IL-10、IL-12およびTNF- α が含まれるが、これらに限るわけではない。

【0056】

本発明の別の実施形態では、M-CSFが動物に投与される。「動物」という用語は、限定するわけではないが脊椎動物、最も好ましくは哺乳動物、例えば限定するわけではないがヒト、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ラマ、ネコ、イヌ、マウス、およびラットを包含する。

【0057】

本発明の別の実施形態では、抗原をM-CSFと同時投与することができる。これらの抗原には、ウイルス（限定でない例として、インフルエンザ、HIV、CMV、EBV、ヒトパピローマウイルス、アデノウイルス、HBV、HCVおよびワクシニア）、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、および腫瘍細胞（腫瘍抗原）上に存在する抗原、ならびにウイルス、細菌、真菌、寄生虫、軟体動物、節足動物、および脊椎動物に由来する毒素抗原が含まれるが、これらに限るわけではない。本発明の実施形態において、抗原は、自己抗体由来のペプチドであって、SLEを処置するための抗原になりうるもの、および突然変異型のFlt3またはc-kitに対応するペプチドであって、AMLを処置するための抗原になりうるものも含むことができる。

【0058】

M-CSFおよび/または抗原は、タンパク質、DNA、RNA、またはウイルスとして動物に投与することができる。動物へのタンパク質の投与は、限定するわけではないが経口、経皮、経粘膜投与によって、または注射（非経口）によって、達成することができる。投与される用量は、どのタイプの投与を使用するかに依存して変動しうる。M-CSFおよび抗原の薬学的に許容できる製剤は当技術分野では知られている。担体または賦形剤を使って医薬組成物を製造することができる。担体の例には、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、さまざまな糖、例えばラクトース、グルコース、もしくはスクロース、またはさまざまなタイプのデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコール、および生理的に適合する溶媒が含まれるが、これらに限るわけではない。生理的に適合する溶媒には、注射用水（WFI）、食塩溶液、およびデキストロースの滅菌溶液が含まれるが、これらに限るわけではない。M-CSFは、例えば限定するわけではないが静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、経口、経粘膜、直腸、または経皮を含む異なる経路によって、投与することができる。

【0059】

インビボでは、M-CSFおよび/または抗原が、0.01 μg ~100mg/日、0.1 μg ~100mg/日、1 μg ~100mg/日、10 μg ~100mg/日、100 μg ~100mg/日、1mg~100mg/日、10mg~100mg/日、50~100mg/日、0.01 μg ~10mg/日、0.1 μg ~10mg/日、1 μg ~10mg/日、10 μg ~10mg/日、100 μg ~10mg/日、1~10mg/日、10~50mg/日、0.01 μg ~1mg/日、0.1 μg ~1mg/日、1 μg ~1mg/日、10 μg ~1mg/日、100 μg ~1mg/日、1~10mg/日、または1~50mg/日のレベルで動物に投与される。齧歯動物への投与の場合、1~20 μg /日のレベルは好ましく、10 μg /日は最も好ましい。ヒトの場合、1~50mg/日のレベルは好ましく、25mg/日は最も好ましい。M-CSFは、限定するわけではないが0.5 μg ~10g/g体重/日、1 μg ~10g/g体重/日、10

10

20

30

40

50

$\mu\text{g} \sim 10\text{g/g}$ 体重/日、 $100 \mu\text{g} \sim 10\text{g/g}$ 体重/日、 $1\text{g} \sim 10\text{g/g}$ 体重/日、 $0.5 \mu\text{g} \sim 1\text{g/g}$ 体重/日、 $1 \mu\text{g} \sim 1\text{g/g}$ 体重/日、 $10 \mu\text{g} \sim 1\text{g/g}$ 体重/日、または $100 \mu\text{g} \sim 1\text{g/g}$ 体重/日（好ましくは $0.5 \mu\text{g/g}$ 体重/日）などの、単位体重ベースで動物に投与することもできる。本発明では他の投薬量も考えられ、それらは当業者に知られるアッセイを使って決定することができる。

【0060】

本発明のさらなる実施形態には、動物から単離された前駆体細胞へのM-CSFの投与が含まれる。これらの細胞はM-CSFによってインビトロで誘導され、抗原にばく露され、治療効果または予防効果を求めてその動物に戻される。そのような「エキスピボ」療法のための技法は、記載のとおり（36、37、44）、当業者には知られている。本発明ではエキスピボ療法のための他の技法も考えられる。

【0061】

インビトロで造血前駆体細胞を誘導するために、例えば後述の実施例1に記載する手法をはじめとする（ただしこれに限るわけではない）当業者に知られる技法によって、細胞を培養し、DCを収集することができる。この実施形態では、DC細胞表面抗原、例えばCD11c、Ly49Q、CD4、CD8、CD22、DEC-205、33D1、PDCA-1、BDCA-1、BDCA-2、BDCA-4、CD25、CD80、CD86、CD40、CD69、Siglec-H、Ly6C、CCR9、HLA-DR、CD123、MHCII、B7H1、CD81、CD62L、CD11b、CD45R、CD45RA、およびF4/80を、当業者に知られる技法で観察することによって、DCが特徴づけられる。これらの技法には、例えば後述の実施例1に記載する方法による表面染色および蛍光活性化細胞選別（FACS）などが含まれるが、これらに限るわけではない。限定するわけではないが、IFN- I 、IFN- α 、IL-12 p70、IL-6、TNF- α 、MCP-1 およびIFN- γ などといったサイトカイン産生量の定量も、使用することができる。これは当業者に知られる技法で達成される。これらの技法には、後述の実施例1に記載するELISAが含まれるが、これに限るわけではない。

【0062】

エキスピボ療法に関わる本発明の実施形態では、M-CSFおよび/または抗原を培養細胞にインビトロでタンパク質として投与することができる。M-CSFタンパク質は、当業者に知られる方法、例えば限定するわけではないがインビトロ原核および真核発現系で、製造することができる。

【0063】

本発明の実施形態では、M-CSFおよび/または抗原が培養細胞に、例えば限定するわけではないが $1 \sim 100\text{ng/ml}$ 、 $1 \sim 75\text{ng/ml}$ 、 $1 \sim 50\text{ng/ml}$ 、 $1 \sim 25\text{ng/ml}$ 、 $1 \sim 10\text{ng/ml}$ 、 $10 \sim 100\text{ng/ml}$ 、 $10 \sim 75\text{ng/ml}$ 、 $25 \sim 100\text{ng/ml}$ 、 $50 \sim 100\text{ng/ml}$ 、 $75 \sim 100\text{ng/ml}$ 、 $25 \sim 75\text{ng/ml}$ 、または $50 \sim 75\text{ng/ml}$ のレベルで、好ましくは $10 \sim 50\text{ng/ml}$ 、最も好ましくは 20ng/ml で、インビトロ投与される。

【0064】

M-CSFおよび/または抗原は、M-CSFをコードし、培養細胞内でのその発現を指示するDNAまたはRNAの導入によって、培養細胞に投与することもできる。この投与方法のための技法には、トランスフェクション、リポフェクション、エレクトロポレーションおよび形質導入のための技法が含まれるが、これらに限るわけではない。M-CSFおよび/または抗原は、M-CSFおよび/または抗原を産生するための遺伝情報を保持するウイルスを使った感染によって細胞に投与することもできる。そのようなウイルスの限定でない例は、DISC-ヘルペスウイルスおよびボックスウイルス、例えば限定するわけではないが修飾ワクシニアウイルス・アンカラ（Modified Vaccinia virus Ankara: MVA）である。MVAの株、MVA-BNは、European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) に受託番号V00083008として寄託されている。当業者はこれらの投与方法についてよく知っている。

【0065】

いくつかの自己免疫疾患、例えば限定するわけではないがSLEは、Toll様受容体9（TLR9）によって媒介されることが示されている（38）。TLR9はDNAを認識し、一定の条件下では、自己免疫疾患において自己DNAを認識することができる。これらの疾患では、TLR9が自己DNAに結合すると、TLR9を発現させるB細胞が増殖することになる。また、pDCもTLR9-

10

20

30

40

50

DNA複合体によって活性化され、増加したレベルのIFN-Iを産生し、それが疾患をさらに悪化させる。pDCのFL誘導は、それがpDC発生を誘導する際に絶え間ない刺激を加えることにより、この悪化の一因になる。本発明の実施形態は、SLEなどの自己免疫疾患を患っている患者にM-CSFが投与され、それがM-CSFによって誘導される新しいDCを感作するように作用するという、より良い治療レジメンを提供する。しかし、FLによる処置とは対照的に、DCが誘導されるだけでなく、M-CSFはTLR9および自己DNA複合体に対するその応答もダウンレギュレートする(23)。このようにM-CSF誘導DCは、患者における特異的免疫応答、例えば限定するわけではないが悪化した自己免疫反応の下方調整を、追加のTLR9 IFN-I産生およびB細胞刺激をトリガーすることなく、促進することができる。

【0066】

10

本発明のもう一つの実施形態では、増殖性障害のための治療レジメンが提供される。そのような増殖性障害には、白血病などのがんタイプが含まれる。これらの白血病には、AMLが含まれるが、これに限るわけではない。AMLおよび他の白血病は、FLの受容体であるFlt3の活性化によって媒介される(39, 48~50)。したがって、本発明のこの実施形態では、DCの発生を誘導するために患者にFLを投与すると、疾患を悪化させることになるだろう。これに対し、本発明では、FLで腫瘍細胞をさらに刺激することなく、腫瘍細胞に対する免疫応答を与えるようにDCを誘導することができるように、M-CSFを腫瘍抗原と一緒に白血病(AMLを含むが、これに限るわけではない)を持つ患者に投与する。Flt3のインヒビターも白血病を処置するためにM-CSFと一緒に使用することができる。Flt3のインヒビターは当業者には知られている。

20

【0067】

本発明の実施形態は、他の増殖性障害(骨髓系統、リンパ球系統もしくは赤血球系統、またはその前駆体細胞から生じる造血系の過形成/新生物細胞が関わる造血新生物障害を含むが、これに限るわけではない)の処置にも向けられる。これらには、赤芽球性白血病、急性前骨髓性白血病(APML)、慢性骨髓性白血病(CML)、リンパ系悪性疾患、例えば限定するわけではないが急性リンパ芽球性白血病(ALL)(B系統ALLおよびT系統ALLを含む)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、前リンパ球性白血病(PLL)、ヘアリー細胞白血病(HLL)およびワルデンストレーム・マクログロブリン血症(WM)が含まれるが、これらに限るわけではない。他の形態の悪性リンパ腫には、非ホジキンリンパ腫およびその変種、末梢T細胞リンパ腫、成人T細胞白血病/リンパ腫(ATL)、皮膚T細胞性リンパ腫(CTCL)

