

(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2011-512846

(P2011-512846A)

(43) 公表日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>	C 1 2 N 5/00 1 O 2	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 35/14 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/14 Z	4 B O 2 4
<b>A 6 1 P 31/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/04	4 B O 6 3
<b>A 6 1 P 31/12 (2006.01)</b>	A 6 1 P 31/12	4 B O 6 5
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 95 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-549786 (P2010-549786)	(71) 出願人	502409721
(86) (22) 出願日	平成21年3月2日 (2009.3.2)		ザ・ユニバーシティ・オブ・トレド
(85) 翻訳文提出日	平成22年11月4日 (2010.11.4)		アメリカ合衆国オハイオ州43606, ト
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/035727		レド, ウエスト・バンクロフト・ストリー
(87) 国際公開番号	W02009/111396		ト 2801
(87) 国際公開日	平成21年9月11日 (2009.9.11)	(74) 代理人	100140109
(31) 優先権主張番号	61/067, 870		弁理士 小野 新次郎
(32) 優先日	平成20年3月3日 (2008.3.3)	(74) 代理人	100089705
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 社本 一夫
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 樹状細胞前駆体集団、それに由来する樹状細胞集団およびその使用

(57) 【要約】

樹状細胞前駆体集団、それに由来する樹状細胞集団、単離、拡張および使用するための方法を開示する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

表面マーカー CD 4 8 および Gr - 1 を用いることにより同定される、単離された樹状細胞前駆体集団 ( DC . com )。

## 【請求項 2】

CD 4 8 - / MHC I - / MHC II - / CD 1 a - / CD 1 d - / CD 1 1 c - の特徴的な表面表現型を有する、単離されたヒト樹状細胞前駆体 ( DC . com )。

## 【請求項 3】

請求項 2 に記載の細胞集団であって、 DC . com 集団が GM - CSF の存在下で培養された場合に、その DC . com 集団が特徴的な樹状突起の形態を示す樹状細胞 ( DC ) に分化する、前記細胞集団。

10

## 【請求項 4】

単離された樹状細胞前駆体集団 ( DC . com ) であって、 CD 1 1 b + / CD 1 1 c - / Ly 6 G + / CD 4 8 - / MHC I - / MHC II - の特徴的な表面表現型を有し；ここで、 DC . com 集団が GM - CSF の存在下で培養された場合、その DC . com 集団は特徴的な樹状突起の形態を示す DC に分化する、前記細胞集団。

## 【請求項 5】

DC . com 集団が GM - CSF の存在下で培養された場合にその DC . com 集団が特徴的な樹状突起の形態を示す樹状細胞 ( DC ) に分化する、請求項 4 に記載の細胞集団。

20

## 【請求項 6】

次の内の 1 つ以上：

- 表面表現型に基づいて CD 1 1 c + DC から識別できること；ここで、 CD 4 8、および MHC クラス I およびクラス II 分子はその DC . com 集団において検出不能である、

- 表面表現型に基づいて他の樹状細胞前駆体から識別できること；ここで、 Ly 6 G がその DC . com 集団において検出可能である；

- OVA タンパク質およびペプチドを、 OT - I および OT - II T 細胞受容体トランスジェニックマウスから単離された CD 8 および CD 4 T 細胞に提示する能力により評価した際に、検出できる抗原提示能力を示さないこと；

30

- 分葉状の核および少数の細胞質顆粒の封入により特徴づけられる形態を有すること；

- 表面表現型、細胞の大きさ、粒状度、および形態に関して均質であること；

- BM 培養において CD 1 1 b + / Ds Red - / CD 1 1 c - 集団と比べて比較的限られた有糸分裂可能性を有すること；

- 好中球前駆細胞の “ 桿状核球 ” 集団と似ていること；ならびに

- 前に同定された DC 亜集団とは別個の DC サブセット ( gr - DC ) に分化する能力を有すること；

により特徴づけられる、単離された樹状細胞前駆体集団 ( DC . com )。

## 【請求項 7】

顆粒球由来 DC ( gr - DC ) を含む、 DC . com に由来する単離された樹状細胞集団。

40

## 【請求項 8】

CD 1 1 c、MHC II、CD 8 6 および DEC 2 0 5 の発現に関してスクリーニングすることにより同定される、請求項 7 に記載の gr - DC 細胞集団。

## 【請求項 9】

インビトロまたはエキソピボ系において免疫応答を誘導するように抗原を提示することができる、請求項 7 に記載の gr - DC 細胞集団。

## 【請求項 10】

抗原が外来性抗原、内因性抗原または自己抗原の内の 1 種類以上である、請求項 7 に記載の gr - DC 細胞集団。

50

## 【請求項 1 1】

抗原がインビトロまたはエキソピボ系において感染性病原体に対する免疫応答を誘導するように微生物抗原を提示することができる、請求項 7 に記載の g r - D C 細胞集団。

## 【請求項 1 2】

抗原がインビトロまたはエキソピボ系において腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導するように腫瘍抗原を提示することができる、請求項 7 に記載の g r - D C 細胞集団。

## 【請求項 1 3】

抗原がインビトロまたはエキソピボ系においてウイルス病原体に対する免疫応答を誘導するようにウイルス抗原を提示することができる、請求項 7 に記載の g r - D C 細胞集団。

10

## 【請求項 1 4】

抗原がインビトロまたはエキソピボ系において免疫応答を誘導するように非微生物性外来性抗原を提示することができる、請求項 7 に記載の g r - D C 細胞集団。

## 【請求項 1 5】

g r - D C が C D 4 および C D 8 T 細胞の両方に対して O V A 抗原を提示する、請求項 7 に記載の g r - D C 細胞集団。

## 【請求項 1 6】

g r - D C が L y 6 G の表面発現を示す請求項 7 に記載の g r - D C 細胞集団。

## 【請求項 1 7】

活性化された樹状細胞を得るための方法であって、以下：

20

D C . c o m および g r - D C の少なくとも一方を含む細胞の集団を提供する、および細胞の少なくとも一部の成熟化を誘発するためにその集団の中の細胞の少なくとも一部を活性化させる、を含む、前記方法。

## 【請求項 1 8】

少なくとも 1 個の D C . c o m または g r - D C 細胞が、以下：少なくとも 1 種類のウイルスまたはその派生物；少なくとも 1 種類の細菌またはその派生物；少なくとも 1 種類の寄生生物；少なくとも 1 種類の菌類またはその派生物；少なくとも 1 種類のサイトカインまたは少なくとも 1 種類のリガンド；の 1 又はそれより多くにより活性化される、請求項 1 7 に記載の方法。

30

## 【請求項 1 9】

T リンパ球を含むあらゆるタイプの生物学的試料に対して実施される、請求項 1 7 に記載の方法。

## 【請求項 2 0】

その試料が血液である、請求項 1 9 に記載の方法。

## 【請求項 2 1】

その試料が自家血液である、請求項 1 8 に記載の方法。

## 【請求項 2 2】

その樹状細胞がヒトのものである、請求項 1 7 に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

T リンパ球を活性化させるための方法であって、以下：

40

D C . c o m および g r - D C の少なくとも一方を含む細胞の集団を提供する；細胞の少なくとも一部の成熟化を誘発するためにその集団の中の細胞の少なくとも一部を活性化させる；および、T リンパ球を樹状細胞と接触させる；を含む、前記方法。

## 【請求項 2 4】

その樹状細胞がヒトのものである、請求項 2 3 に記載の方法。

## 【請求項 2 5】

樹状細胞を活性化する化合物を同定するための方法であって、化合物を D C . c o m お

50

よび g r - D C の少なくとも 1 つを含む細胞の集団と接触させ、そして細胞の活性化を検出する工程を含む、前記方法。

【請求項 26】

その樹状細胞がヒトのものである請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

樹状細胞系を単離するためのインビトロの方法であって、以下：

対象から樹状細胞前駆体を単離する；

単離した細胞を有効量の G M - C S F を含む適切な培地の中で培養状態に置く；

細胞の顆粒球由来樹状細胞 ( g r - D C ) への分化を誘導する；および

対象に特有の樹状細胞系を得るために、細胞を連続的な細胞分裂により増殖させる；

10

を含む、前記方法。

【請求項 28】

細胞が少なくとも 20、30、40、50、60、70、80、90、および好ましくは少なくとも 100 回の細胞分裂の後に単離される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

様々な樹状細胞系または“クローン”を得るために得られた樹状細胞系をクローニングすることをさらに含み、“系のクローニング”がこの系の細胞の個別化、および単一の細胞から得られた遺伝的に同一の細胞を集めることを意味する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

興味のある表現型を有する少なくとも 1 種類のクローンを同定するために、様々な樹状細胞系またはクローンの内の 1 種類を選択することをさらに含む、請求項 29 に記載の方法。

20

【請求項 31】

選択された細胞が C D 4 8 陰性 / M H C クラス I 陰性の表現型を有する、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 32】

請求項 27 に記載の方法に従って得られた単離された細胞系。

【請求項 33】

樹状細胞前駆体 ( D C . c o m ) 系を単離するためのインビトロの方法であって、以下

：

対象から樹状細胞前駆体を単離する；

単離した細胞を有効量の G M - C S F を含む適切な培地の中で培養状態に置く、

単離した細胞から D C 前駆体細胞前駆体 ( D C . c o m ) 系を生成する、および

対象に特有の樹状細胞系を得るために、細胞を連続的な細胞分裂により増殖させる；

30

を含む、前記方法。

【請求項 34】

細胞が少なくとも 20、30、40、50、60、70、80、90、および好ましくは少なくとも 100 回の細胞分裂の後に単離される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

様々な樹状細胞系または“クローン”を得るために得られた樹状細胞系をクローニングすることをさらに含み、“系のクローニング”がこの系の細胞の個別化、および単一の細胞から得られた遺伝的に同一の細胞を集めることを意味する、請求項 33 に記載の方法。

40

【請求項 36】

さらに興味のある表現型を有する少なくとも 1 種類のクローンを同定するために様々な樹状細胞系またはクローンの内の 1 種類を選択することを含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

選択された細胞が C D 4 8 陰性 / M H C クラス I 陰性の表現型を有する、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 38】

50

樹状細胞を活性化する化合物を同定するための方法であって、以下：

化合物を DC . com または gr - DC 細胞系と接触させる、および細胞系の活性化を検出する；

を含む、前記方法。

【請求項 39】

感染性のまたは微生物性の因子（細菌、ウイルス、寄生生物、菌類）、癌、移植片対宿主疾患、アレルギーおよび自己免疫疾患と関係する病理の少なくとも 1 タイプの処置における、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 40】

抗腫瘍免疫療法および細胞療法における樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC の使用であって、その樹状細胞系 DC . com および / または gr - DC、またはその機能的派生物が免疫療法薬剤である、前記使用。

【請求項 41】

癌の処置のための抗腫瘍免疫応答を促進する医薬組成物を製造するための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 42】

感染症の処置のための抗微生物応答を促進する医薬組成物を製造するための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 43】

ウイルス性疾患の処置のための抗ウイルス応答を促進する医薬組成物を製造するための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 44】

非微生物性外因性自己免疫疾患の処置のための応答を促進する医薬組成物を製造するための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 45】

移植片対宿主疾患の処置のための応答を促進する医薬組成物を製造するための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 46】

DC が保護的な、または病原性の役割を果たしていることが既知である疾患における gr - DC の数および / または機能を検査するための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 47】

望まれる形の免疫応答を選択的に誘導するように設計された、カスタマイズされた細胞に基づく療法のための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 48】

DC . com および / または gr - DC を活性化するように設計された新しいクラスのワクチンアジュバントおよび配合物を開発するための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 49】

DC . com および / または gr - DC の機能を選択的に増進または阻害する小さい化合物をスクリーニングするための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用。