30

、大型顆粒リンパ球性白血病(LGF)、ホジキン病およびリード-シュテルンベルク病が含まれるが、これらに限るわけではない。

【0068】

また本発明の実施形態は、限定するわけではないが、呼吸器系癌、胃腸系癌、泌尿生殖器系癌、精巣癌、乳癌、前立腺癌、内分泌系癌、および黒色腫を含む上皮または内分泌組織の悪性疾患の処置も包含する。典型的な癌には、子宮頸、肺、前立腺、乳房、頭頸部、結腸および卵巣の組織から形成されるものが含まれるが、これらに限るわけではない。

【0069】

さらにまた、本発明の実施形態は、造血前駆体細胞から前記前駆体細胞のM-CSF刺激によって生成される樹状細胞を包含する。好ましい一実施形態では、前記樹状細胞の生成がFLに依存しない。生成された樹状細胞はcDCタイプまたはpDCタイプでありうる。造血前駆体細胞には骨髓細胞が含まれるが、これに限るわけではない。M-CSF刺激によって樹状細胞を生成させるための方法は、本明細書で詳しく説明する。

40

【0070】

本発明はさらに、M-CSFをコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルスに関する。本発明によれば、ボックスウイルスは任意のボックスウイルスであることができる。したがってボックスウイルスは、チョルドボックスウイルス亜科およびエントモボックスウイルス亜科の任意のウイルスであることができる(「Fields Virology」第3版(Lippincott-Raven Publishers、米国フィラデルフィア、ISBN 0-7817-0253-4)の第83章を参照されたい)。組換えボックスウイルスをヒトを含む哺乳類動物で遺伝子を発現させるために

50

使用する場合は、チョルドボックスウイルス亜科のウイルスが特に好ましい。チョルドボックスウイルス亜科に属する特に好ましい属は、オルトボックスウイルス、パラボックスウイルス、アビボックスウイルス、カプリボックスウイルス、レポリボックスウイルスおよびスイボックスウイルスである。最も好ましいのはオルトボックスウイルスおよびアビボックスウイルスである。アビボックスウイルスの例はカナリア痘ウイルスおよび鶏痘ウイルスである。オルトボックスウイルスの例はワクシニアウイルスである。本発明に従って使用することができるワクシニアウイルス株は、コペンハーゲン（Copenhagen）株、ワイエス（Wyeth）株、ウェスタンリザーブ（Western Reserve）株、エルストリー（Elstree）株、NYCBH株など、任意のワクシニアウイルス株であることができる。特に好ましいのは修飾ワクシニア・アンカラ（MVA）である。

10

【0071】

MVAは、ワクシニアウイルスのアンカラ株（CVA）をニワトリ胚線維芽細胞で516代にわたって連続継代することによって作出された（概要については、Mayr, A.ら, Infection 3, 6-14 [1975]を参照されたい）。これらの長期間にわたる継代の結果、得られたMVAウイルスではそのゲノム配列のうち約31キロ塩基が欠失しており、したがって宿主細胞は鳥類細胞に著しく制限されると記載されている（Meyer, H.ら, J. Gen. Virol. 72, 1031-1038 [1991]）。得られたMVAは著しく病原性であることが、さまざまな動物モデルで示されている（Mayr, A.およびDanner, K.[1978] Dev. Biol. Stand. 41:225-34）。

【0072】

本発明では任意のMVA株を使用することができる。好ましい一実施形態では、MVAが次の有利な性質を少なくとも一つ、二つ、または好ましくは三つ持つことを特徴とする：

20

(i) ニワトリ胚線維芽細胞（CEF）ではインビトロで増殖的複製能を持つが、ヒト細胞株では、ヒトケラチノサイト細胞株HaCaT、ヒト胎児腎臓細胞株293、ヒト骨骨肉腫細胞株143B、およびヒト子宮頸部腺癌細胞株HeLaにおいてそうであるように、増殖的複製能を持たない；

(ii) 成熟BおよびT細胞を産生する能力を持たず、したがって重度の免疫欠陥を持ち、複製ウイルスに対する感受性が高いマウスモデルにおいて、複製することができない；および

(iii) DNAプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンと比較して、少なくとも同じレベルの特異的免疫応答を、ワクシニアウイルスプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンで誘導する。

30

【0073】

ブダベスト条約の要件に従って寄託された、本発明で使用されるMVAウイルス株の例は、英国ソールズベリーのEuropean Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) に受託番号ECACC V94012707およびECACC V00120707としてそれぞれ寄託されたMVA 572株およびMVA 575株である。好ましい一実施形態では、前記MVAが、「MVA-BN」と表示される、英国ソールズベリーのEuropean Collection of Cell Cultures (ECACC) に番号V00083008として寄託されたMVAワクシニアウイルスおよびその派生株である。

【0074】

ある実施形態では、本発明のボックスウイルスが少なくとも一つの異種核酸配列を含む。以下、通常は自然界においてそのウイルスと密接に関連して見出されることがない核酸配列の任意の組合せについて「異種」という用語を使用し、そのようなウイルスを「組換えウイルス」ともいう。好ましくは異種核酸配列は、少なくとも一つの抗原、抗原エピトープ、および/または治療化合物をコードする配列である。抗原エピトープおよび/または抗原は、感染性因子の抗原エピトープおよび/または抗原であることができる。感染性因子はウイルス、真菌、病原性単細胞真核または原核生物、および寄生生物であることができる。ウイルスは、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、パラミクソウイルス、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスのファミリー、または出血熱を引き起こすウイルスから選択することができる。感染性因子は炭疽菌であることができる。

40

【0075】

50

さらにもう一つの実施形態によれば、上述した抗原エピトープの選択に加えて、もう一つのボックスウイルス異種配列源またはワクシニア異種配列源から異種配列を選択することもできる。これらのウイルス配列は、そのウイルスの宿主スペクトルまたは免疫原性を調整するために使用することができる。

【0076】

さらにもう一つの実施形態において、本発明のボックスウイルスは、治療化合物を発現させる異種遺伝子/核酸をコードしうる。ウイルス中の異種核酸がコードする「治療化合物」は、例えばアンチセンス核酸などの治療核酸、または所望の生物学的活性を持つペプチドもしくはタンパク質であることができる。

【0077】

さらにもう一つの好ましい実施形態によれば、異種核酸配列の発現は、好ましくはボックスウイルスプロモーター、より好ましくはワクシニアウイルスプロモーターの転写制御を受けるが、これに限るわけではない。

【0078】

さらにもう一つの実施形態によれば、異種核酸配列の挿入は、好ましくは、ウイルスゲノムの非必須領域に行われる。本発明のもう一つの好ましい実施形態では、異種核酸配列が、ボックスウイルスゲノム（PCT/EP96/02926に開示されているMVAを含むが、これに限るわけではない）中の天然の欠失部位に挿入される。ボックスウイルスゲノム中に異種配列を挿入する方法は、当業者には知られている。

【0079】

さらなる実施形態によれば、本発明は、ワクチンまたは医薬品として使用するための本発明の組換えボックスウイルスに関する。本発明は、上で特定した増殖性疾患および/または自己免疫疾患を処置するための、本明細書に記載するM-CSFをコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルスにも関係する。さらにまた本発明は、増殖性疾患および/または自己免疫疾患を処置するための医薬組成物を製造するための、M-CSFをコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルスの使用も包含する。

【0080】

より一般的に述べると、本発明は、本発明の組換えボックスウイルスを含むワクチンまたは医薬組成物に関する。ワクチンまたは医薬組成物を製造し、動物または人体に投与できるようにする方法は、当業者には知られている。ベクターがボックスウイルスベクターまたはワクシニアウイルスベクター、特にMVAベクターなどのウイルスベクターである場合は、当業者の知識に従って、例えば静脈内、筋肉内、鼻腔内、皮内または皮下投与などにより、それを動物または人体に投与することもできる。

【0081】

医薬組成物またはワクチンは、一般に、本発明のプロモーター、発現カセットまたはベクターに加えて、一つ以上の薬学的に許容できかつ/または承認された担体、添加剤、抗生物質、保存剤、佐剤、希釈剤および/または安定剤を含みうる。そのような補助物質は、水、食塩水、グリセロール、エタノール、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝物質などであることができる。適切な担体は、典型的には、大きくてゆっくり代謝される分子、例えばタンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、アミノ酸ポリマー、アミノ酸コポリマー、脂質集合体などである。

【0082】

医薬組成物またはワクチンを製造するには、本発明の組換えボックスウイルス、特に組換えMVAなどの組換えワクシニアウイルスを、生理的に許容できる形態に変換する。ワクシニアウイルス、特にMVAの場合は、これを、痘瘡に対するワクチン接種に用いられるボックスウイルスワクチンの製造における経験に基づいて行うことができる（Stickl, H.ら [1974] Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392に記載されている）。例えば精製ウイルスは、約10mM トリス、140mM NaCl pH7.4中に製剤化して、 5×10^8 TCID₅₀/mlの力価で、-80℃で保存される。ワクチン注射剤を製造するには、例えば本発明の組換えウイルスの粒子 $10^1 \sim 10^9$ 個を、リン酸緩衝食塩水（PBS）中、2%ペプトンおよび1%ヒトアルブミンの存在

10

20

30

40

50

下に、アンプル中、好ましくはガラスアンプル中で凍結乾燥する。あるいは、ワクチン注射剤を、製剤中のウイルスの段階的凍結乾燥によって製造することもできる。この製剤は、さらに、例えばマンニトール、デキストラン、糖、グリシン、乳糖もしくはポリビニルピロリドンなどの添加剤、または、インビボ投与に適した酸化防止剤もしくは不活性ガス、安定剤または組換えタンパク質（例えばヒト血清アルブミン）などの他の添加剤も含むことができる。凍結乾燥に適した典型的なウイルス含有製剤は、10mMトリス緩衝液、140mM NaCl、18.9g/lデキストラン（MW36000～40000）、45g/lショ糖、0.108g/l L-グルタミン酸一カリウム塩一水和物、pH7.4を含む。次に、ガラスアンプルを密封して、4℃～室温で数ヶ月間保存することができる。しかし、必要がない限り、アンプルは-20℃未満の温度で保存することが好ましい。

10

【0083】

ワクチン接種または治療を行うには、上記の凍結乾燥品を0.1～0.5mlの水性溶液、好ましくは水、生理食塩水またはトリス緩衝液に溶解し、それを全身的または局所的に、すなわち非経口投与、筋肉内投与、または当業者に知られている他の任意の投与経路によって、投与することができる。当業者であれば、投与様式、用量および投与回数を、既知の方法で最適化することができる。