【請求項 50】

10

20

30

40

50

樹状細胞へ方向付けされた前駆細胞集団 (DC.com) の同定のための方法であって、その集団が検出可能な抗原提示能力を示す；骨髓サプレッサー細胞機能を示す；外来分子を取り込むその能力において効率的である；CD48、MHC I、MHC II、CD1a、CD1d、CD11c の内の1種類以上の発現を獲得する；かどうかを決定する工程を含む、前記方法。

【請求項51】

DC.com 集団の精製のための方法であって、樹状細胞前駆体集団を少なくともCD48およびMHCクラスIマーカーに関してスクリーニングする工程を含む、前記方法。

【請求項52】

gr-DC 集団の精製のための方法であって、樹状細胞集団を少なくともCD11c、MHCクラスII、CD86およびDEC205マーカーに関してスクリーニングする工程を含む、前記方法。

10

【請求項53】

桿状核球集団の精製のための方法であって、樹状細胞前駆体集団を少なくともCD48およびMHCクラスIマーカーに関してスクリーニングする工程を含む、前記方法。

【請求項54】

樹状細胞へ方向付けされた前駆細胞集団 (DC.com) の拡張のための方法であって、単離されたDC.com 細胞の集団をGM-CSF中で培養する、および場合によりその培養物に骨髓 (BM) フィーダー細胞を添加する工程を含む、前記方法。

【請求項55】

前駆体樹状細胞 (DC.com) を顆粒球樹状細胞 (gr-DC) の表現型を示すように誘導するための方法であって、以下：

20

i) (CD45.2+である) C57BL/6マウスの骨髓 (BM) 培養物からCD48陰性/Gr-1高DC.com 集団を精製する、

ii) 工程i)からの集団を、(CD45.1+である) B6/SJLマウスから新しく単離したBM細胞とGM-CSFの存在下で共培養する；

iii) 抗CD45.2および抗CD45.1抗体で分染することにより識別されたDC.com 集団に由来する細胞を識別する；ならびに

iv) CD45.2+細胞を1種類以上の示されたマーカーの表面発現に関して分析する；

30

を含む、前記方法。

【請求項56】

gr-DC.com 細胞がCD11c、MHCクラスII、DEC205の発現を獲得し、Ly6Gの表面発現を維持する、請求項56に記載の方法。

【請求項57】

細胞が蛍光活性化細胞選別FACSにより精製される、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

哺乳類の前駆体樹状細胞から顆粒球樹状細胞 (gr-DC) の表現型を有する細胞を生成するための方法であって、以下：

i) 哺乳類の血液試料から前駆体樹状細胞を含む細胞画分を用意する；

40

ii) 次のことにより、工程(i)の細胞画分の少なくとも1サブセットを単離する：

工程i)からの集団を、CD45.1+である新しく単離したBM細胞とGM-CSFの存在下で共培養する；

抗CD45.2および抗CD45.1抗体で分染することにより識別されたDC.com 集団に由来する細胞を識別する；そして

CD45.2+細胞を1種類以上の示されたマーカーの表面発現に関して分析する；ならびに

iii) 工程(ii)の接触させた細胞を集める；

を含む、前記方法。

【請求項59】

50

細胞が蛍光活性化細胞選別 F A C S により精製される、前記の請求項に記載の方法。

【請求項 6 0】

それを必要とする対象において炎症状態を改善するための方法であって、有効量の D C . c o m に由来する組成物を投与することを含む、前記方法。

【請求項 6 1】

C D 4 8 陰性 / G r - 1 高 - 早期樹状細胞を有効量の G M - C S F と接触させ、それによりその細胞の顆粒球由来樹状細胞 ( g r - D C ) への分化を誘導することを含む方法であって、ここで L y 6 G が g r - D C の表面上で発現しており、そしてここで g r - D C が少なくとも 1 種類の外来抗原を C D 8 および C D 4 T 細胞に提示する、前記方法。

【請求項 6 2】

その有効量がすくなくとも 1 0 n g / m l であり、そしてその接触がすくなくとも 1 日間である、前記の請求項に記載の方法。

【請求項 6 3】

樹状細胞 ( D C ) の T 細胞との相互作用の作用因子を同定する方法であって、以下：

i ) D C . c o m 集団を T 細胞および試験薬剤と混合する、ならびに

i i ) 候補物質が D C . c o m の T 細胞との相互作用を変化させるかどうかを決定する、ここで、D C . c o m の T 細胞との相互作用を変化させる試験薬剤は樹状細胞の相互作用の作用因子である；

を含む、前記方法。

【請求項 6 4】

D C . c o m 組成物が検出可能な標識に結合した精製された D C . c o m を含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

樹状細胞 ( D C ) の T 細胞との相互作用の作用因子を同定する方法であって、以下：

i ) g r - D C 集団を T 細胞および試験薬剤と混合する、ならびに

i i ) 候補物質が g r - D C の T 細胞との相互作用を変化させるかどうかを決定する、ここで、g r - D C の T 細胞との相互作用を変化させる試験薬剤は樹状細胞の相互作用の作用因子である；

を含む、前記方法。

【請求項 6 6】

g r - D C 組成物が検出可能な標識に結合した精製された g r - D C を含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

試験薬剤をスクリーニングする方法であって、D C . c o m 組成物の T 細胞との相互作用に影響を与える試験薬剤が、D C . c o m 組成物の T 細胞への結合における変化により同定される、前記方法。

【請求項 6 8】

試験薬剤をスクリーニングする方法であって、D C . c o m 組成物の T 細胞との相互作用に影響を与える試験薬剤が、D C . c o m に仲介される T 細胞の活性化における変化により同定される、前記方法。

【請求項 6 9】

試験薬剤をスクリーニングする方法であって、g r - D C 組成物の T 細胞との相互作用に影響を与える試験薬剤が、g r - D C 組成物の T 細胞への結合における変化により同定される、前記方法。

【請求項 7 0】

試験薬剤をスクリーニングする方法であって、g r - D C 組成物の T 細胞との相互作用に影響を与える試験薬剤が、g r - D C に仲介される T 細胞の活性化における変化により同定される、前記方法。

【請求項 7 1】

D C . c o m および g r - D C 、ならびにそれらの機能的変種の中のすくなくとも 1 種類

10

20

30

40

50

を含む細胞の集団を含む医薬組成物。

【請求項 7 2】

感染症、癌に関連する疾患、炎症性の障害もしくは疾患、免疫に関連する障害もしくは疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の処置に有用である、請求項 7 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 7 3】

対象において対象が次の障害：感染症、癌に関連する疾患、炎症性の疾患、免疫に関連する疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の内の 1 種類以上を有するかどうか、もしくはそれを発現する危険にさらされているかどうかを診断する、予後を決定する、および / またはそれを処置する方法であって、以下：

対象からの検査試料において DC . com または gr - DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーのレベルを測定する、

ここで、検査試料におけるそのマーカーのレベルの、対照試料における対応するマーカーのレベルと比較した変化は、対象がその障害を有すること、またはそれを発現する危険にさらされていることのどちらかを示す；

を含む、前記方法。

【請求項 7 4】

検査試料における少なくとも 1 種類のマーカーのレベルが対照試料における対応するマーカーのレベルよりも低い、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

検査試料における少なくとも 1 種類のマーカーのレベルが対照試料における対応するマーカーのレベルよりも高い、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

少なくとも 1 種類のマーカーが正常な組織および / または細胞と冒された組織および / または細胞の間で差次的に発現している、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 7】

試料が血液試料を含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 8】

試料が血清または血漿の血液試料の内の 1 種類以上を含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 9】

少なくとも 1 種類のマーカーを含むマーカーであって、正常な組織および / または細胞と冒された組織および / または細胞の間で相違して発現しており、DC . com および gr - DC 細胞集団の内の 1 種類以上に由来する、前記マーカー。

【請求項 8 0】

次の障害：感染症、癌に関連する疾患、炎症性の疾患、免疫に関連する疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の内の 1 種類以上を有する対象の予後を決定するための方法であって、対象からの検査試料において少なくとも 1 種類のマーカーのレベルを測定する工程を含み、

ここで該マーカーは DC . com および gr - DC の内の 1 種類以上に由来し；そして

ここで： i ) そのマーカーが不都合な予後と関係している；および ii ) 検査試料における少なくとも 1 種類のマーカーのレベルの、対照試料における対応するマーカーのレベルと比較した変化が、不都合な予後を示している；

前記方法。

【請求項 8 1】

次の障害：感染症、癌に関連する疾患、炎症性の疾患、免疫に関連する疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の内の 1 種類以上を処置する方法であって、少なくとも 1 種類のマーカーが対象の冒された細胞において対照の細胞と比較して下方制御または上方制御され、そのマーカーが DC . com および gr - DC の内の 1 種類以上に由来し、該方法は以下：

i ) その少なくとも 1 種類のマーカーが冒された細胞において下方制御される場合、対

10

20

30

40

50

象における冒された細胞の増殖が阻害されるように、対象に有効量の少なくとも1種類の単離されたマーカー、もしくはその単離された変種もしくは生物学的に活性な断片を投与する；または

i i) その少なくとも1種類のマーカーが冒された細胞において上方制御される場合、対象における冒された細胞の増殖が阻害されるように、対象にその少なくとも1種類のマーカーの発現を阻害するための有効量の少なくとも1種類の化合物を投与する；

を含む、前記方法。

【請求項82】

次の障害：感染症、癌に関連する疾患、炎症性の疾患、免疫に関連する疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の内の1種類以上を処置する方法であって、少なくとも1種類のマーカーが対象の冒された細胞において対照の細胞と比較して下方制御または上方制御され、そのマーカーがDC・comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来し、該方法は以下：

(1) 対象における冒された細胞の中の少なくとも1種類のマーカーの、対照の細胞と比較した量を決定する；および

(2) 次のことにより、冒された細胞の中で発現したマーカーの量を変化させる：

(i) 冒された細胞の中で発現したマーカーの量が対照の細胞の中で発現したマーカーの量よりも少ない場合、対象に有効量の少なくとも1種類の単離されたマーカーを投与する；または

(i i) 冒された細胞の中で発現したマーカーの量が対照の細胞の中で発現したマーカーの量よりも大きい場合、対象に少なくとも1種類のマーカーの発現を阻害するための有効量の少なくとも1種類の化合物を投与する；

を含む、前記方法。

【請求項83】

少なくとも1種類の単離されたマーカーおよび医薬的に許容できるキャリアーを含む医薬組成物であって、そのマーカーがDC・comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来する医薬組成物。

【請求項84】

少なくとも1種類の単離されたマーカーが冒された細胞において対照の細胞と比較して下方制御されるマーカーと一致する、請求項83に記載の医薬組成物。

【請求項85】

抗炎症剤を同定する方法であって、細胞に試験薬剤を与え、冒された細胞の中で減少した発現レベルと関係する少なくとも1種類のマーカーのレベルを測定することを含み、

ここで、冒された細胞の中のそのマーカーのレベルの、対照の細胞と比較した増大が、その試験薬剤が抗炎症癌剤であることを示している；そして

ここで、そのマーカーがDC・comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来する；前記方法。

【請求項86】

抗炎症剤を同定する方法であって、細胞に試験薬剤を与え、冒された細胞の中で増大した発現レベルと関係する少なくとも1種類のマーカーのレベルを測定することを含み、

ここで、その細胞の中のそのマーカーのレベルの、対照の細胞と比較した低下が、その試験薬剤が抗炎症剤であることを示しており、そして

ここで、そのマーカーがDC・comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来する；前記方法。

【請求項87】

炎症性障害を予防、診断および/または処置するための療法の有効性を評価する方法であって、以下：

i) 動物にその有効性を評価している療法を受けさせる、および

i i) 試験している処置の、その障害の処置または予防における有効性のレベルを、少なくとも1種類のマーカーを評価することにより決定する、

10

20

30

40

50

を含み、

ここで、そのマーカーは DC・com および gr - DC の内の 1 種類以上に由来する、前記方法。

【請求項 88】

候補である療法薬が次のものの内の 1 種類以上：医薬組成物、栄養補強組成物、およびホメオパシー組成物、を含む、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