【0084】

さらにもう一つの実施形態において、本発明は、造血前駆体細胞から樹状細胞（DC）を生成させるための、本発明の組換えボックスウイルスまたは医薬組成物の使用に関する。

【0085】

本発明は、動物中で抗原に対する免疫応答を誘導するためのキットも包含する。本発明の一実施形態において、キットは、本発明の組換えウイルスを第1バイアル/容器に含み、抗原（それに対する免疫応答を誘導させようとするもの）を第2バイアル/容器に含む。ウイルスは組換えボックスウイルス、特にMVAにとって異種である追加ヌクレオチド配列を含有する組換えMVAであることができる。好ましい一実施形態では、組換えボックスウイルスが、M-CSFをコードする核酸を含むMVAウイルスである。特に好ましい一実施形態では、上記のキットが、M-CSFをコードする遺伝子を含む本発明の組換えボックスウイルスを第1バイアルに含み、上述の抗原を第2バイアルに含む。キットは、第1ステップとして、動物中で樹状細胞（DC）を増加および/または生成させるために、本発明の組換えボックスウイルスを含む第1バイアルを前記動物に投与するようにという指示も含む。第1バイアルは、動物から取り出された造血前駆体細胞に、インビトロおよび/またはエクシボで投与することもできる。M-CSFの添加後に樹状細胞が増加および/または生成したかどうかを決定するための方法は、本明細書に詳しく説明する。前記樹状細胞を生成させた後に、抗原を含む第2バイアルを、生成した樹状細胞にインビトロおよび/またはエクシボで投与することができる。次に、そのばく露された樹状細胞を、動物に再導入することができる。あるいは、抗原を含む第2バイアルを動物にインビボで投与することもできる。

20

30

【0086】

以下の詳細な実施例は、本発明をより良く理解する一助となるように記載するものである。しかし本発明はこれらの実施例に限定されるわけではない。本発明の他の実施形態は、ここに開示する本発明の明細および実施を検討することにより、当業者には明白になるだろう。

40

【実施例】

【0087】

<実施例1>

材料と方法

マウス—C57BL/6マウスはHarlan Winkelmann（ドイツ・ボルヒェン）から入手し、6～10週齢で使用した。FLKOマウスは記載（14）されているように開発され、チューリッヒ大学の実験動物学研究所（Institute of Labortierkunde）で繁殖された。ユビキチンプロモーター下の緑色蛍光タンパク質（GFP）を発現させるマウス [C57BL/6-Tg(UBC-GFP)30Sc ha/J、以下UBC-GFPマウスともいう] はCharles River Laboratories（ドイツ・ズルツフ

50

ェルト) から購入した。動物実験は、現地政府の動物倫理委員会の承認を受けて、そのガイドラインに従って行った。

【0088】

抗体および試薬－組換え (rec) flagタグ付きマウス (mu) FLは、先に記述したように (10)、自社において、CHO細胞中で発現させ、精製した。recmuM-CSFおよびrechum-CSFをTebu-Bio (ドイツ・フランクフルト) から、またrechum-CSFをR&D Systems (ドイツ・ウィースバーデン) から入手した。cFMS受容体チロシンキナーゼインヒビター (カタログ番号344036) はEMD Biosciences (ドイツ・ダルムシュタット) から入手した。CpGモチーフを含有するオリゴヌクレオチド (CpG2216およびCpG1668) は、公表された配列 (35) に従い、TIB MOLBIOL (ドイツ・ベルリン) によって合成された。イミキモド (R837) およびパルミトイル-3-システイン-セリン-リジン-4 (Pam-3-Cys) はInvivoGen (米国サンディエゴ) から購入した。ポリ (シチジル-イノシン) 酸 (ポリI:C)、リポ多糖 (LPS) および7-アリル-7,8-ジヒドロ-8-オキソグアノシン (ロキソリビン) はSigma-Aldrich (ドイツ・タウフキルヒェン) から購入した。全ての抗体は、別段の言明がない限り、次の例外を除いて、Becton Dickinson (ドイツ) から入手した：精製およびFITCコンジュゲート抗CD11c (ラットクローン223H7) および抗Ly49Q (Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH、ドイツ・エーヒンク)、抗mPDCA-1 (Miltenyi Biotec、ドイツ・ベルギッシュグラートバッハ) および抗F4/80 (NatuTec GmbH、ドイツ・フランクフルト)、抗CD117-PeCy7 (クローン2B8)、抗CD34-Pe (クローンRAM34) (NatuTec GmbH、ドイツ・フランクフルト) および抗CD115 (クローンAFS98、およびアイソタイプ対応ラットIgG2a対照)。もう一つのM-CSR mAb (クローン604B5 2E11、Serotec GmbH、ドイツ・デュッセルドルフ) も使用したが、このmAbによる染色は、クローンAFS98とは異なり、全BMでは極めて低く、このクローンを使ってCLP上のM-CSFR発現を検出することはできなかったことに注意すべきである。エクスビオDC精製 (21) 用の枯渇カクテルにその上清を使用した多くのハイブリドーマは、Ken Shortman教授 (WEHI、オーストラリア・メルボルン) から提供された。

【0089】

M-CSFおよびFL BM培養物－BM細胞をマウスの大腿骨および脛骨から洗い出した。赤血球溶解緩衝液 (Sigma-Aldrich) を使ってBM細胞懸濁液から赤血球を枯渇させた。次にBM細胞を直接または枯渇後に培養した。枯渇させるには、BM細胞をCD11cおよびCD45R (B220) に対するラット抗体と共に30分間インキュベートした後、ヤギ抗ラット磁気ビーズ (QiaGen、ドイツ・ヒルデン) と共に30分間インキュベートした。この枯渇手法により、常に、全BM細胞の65～80%が除去された。ラット抗体の非存在下で、ビーズのみによる枯渇でも、おそらくはFcR/Ig相互作用により、約50%のBM細胞が枯渇されることに注意すべきである。全BM細胞または枯渇BM細胞は、10%FCS、50 μ M β -メルカプトエタノール、100IU/ml ペニシリン/ストレプトマイシン (完全培地) および20ng/mlのrecmuM-CSFもしくはrechum-CSFまたは35ng/mlのrecmuFLを補足したRPMI-1640培地 (Gibco) 中、 1.5×10^6 細胞/mlで、5%CO₂を含有する湿潤雰囲気下、37°Cで6～8日間培養した。M-CSF培養物には新鮮なM-CSFを培地交換なしで3日ごとに供給した。

【0090】

M-CSFまたはFL BM培養物の表面染色－収集した細胞を、2%FCSおよび2mM EDTAを含有するPBS (FACS緩衝液) 中で洗浄した。次に、1mg/ml精製抗CD16/32モノクローナル抗体 (クローン2.4G2) と共に氷上で20分間インキュベートすることによって、FcR結合をブロックした。次に、等体積の2×濃縮特異抗体染色剤を細胞懸濁液に加え、さらに20分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液中で洗浄し、1 μ g/mlヨウ化プロピジウムを含有するFACS緩衝液に再懸濁した。

【0091】

DCサブセットの活性化およびELISAによるサイトカイン産生の解析－無選別M-CSFもしくはFL BM培養物または選別DC (0.25～0.5 $\times 10^6$ 細胞/ml) を、刺激剤を添加してまたは添加せずに、完全培地中で18～24時間刺激する。使用した刺激剤は次のとおりである：1 μ g/ml Pam-3-Cys、100 μ g/ml ポリ (I:C)、1 μ g/ml LPS、1 μ g/ml R837、1mMロキソリビン、0.5

μM CpG2216、 $0.5\mu\text{M}$ CpG1668。培養上清をIFN- α の存在について、以前記述したように(21)、2部位(two-site)ELISAによってアッセイした。他のサイトカイン(IL-12 p70、IL-6、TNF- α 、MCP-1およびIFN- γ)はサイトメトリック・ビーズ・アレイ(Cytometric Bead Array)マウス炎症キット(Mouse Inflammation Kit)(Becton Dickinson)を使って測定した。刺激されたDCを上述のようにブロックし、CD8 α 、CD40、CD69、CD80およびCD86に対する抗体で染色した。

【0092】

インビボM-CSF処置—野生型マウスおよびFLK0マウスを、0.01%BSA中のM-CSF $10\mu\text{g}$ (体積 $100\mu\text{l}$)または賦形剤のみで、5日間連続してip処置した。その5日間の最後にマウスを屠殺した。腹膜を完全培地で3回洗った後、DC精製用に臓器を集めた。

【0093】

エクスピボDC精製—M-CSF処置マウスまたは賦形剤処置マウスの脾臓から、基本的に以前述べたように(21)、マウス容量オスモル濃度(308mOsm)に調節したFACS緩衝液、RPM Iおよび1.077A Nycodenz(Progen Biotechnik GmbH、ドイツ・ハイデルベルク)を使って、DCを精製した。

【0094】

前駆細胞の培養。CMP(Lin⁻Sca-1⁻ckit⁺CD34⁺FcR^{int})、CLP(Lin⁻Sca-1⁺c-kit^{int}IL-7R⁺Thy-1⁻)または顆粒球/マクロファージ前駆細胞(GMP、Lin⁻Sca-1⁻c-kit⁺CD34⁺FcR^{hi})を、以前述べたように²¹、C57BL/6 BMから単離し、FACS-ARIA装置で純度95%超まで選別した。2500個の細胞およびその段階2倍希釈液を、24ウェルプレートに入っているUBC-GFP BM細胞の1ml懸濁液に加えた。最終UBC-GFP BM細胞濃度を 1.0×10^6 細胞/mlとした。M-CSF培養またはFL培養をこれらのウェルで上述のように行った。6日後に試料を数え上げ、FACSで解析し、C57BL/6前駆細胞から生じた子孫にGFP^{neg}細胞としてゲートをかけた。CLP(Lin⁻Sca-1⁺c-kit^{int}IL-7R⁺Thy-1⁻)上のM-CSFR(CD115)およびFlt3(CD135)発現を解析するために、リニエージ枯渇(lineage depleted)細胞をまずSca-1-FITCおよびThy-1-PE抗体で染色し、Sca-1⁺Thy-1⁻細胞を選別した。次に、これらの前濃縮細胞(再分析したところ純度>95%)をCD117-PE-CY7、IL-7R-APCおよびCD115-PEまたはCD135-PEのどちらか一方で染色した。

<実施例2>

【0095】

M-CSFと共に培養した全BM細胞はCpG-ODNに応答するIFN- α の強力な産生細胞である

マウス骨髄(BM)細胞をFLと共に8~10日間培養すると、定常状態マウス脾臓のDC集団とよく似た何百万もの高度に純粋なpDCおよびcDCの生成が起こると報告されている(19)。これらのFL培養物内でのpDC発生の動態をルーチンのために、マルチウェルフォーマットでFLと共にインキュベートされた全BM細胞のIFN- α 産生能を、0~7日の時間経過にわたって解析した。M-CSFはBM細胞からマクロファージを生成させるために日常的に使用されるので、陰性対照として、並行して全BM細胞をM-CSFと共に培養した。通常、培地およびM-CSFは数日ごとに交換され、7日以上培養期間の最後に接着細胞だけが収集される(17)。しかしそうではなく、M-CSF培養物をFL培養物と全く同じように処理し、全M-CSF培養物のウェル(接着細胞と非接着細胞を含む)をCpG-2216に応答して起こるIFN- α 産生について解析した。意外なことに、M-CSF培養物において、IFN- α が高レベルに誘導された。そのうえ、CpG-2216に応答して産生されるIFN- α が培養時間と共に増加したことから、M-CSF培養中にIFN- α 産生細胞が生成されつつあることが暗示された(図1A)。

<実施例3>

【0096】

M-CSF BM培養物中で誘導されたIFN- α 産生細胞はpDCの特徴を示すが、FLの影響を受けずに発生する

全BM細胞からpDCおよびcDCを枯渇させると、BM細胞のCpG誘導IFN- α 産生能が枯渇した。DC枯渇BM細胞をM-CSFと共に6日間培養したところ、強力なIFN- α 産生能が、M-CSF培養物の非接着細胞中に再び検出された。

【0097】

非接着性M-CSF生成細胞がpDCに予想される表現型を示すかどうかを決定するために、それらをCD11cおよびCD45RAで染色した。実際、培養物内の細胞のうち10～20%の集団が、高レベルのCD45RAと中レベルのCD11cを発現させると共に、CD3、CD19またはCD49bまたはNK1.1発現を欠き、側方散乱および前方散乱は少なく、これは、pDCの表現型と一致した（図1Bおよび未掲載データ）。

【0098】

pDCの収量はFLで得られるものよりかなり少なかったものの、M-CSFがpDC発生を誘導することは明らかだった。二つの培養物を6日間の培養後に並べて比較したところ、M-CSFの効率はFLの約10分の1だった（図1B）。比較のために6日目を選択した理由は、この段階後にM-CSF培養物が著しく酸性になること、および培養物から選別されたDC集団は培養中ではるかに急速に死滅し、サイトカインを産生できなかったからである。

【0099】

pDCのM-CSF誘導が内在性FLを要求するかどうかを決定するために、FL遺伝子が除去されているマウス（FLKOマウス）からの同型BM培養物を調べた。FLKOマウスのBM培養物から得られる全細胞数は、培養をM-CSFを添加して行うかFLを添加して行うかにかかわらず減少したことから（図1c）、FLの非存在下でもpDCが発生することが示された。まず最初にDC集団を枯渇させ、外因性M-CSFのみの存在下で、FLの潜在的影響が及ばない状態でBMを培養することにより、pDCの表現型および形態を持つ細胞が産生されることは、明らかだった。これらのM-CSF生成pDCをM-pDCと呼ぶ。

<実施例4>

【0100】

M-pDCの詳細な表面表現型

野生型マウスおよびFLKOマウス由来のM-pDCの詳細な表現型決定により、誘発されたpDCは40個を越える表面マーカーに関して同一の表現型を示したことがわかる。FLを使ってインビトロで生成されたpDC（FL-pDC）と比較したところ、これら二つの異なるサイトカインで生成されるpDC間では、数多くの細胞表面マーカーが異なっていた。実際、図2に示すように、M-pDCは、多くのマーカーについて、FL-pDCとエクスビボ単離脾臓pDCの間であると思われるような表現型を示した。pDCの分化マーカーとして認識される分子；Ly49Q（20）、CD4（21）およびMHCIIは全て、M-pDC上の方がFL-pDC上よりも多く、脾臓pDC上のレベルに極めて近い。M-pDCはエクスビボ脾臓pDCと同程度に高レベルのLy6Cを発現させる。pDCはLy6C⁺前駆体から発生することが最近示されたので、M-pDCはpDC発生においてFL-pDCとは異なるさらに分化した状態を表す（22）。

【0101】

M-pDC上でのB7H1、CD81、CD62LおよびCD11bの表面発現も、FL-pDCよりもエクスビボpDCに方に似ている。対照的に、M-pDCは最低レベルのCD44を発現させ、脾臓pDCによって発現される高レベルとFL-pDCによって発現される低レベルとの間を埋める幅の表面CD24を発現させる。またM-pDCは低レベルのF4/80を発現させる。低いF4/80発現はM-pDCに「骨髄系」の表現型を付与する。M-pDCは極めて低レベルのCD11b（FL-pDCの10分の1程度）を発現させ、Ly6Gを発現させない。

<実施例5>

【0102】

高度に精製されたM-pDCはTLR7およびTLR9のリガンドによって活性化される

FL-pDCおよびエクスビボpDCと同様に、M-pDCはTLR3、TLR4またはGM-CSFに対するリガンドでは活性化されなかったが、TLR2リガンドPam-3-Cysに対して極めて微小な表面活性化を示した（図3A）。これらの刺激に対するM-pDCの生存率は極めて低かった（<5%）、未掲載データ。

【0103】

FL-pDCおよびエクスビボpDCと同様に、選別されたM-pDCは、CD8 α 、CD69、CD86およびCD40の増加した発現が示すとおり（図3Bおよび未掲載データ）、TLR7およびTLR9のリガ

10

20

30

40

50

ドで活性化された。M-pDCだけが、TLR7およびTLR 9リガンドに対して検出可能なサイトカインを産生した（図3Cおよび未掲載データ）。A型CpG-ODN（CpG2216）に応答して、M-pDCは高レベルのIFN- α を産生した（図3C）。M-pDCによって産生されたIFN- α の絶対量はFL-pDCによって産生された量の2分の1程度だった。TLR7およびTLR 9リガンドによって誘導される他のサイトカインには、IL-6およびTNF- α が含まれた（図3D）。M-pDCはFL-pDCと類似するレベルのIL-6を産生したが、FL-pDCよりも高レベルのTNF- α を産生した。M-pDCによるIL-10、IL-12p70、MCP-1およびIFN- γ の産生も調べたが、これらのサイトカインはいずれも検出されなかった。

【0104】

終夜刺激後に、M-pDCを表現型の変化について調べた。M-pDCは、FL-pDCおよびエキスビポDCと同様に、TLR刺激を受けて、増加したレベルのCD8a、CD69、CD86およびCD40を発現させた。

<実施例6>

【0105】

M-CSF BM培養物では通常型DCも発生する

図1に示すように、M-CSF BM培養物では、CD45RAまたはT、BもしくはNK細胞マーカーを同時に発現させないCD11c⁺細胞も誘導された。pDCと同様に、これらの細胞はFLKOマウスのBM培養物でも発生した。これらの細胞の表面表現型解析により、それらは、補助刺激マーカーおよびMHCIIを発現させる通常型（c）DCに似ていることがわかる（図7）。M-CSF BM培養物内で生成したM-cDCは、FL-cDCと同様に、活性化マーカー（CD80、CD86、CD40、MHCII）に関して不均一であったが、全体として、FL培養物中で誘導されたcDCよりも高レベルなこれらのマーカーを示した。FL-DC培養物では、CD11b^{lo}CD24^{hi}cDCは、CD8⁺CD11b⁻CD24^{hi}CD205⁺脾臓cDC等価物に相当する。M-CSF培養物中で生成したcDCは、低レベルのCD11bを発現させる細胞を含有するが、それらはFL-cDCには存在する極めて高レベルなCD24を発現させる細胞を欠くことから、それらはおそらくCD8⁺cDC等価物を産生しないことが示唆される。TLR刺激時に、cDCは活性化されて、成熟エキスビポ活性化cDCに類似した。

【0106】

興味深いことに、M-cDCおよびM-pDCの活性化において、それらはTLR9リガンドによく応答した。これは、TLR9をダウンレギュレートし、その結果として、TLR9リガンドに対してあまり応答しないM-CSF培養物内のマクロファージとは、極めて異なるシナリオである。

<実施例7>

【0107】

M-pDC生成は活性c-fmsに依存する

BM骨髓球系共通前駆細胞（CMP）およびリンパ球系共通前駆細胞（CLP）内のFlt3⁺細胞が、マウスリンパ器官内でのcDCおよびpDCの前駆体であることは、以前に示されており（24、25）、DC発生にとってFLは不可欠であると考えられていた。したがって、FLの非存在下でのDCの生成、特に典型的な単球性ポエチンによるpDCの生成は、予想外だった。図1に示すように、M-pDCは明らかにFLの非存在下で発生するが、それらはFL-pDCに対して多くの類似点も示す。M-CSFおよびFLが、各々の受容体Flt3およびc-fmsと同様に、構造的類似性を持つことから、M-CSFがFlt3を介してシグナルしているかどうかを調べた。すなわちM-CSFが、同様にFlt3を介してシグナルするFL代替物として作用してM-CSF誘導「FL-DC」を生成させるのかどうかを調べた。

【0108】

受容体チロシンキナーゼのインヒビターは数多く存在し、その交差反応性のレベルはさまざまである。インヒビターの一つ、cFMS受容体チロシンキナーゼインヒビター（Calbiochem）（これは、高度に特異的なc-fmsインヒビターであると報告されている）を使用した。事実、cFMS受容体チロシンキナーゼインヒビターは、幅広い濃度範囲でM-CSFの造血作用を完全に遮断した（図6）。最も高いインヒビター濃度ではFLによるDCの生成も遮断した。しかし、0.63~1.3 μ Mの範囲で使用したcFMSインヒビターは、FLが媒介するFL-DC生成に対してわずかな影響しか持たなかった（図4Aおよび図8）。これらと同じ低濃度で

もM-DC生成は遮断されたので、M-pDC生成にはFlt3受容体チロシンキナーゼを介したM-CSF作用が関与しない。c-fmsインヒビターは高濃度ではプロミスキヤス（promiscuous）な受容体チロシンキナーゼインヒビターであるようだが、低濃度ではFL-DC生成を阻害せず、これが実際にc-fms特異的であることが証明される。全く対照的に、Flt3インヒビター（Flt3インヒビターII、Calbiochem）はFL-DCの生成に関して著しく阻害的であるが、M-DCの生成についてはそうでない（図4Bおよび図8）。このようにM-pDCおよびM-cDCは、インビトロで、Flt3およびFLには依存せずに、M-CSFにより、c-FMSシグナリングを介して生成されうる。

<実施例 8>

【0109】

M-CSFはインビボでM-pDCおよびM-cDC生成を誘導する

M-CSFの遺伝子に突然変異を持つために機能的なM-CSFを欠くop/opマウスは、減少した脾臓DC数を示すことが、最近、報告された²⁷。具体的にはcDCは約2分の1に減少し、pDCは約3分の1に減少した。これは、実質的に、FLを欠くマウスに見られる効果ほどの効果ではなかったが、それでもなお、M-CSFの欠如がDC数の減少をもたらしたことから、M-CSFはDCコエチンであるという仮定が実証された。MacDonaldら（2005）によって始められた研究をさらに検証するべく、M-CSFが実際にインビボでDC数を増加させうるかどうかを解析するために、マウスにM-CSFを投与した。先行技術の他の参考文献によれば、10~200 μ /日の範囲にある一連の外因性M-CSF濃度が投与されている。使用されたM-CSFの供給源は広範囲にわたってさまざまであり、その結果、比活性も同様である。したがって、投与すべきM-CSFの最適レベルまたは飽和レベルを判定することは不可能である。そのうえ、M-CSFは循環中でわずか10分という極めて短い半減期を持つことが報告されている²⁸。決定された比活性を持つ市販のM-CSFには法外なコストがかかるので、「原理証明（proof of principle）」実証実験を行い、10 μ g/日のM-CSFをC57BL/6マウスまたはFLK0マウスに5日間投与した。この量は増減せず、適用期間の延長も試みなかった。しかし、5日間の適用後には、調べたマウスの腹腔洗浄液中にF4/80^{hi}細胞の著しい増加が観察されることは明らかだった（未掲載データ）。前記の知見はM-CSFが実際にインビボで作用を誘導していることを示す。