その評価されている療法がヒトの対象における使用のためのものである、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 90】

製品であって、次のもの：DC・com および gr - DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーを含む炎症性障害に関するマーカーに結合する少なくとも 1 種類の捕捉試薬、を含む前記製品。

【請求項 91】

炎症性障害を処置するための療法薬のための候補化合物に関するスクリーニングのためのキットであって、次のもの：DC・com および gr - DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーの 1 種類以上の試薬；ならびに、少なくとも 1 種類のマーカーを発現する細胞、を含む前記キット。

【請求項 92】

そのマーカーの存在が少なくとも 1 種類のマーカーと特異的に結合する抗体または抗体断片を含む試薬を用いて検出される、請求項 91 に記載のキット。

【請求項 93】

炎症性障害または関係する疾患の応答シグナル伝達経路を妨げる薬剤の、個体においてその合併症を処置する、予防する、逆行させる、またはその重症度を制限するための医薬品の製造のための使用であって、その薬剤が DC・com および gr - DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーを含む、前記使用。

【請求項 94】

それを必要とする対象において炎症性障害または関係する合併症を処置する、予防する、逆行させる、またはその重症度を制限する方法であって、対象に少なくとも 1 種類の炎症性応答カスケードを妨げる薬剤を投与することを含み、ここで該薬剤は DC・com および gr - DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーを含む、前記方法。

【請求項 95】

少なくとも 1 種類の炎症に関係する疾患の応答カスケードを妨げる薬剤の、対象において炎症に関連する合併症を処置する、予防する、逆行させる、またはその重症度を制限するための医薬品の製造のための使用であって、その薬剤が DC・com および gr - DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーを含む、前記使用。

【請求項 96】

DC・com および gr - DC の内の 1 種類以上に由来するマーカーの内の 1 種類以上のアンチセンス阻害剤を含む組成物。

【請求項 97】

対象に療法上有効量の請求項 96 に記載の組成物を投与することを含み、それを必要とする対象を処置する方法。

【請求項 98】

組成物が予防的に投与される、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 99】

組成物の投与が障害の 1 種類以上の症状の開始を遅延させる、請求項 97 に記載の方法。

【請求項 100】

組成物の投与が炎症性障害の発現を阻害する、請求項 97 に記載の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 101】**

組成物の投与が感染を阻害する、請求項 97 に記載の方法。

**【請求項 102】**

生物学的試料において障害の存在を検出するための方法であって、以下：

i) その障害を含んでいる疑いのある生物学的試料をそれに関するマーカーにさらす、および

ii) もしあるならば試料中のそのマーカーの存在または欠如を検出する、ここで、そのマーカーは DC、com および gr-DC の内の 1 種類以上に由来する；を含む、前記方法。

**【請求項 103】**

マーカーが検出可能な標識を含む、請求項 102 に記載の方法。

**【請求項 104】**

さらに、対象からの生物学的試料の中のそのマーカーの量を正常な対象からの対応する生物学的試料の中のマーカーの量と比較することを含む、請求項 102 に記載の方法。

**【請求項 105】**

さらに、異なる時点で対象から複数の生物学的試料を集め、それぞれの生物学的試料の中のそのマーカーの量を比較してそのマーカーの量が対象において時間の経過につれて増大している、または減少しているかどうかを決定することを含む、請求項 102 に記載の方法。

**【請求項 106】**

対象において炎症性障害を処置するための方法であって、以下：それを必要とする対象に、療法上有効量の DC、com または gr-DC の内の 1 種類以上に由来する炎症性受容体作動薬を投与する、を含む前記方法。

**【請求項 107】**

その受容体作動薬が DC、com または gr-DC に由来するマーカーの内の 1 種類以上のアンチセンス阻害剤である、請求項 106 に記載の方法。

**【請求項 108】**

炎症性障害により冒された細胞の分化を誘導するのに有効な療法薬または療法薬の組み合わせを同定するためのインビトロの方法であって、次の段階：

i) 冒された細胞を培養する、

ii) 少なくとも 1 種類の化合物を工程 i) の培地に添加する、

iii) 少なくとも 1 種類のマーカーの、段階 (i) および (ii) の間の発現のレベルの進展を分析する、ならびに

iv) 段階 (i) および (ii) の間のそのマーカーの発現のレベルの変化を誘導する化合物または化合物の組み合わせを同定する、

を含む前記方法。

**【請求項 109】**

段階 (iii) が少なくとも 1 種類のマーカーの発現のレベルの分析を含む、請求項 108 に記載の方法。

**【請求項 110】**

段階 (iv) が少なくとも 1 種類のマーカーの発現のレベルを調節する化合物または化合物の組み合わせの同定を含む、請求項 108 に記載の方法。

**【請求項 111】**

段階 (iv) が少なくとも 1 種類のマーカーの発現のレベルを低減させる化合物または化合物の組み合わせの同定を含む、請求項 108 に記載の方法。

**【請求項 112】**

その化合物が炎症性障害の処置のための療法薬である、請求項 108 に記載の方法。

**【請求項 113】**

炎症性障害を有する対象から冒された組織および / または細胞を分類するための方法であって、以下：

10

20

30

40

50

試験細胞集団における DC、com および gr-DC の内の 1 種類以上に由来する 1 種類以上のマーカーの発現を測定する、ここで、試験細胞集団の中の少なくとも 1 個の細胞は、1 種類以上のそのマーカーを発現することができる；

そのマーカー（単数又は複数）の発現を、それに関して分類が既知である少なくとも 1 個の細胞を含む参照細胞集団におけるそのマーカー（単数又は複数）の発現と比較する；ならびに

もし存在するならば、試験細胞集団および参照細胞集団における、その構成するグループから選択された 1 種類以上のマーカーの発現レベルにおける違いを同定し、それにより対象における炎症性障害を分類する；

を含む前記方法。

10

【請求項 114】

試験細胞集団におけるそのマーカー（単数又は複数）の発現における、参照細胞集団と比較した違いが、その試験細胞集団が参照細胞集団からの細胞と異なる分類を有することを示す、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 115】

試験細胞集団におけるそのマーカー（単数又は複数）の、参照細胞集団と比較して類似した発現パターンが、その試験細胞集団が参照細胞集団からの細胞と同じ分類を有することを示す、請求項 113 に記載の方法。

【請求項 116】

参照細胞集団が複数の細胞またはデータベースである、請求項 113 に記載の方法。

20

【請求項 117】

参照細胞集団が、次のもの：正常な組織からの細胞集団として分類される参照細胞集団、および冒された組織からの細胞集団として分類される参照細胞集団；からなる群より選択される、請求項 83 に記載の方法。

【請求項 118】

DC、com 集団を同定および精製するための、定義された表面表現型の使用。

【請求項 119】

桿状核球集団を同定および精製するための、定義された表面表現型の使用。

【請求項 120】

gr-DC 集団を同定および精製するための、定義された表面表現型の使用。

30

【請求項 121】

DC、com 集団を拡張するための、GM-CSF および場合により少なくとも 1 種類の他のサイトカインの使用。

【請求項 122】

DC、com の gr-DC への分化を促進するための、GM-CSF および場合により少なくとも 1 種類の他のサイトカインの使用。

【請求項 123】

CD48、MHC I、MHC II、CD1a、CD1d、CD11c の内の 1 種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、対象中の組織において DC、com を同定するための方法。

40

【請求項 124】

Ly6G の発現に関してスクリーニングする工程を含む、対象中の組織において桿状核球を同定するための方法。

【請求項 125】

CD11c、MHC II、CD86 および DEC205 の内の 1 種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、対象中の組織において gr-DC を同定するための方法。

【請求項 126】

DC、com のマーカーの内の 1 種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、DC、com の拡張を促進または阻害する化合物を同定するための方法。

50

## 【請求項 127】

DC.comおよび/またはgr-DCのマーカの内の1種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、DC.comのgr-DCへの分化を促進または阻害する化合物を同定するための方法。

## 【請求項 128】

DC.comのマーカの内の1種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、DC.comの遺伝子発現プロファイルおよび機能を試験するための方法。

## 【請求項 129】

gr-DCのマーカの内の1種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、gr-DCの遺伝子発現プロファイルおよび機能を試験するための方法。

10

## 【請求項 130】

それを必要とする対象においてDC.comを刺激する少なくとも1種類の化合物を含むワクチン。

## 【請求項 131】

それを必要とする対象においてgr-DCを刺激する少なくとも1種類の化合物を含むワクチン。

## 【請求項 132】

それを必要とする対象においてDC.comを刺激する少なくとも1種類の化合物を含む免疫刺激療法組成物。

## 【請求項 133】

それを必要とする対象においてgr-DCを刺激する少なくとも1種類の化合物を含む免疫刺激療法組成物。

20

## 【請求項 134】

DC.comの表現型、遺伝子プロファイル、または機能のマーカとしての使用。

## 【請求項 135】

gr-DCの表現型、遺伝子プロファイル、または機能のマーカとしての使用。

## 【請求項 136】

DC.comおよび/またはgr-DCの定義された表面表現型の、標的を定めた遺伝子送達のための使用。

## 【請求項 137】

DC.comおよび/またはgr-DCの定義された表面表現型の、標的を定めた薬物送達のための使用。

30

## 【請求項 138】

定義された表面のDC.comの、DCに関する直接の前駆体としての使用。

## 【請求項 139】

pIL1-DsRedトランスジェニックマウス系統の、DC.com集団を研究するためのモデルとしての使用。

## 【請求項 140】

pIL1-DsRedトランスジェニックマウス系統の、新薬の発見のための道具としての使用。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明者：Akira Takashima, Hironori Matsushima, Shuo Geng

関連出願の相互参照および資金提供を受けた研究に関する記載

[00001] 本発明は、2008年3月3日に出願された仮特許出願シリアル番号61/067,870の利益を主張する。この発明は、国立関節炎、骨格筋、皮膚疾患研究所助成金番号5R01AR053355-03の下での政府支援によりなされた。政府はこの発明において一定の権利を有する。

50

## 【 0 0 0 2 】

【00002】 この発明は概して樹状細胞のある定義されたサブセットを作る、および使用する方法に、より詳細には、樹状細胞 - g r - D C のサブセットのインビトロでの生成の方法に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 3 】

【00003】 この節で開示される背景技術が法律的に先行技術を構成するという自認は無い。

## 【 0 0 0 4 】

【00004】 樹状細胞 ( D C ) は体内の事実上全ての組織にあるプロフェッショナル抗原提示細胞のファミリーである。 D C は感染性微生物、癌細胞、自己免疫疾患、移植片拒絶、移植片対宿主拒絶疾患、および他の有害である可能性がある抗原に対する先天性および適応免疫応答の両方の誘導において極めて重要な役割を果たしている。定常状態における D C は、自己抗原および無害な環境抗原に対する免疫寛容の維持において同様に重要な役割を果たしている。