【0110】

脾臓中のDC集団を解析することにより、M-CSFは、pDC数とcDC数の両方について、約2倍という再現可能な増加を誘導していることが明らかになった。この増加はC57BL/6マウスおよびFLK0マウスにおいて明白だった（図5）。cDC亜集団をより詳しく調べたところ、CD8+集団およびCD8-集団がかなり均一に増加していることが示された（未掲載データ）。図5Aで明らかなように、M-CSF処置後に精製された低密度（light density）非DCの増加はあったものの、M-CSF処置は全脾細胞の増加を誘導しなかった（図5B）。CD11cintCD45RA-およびCD45RA^{hi}CD11c-/lo細胞は潜在的に未成熟DC集団を含有しうるが、それはこれ以上調べなかった。DCに似た細胞のより大規模な増加（6倍を超える増加）が、調べたC57BL/6マウスの腹腔洗浄液でも明白だった（未掲載データ）。

【0111】

これは、M-CSFが、pDCおよびcDCをインビトロで誘導するだけでなく、インビボでも、FLの非存在下でさえ、DC数を増加させる能力を持つことを示す、初めての証拠である。

<実施例 9>

【0112】

M-DC前駆体能を持つ前駆細胞集団

インビボでもインビトロでもFLの非存在下で生成されうるDCサブタイプの同定は、直ちに、それらの前駆体細胞の性質の問題を提起する。この因子が初期系統前駆細胞に作用してM-DCを生成させるのか、それとも、M-CSFは伝統的には「骨髄系」の増殖因子であると考えられているので、骨髄系統内の後期前駆体に作用してM-DCを生成させるのかを考察した。CMP、GMPおよびCLPをマウスBMから精製した。精製細胞集団の段階希釈液を「フィーダー」UBC-GFP BM細胞と混合し、M-CSF培養を6日間行った。

【0113】

3つの前駆体集団のそれぞれの子孫を解析したところ、分化拘束された (committed) GM Pは、前記培養条件ではM-DC産生能を持たないことが明らかになった (図6Bおよび6C)。CMPは極めて効率のよいM-cDCの前駆体であり、インプット前駆細胞1個あたり8~10個のM-cDCを産生したが、このレベルはインプット細胞数が156を下回ると劇的に低下した。これはおそらく、M-cDCがCMPの小さな亜集団から生じていることを示唆するのだろう。これに対し、CLPは、M-pDC生成に関してCMPより少なくとも10倍は効率がよかった。CLPはインプット前駆細胞1個あたり少なくとも10個のM-pDCおよび約5個のM-cDCというアウトプットを生じた (図6Bおよび6C)。これらのデータは、CMPおよびCLPがどちらも、M-CSFにตอบสนองしてM-DCを生成させることができる前駆細胞であることを示している。驚いたことに、CLPは最も効率のよいM-pDC前駆細胞だった。本発明者らはCLPをM-CSFR (CD115) に対する抗体で染色した (図6D)。CLゲート内の細胞の約20%が高レベルのCD115を発現させた。並行して行ったFlt3 (CD135) 染色は、CLPの大半がCD135+であり、したがってCD115+細胞の少なくとも一部はCD135+でもあるに違いないことを示した。そのうえ、CLPの多くは、アイソタイプ対照のバックグラウンドをわずかに上回る極めて低いCD115を発現させたことから、多くのCLPは、実際、本明細書に記載のDC培養中でM-CSFにตอบสนองするために必要な受容体を備えていることが示された。

10

【0114】

このように、本明細書に記載のM-DCは、インビトロおよびインビボで、おそらくCLPおよびCMP前駆細胞集団内の前駆体から生じるのだろう。

20

引用文献

以下の引用文献が引用される。各引用文献の内容全体は、依拠され、参照により本開示に組み込まれる。

1. Steinman, R.M. and K. Inaba. 1999. Myeloid dendritic cells. *J Leukoc. Biol.* 66:205-208.
2. Shortman, K. and Y.J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151-161.
3. Scheicher, C., M. Mehlig, R. Zecher, and K. Reske. 1992. Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol Methods* 154:253-264.
4. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R.M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp. Med.* 176:1693-1702.
5. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp. Med.* 179:1109-1118.
6. Vremec, D., G.J. Lieschke, A.R. Dunn, L. Robb, D. Metcalf, and K. Shortman. 1997. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* 27:40-44.
7. Gilliet, M., A. Boonstra, C. Paturel, S. Antonenko, X.L. Xu, G. Trinchieri, A.O'Garra, and Y.J. Liu. 2002. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 195:953-958.
8. Brasel, K., S.T. De, J.L. Smith, and C.R. Maliszewski. 2000. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* 96:3029-3039.
9. Brawand, P., D.R. Fitzpatrick, B.W. Greenfield, K. Brasel, C.R. Maliszewski, and T. De Smedt. 2002. Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from Flt3 l

30

40

50

igand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J. Immunol.* 169:6711-6719.

10. O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, J. Pooley, R. Evans, S. Woulfe, and K. Shortman. 2002. Effects of administration of progenipoiectin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice. *Blood* 99:2122-2130.

11. Pulendran, B., J. Banchereau, S. Burkeholder, E. Kraus, E. Guinet, C. Chalouni, D. Caron, C. Maliszewski, J. Davoust, J. Fay, and K. Palucka. 2000. Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J. Immunol.* 165:566-572.

12. Maraskovsky, E., K. Brasel, M. Teepe, E. R. Roux, S. D. Lyman, K. Shortman, and H. J. McKenna. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* 184:1953-1962.

13. Bjorck, P. 2001. Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 98:3520-3526.

14. McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, S. T. De, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, D. H. Lynch, J. Smith, B. Pulendran, E. R. Roux, M. Teepe, S. D. Lyman, and J. J. Peschon. 2000. Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells. *Blood* 95:3489-3497.

15. Ishii, K. J. and S. Akira. 2006. Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trends Immunol.* 27:525-532.

16. Diebold, S. S., M. Montoya, H. Unger, L. Alexopoulou, P. Roy, L. E. Haswell, A. Al Shamkhani, R. Flavell, P. Borrow, and Reis e Sousa. 2003. Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers. *Nature* 424:324-328.

17. Hochrein, H., B. Schlatter, M. O'Keeffe, C. Wagner, F. Schmitz, M. Schiemann, S. Bauer, M. Suter, and H. Wagner. 2004. Herpes simplex virus type-1 induces IFN- α production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:11416-11421.

18. Krug, A., S. Rothenfusser, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, S. Blackwell, Z. K. Ballas, S. Endres, A. M. Krieg, and G. Hartmann. 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α / β in plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31:2154-2163.

19. Naik, S. H., A. I. Proietto, N. S. Wilson, A. Dakic, P. Schnorrer, M. Fuchsberger, M. H. Lahoud, M. O'Keeffe, Q. X. Shao, W. F. Chen, J. A. Villadangos, K. Shortman, and L. Wu. 2005. Cutting edge: generation of splenic CD8⁺ and CD8⁻ dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J. Immunol.* 174:6592-6597.

20. Omatsu, Y., T. Iyoda, Y. Kimura, A. Maki, M. Ishimori, N. Toyama-Sorimachi, and K. Inaba. 2005. Development of Murine Plasmacytoid Dendritic Cells Defined by Increased Expression of an Inhibitory NK Receptor, Ly49Q. *J. Immunol.* 174:6657-6662.

21. O'Keeffe, M., H. Hochrein, D. Vremec, I. Caminschi, J. L. Miller, E. M. Anders, L. Wu, M. H. Lahoud, S. Henri, B. Scott, P. Hertzog, L. Tatarczuch, and K. Shortman. 2002. Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8⁽⁺⁾ dendritic cells only after microbial stimulus. *J. Exp. Med.* 196:1307-1319.

22. Kreisel, F. H., A. Blasius, D. Kreisel, M. Colonna, and M. Cella. 2006. Interfer

on-producing cells develop from murine CD31(high)/Ly6C(-) marrow progenitors. *Cell Immunol* 242:91-98.

23. Sweet, M.J., C.C.Campbell, D.P.Sester, D.Xu, R.C.McDonald, K.J.Stacey, D.A. Hume, and F.Y.Liew. 2002. Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J Immunol* 168:392-399.

24. D'Amico, A. and L.Wu. 2003. The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *J. Exp. Med* 198:293-303.

25. Karsunky, H., M.Merad, A.Cozzio, I.L.Weissman, and M.G.Manz. 2003. Flt3 ligand and regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp. Med.* 198:305-313. 10

26. MacDonald, K.P., V.Rowe, A.D.Clouston, J.K.Welply, R.D.Kuns, J.L.Ferrara, R.Thomas, and G.R.Hill. 2005. Cytokine expanded myeloid precursors function as regulatory antigen-presenting cells and promote tolerance through IL-10-producing regulatory T cells. *J. Immunol.* 174:1841-1850.

27. Bartocci, A., D.S.Mastrogriannis, G.Migliorati, R.J.Stockert, A.W.Wolkoff, and E.R.Stanley. 1987. Macrophages specifically regulate the concentration of their own growth factor in the circulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:6179-6183. 20

28. Rolland, A., L.Guyon, M.Gill, Y.H.Cai, J.Banchereau, K.McClain, and A.K.Palucka. 2005. Increased blood myeloid dendritic cells and dendritic cell-poietins in Langerhans cell histiocytosis. *J Immunol* 174:3067-3071.

29. Guha-Thakurta, N. and J.A.Majde. 1997. Early induction of proinflammatory cytokine and type I interferon mRNAs following Newcastle disease virus, poly [rI:rC], or low-dose LPS challenge of the mouse 1. *J Interferon Cytokine Res.* 17:197-204.

30. Vollstedt, S., M.O'Keeffe, B.Ryf, B.Glanzmann, H.Hochrein, and M.Suter. 2006. The long-term but not the short-term antiviral effect of IFN-alpha depends on Flt3 ligand and pDC. *Eur. J. Immunol.* 36:1231-1240. 30

31. Franchini, M., H.Hefti, S.Vollstedt, B.Glanzmann, M.Riesen, M.Ackermann, P.Chaplin, K.Shortman, and M.Suter. 2004. Dendritic cells from mice neonatally vaccinated with modified vaccinia virus Ankara transfer resistance against herpes simplex virus type I to naive one-week-old mice. *J. Immunol.* 172:6304-6312.

32. Itoh, Y., T.Okanoue, S.Sakamoto, K.Nishioji, and K.Kashima. 1997. The effects of prednisolone and interferons on serum macrophage colony stimulating factor concentrations in chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 26:244-252.

33. Gill, M.A., P.Blanco, E.Arce, V.Pascual, J.Banchereau, and A.K.Palucka. 2002. Blood dendritic cells and DC-poietins in systemic lupus erythematosus. *Hum. Immunol.* 63:1172-1180. 40

34. Chitu, V. and E.R.Stanley. 2006. Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation. *Curr. Opin. Immunol* 18:39-48.

35. Spies, B., H.Hochrein, M.Vabulas, K.Huster, D.H.Busch, F.Schmitz, A.Heit, and H.Wagner. 2003. Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via Toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice. *J. Immunol.* 171:5908-5912.

36. Hsu et al. 1996. Vaccination of Patients with B-Cell Lymphoma Using Autologous Antigen-Pulsed Dendritic Cells. *Nat. Med.* 2:52-58.

37. Paglia, et al. 1996. Murine Dendritic Cells Loaded In Vitro with Soluble Protein Prime Cytotoxic T Lymphocytes against Tumor Antigen In Vivo. *J.Exp. Med* 50

. 1996,183: 317-22.

38. Christensen and Shlomochik. 2007. Regulation of lupus-related autoantibody production and clinical disease by Toll-like receptors. *Semin. Immunol.* 19: 11-23.

39. Sweet et al. 2002. Colony-stimulating factor-1 suppresses responses to CpG DNA and expression of toll-like receptor 9 but enhances responses to lipopolysaccharide in murine macrophages. *J. Immunol.* 168: 392-99.

40. Xu et al., 2004. translation: Detection of FLT3 gene and FLT3/ITD gene mutation in chronic myeloid leukemia and its significance. *Ai Zheng*,, 23:1218-21 [abstract available in English].

40. Hubel, et al., 2002. Therapeutic use of cytokines to modulate phagocyte function for the treatment of infectious diseases: Current status of Granulocyte Colony-Stimulating Factor, Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor, Macrophage Colony-Stimulating Factor, and Interferon- γ . *J. Infect. Dis.*, 185: 1490-501.

41. Fogg et al., 2006. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science*, 311:83-87.

42. Takashima et al., 1995. Colony-stimulating Factor-1 Secreted by Fibroblasts Promotes the Growth of Dendritic Cell Lines (XS Series) Derived From Murine Epidermis. *J. Immunol.*, 154:5128-35.

43. Chito and Stanley, 2006. Colony-stimulating Factor-1 in Immunity and Inflammation. *Curr. Op. Immunol.*, 28:39-48.

44. U.S. Patent No. 7,198,948.

45. Stoll ML, Price KD, Silvén CJ, Jiang F, Gavalchin J. 2007. Immunization with peptides derived from the idiotype region of lupus-associated autoantibodies delays the development of lupus nephritis in the (SWR $\times$ NZB)F(1) murine model. *J Autoimmun.* (Epub ahead of print)

46. Zhang W, Frank MB, Reichlin M. 2002. Production and characterization of human monoclonal anti-idiotypic antibodies to anti-dsDNA antibodies. *Lupus*, 11(6): 362-9.

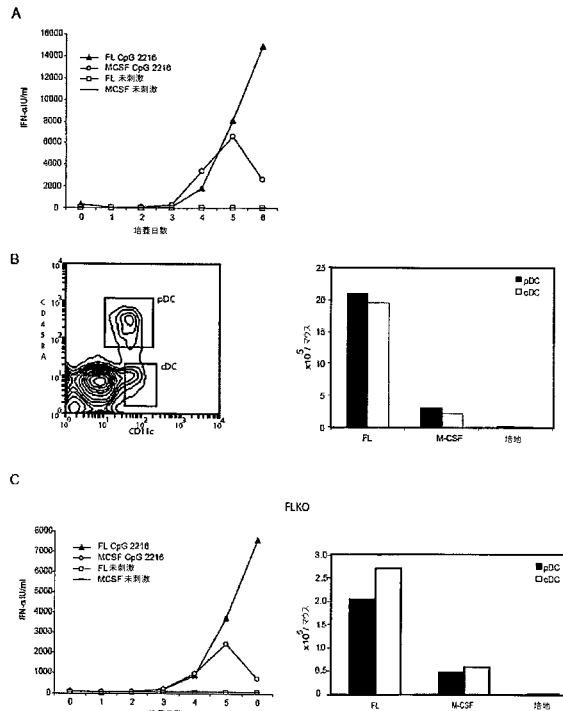
47. Graf C, Heidel F, Tenzer S, Radsak MP, Solem FK, Britten CM, Huber C, Fischer T, Wolfel T. 2006. A neoepitope generated by a FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8 $^{+}$ T cells. *Blood*. (Epub ahead of print).

48. Kappelmayer J, Udvardy M, Antal-Szalmas P. 2007. Pgp and FLT3: identification and modulation of two proteins that lead to chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Curr Med Chem.*, 14:519-30.

49. Zheng R, Small D. 2005. Mutant FLT3 signaling contributes to a block in myeloid differentiation. *Leuk Lymphoma.* 46:1679-87.

50. Advani AS. 2005. FLT3 and acute myelogenous leukemia: biology, clinical significance and therapeutic applications. *Curr Pharm Des.* 11:3449-57.

【図 1】



【図 2】

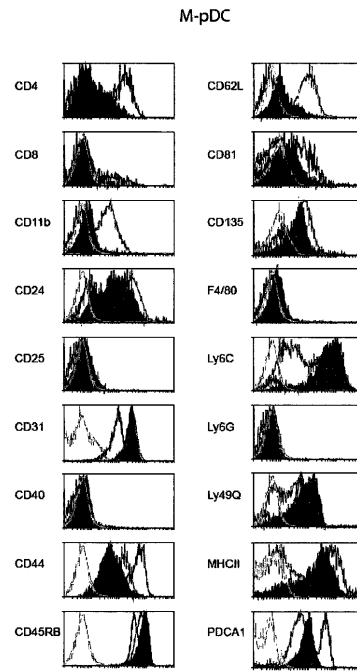
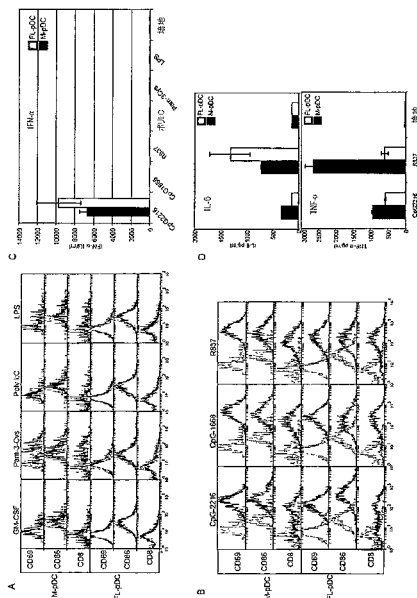
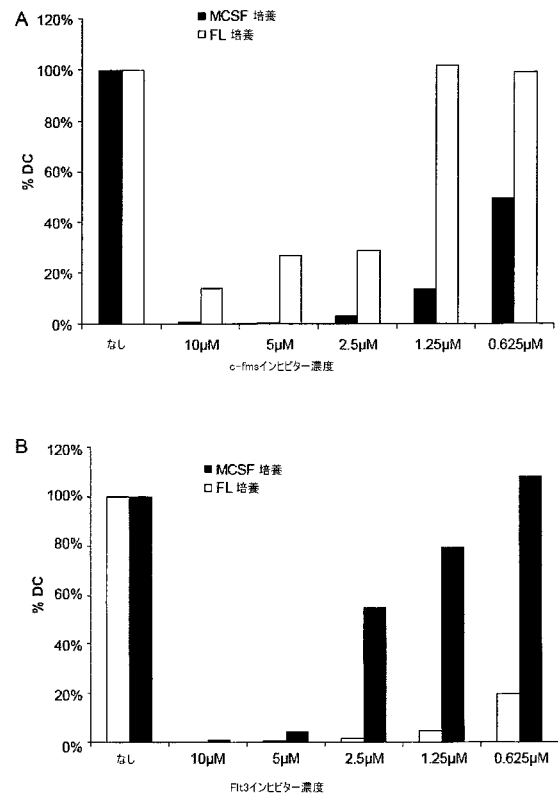


FIGURE 2

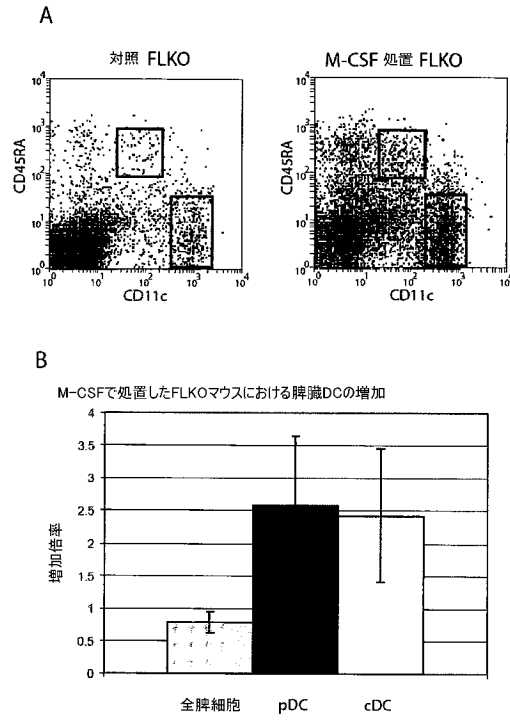
【図 3】



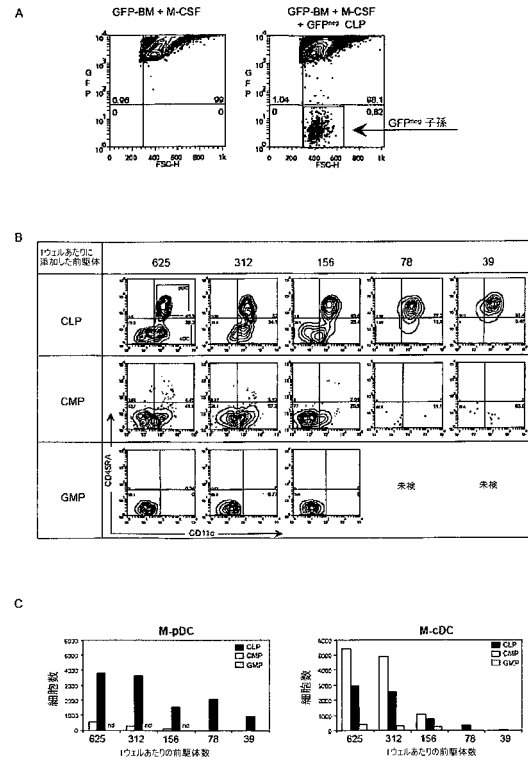
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