10

## 【 0 0 0 5 】

【00005】 いくつかの表現型が異なる D C サブセットが文献において報告されており、これには単球由来 D C 、骨髄性 D C 、形質細胞様 D C 、およびリンパ球系 D C が含まれる (Shortman and Liu, 2002) (Villadangos and Schnorrer, 2007)。これらの D C サブセットが機能的特性および発生経路において互いに異なるのかどうかは、まだいくらかははっきりしないままである。実際、培養および組織においていくつかの異なる造血集団が D C を生じさせるのが示されている (Rossner et al, 2005) (Naik et al, 2007) (Randolph et al, 1999) (Fogg et al, 2006) (del Hoyo et al, 2002) (Larregina et al, 2001) (D'Amico and Wu, 2003) (Diao et al, 2006) (Onai et al, 2007) (O'Keefe et al, 2003) (Naik et al, 2006) (Ginhoux et al, 2006) (Zuniga et al, 2004) (Bruno et al, 2001) (Wang et al, 2002) (Mende et al, 2006) (Diao et al, 2004) (Karsunky et al, 2003) (Iijima et al, 2007) (Welner et al, 2007) (Wu and Liu, 2007) (Wu and Dakic, 2004) (Shortman and Naik, 2007) (Naik, 2008) (Dakic and Wu, 2003))。

20

## 【 先行技術文献 】

## 【 非特許文献 】

30

## 【 0 0 0 6 】

【非特許文献 1】 Shortman and Liu, 2002

【非特許文献 2】 Villadangos and Schnorrer, 2007

【非特許文献 3】 Rossner et al, 2005

【非特許文献 4】 Naik et al, 2007

【非特許文献 5】 Randolph et al, 1999

【非特許文献 6】 Fogg et al, 2006

【非特許文献 7】 del Hoyo et al, 2002

【非特許文献 8】 Larregina et al, 2001

【非特許文献 9】 D'Amico and Wu, 2003

40

【非特許文献 10】 Diao et al, 2006

【非特許文献 11】 Onai et al, 2007

【非特許文献 12】 O'Keefe et al, 2003

【非特許文献 13】 Naik et al, 2006

【非特許文献 14】 Ginhoux et al, 2006

【非特許文献 15】 Zuniga et al, 2004

【非特許文献 16】 Bruno et al, 2001

【非特許文献 17】 Wang et al, 2002

【非特許文献 18】 Mende et al, 2006

【非特許文献 19】 Diao et al, 2004

50

【非特許文献 20】Karsunky et al, 2003

【非特許文献 21】Iijima et al, 2007

【非特許文献 22】Welner et al, 2007

【非特許文献 23】Wu and Liu, 2007

【非特許文献 24】Wu and Dakic, 2004

【非特許文献 25】Shortman and Naik, 2007

【非特許文献 26】Naik, 2008

【非特許文献 27】Dakic and Wu, 2003

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0007】

[00006] 最近の研究はDCに関するいくつかの前駆細胞集団を同定したが、DCに関する直接の前駆体はまだ決定されていない。この発明はこれらの問題に取り組む。

【課題を解決するための手段】

【0008】

[00007] 第1観点において、本明細書において表面マーカーCD48およびGr-1を用いることにより同定された単離された樹状細胞前駆体集団(DC.com)を提供する。

【0009】

[00008] 別の観点において、本明細書においてCD48-/MHC I-/MHC II-/CD1a-/CD1d-/CD11c-の特徴的な表面表現型を有する単離されたヒト樹状細胞前駆体(DC.com)を提供する。

20

【0010】

[00009] 特定の態様において、DC.com集団がGM-CSFの存在下で培養された場合、そのDC.com集団は特徴的な樹状突起の形態を示す樹状細胞(DC)に分化する。

【0011】

[00010] 別の観点において、本明細書においてCD11b+/CD11c-/Ly6G+/CD48-/MHC I-/MHC II-の特徴的な表面表現型を有する単離された樹状細胞前駆体集団(DC.com)を提供する；ここで、DC.com集団がGM-CSFの存在下で培養された場合、そのDC.com集団は特徴的な樹状突起の形態を示すDCに分化する。特定の態様において、DC.com集団がGM-CSFの存在下で培養された場合、そのDC.com集団は特徴的な樹状突起の形態を示す樹状細胞(DC)に分化する。

30

【0012】

[00011] 別の観点において、本明細書において次の内の1つ以上により特徴づけられる単離された樹状細胞前駆体集団(DC.com)を提供する：-表面表現型に基づいてCD11c+ DCから識別できること；ここでCD48、およびMHCクラスIおよびクラスII分子はそのDC.com集団において検出不能である、-表面表現型に基づいて他の樹状細胞前駆体から識別できること；ここでそのDC.com集団においてLy6Gが検出可能である；-OVAタンパク質およびペプチドをOT-IおよびOT-II T細胞受容体トランスジェニックマウスから単離されたCD8およびCD4 T細胞に提示する能力により評価した際に、検出できる抗原提示能力を示さないこと；-分葉状の核および少数の細胞質顆粒の封入により特徴づけられる形態を有すること；-表面表現型、細胞の大きさ、粒状度(granularity)、および形態に関して均質であること；-BM培養においてCD11b+/DsRed-/CD11c-集団と比べて比較的限られた有糸分裂可能性を有すること；-好中球前駆細胞の“桿状核球(band cell)”集団と似ていること；ならびに-前に同定されたDC亜集団と異なるDCサブセット(gr-DC)に分化する能力を有すること。

40

【0013】

50

[00012] 別の観点において、本明細書において顆粒球由来DC (gr-DC)を含むDC.comに由来する単離された樹状細胞集団を提供する。

【0014】

[00013] 特定の態様において、gr-DC細胞集団はCD11c、MHC II、CD86およびDEC205の発現に関してスクリーニングすることにより同定される。

【0015】

[00014] 特定の態様において、gr-DC細胞集団はインビトロまたはエキソピボ(ex vivo)系において免疫応答を誘導するように抗原を提示することができる。

【0016】

[00015] 特定の態様において、抗原は次の内の1種類以上である：外来性抗原、内因性抗原または自己抗原。

【0017】

[00016] 特定の態様において、抗原はインビトロまたはエキソピボ系において感染性病原体に対する免疫応答を誘導するように微生物抗原を提示することができる。

【0018】

[00017] 特定の態様において、抗原はインビトロまたはエキソピボ系において腫瘍細胞に対する免疫応答を誘導するように腫瘍抗原を提示することができる。

【0019】

[00018] 特定の態様において、抗原はインビトロまたはエキソピボ系においてウイルス病原体に対する免疫応答を誘導するようにウイルス抗原を提示することができる。

【0020】

[00019] 特定の態様において、抗原はインビトロまたはエキソピボ系において免疫応答を誘導するように非微生物性外来性抗原を提示することができる。

【0021】

[00020] 特定の態様において、gr-DCはCD4およびCD8 T細胞の両方に対してOVA抗原を提示する。

【0022】

[00021] 特定の態様において、gr-DCはLy6Gの表面発現を示す。

【0023】

[00022] 第1観点において、本明細書において次のことを含む活性化された樹状細胞を得るための方法を提供する：DC.comおよびgr-DCの少なくとも一方を含む細胞の集団を提供し、細胞の少なくとも一部の成熟化を誘発するためにその集団の中の細胞の少なくとも一部を活性化させる。

【0024】

[00023] 特定の態様において、少なくとも1個のDC.comまたはgr-DC細胞が次の内の1種類以上により活性化される：少なくとも1種類のウイルスまたはその派生物；少なくとも1種類の細菌またはその派生物；少なくとも1種類の寄生生物；少なくとも1種類の菌類またはその派生物；少なくとも1種類のサイトカインまたは少なくとも1種類のリガンド。

【0025】

[00024] 特定の態様において、その方法はTリンパ球を含むあらゆるタイプの生物学的試料に対して実施される。特定の態様において、その試料は血液である。特定の態様において、その試料は自家血液である。特定の態様において、その樹状細胞はヒトのものである。

【0026】

[00025] 別の観点において、本明細書において次のことを含むTリンパ球を活性化させるための方法を提供する：DC.comおよびgr-DCの少なくとも一方を含む細胞の集団を提供する；細胞の少なくとも一部の成熟化を誘発するためにその集団の中の細胞の少なくとも一部を活性化させる；および、Tリンパ球を樹状細胞に接触させる。

【0027】

10

20

30

40

50

[00026] 別の観点において、本明細書において化合物を DC . com および gr - DC の少なくとも一方を含む細胞の集団と接触させ、細胞の活性化を検出する工程を含む、樹状細胞を活性化させる化合物を同定するための方法を提供する。

【0028】

[00027] 別の観点において、本明細書において次のことを含む樹状細胞系を単離するためのインビトロの方法を提供する：対象から樹状細胞前駆体を単離する；単離した細胞を有効量の GM - CSF を含む適切な培地の中で培養状態に置く (plac ing i n c u l t u r e) ；細胞の顆粒球由来樹状細胞 (gr - DC) への分化を誘導する；および、対象に特有の樹状細胞系を得るために、細胞を連続的な細胞分裂により増殖させる。特定の態様において、少なくとも 20、30、40、50、60、70、80、90、および好ましくは少なくとも 100 回の細胞分裂の後に細胞を単離する。特定の態様において、その方法はさらに得られた樹状細胞系を様々な樹状細胞系または“クローン”を得るためにクローニングすることを含み、ここで“系のクローニング”はこの系の細胞の個別化、および単一の細胞から得られた遺伝的に同一の細胞を集めることを意味する。特定の態様において、その方法はさらに、興味のある表現型を有する少なくとも 1 種類のクローンを同定するために様々な樹状細胞系またはクローンの内の 1 種類を選択することを含む。特定の態様において、選択された細胞は CD 48 陰性 / MHC クラス I 陰性の表現型を有する。

10

【0029】

[00028] 別の観点において、本明細書において記述された方法に従って得られた単離された細胞系を本明細書において提供する。

20

【0030】

[00029] 別の観点において、本明細書において次のことを含む樹状細胞前駆体 (DC . com) 系を単離するためのインビトロの方法を提供する：対象から樹状細胞前駆体を単離する；単離した細胞を有効量の GM - CSF を含む適切な培地の中で培養状態に置き、単離した細胞から DC 前駆体細胞前駆体 (DC . com) 系を生成し、対象に特有の樹状細胞系を得るために細胞を連続的な細胞分裂により増殖させる。特定の態様において、少なくとも 20、30、40、50、60、70、80、90、および好ましくは少なくとも 100 回の細胞分裂の後に細胞を単離する。特定の態様において、その方法はさらに得られた樹状細胞系を様々な樹状細胞系または“クローン”を得るためにクローニングすることを含み、ここで“系のクローニング”はこの系の細胞の個別化、および単一の細胞から得られた遺伝的に同一の細胞を集めることを意味する。特定の態様において、その方法はさらに、興味のある表現型を有する少なくとも 1 種類のクローンを同定するために様々な樹状細胞系またはクローンの内の 1 種類を選択することを含む。特定の態様において、選択された細胞は CD 48 陰性 / MHC クラス I 陰性の表現型を有する。

30

【0031】

[00030] 別の観点において、本明細書において次のことを含む樹状細胞を活性化させる化合物を同定するための方法を提供する：化合物を DC . com または gr - DC 細胞系と接触させ、細胞系の活性化を検出する。

【0032】

40

[00031] 別の観点において、感染性の、または微生物性の因子 (細菌、ウイルス、寄生生物、菌類)、癌、移植片対宿主疾患、アレルギーおよび自己免疫疾患と関係する病理の少なくとも 1 タイプの処置における樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

【0033】

[00032] 別の観点において、抗腫瘍免疫療法および細胞療法における樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC の使用を本明細書において提供し、ここでその樹状細胞系 DC . com および / または gr - DC、またはその機能的派生物は免疫療法薬剤である。

【0034】

50

[00033] 別の観点において、癌の処置のための抗腫瘍免疫応答を促進する医薬組成物を製造するための樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 3 5 】

[00034] 別の観点において、感染症の処置のための抗微生物応答を促進する医薬組成物を製造するための樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 3 6 】

[00035] 別の観点において、ウイルス性疾患の処置のための抗ウイルス応答を促進する医薬組成物を製造するための樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

10

【 0 0 3 7 】

[00036] 別の観点において、非微生物性外因性自己免疫疾患の処置のための応答を促進する医薬組成物を製造するための樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 3 8 】

[00037] 別の観点において、移植片対宿主疾患の処置のための応答を促進する医薬組成物を製造するための樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 3 9 】

20

[00038] 別の観点において、DC が保護的な、または病原性の役割を果たしていることが既知である疾患における gr - DC の数および / または機能を検査するための樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 4 0 】

[00039] 別の観点において、望まれる形の免疫応答を選択的に誘導するように設計された、カスタマイズされた細胞に基づく療法のための、樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 4 1 】

30

[00040] 別の観点において、DC . com および / または gr - DC を活性化させるように設計された新しいクラスのワクチンアジュバントおよび配合物を開発するための樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 4 2 】

[00041] 別の観点において、DC . com および / または gr - DC の機能を選択的に増進または阻害する小さい化合物をスクリーニングするための樹状細胞前駆体系 DC . com および / または樹状細胞系 gr - DC、またはその機能的派生物の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 4 3 】

40

[00042] 別の観点において、その集団が検出可能な抗原提示能力を示す ; 骨髄サプレッサー細胞機能を示す ; 外来分子を取り込むその能力において効率的である ; CD 4 8、MHC I、MHC II、CD 1 a、CD 1 d、CD 1 1 c の内の 1 種類以上の発現を獲得するかどうかを決定する工程を含む、樹状細胞へ方向付けされた ( committed ) 前駆細胞集団 ( DC . com ) の同定のための方法を本明細書において提供する。

【 0 0 4 4 】

[00043] 別の観点において、樹状細胞前駆体集団を少なくとも CD 4 8 および MHC クラス I マーカーに関してスクリーニングする工程を含む、DC . com 集団の精製のための方法を本明細書において提供する。

【 0 0 4 5 】

50

[00044] 別の観点において、樹状細胞集団を少なくともC11c、MHCクラスII、CD86およびDEC205マーカーに関してスクリーニングする工程を含む、gr-DC集団の精製のための方法を本明細書において提供する。

【0046】

[00045] 別の観点において、樹状細胞前駆体集団を少なくともCD48およびMHCクラスIマーカーに関してスクリーニングする工程を含む、桿状核球集団の精製のための方法を本明細書において提供する。

【0047】

[00046] 別の観点において、単離されたDC.com細胞の集団をGM-CSF中で培養する、および場合によりその培養物に骨髄(BM)フィーダー細胞を添加する工程を含む、樹状細胞へ方向付けされた前駆細胞集団(DC.com)の拡張のための方法を本明細書において提供する。

10

【0048】

[00047] 別の観点において、次のことを含む、前駆体樹状細胞(DC.com)を顆粒球樹状細胞(gr-DC)の表現型を示すように誘導するための方法を本明細書において提供する：i)(CD45.2+である)C57BL/6マウスの骨髄(BM)培養物からCD48陰性/Gr-1高(Gr-1-high)DC.com集団を精製する、ii)工程i)からの集団を、(CD45.1+である)B6/SJLマウスから新しく単離したBM細胞とGM-CSFの存在下で共培養する；iii)抗CD45.2および抗CD45.1抗体で分染することにより識別されたDC.com集団に由来する細胞を識別する；ならびにiv)CD45.2+細胞を1種類以上の示されたマーカーの表面発現に関して分析する。特定の態様において、gr-DC.com細胞はCD11c、MHCクラスII、DEC205の発現を獲得し、Ly6Gの表面発現を維持する。特定の態様において、細胞は蛍光活性化細胞選別FACSにより精製される。

20

【0049】

[00048] 別の観点において、次のことを含む、哺乳類の前駆体樹状細胞から顆粒球樹状細胞(gr-DC)の表現型を有する細胞を生産するための方法を本明細書において提供する：i)哺乳類の血液試料から前駆体樹状細胞を含む細胞画分を用意する；ii)次のことにより、工程(i)の細胞画分の少なくとも1サブセットを単離する：工程i)からの集団を、CD45.1+である新しく単離したBM細胞とGM-CSFの存在下で共培養する；抗CD45.2および抗CD45.1抗体で分染することにより識別されたDC.com集団に由来する細胞を識別する；ならびにCD45.2+細胞を1種類以上の示されたマーカーの表面発現に関して分析する；ならびにiii)工程(ii)の接触させた細胞を集める。

30

【0050】

[00049] 別の観点において、有効量のDC.comに由来する組成物を投与することを含む、それを必要とする対象において炎症状態を改善するための方法を本明細書において提供する。

【0051】

[00050] 別の観点において、CD48陰性/Gr-1高-早期樹状細胞を有効量のGM-CSFと接触させ、それによりその細胞の顆粒球由来樹状細胞(gr-DC)への分化を誘導することを含む方法を本明細書において提供し、ここでLy6Gがgr-DCの表面上で発現しており、gr-DCは少なくとも1種類の外来の抗原をCD8およびCD4 T細胞に提示する。特定の態様において、有効量はすくなくとも10ng/mlであり、その接触は少なくとも1日間である。

40

【0052】

[00051] 別の観点において、次のことを含む、樹状細胞(DC)のT細胞との相互作用の作用因子を同定する方法を本明細書において提供する：i)DC.com集団をT細胞および試験薬剤と混合する、ならびにii)候補物質がDC.comのT細胞との相互作用を変化させるかどうかを決定する、ここで、DC.comのT細胞との相互作用を変

50

化させる試験薬剤は樹状細胞の相互作用の作用因子である。特定の態様において、DC・com組成物は検出可能な標識に結合した精製されたDC・comを含む。

【0053】

[00052] 別の観点において、次のことを含む、樹状細胞(DC)のT細胞との相互作用の作用因子を同定する方法を本明細書において提供する：i) gr-DC集団をT細胞および試験薬剤と混合する、ならびにii) 候補物質がgr-DCのT細胞との相互作用を変化させるかどうかを決定する、ここで、gr-DCのT細胞との相互作用を変化させる試験薬剤は樹状細胞の相互作用の作用因子である。特定の態様において、gr-DC組成物は検出可能な標識に結合した精製されたgr-DCを含む。

【0054】

[00053] 別の観点において、試験薬剤をスクリーニングする方法を本明細書において提供し、ここでDC・com組成物のT細胞との相互作用に影響を与える試験薬剤はDC・com組成物のT細胞への結合における変化により同定される。

【0055】

[00054] 別の観点において、試験薬剤をスクリーニングする方法を本明細書において提供し、ここでDC・com組成物のT細胞との相互作用に影響を与える試験薬剤はDC・comに仲介されるT細胞の活性化における変化により同定される。

【0056】

[00055] 別の観点において、試験薬剤をスクリーニングする方法を本明細書において提供し、ここでgr-DC組成物のT細胞との相互作用に影響を与える試験薬剤はgr-DC組成物のT細胞への結合における変化により同定される。

【0057】

[00056] 別の観点において、試験薬剤をスクリーニングする方法を本明細書において提供し、ここでgr-DC組成物のT細胞との相互作用に影響を与える試験薬剤はgr-DCに仲介されるT細胞の活性化における変化により同定される。

【0058】

[00057] 別の観点において、DC・comおよびgr-DC、ならびにそれらの機能的変種(variant)の内の少なくとも1種類を含む細胞の集団を含む医薬組成物を本明細書において提供する。

【0059】

[00058] 特定の態様において、その医薬組成物は感染症、癌に関連する疾患、炎症性の障害もしくは疾患、免疫に関連する障害もしくは疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の処置に有用である。

【0060】

[00059] 別の観点において、対象において対象が次の障害：感染症、癌に関連する疾患、炎症性の疾患、免疫に関連する疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の内の1種類以上を有するかどうか、もしくはそれを発現する危険にさらされているかどうかを診断する、予後を決定する、および/またはそれを処置する方法であって、次のことを含む方法を本明細書において提供する：対象からの試験試料においてDC・comまたはgr-DCの内の1種類以上に由来する少なくとも1種類のマーカーのレベルを測定する、ここで、検査試料におけるそのマーカーのレベルの、対照試料における対応するマーカーのレベルと比較した変化は、対象がその障害を有すること、またはそれを発現する危険にさらされていることのどちらかを示している。特定の態様において、検査試料における少なくとも1種類のマーカーのレベルは、対照試料における対応するマーカーのレベルよりも低い。特定の態様において、検査試料における少なくとも1種類のマーカーのレベルは、対照試料における対応するマーカーのレベルよりも高い。特定の態様において、少なくとも1種類のマーカーは、正常な組織および/または細胞と冒された組織および/または細胞の間で相違して発現している。特定の態様において、試料は血液試料を含む。特定の態様において、試料は血清または血漿の血液試料の内の1種類以上を含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 6 1 】

[00060] 別の観点において、正常な組織および/または細胞と冒された組織および/または細胞の間で相違して発現しておりDC・comおよびgr-DC細胞集団の内の1種類以上に由来する少なくとも1種類のマーカーを含むマーカーを本明細書において提供する。

## 【 0 0 6 2 】

[00061] 別の観点において、次の障害：感染症、癌に関連する疾患、炎症性の疾患、免疫に関連する疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の内の1種類以上を有する対象の予後を決定するための方法であって、対象からの試験試料において少なくとも1種類のマーカーのレベルを測定する工程を含む方法を本明細書において提供し、ここでそのマーカーはDC・comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来する；ならびに、ここで：i)そのマーカーは不都合な予後と関係している；およびii)検査試料における少なくとも1種類のマーカーのレベルの、対照試料における対応するマーカーのレベルと比較した変化は、不都合な予後を示している。

10

## 【 0 0 6 3 】

[00062] 別の観点において、次の障害：感染症、癌に関連する疾患、炎症性の疾患、免疫に関連する疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の内の1種類以上を処置する方法であって、少なくとも1種類のマーカーが対象の冒された細胞において対照の細胞と比較して下方制御または上方制御される方法を本明細書において提供し、ここでそのマーカーはDC・comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来し、その方法は次のことを含む：i)その少なくとも1種類のマーカーが冒された細胞において下方制御される場合、対象における冒された細胞の増殖が阻害されるように、対象に有効量の少なくとも1種類の単離されたマーカー、もしくはその単離された変種もしくは生物学的に活性な断片を投与する；またはii)その少なくとも1種類のマーカーが冒された細胞において上方制御される場合、対象における冒された細胞の増殖が阻害されるように、対象にその少なくとも1種類のマーカーの発現を阻害するための有効量の少なくとも1種類の化合物を投与する。

20

## 【 0 0 6 4 】

[00063] 別の観点において、次の障害：感染症、癌に関連する疾患、炎症性の疾患、免疫に関連する疾患、自己免疫疾患、宿主対移植片拒絶疾患、過敏性反応、または同種移植片拒絶の内の1種類以上を処置する方法であって、少なくとも1種類のマーカーが対象の冒された細胞において対照の細胞と比較して下方制御または上方制御される方法を本明細書において提供し、ここでそのマーカーはDC・comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来し、その方法は次のことを含む：(1)対象における冒された細胞の中の少なくとも1種類のマーカーの、対照の細胞と比較した量を決定する；および(2)次のことにより、冒された細胞の中で発現したマーカーの量を変化させる：(i)冒された細胞の中で発現したマーカーの量が対照の細胞の中で発現したマーカーの量よりも少ない場合、対象に有効量の少なくとも1種類の単離されたマーカーを投与する；または(ii)冒された細胞の中で発現したマーカーの量が対照の細胞の中で発現したマーカーの量よりも大きい場合、対象に少なくとも1種類のマーカーの発現を阻害するための有効量の少なくとも1種類の化合物を投与する。

30

40

## 【 0 0 6 5 】

[00064] 別の観点において、少なくとも1種類の単離されたマーカーおよび医薬的に許容できるキャリアーを含む医薬組成物を本明細書において提供し、ここでそのマーカーはDC・comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来する。特定の態様において、その少なくとも1種類の単離されたマーカーは、冒された細胞において対照の細胞と比較して下方制御されるマーカーと一致する。