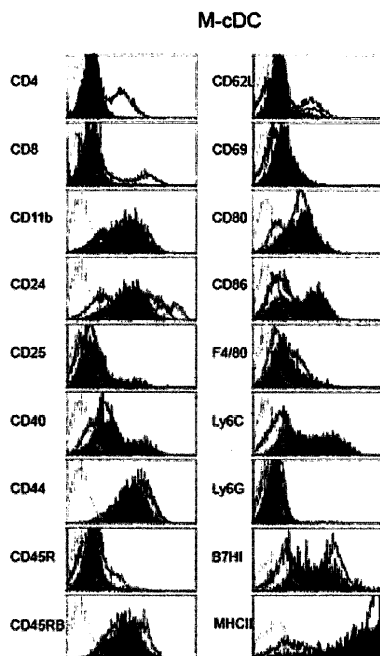
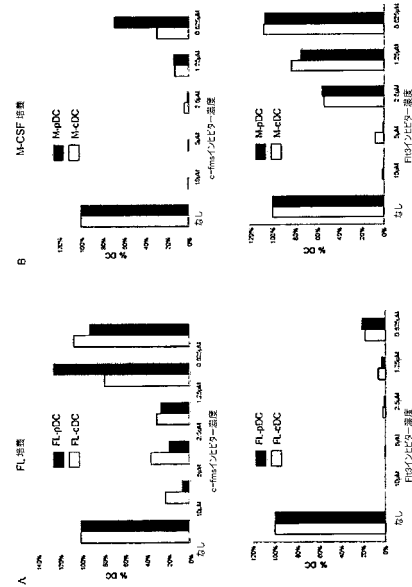


FIGURE 7

【図 8】



【手続補正書】

【提出日】平成22年1月5日(2010.1.5)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

Fms様チロシンキナーゼ3リガンド (FL) 非依存的かつ/または顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子 (GM-CSF) 非依存的な樹状細胞 (DC) の生成方法であって、

- ・造血前駆体細胞を培養すること；および
- ・マクロファージ-コロニー刺激因子 (M-CSF) 受容体リガンドを投与することを含む方法。

【請求項 2】

DCが形質細胞様樹状細胞 (pDC) および/または通常型樹状細胞 (cDC) である、請求項1の方法。

【請求項 3】

前駆体細胞が骨髄細胞である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

M-CSF受容体リガンドの投与前および投与後に樹状細胞の数が定量され、M-CSF受容体リガンド投与後のDCの数が、M-CSF受容体リガンド投与前のDCの数より増加する、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

pDCおよび/またはcDCの数が少なくとも一つの細胞表面マーカーのレベルを測定することによって定量される、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

pDCの数を定量するための少なくとも一つの細胞表面マーカーがCD11c、CD45R、CD45RA、PDCA-1、CCR9、Ly49Q、Ly6C、Siglec-H、HLA-DR、CD4、CD123、BDCA-2、またはBDCA-4である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

cDCの数を定量するための少なくとも一つの細胞表面マーカーがCD11c、CD11b、CD4、CD8、Sirp-アルファ、DEC-205、MHCII、33D1、HLA-DR、BDCA-1、BDCA-3、またはCLEC9Aである、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

DCが収集される、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

生成したDCによって産生されるサイトカインが集められる、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

産生されるサイトカインがIFN- α 、IFN- β 、IL-1、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-16、IL-18、IL-23、IL-27、IL-28、IL-29、TNF- α 、TNF- β およびケモカインを含む群より選択される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

産生されるサイトカインがインターフェロン- α (IFN- α) である、請求項 9 または 10 に記載の方法。

【請求項 12】

DCを抗原にばく露することをさらに含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

抗原が腫瘍、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、植物、軟体動物、節足動物に由来するか、または脊椎動物毒素に由来する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

DCを少なくとも一つの刺激剤にばく露することによってDCを刺激することをさらに含む、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

少なくとも一つの刺激剤がIFN- α 、IFN- β 、IL-6、IL-10、IL-12、TNF- α 、TLRアゴニスト、ウイルス、細菌、真菌、植物またはその一部である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

M-CSF受容体リガンドがウイルスベクターに入れて投与される、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

ウイルスベクターがポックスウイルスベクターである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

ポックスウイルスベクターがワクシニアウイルスベクターである、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

ワクシニアウイルスベクターが修飾ワクシニアウイルス・アンカラ (Modified Vaccinia virus Ankara: MVA) ベクターである、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

M-CSF受容体リガンドがポリペプチドとして投与されるか、細胞中で発現される核酸として投与される、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

核酸がDNAまたはRNAである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

ヒトを含む動物から前駆体細胞を取り出すこと、および収集された樹状細胞をヒトを含むその動物に再導入することをさらに含む、請求項 1 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

ヒトを含む動物中の樹状細胞 (DC) の数を高める方法であって、ヒトを含むその動物にM-CSF受容体リガンドを抗原と同時に投与することを含み、その同時投与がヒトを含むその動物におけるDCの数の増加をもたらす方法。

【請求項 2 4】

抗原が腫瘍、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、植物、軟体動物、節足動物、または脊椎動物毒素に由来する、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

動物がマウスおよび/またはヒトである、請求項 2 3 または 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

樹状細胞がpDCおよび/またはcDCである、請求項 2 3 ～ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

ヒトを含む動物中で抗原に対する免疫応答を誘導する方法であって、

- (A) ヒトを含む動物から造血前駆体細胞を取り出すこと；
- (B) その前駆体細胞を培養すること；
- (C) その培養細胞にM-CSF受容体リガンドを投与すること；
- (D) 樹状細胞 (DC) を生成させること；
- (E) そのDCを抗原にばく露すること；
- (F) ばく露されたDCを収集すること；および
- (G) 収集されたDCをヒトを含むその動物に再導入することを含む方法。

【請求項 28】

抗原が腫瘍、ウイルス、細菌、真菌、寄生虫、プリオン、植物、軟体動物、節足動物に由来するか、または脊椎動物毒素に由来する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

ヒトを含む動物に抗原を投与することをさらに含む、請求項 27 または請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

動物が増殖性障害および/または自己免疫疾患を患っているヒト患者である、請求項 27 ～ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

ヒト患者が全身性エリテマトーデス (SLE) を患っており、抗原が SLE 関連自己抗体のアイディオタイプまたは相補性決定領域 (CDR) に由来するペプチドである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

ヒト患者が急性骨髄性白血病 (AML) および/または急性リンパ芽球性白血病 (ALL) を患っており、抗原が患者の突然変異したもしくは重複した Flt3 受容体、または突然変異した c-kit 受容体に由来する新規ペプチドを含む、請求項 30 または請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

Fms 様チロシンキナーゼ 3 リガンド (FL) および/または顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子 (GM-CSF) を同時投与することなく、M-CSF 受容体リガンドを投与することを含む、上記請求項 27 ～ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

増殖性障害および/または自己免疫疾患を患っている患者を処置する方法であって、前記患者に M-CSF 受容体リガンドを投与することによって前記患者における DC の数を増加させることを含む方法。

【請求項 35】

増殖性障害および/または自己免疫疾患を患っている患者を処置するための医薬組成物を製造するための M-CSF 受容体リガンドの使用であって、前記患者への M-CSF 受容体リガンドの投与が前記患者における DC の数を増加させる使用。

【請求項 36】

増殖性障害および/または自己免疫疾患を患っている患者を処置するための M-CSF 受容体リガンドであって、前記患者への M-CSF 受容体リガンドの投与が、前記患者における DC の数を増加させる M-CSF 受容体リガンド。

【請求項 37】

増殖性障害および/または自己免疫疾患を患っている患者を処置するための M-CSF 受容体リガンドを含む医薬組成物であって、前記患者への M-CSF 受容体リガンドの投与が前記患者における DC の数を増加させる医薬組成物。

【請求項 38】

前記増殖性疾患が急性骨髄性白血病 (AML) および急性リンパ芽球性白血病 (ALL) を含む群より選択されるがんであり、前記自己免疫疾患が全身性エリテマトーデス (SLE) である、請求項 34 に記載の方法、請求項 35 に記載の使用、請求項 36 に記載の M-CSF 受容体リガンドおよび/または請求項 37 に記載の医薬組成物。

【請求項 39】

免疫応答を刺激する方法であって、

- (A) 造血前駆体細胞を培養すること；
- (B) その培養細胞に M-CSF 受容体リガンドを投与すること；
- (C) 樹状細胞 (DC) を生成させること；および
- (D) その DC を免疫細胞にばく露すること

を含み、その免疫細胞が刺激されて免疫応答を生じる方法。

【請求項 40】

免疫細胞がT細胞、ヘルパーT細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、またはマクロファージである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

T細胞が調節性T細胞、サプレッサーT細胞、またはキラーT細胞である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

ヘルパーT細胞がTh1、Th2、またはTh17細胞である、請求項 40 または 41 に記載の方法。

【請求項 43】

DCがインビトロおよび/またはインビボで免疫細胞にばく露される、請求項 39～42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

免疫応答が抗アレルギー免疫応答、抗敗血症免疫応答、抗移植片免疫応答、抗腫瘍免疫応答、抗自己免疫応答、寛容誘発性免疫応答、抗病原体免疫応答、または調節性免疫応答である、請求項 39～43 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 45】

造血前駆体細胞から前記前駆体細胞をM-CSF受容体リガンドで刺激することによって生成される樹状細胞。

【請求項 46】

前記前駆体細胞が骨髓細胞である、請求項 45 に記載の樹状細胞。

【請求項 47】

樹状細胞の生成がFms様チロシンキナーゼ3リガンド（FL）および/または顆粒球-マクロファージ-コロニー刺激因子（GM-CSF）に依存しない、請求項 45 または 46 に記載の樹状細胞。

【請求項 48】

M-CSF受容体リガンドをコードする核酸配列を含む組換えボックスウイルス。

【請求項 49】

前記ボックスウイルスがワクシニアウイルスである、請求項 48 に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 50】

前記ウイルスが修飾ワクシニアウイルス・アンカラ（MVA）である、請求項 49 に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 51】

前記MVAが、以下の性質を少なくとも一つは持つことを特徴とする、請求項50に記載の組換えボックスウイルス：

(i) ニワトリ胚線維芽細胞（CEF）ではインビトロで増殖的複製能を持つが、ヒトケラチノサイト細胞株（HaCaT）、ヒト胎児腎臓細胞株（293）、ヒト骨骨肉腫細胞株（143B）、およびヒト子宮頸部腺癌細胞株（HeLa）では増殖的複製能を持たない、

(ii) 成熟BおよびT細胞を産生する能力を持たず、したがって重度の免疫欠陥を持ち、複製ウイルスに対する感受性が高いマウスモデルにおいて、複製することができない、および

(iii) DNAプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンと比較して、少なくとも同じレベルの特異的免疫応答を、ワクシニアウイルスプライム/ワクシニアウイルスブーストレジメンで誘導する。

【請求項 52】

上記の有利な性質を少なくとも二つは持つ、請求項 51 に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 53】