## 【 0 0 6 6 】

[00065] 別の観点において、細胞に試験薬剤を与え、冒された細胞の中で減少した発現レベルと関係する少なくとも1種類のマーカーのレベルを測定することを含む、抗炎症

50

剤を同定する方法を本明細書において提供し、ここで冒された細胞の中のそのマーカーのレベルの、対照の細胞と比較した増大は、その試験薬剤が抗炎症癌剤 (anti-inflammatory cancer agent) であることを示している；ならびに、ここでそのマーカーは DC.com および gr-DC の内の 1 種類以上に由来する。

【0067】

[00066] 別の観点において、細胞に試験薬剤を与え、冒された細胞の中で増大した発現レベルと関係する少なくとも 1 種類のマーカーのレベルを測定することを含む、抗炎症剤を同定する方法を本明細書において提供し、ここでその細胞の中のそのマーカーのレベルの、対照の細胞と比較した低下は、その試験薬剤が抗炎症剤であることを示しており、ここでそのマーカーは DC.com および gr-DC の内の 1 種類以上に由来する。

10

【0068】

[00067] 別の観点において、次のことを含む、炎症性障害を予防、診断および/または処置するための療法の有効性を評価する方法を本明細書において提供する：i) 動物にその有効性を評価している療法を受けさせる、および ii) 試験している処置の、その障害の処置または予防における有効性のレベルを、少なくとも 1 種類のマーカーを評価することにより決定する、ここで、そのマーカーは DC.com および gr-DC の内の 1 種類以上に由来する。

【0069】

[00068] 特定の態様において、候補である療法薬は、次のものの内の 1 種類以上を含む：医薬組成物、栄養補強組成物、およびホメオパシー組成物。

20

【0070】

[00069] 特定の態様において、その評価されている療法はヒトの対象における使用のためのものである。

【0071】

[00070] 別の観点において、次のものを含む製品を本明細書において提供する：DC.com および gr-DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーを含む炎症性障害のためのマーカーに結合する少なくとも 1 種類の捕捉試薬。

【0072】

[00071] 別の観点において、炎症性障害を処置するための療法薬のための候補化合物に関するスクリーニングのためのキットを本明細書において提供し、ここでそのキットは次のものを含む：DC.com および gr-DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーの 1 種類以上の試薬；ならびに、少なくとも 1 種類のマーカーを発現する細胞。

30

【0073】

[00072] 特定の態様において、そのマーカーの存在は少なくとも 1 種類のマーカーと特異的に結合する抗体または抗体断片を含む試薬を用いて検出される。

【0074】

[00073] 別の観点において、炎症性障害または関係する疾患の応答シグナル伝達経路を妨げる薬剤の、個人においてその合併症を処置する、予防する、逆行させる、またはその重症度を制限するための医薬品の製造のための使用を本明細書において提供し、ここでその薬剤は DC.com および gr-DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーを含む。

40

【0075】

[00074] 別の観点において、対象に少なくとも 1 種類の炎症性応答カスケードを妨げる薬剤を投与することを含む、それを必要とする対象において炎症性障害または関係する合併症を処置する、予防する、逆行させる、またはその重症度を制限する方法を本明細書において提供し、ここでその薬剤は DC.com および gr-DC の内の 1 種類以上に由来する少なくとも 1 種類のマーカーを含む。

【0076】

[00075] 別の観点において、少なくとも 1 種類の炎症に関係する疾患の応答カスケー

50

ドを妨げる薬剤の、対象において炎症に関連する合併症を処置する、予防する、逆行させる、またはその重症度を制限するための医薬品の製造のための使用を本明細書において提供し、ここでその薬剤はDC.comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来する少なくとも1種類のマーカーを含む。

【0077】

[00076] 別の観点において、DC.comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来するマーカーの内の1種類以上のアンチセンス阻害剤を含む組成物を本明細書において提供する。

【0078】

[00077] 別の観点において、対象に療法上有効量の本明細書で記述した組成物を投与することを含む、それを必要とする対象を処置する方法を本明細書において提供する。特定の態様において、その組成物は予防的に投与される。特定の態様において、その組成物の投与は障害の1種類以上の症状の開始を遅延させる。特定の態様において、その組成物の投与は炎症性障害の発現を阻害する。特定の態様において、その組成物の投与は感染を阻害する。

10

【0079】

[00078] 別の観点において、生物学的試料において障害の存在を検出するための方法を本明細書において提供し、その方法は次のことを含む：i) その障害を含んでいる疑いのある生物学的試料をそれに関するマーカーにさらす、およびii) もしあるならば試料中のそのマーカーの存在または欠如を検出する；ここで、そのマーカーはDC.comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来する。特定の態様において、そのマーカーは検出可能な標識を含む。

20

【0080】

[00079] 特定の態様において、その方法はさらに、対象からの生物学的試料の中のそのマーカーの量を正常な対象からの対応する生物学的試料の中のそのマーカーの量と比較することを含む。

【0081】

[00080] 特定の態様において、その方法はさらに、異なる時点で対象から複数の生物学的試料を集め、それぞれの生物学的試料の中のそのマーカーの量を比較してそのマーカーの量が対象において時間の経過につれて増大している、または減少しているかどうかを決定することを含む。

30

【0082】

[00081] 別の観点において、対象において炎症性障害を処置するための方法を本明細書において提供し、その方法は次のことを含む：それを必要とする対象に、療法上有効量のDC.comまたはgr-DCの内の1種類以上に由来する炎症性受容体作動薬を投与する。特定の態様において、その受容体作動薬は、DC.comまたはgr-DCに由来するマーカーの内の1種類以上のアンチセンス阻害剤である。

【0083】

[00082] 別の観点において、炎症性障害により冒された細胞の分化を誘導するのに有効な療法薬または療法薬の組み合わせを同定するためのインピトロの方法を本明細書において提供し、その方法は次の段階を含む：i) 冒された細胞の培養、ii) 少なくとも1種類の化合物を工程i)の培地に添加する、iii) 少なくとも1種類のマーカーの、段階(i)および(ii)の間の発現のレベルの進展を分析する、ならびにiv) 段階(i)および(ii)の間のそのマーカーの発現のレベルの変化を誘導する化合物または化合物の組み合わせを同定する。特定の態様において、段階(iii)は少なくとも1種類のマーカーの発現のレベルの分析を含む。特定の態様において、段階(iv)は少なくとも1種類のマーカーの発現のレベルを調節する化合物または化合物の組み合わせの同定を含む。特定の態様において、段階(iv)は少なくとも1種類のマーカーの発現のレベルを低減させる化合物または化合物の組み合わせの同定を含む。

40

【0084】

50

[00083] 特定の態様において、その化合物は炎症性障害の処置のための療法薬である。

【 0 0 8 5 】

[00084] 別の観点において、次のことを含む、炎症性障害を有する対象から冒された組織および/または細胞を分類するための方法を本明細書において提供する：試験細胞集団におけるDC、comおよびgr-DCの内の1種類以上に由来する1種類以上のマーカーの発現を測定する、ここで、試験細胞集団の中の少なくとも1個の細胞は、1種類以上のそのマーカーを発現することができる；そのマーカー（単数又は複数）の発現を、それに関して分類が既知である少なくとも1個の細胞を含む参照細胞集団におけるそのマーカー（単数又は複数）の発現と比較する；ならびに、もし存在するならば、試験細胞集団および参照細胞集団における、その構成するグループから選択された1種類以上のマーカーの発現レベルにおける違いを同定し、それにより対象における炎症性障害を分類する。

10

【 0 0 8 6 】

[00085] 特定の態様において、試験細胞集団におけるそのマーカー（単数又は複数）の発現における、参照細胞集団と比較した違いは、その試験細胞集団が参照細胞集団からの細胞と異なる分類を有することを示す。

【 0 0 8 7 】

[00086] 特定の態様において、試験細胞集団におけるそのマーカー（単数又は複数）の、参照細胞集団と比較して類似した発現パターンは、その試験細胞集団が参照細胞集団からの細胞と同じ分類を有することを示す。

20

【 0 0 8 8 】

[00087] 特定の態様において、参照細胞集団は複数の細胞またはデータベースである。

【 0 0 8 9 】

[00088] 特定の態様において、参照細胞集団は次のものからなるグループから選択される：正常な組織からの細胞集団として分類される参照細胞集団、および冒された組織からの細胞集団として分類される参照細胞集団。

【 0 0 9 0 】

[00089] 別の観点において、DC、com集団を同定および精製するための、定義された表面表現型の使用を本明細書において提供する。

30

【 0 0 9 1 】

[00090] 別の観点において、桿状核球集団を同定および精製するための、定義された表面表現型の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 9 2 】

[00091] 別の観点において、gr-DC集団を同定および精製するための、定義された表面表現型の使用を本明細書において提供する。

【 0 0 9 3 】

[00092] 別の観点において、DC、com集団を拡張するための、GM-CSFおよび場合により少なくとも1種類の他のサイトカインの使用を本明細書において提供する。

40

【 0 0 9 4 】

[00093] 別の観点において、DC、comのgr-DCへの分化を促進するための、GM-CSFおよび場合により少なくとも1種類の他のサイトカインの使用を本明細書において提供する。

【 0 0 9 5 】

[00094] 別の観点において、CD48、MHC I、MHC II、CD1a、CD1d、CD11cの内の1種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、対象中の組織においてDC、comを同定するための方法を本明細書において提供する。

【 0 0 9 6 】

[00095] 別の観点において、Ly6Gの発現に関してスクリーニングする工程を含む、対象中の組織において桿状核球を同定するための方法を本明細書において提供する。

50

## 【 0 0 9 7 】

[00096] 別の観点において、CD 1 1 c、MHC I I、CD 8 6 およびDEC 2 0 5 の内の 1 種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、対象中の組織において gr - DC を同定するための方法を本明細書において提供する。

## 【 0 0 9 8 】

[00097] 別の観点において、DC . com のマーカーの内の 1 種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、DC . com の拡張を促進または阻害する化合物を同定するための方法を本明細書において提供する。

## 【 0 0 9 9 】

[00098] 別の観点において、DC . com および / または gr - DC のマーカーの内の 1 種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、DC . com の gr - DC への分化を促進または阻害する化合物を同定するための方法を本明細書において提供する。

10

## 【 0 1 0 0 】

[00099] 別の観点において、DC . com のマーカーの内の 1 種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、DC . com の遺伝子発現プロファイルおよび機能を試験するための方法を本明細書において提供する。

## 【 0 1 0 1 】

[00100] 別の観点において、gr - DC のマーカーの内の 1 種類以上の発現に関してスクリーニングする工程を含む、gr - DC の遺伝子発現プロファイルおよび機能を試験するための方法を本明細書において提供する。

20

## 【 0 1 0 2 】

[00101] 別の観点において、それを必要とする対象においてDC . com を刺激する少なくとも 1 種類の化合物を含むワクチンを本明細書において提供する。

## 【 0 1 0 3 】

[00102] 別の観点において、それを必要とする対象においてgr - DC を刺激する少なくとも 1 種類の化合物を含むワクチンを本明細書において提供する。

## 【 0 1 0 4 】

[00103] 別の観点において、それを必要とする対象においてDC . com を刺激する少なくとも 1 種類の化合物を含む免疫刺激療法組成物を本明細書において提供する。

30

## 【 0 1 0 5 】

[00104] 別の観点において、それを必要とする対象においてgr - DC を刺激する少なくとも 1 種類の化合物を含む免疫刺激療法組成物を本明細書において提供する。

## 【 0 1 0 6 】

[00105] 別の観点において、DC . com の表現型、遺伝子プロファイル、または機能のマーカーとしての使用を本明細書において提供する。

## 【 0 1 0 7 】

[00106] 別の観点において、gr - DC の表現型、遺伝子プロファイル、または機能のマーカーとしての使用を本明細書において提供する。

## 【 0 1 0 8 】

[00107] 別の観点において、DC . com および / または gr - DC の定義された表面表現型の、標的を定めた (targeted) 遺伝子送達のための使用を本明細書において提供する。

40

## 【 0 1 0 9 】

[00108] 別の観点において、DC . com および / または gr - DC の定義された表面表現型の、標的を定めた薬物送達のための使用を本明細書において提供する。

## 【 0 1 1 0 】

[00109] 別の観点において、定義された表面のDC . com (the defined surface the DC . com) の、DC に関する直接の前駆体としての使用を本明細書において提供する。

50

## 【 0 1 1 1 】

【00110】 別の観点において、p I L 1 - D s R e dトランスジェニックマウス系統の、D C . c o m集団を研究するためのモデルとしての使用を本明細書において提供する。

## 【 0 1 1 2 】

【00111】 別の観点において、p I L 1 - D s R e dトランスジェニックマウス系統の、新薬の発見のための道具としての使用を本明細書において提供する。

## 【 0 1 1 3 】

【00112】 本発明の他のシステム、方法、特徴、および利点は、下記の図面および詳細な記述の吟味により当業者には明らかであろう、または明らかになるであろう。全てのその追加のシステム、方法、特徴、および利点はこの記述の内に含まれること、本発明の範囲内に含まれること、および添付された特許請求の範囲により保護されることを意図する。

10

## 【 0 1 1 4 】

【00113】 本特許または出願書類は、1個以上のカラーで作成された図面および/または1個以上の写真を含んでいてよい。カラーの図面および/または写真を有するこの特許または特許出願刊行物のコピーは、請求および必要な料金の支払いに応じて特許庁により提供されるであろう。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 1 1 5 】

【図1】【00114】 図1 . p I L 1 - D s R e dトランスジェニックマウス系統のためのコンストラクト：このコンストラクトはI L - プロモーター駆動D s R e dトランスジェニックマウス系統を生み出すために用いられた。

20

【図2】【00115】 図2 . p I L 1 - D s R e dトランスジェニックマウスに由来するD CによるD s R e dの発現：p I L 1 - D s R e dトランスジェニックマウスから生成したC D 1 1 c + D C培養物を、示した濃度でのL P Sによる刺激の24時間後のD s R e dの発現に関して調べた。D CはL P Sにより刺激するとD s R e d蛍光シグナルを示すことを特筆する。

【図3】【00116】 図3 . p I L 1 - D s R e dトランスジェニックマウスからのB M細胞培養物におけるD s R e d蛍光シグナルの検出：p I L 1 - D s R e dトランスジェニックまたは野生型C 5 7 B L / 6マウスから単離された骨髄(B M)細胞を、1 0 n g / m l G M - C S Fの存在下で2日間培養し、次いでD s R e dの発現に関して調べた。p I L 1 - D s R e dトランスジェニックマウスから生成したB M培養物のみがL P S刺激の非存在下においてさえもかなりのD s R e dシグナルを示すことを特筆する。

30

【図4】【00117】 図4 . B M培養におけるD s R e dの発現に関する速度論：p I L 1 - D s R e dトランスジェニックから単離されたB M細胞を、1 0 n g / m l G M - C S Fの存在下で示した期間の間培養し、次いでD s R e dの発現に関して調べた。示したデータは、1 0<sup>6</sup>個の開始時のB M細胞あたりのD s R e d陽性細胞の数である(3通りの培養物からの平均±S D)。開始時のB M細胞集団においてはD s R e d +の細胞がほとんど完全に存在しないことおよびそれに続く培養におけるD s R e d +の細胞の急速な増加を特筆する。

40

【図5A】【00118】 図5 A - 5 B . B M培養におけるD s R e d +の細胞によるC D 1 1 bおよびC D 1 1 cの発現：p I L 1 - D s R e dトランスジェニックから単離されたB M細胞を、1 0 n g / m l G M - C S F、2 0 0 n g / m l F l t 3リガンド、または1 0 n g / m l M - C S Fの存在下または非存在下で示した期間の間培養し、次いでD s R e dの発現に関して、さらにC D 1 1 b(図5 A)およびC D 1 1 c(図5 B)の表面発現に関して調べた。G M - C S FはB M培養の早期におけるD s R e d + / C D 1 1 b +細胞の増加、さらに後期におけるD s R e d + / C D 1 1 b +およびD s R e d - / C D 1 1 c + D Cの数の増大を促進することを特筆する。

【図5B】【00118】 図5 A - 5 B . B M培養におけるD s R e d +の細胞によるC D 1 1 bおよびC D 1 1 cの発現：p I L 1 - D s R e dトランスジェニックから単離され

50

たBM細胞を、 $10\text{ ng/ml}$  GM-CSF、 $200\text{ ng/ml}$  Flt3リガンド、または $10\text{ ng/ml}$  M-CSFの存在下または非存在下で示した期間の間培養し、次いでDsRedの発現に関して、さらにCD11b (図5A) およびCD11c (図5B) の表面発現に関して調べた。GM-CSFはBM培養の早期におけるDsRed+/CD11b+細胞の増加、さらに後期におけるDsRed+/CD11b+およびDsRed-/CD11c+ DCの数の増大を促進することを特筆する。

【図6】[00119] 図6. DsRed+/CD11b+/CD11c-集団の、CD11c+ DCに分化する(different)可能性: pIL1-DsRedトランスジェニックマウスの、GM-CSFを補ったBM培養物(3日目)中のCD11b+細胞を、DsRedの発現およびCD11cの表面発現に基づいて4種類の画分に選別した。それぞれの画分をGM-CSFの存在下での培養に戻し、次いで示した時点におけるDsRedおよびCD11cの発現に関して調べた。0日目のプロファイルは、それぞれの選別された集団の純度を表す。DsRed+/CD11b+/CD11c-集団("DC.com"と表示した)は、GM-CSFがある培養状態に置かれるとDCマーカーCD11cを発現し始めることを特筆する。

10

【図7】[00120] 図7. BM培養におけるDC.comの出現に関する速度論: pIL1-DsRedトランスジェニックから単離されたBM細胞を、 $10\text{ ng/ml}$  GM-CSFの存在下で示した期間の間培養し、次いでDC.comおよびDC集団の数に関して調べた。示したデータは、 $10^6$ 個の開始時のBM細胞あたりのDsRed+/CD11c-のDC.com細胞(実線)、DsRed+/CD11c+のDC(破線)、およびDsRed-/CD11c+のDC(点線)の数である。培養における最初の24時間以内のDsRed+/CD11c-の細胞の急速かつ深い(profound)増加を特筆する。

20

【図8】[00121] 図8. BM培養におけるDsRed+の細胞の増加に対するサイトカインの差次的作用: pIL1-DsRedトランスジェニックから単離されたBM細胞を、それぞれのサイトカイン( $10\text{ ng/ml}$ )の存在下で2日間培養し、次いで細胞の生存度およびDsRed蛍光シグナルを示す細胞の%に関して調べた。選ばれたサイトカイン(GM-CSFを含む)のみがBM培養におけるDsRed+の細胞の増加を促進することを特筆する。

【図9】[00122] 図9. BM培養におけるDsRed+の細胞のGM-CSFに依存する増加に対するサイトカインの差次的作用: 示したサイトカインのそれぞれを、GM-CSF( $10\text{ ng/ml}$ )を補ったpIL1-DsRedトランスジェニックマウスからのBM細胞培養物に、 $10\text{ ng/ml}$ で添加した。2日後、試料を細胞の生存度およびDsRed蛍光シグナルを示す細胞の%に関して調べた。選ばれたサイトカイン(インターフェロン-を含む)のみがBM培養におけるDsRed+の細胞のGM-CSFに依存する増加を阻害することを特筆する。

30

【図10】[00123] 図10. BM培養におけるCD11c+のDCの増加に対するサイトカインの差次的作用: pIL1-DsRedトランスジェニックから単離されたBM細胞を、それぞれのサイトカイン( $10\text{ ng/ml}$ )の存在下で2日間培養し、次いで細胞の生存度およびDCマーカーCD11cを発現する細胞の%に関して調べた。示したデータは、3通りの培養物からの平均±SDである(\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.001$ )。選ばれたサイトカイン(GM-CSFを含む)のみがBM培養におけるDCの増加を促進することを特筆する。

40

【図11】[00124] 図11. DsRed+/CD11b+/CD11c-集団の形態学的な特徴: pIL1-DsRedトランスジェニックマウスの、GM-CSFを補ったBM培養物(3日目)中のCD11b+細胞を、DsRedの発現およびCD11cの表面発現に基づいて4種類の画分に選別した。それぞれの画分のサイトスピン(Cytospin)プレパラートを、ギムザ染色の後に細胞の形態に関して調べた(上のパネル)。それぞれの画分を、フローサイトメトリーにより細胞の大きさ(FSC)および粒状度(SSC)に関するも調べた。FACSで精製したDsRed+/CD11b+/CD1

50

1 c - 細胞 (すなわち DC . com) は一様に特徴的な形態、比較的小さな細胞の大きさ (FSC)、および限られた粒状度 (SSC) を示すことを特筆する。

【図 1 2】 [00125] 図 1 2 . DC . com の超微細構造の特徴 : CD 1 1 b + / DsRed + / CD 1 1 c - 細胞を、pIL1 - DsRed トランスジェニックマウスの、GM - CSF を補った BM 培養物 (3 日目) から FACS で精製した。次いで試料を電子顕微鏡の下で調べた。FACS で精製した DsRed + / CD 1 1 b + / CD 1 1 c - 細胞 (すなわち DC . com) は一様に短いプロセスおよび分葉状の核を示すことを特筆する。

【図 1 3】 [00126] 図 1 3 . DC . com の有糸分裂可能性 : pIL1 - DsRed トランスジェニックマウスの、GM - CSF を補った BM 培養物 (3 日目) 中の CD 1 1 b + 細胞を、BrdU での標識の 18 時間後に、DsRed の発現および CD 1 1 c の表面発現に基づいて 4 種類の画分に選別した (上のパネル)。あるいは、選別した集団を BrdU の存在下でさらに 18 時間培養した (下のパネル)。次いで試料を BrdU の取り込みおよび DNA 含有量に関して (7 - AAD 染色により) 調べた。示した四角の中の細胞は、高い有糸分裂可能性を有する細胞を表す。DsRed + / CD 1 1 b + / CD 1 1 c - 細胞 (すなわち DC . com) の比較的限られた有糸分裂可能性を特筆する。

【図 1 4】 [00127] 図 1 4 . DC . com の表面表現型 : pIL1 - DsRed トランスジェニックマウスの、GM - CSF を補った BM 培養物 (3 日目) 中の、DsRed + / CD 1 1 b + / CD 1 1 c - である DC . com 画分および 3 種類の他の集団を、示した分子の表面発現に関して調べた。アイソタイプを合わせた対照の IgG を用いた染色プロフィールを実線で示す。DC . com 集団は MHC クラス I 陰性、Gr - 1 陽性、Ly 6 G 陽性、Ly 6 C 陽性、および CD 4 8 陰性を含む特徴的な表面表現型により定義することができることを特筆する。