上記の有利な性質を三つとも持つ、請求項 51 に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 5 4】

前記MVAがソールズベリー（英国）のEuropean Collection of Cell Cultures（ECACC）に番号V00083008として寄託されているMVAワクシニアウイルスである、請求項 5 1～5 3のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 5 5】

少なくとも一つの抗原および/または抗原エピトープをコードする配列から選択される異種核酸配列をさらに含む、請求項 4 8～5 4のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 5 6】

医薬品またはワクチンとしての請求項 4 8～5 5のいずれか一項の組換えボックスウイルス。

【請求項 5 7】

請求項 4 8～5 5のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスと、場合によっては薬学的に許容できる担体、希釈剤および/または添加剤とを含む医薬組成物またはワクチン。

【請求項 5 8】

医薬組成物またはワクチンを製造するための請求項 4 8～5 5のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスの使用。

【請求項 5 9】

増殖性障害および/または自己免疫疾患を処置するための医薬組成物またはワクチンを製造するための請求項 5 8に記載の使用。

【請求項 6 0】

増殖性障害および/または自己免疫疾患を処置するための請求項 4 8～5 5のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルス。

【請求項 6 1】

増殖性障害および/または自己免疫疾患を処置するための請求項 4 8～5 5のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスを含む医薬組成物またはワクチン。

【請求項 6 2】

増殖性疾患が急性骨髄性白血病（AML）および急性リンパ芽球性白血病（ALL）を含む群より選択されるがんであり、前記自己免疫疾患が全身性エリテマトーデス（SLE）である、請求項 5 8または請求項 5 9に記載の使用、請求項 6 0に記載の組換えボックスウイルスおよび/または請求項 6 1に記載の医薬組成物またはワクチン。

【請求項 6 3】

造血前駆体細胞から樹状細胞（DC）を生成させるための請求項 4 8～5 5のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスの使用および/または請求項 5 7に記載の医薬組成物またはワクチンの使用。

【請求項 6 4】

ヒトを含む動物中で抗原に対する免疫応答を誘導するためのキットであって、M-CSF受容体リガンドおよび/または請求項 4 8～5 5のいずれか一項に記載の組換えボックスウイルスと抗原とを含むキット。

【請求項 6 5】

M-CSF受容体リガンドおよび/または組換えボックスウイルスが第1バイアルに含有され、抗原が第2バイアルに含有される、請求項 6 4に記載のキット。

【請求項 6 6】

前記第1バイアルが樹状細胞（DC）を生成させかつ/または増加させるためにヒトを含む動物に投与され、次いで、DCが生成されかつ/または増加した後に、抗原を含む前記第2バイアルがヒトを含む前記動物に投与される、請求項 6 5に記載のキット。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/003366

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CREMER ISABELLE ET AL: "Long-lived immature dendritic cells mediated by TRANCE-RANK interaction." BLOOD 15 NOV 2002, vol. 100, no. 10, 15 November 2002 (2002-11-15), pages 3646-3655, XP002444107 ISSN: 0006-4971 page 3648, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 2 page 3652, left-hand column, paragraph 2 ----- -/-	1-22, 39-44

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 July 2008

Date of mailing of the international search report

28/07/2008

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gruber, Andreas

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/003366

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAMPS A W A ET AL: "ROLE OF MACROPHAGE COLONY-STIMULATING FACTOR IN THE DIFFERENTIATION AND EXPANSION OF MONOCYTES AND DENDRITIC CELLS FROM CD34+ PROGENITOR CELLS" MEDICAL ONCOLOGY, SCIENCE AND TECHNOLOGY LETTERS, NORTHWOOD, GB, vol. 16, no. 1, May 1999 (1999-05), pages 46-52, XP009024209 ISSN: 1357-0560 page 50, right-hand column, paragraph 2	1-22
X	EP 0 326 149 A (GREEN CROSS CORP [JP]; MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD [JP]) 2 August 1989 (1989-08-02)	34-38, 64-66
Y	the whole document	48-63
X	KIM J J ET AL: "Macrophage colony-stimulating factor can modulate immune responses and attract dendritic cells in vivo." HUMAN GENE THERAPY 20 JAN 2000, vol. 11, no. 2, 20 January 2000 (2000-01-20), pages 305-321, XP002488534 ISSN: 1043-0342	23-26, 64-66
Y	the whole document	48-63
X	MISAWA ERIKO ET AL: "Administration of macrophage colony-stimulating factor mobilized both CD11b+CD11c+ cells and NK1.1+ cells into peripheral blood." INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY JUN 2004, vol. 4, no. 6, June 2004 (2004-06), pages 791-803, XP002488535 ISSN: 1567-5769 the whole document	34-38, 45-47, 64-66
A	BRIARD D ET AL: "Importance of stromal determinants in the generation of dendritic and natural killer cells in the human spleen." CLINICAL AND EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY MAY 2005, vol. 140, no. 2, May 2005 (2005-05), pages 265-273, XP002444106 ISSN: 0009-9104 page 271, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 2	1-66

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/003366

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOLLAH ZIA U A ET AL: "Macrophage colony-stimulating factor in cooperation with transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of CD34+ hematopoietic progenitor cells into Langerhans cells under serum-free conditions without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY FEB 2003, vol. 120, no. 2, February 2003 (2003-02), pages 256-265, XP002444108 ISSN: 0022-202X page 257, right-hand column, paragraph 3; figure 8	1-66
A	BARBAROUX JEAN-BAPTISTE ET AL: "Tumor necrosis factor-alpha- and IL-4-independent development of Langerhans cell-like dendritic cells from M-CSF-conditioned precursors." THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY JAN 2006, vol. 126, no. 1, January 2006 (2006-01), pages 114-120, XP002444109 ISSN: 0022-202X the whole document	1-66
A	MACDONALD KELLI P A ET AL: "The colony-stimulating factor 1 receptor is expressed on dendritic cells during differentiation and regulates their expansion." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 1 AUG 2005, vol. 175, no. 3, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 1399-1405, XP002444110 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-66
A	TAKASHIMA A ET AL: "Colony-stimulating factor-1 secreted by fibroblasts promotes the growth of dendritic cell lines (XS series) derived from murine epidermis." JOURNAL OF IMMUNOLOGY (BALTIMORE, MD. : 1950) 15 MAY 1995, vol. 154, no. 10, 15 May 1995 (1995-05-15), pages 5128-5135, XP002444111 ISSN: 0022-1767 the whole document	1-66

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/003366

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/020613 A (CORP OF THE TRUSTEES OF THE OR [AU]; RICE ALISON MARY [AU]; HART DEREK) 11 March 2004 (2004-03-11) the whole document	1-66

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2008/003366

Patent document id in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0326149	A	02-08-1989	CA 1336399 C	25-07-1995
			DE 68908426 D1	23-09-1993
			DE 68908426 T2	05-01-1994
			ES 2043901 T3	01-01-1994
			JP 1193227 A	03-08-1989
			US 5254534 A	19-10-1993
WO 2004020613	A	11-03-2004	CA 2496502 A1	11-03-2004
			EP 1546306 A1	29-06-2005
			US 2006002899 A1	05-01-2006

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		
A 6 1 K 31/7105	(2006.01)	A 6 1 K 31/7105		
A 6 1 K 31/711	(2006.01)	A 6 1 K 31/711		
A 6 1 K 39/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	A	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 K 39/00	H	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 35/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02		
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 35/02		
A 6 1 P 37/06	(2006.01)	A 6 1 P 37/08		
A 6 1 K 39/275	(2006.01)	A 6 1 P 37/06		
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	A 6 1 K 39/275		
		G 0 1 N 33/53	Y	

(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, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, 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, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ホーホライン・フーベルトゥス

ドイツ連邦共和国、8 1 8 2 5 ムーニヒ、ハフストラーセ、1 3 4

(72)発明者 オキーフ・メレディス

ドイツ連邦共和国、8 0 4 6 9 ムーニヒ、ガイヤーストラッセ、3 4

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AA95X AC14 BD21 BD39 CA24 CA44 CA45
 4C084 AA02 AA13 BA44 CA53 DB01 NA14 ZB072 ZB082 ZB132 ZB262
 ZB272 ZC422
 4C085 AA03 BA01 BA85 EE01
 4C086 EA16 MA01 MA04 NA14 ZB07 ZB08 ZB13 ZB26 ZB27 ZC42
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA01 DA16 DA75 EA20 FA71

专利名称(译)	巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 诱导树突状细胞发育		
公开(公告)号	JP2010525797A	公开(公告)日	2010-07-29
申请号	JP2010504559	申请日	2008-04-25
[标]申请(专利权)人(译)	巴法里安诺迪克有限公司		
申请(专利权)人(译)	巴伐利亚北欧，ACTY洛杉矶矶萝卜		
[标]发明人	ホーホラインフーベルトゥス オキーフメレディス		
发明人	ホーホラインフーベルトゥス オキーフメレディス		
IPC分类号	C12N5/0784 C07K14/52 C07K14/56 C12N7/00 A61K38/00 A61K48/00 A61K31/7105 A61K31/711 A61K39/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P35/02 A61P37/08 A61P37/06 A61K39/275 G01N33/53		
CPC分类号	A61P35/00 A61P35/02 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 C12N5/0639		
FI分类号	C12N5/00.202.M C07K14/52 C07K14/56 C12N7/00 A61K37/02 A61K48/00 A61K31/7105 A61K31/711 A61K39/00.A A61K39/00.H A61P35/00 A61P37/02 A61P35/02 A61P37/08 A61P37/06 A61K39/275 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AA95X 4B065/AC14 4B065/BD21 4B065/BD39 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA45 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/DB01 4C084 /NA14 4C084/ZB072 4C084/ZB082 4C084/ZB132 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZC422 4C085 /AA03 4C085/BA01 4C085/BA85 4C085/EE01 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA14 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB13 4C086/ZB26 4C086/ZB27 4C086/ZC42 4H045/AA10 4H045 /AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA16 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA71		
代理人(译)	上西 克礼		
优先权	11/790798 2007-04-27 US 2007008785 2007-04-30 EP		
其他公开文献	JP5721428B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了通过施用巨噬细胞集落刺激因子 (M-CSF) 诱导树突状细胞 (DC) 发育的方法。M-CSF诱导DC分化成亚型，例如浆细胞样DC和常规DC。所述分化不依赖于Fms样酪氨酸激酶3-配体 (FL) 和/或粒细胞 - 巨噬细胞 - 集落刺激因子 (GM-CSF)。用M-CSF诱导可以在体外从造血前体如骨髓细胞或体内实现。在体外，M-CSF衍生的DC可用于产生细胞因子并刺激其他免疫应答细胞。M-CSF还可用于诱导从动物中移出的前体细胞发育成DC。此外，这些分离的DC可以暴露于抗原，以在重新引入动物时刺激特异性免疫应答。本发明还提供了对诸如急性髓性白血病的癌症和诸如系统性红斑狼疮的自身免疫疾病的治疗。

3