【図 1 5】 [00128] 図 1 5 A - 1 5 B . DC . com の抗原提示能力 : pIL1 - DsRed トランスジェニックマウスの、GM - CSF を補った BM 培養物 (3 日目) 中の CD 1 1 b + 細胞を、DsRed の発現および CD 1 1 c の表面発現に基づいて 4 種類の画分に選別した。それぞれの画分を OVA タンパク質または OVA ペプチドを用いてパルス (pulse) し、次いで OT - I トランスジェニックマウスから精製した CD 8 T 細胞 (図 1 5 A) または OT - II トランスジェニックマウスから精製した CD 4 T 細胞 (図 1 5 B) と共培養した。添加された DC . com または他の集団の数を X 軸においてプロットする。丸は抗原パルスの無い対照の共培養物を示す。示したデータは、4 日目における 3 H - チミジンの取り込み (3 通りの培養物からの平均 ± SD) である。DC . com 集団は検出可能な抗原提示能力を示さず、一方で 2 種類の DC 集団 (CD 1 1 c + / DsRed + 細胞および CD 1 1 c + / DsRed - 細胞) はタンパク質およびペプチドの抗原を CD 8 および CD 4 T 細胞の両方に効率的に提示することを特筆する。

【図 1 6】 [00129] 図 1 6 . DC . com における骨髄由来サブレッサー細胞機能の欠如 : pIL1 - DsRed トランスジェニックマウスの、GM - CSF を補った BM 培養物 (3 日目) 中の CD 1 1 b + / CD 1 1 c - 細胞を、DsRed の発現に基づいて 2 種類の画分に選別した。DsRed + の細胞 (DC . com) (黒丸) および DsRed - の細胞 (白丸) を、OT - 1 トランスジェニックマウスから単離した脾臓細胞と共に、OVA タンパク質 (左のパネル) または OVA ペプチド (右のパネル) の存在下で共培養した。示したデータは、3 日目における 3 H - チミジンの取り込み (3 通りの培養物からの平均 ± SD) である。CD 1 1 b + / CD 1 1 c - / DsRed - の細胞は抗原特異的な T 細胞の増殖を細胞数に依存する方式で阻害し、一方で CD 1 1 b + / CD 1 1 c - / DsRed + の細胞 (DC . com) は骨髄由来サブレッサー細胞機能を示さないことを特筆する。

【図 1 7】 [00130] 図 1 7 . DC . com のエンドサイトーシスの可能性 : pIL1 - DsRed トランスジェニックマウスの、GM - CSF を補った BM 培養物 (3 日目) 中の CD 1 1 b + 細胞を、DsRed の発現および CD 1 1 c の表面発現に基づいて 4 種類の画分に選別した。それぞれの画分を FITC コンジュゲートデキストランと共に 10

10

20

30

40

50

分間保温した。示したデータは、F I T C - デキストランの取り込みに関する F A C S プロフィール（上のパネル）および3通りの試料からの中央値の蛍光強度の平均 $\pm$ S D（下のパネル）である。D C . c o m 集団は外来分子を取り込むそれらの能力において他の集団よりもはるかに効率的であることを特筆する。

【図18】[00131] 図18 . p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウスのリンパ組織において同定された D s R e d + の細胞：p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウス（上）または野生型の対照のマウス（下）の B M、末梢血、脾臓、およびリンパ節から新しく調製した細胞懸濁液を、D s R e d の発現（X 軸）対粒状度（Y 軸）に関して調べた。全ての試験した組織において D s R e d + の細胞が存在するが、p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウスからのもののみであることを特筆する。

10

【図19】[00132] 図19 . リンパ組織における D s R e d + の細胞の同一性：p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウスの B M、末梢血、脾臓、およびリンパ節から新しく調製した細胞懸濁液を、D s R e d の発現（X 軸）対 C D 1 1 b または C D 1 1 c の表面発現（Y 軸）に関して調べた。C D 1 1 b は組織常在性の D s R e d + の細胞の大部分により発現されており、これは我々の B M 培養における D s R e d + の細胞での発現と矛盾しないことを特筆する。

【図20】[00133] 図20 . B M 中の常在性 D C . c o m の表面表現型：p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウスから新しく調製した細胞懸濁液を、D s R e d の発現（X 軸）対示した分子に関する表面発現（Y 軸）に関して調べた。B M 常在性の D s R e d + の集団は B M 培養物中で同定された D C . c o m と識別不能であることを特筆する。

20

【図21】[00134] 図21 . 末梢血中の常在性 D C . c o m の表面表現型：p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウスから新しく調製した末梢血試料を、D s R e d の発現（X 軸）対示した分子に関する表面発現（Y 軸）に関して調べた。末梢血中の D s R e d + の集団は B M 培養物中で同定された D C . c o m と識別不能であることを特筆する。

【図22】[00135] 図22 . リンパ節中の常在性 D C . c o m の表面表現型：p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウスの鼠径部リンパ節から新しく調製した細胞懸濁液を、D s R e d の発現（X 軸）対示した分子に関する表面発現（Y 軸）に関して調べた。リンパ節中の D s R e d + の集団は B M 培養物中で同定された D C . c o m と識別不能であることを特筆する。

30

【図23】[00136] 図23 A - 23 B . 炎症条件下での皮膚における D s R e d + の細胞の出現：p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウスを、耳の皮膚における D s R e d の発現に関して、オキサゾロン（O X）の局所的適用の後の異なる時点において共焦点顕微鏡により調べた（図23 A）。野生型のマウスの耳の皮膚を、O X の適用の24時間後に調べた（図23 B）。p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウスの耳の皮膚を、ジニトロフルオロベンゼン（D N F B）もしくは乳酸の局所的適用またはテープストリッピングの24時間後に調べた（図23 C）。スケールバー：50  $\mu$ m。D s R e d + の細胞は通常健康な皮膚においても稀に見つかるが、それらは全ての試験した炎症条件下で急速に出現することを特筆する。

40

【図24】[00137] 図24 . 炎症性皮膚病変において出現している D s R e d + の細胞の位置：p I L 1 - D s R e d トランスジェニックマウスを、耳の皮膚における D s R e d の発現に関して、局所的 O X 適用の24時間後に共焦点顕微鏡により調べた。示したデータは、皮膚表面からの示した深度における D s R e d + の細胞の z 軸局在（z - a x i s l o c a l i z a t i o n）である。スケールバー：50  $\mu$ m。表皮区画（0から30  $\mu$ mまでの範囲）においてわずかな D s R e d + の細胞が見つかるが、D s R e d + の細胞の大部分は真皮区画（30から70  $\mu$ mまでの範囲）において、毛嚢の周辺に優先的に位置している。皮膚の表面で観察される蛍光シグナルは、毛嚢および角質層（死んだケラチノサイト（k e r a t u n o c y t e s）で構成される最も外側の層）と関係する自己蛍光である。

50

【図25】[00138] 図25A - 25D. DsRedの蛍光シグナルとIL- $\beta$ の産生の間の相関：野生型のマウスおよびpIL1-DsRedトランスジェニックマウスに、耳の皮膚において、OXまたはビヒクルのみの局所的適用を受けさせた。耳の皮膚の試料におけるIL- $\beta$  mRNAの発現を、OXまたはビヒクルのみの局所的適用の24時間後に、リアルタイムPCRにより調べた(図25A)。野生型のマウス(図25B)およびpIL1-DsRedトランスジェニックマウス(図25C)において、耳の皮膚におけるOXまたはビヒクルのみの適用の後の示した時点で、我々は耳の皮膚の抽出物中のIL-タンパク質のレベルをELISAにより調べた。図25Dにおいて、我々はOXで処理した(黒い記号)またはビヒクルで処理した(白い記号)野生型のマウス(三角)およびpIL1-DsRedトランスジェニックマウス(丸)からの皮膚の抽出物におけるDsRedの蛍光シグナルも測定した。示したデータはグループあたり3匹のマウスからの平均 $\pm$ SDである(\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。DsRedの蛍光シグナルは組織中のIL- $\beta$ の産生とよく相関していることを特筆する。

10

【図26】[00139] 図26A - 26C. 表皮区画において出現しているDsRed+の細胞の表面表現型：表皮細胞の懸濁液を、pIL1-DsRedトランスジェニックマウスの耳の皮膚から、局所的OX処理の後の示した時点において調製し、DsRedの発現に関して調べた(図26A)。野生型のマウスまたはpIL1-DsRedトランスジェニックマウスからの表皮細胞の懸濁液を、DsRedの発現およびCD45の発現に関しても調べた(図26B)。上記の実験において、CD45+の白血球集団を示したマーカーの発現に関して調べた(図26C)。OX処理が、CD45+、CD11b+、およびGr-1+であるDsRed表皮細胞の数の時間に依存する増大を誘導することを特筆する。

20

【図27】[00140] 図27A - 27C. 真皮区画において出現しているDsRed+の細胞の表面表現型：真皮細胞の懸濁液を、pIL1-DsRedトランスジェニックマウスの耳の皮膚から、局所的OX処理の後の示した時点において調製し、DsRedの発現に関して調べた(図27A)。野生型のマウスまたはpIL1-DsRedトランスジェニックマウスからの真皮細胞の懸濁液を、DsRedの発現およびCD45の発現に関しても調べた(図27B)。上記の実験において、CD45+の白血球集団を示したマーカーの発現に関して調べた(図27C)。OX処理が、CD45+、CD11b+、およびGr-1+であるDsRed真皮細胞の数の時間に依存する増大を誘導することを特筆する。

30

【図28】[00141] 図28. 野生型のマウスにおけるDC $\cdot$ comの同定：野生型のC57BL/6マウスから生成した、GM-CSFを補ったBM培養物(1日目)を、Gr-1およびCD48の発現に関して調べた。次いでCD48陰性/Gr-1高集団を示した表面マーカーの発現に関して調べた。野生型のマウスにおいて同定されたDC $\cdot$ com集団は、元はpIL1-DsRedトランスジェニックマウスを用いて同定されたCD11b+/DsRed+/CD11c- DC $\cdot$ com集団と識別不能であることを特筆する。

【図29】[00142] 図29A - 29B. 野生型のマウスから精製したDC $\cdot$ com集団の形態学的な特徴：CD48陰性/Gr-1高集団を、野生型のC57BL/6マウスのGM-CSFを補ったBM培養物からFACS精製した。次いで試料をH&E染色のために処理した。事実上全ての細胞が帯型の分葉状の核を示しており、従って、pIL1-DsRedトランスジェニックマウスから精製したDC $\cdot$ com細胞に似ていることを特筆する。

40

【図30】[00143] 図30A - 30B. BMフィーダー細胞と共培養している間のDC $\cdot$ comの分化：CD48陰性/Gr-1高DC $\cdot$ com集団を、(CD45.2+である)C57BL/6マウスのBM培養物からFACS精製し、次いで(CD45.1+である)B6/SJLマウスからの新しく単離したBM細胞とGM-CSFの存在下で共培養した。DC $\cdot$ com集団に由来する細胞は、抗CD45.2および抗CD45.1抗体で分染することによりフィーダーと識別することができる(図30A)。この系にお

50

る6日間の共培養の後、CD45<sup>+</sup>細胞を示したマーカーの表面発現に関して分析した(図30B)。DC<sup>com</sup>細胞がCD11c、MHCクラスII、DEC205および他のDCマーカーを獲得する一方でLy6Gの表面発現を維持していることを特筆する。

【図31】[00144] 図31A-31B. DC<sup>com</sup>由来DCの形態: CD48陰性/G<sub>r</sub>-1高DC<sup>com</sup>集団を、(CD45<sup>+</sup>である)C57BL/6マウスのBM培養物からFACS精製し、次いで(CD45<sup>+</sup>である)B6/SJLマウスからの新しく単離したBM細胞とGM-CSFの存在下で共培養した。この系における6日間の共培養の後、CD45<sup>+</sup>細胞をFACS精製し、H&E染色のために処理した。細胞の大部分がDCの特徴的な形態を示している一方で少数の細胞が非常に多くの細胞質顆粒を示していることを特筆する。

【図32】[00145] 図32. g<sub>r</sub>-DC対mo-DCによるLy6Gの差次的発現: 野生型のマウスのBMから新しく単離したCD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup>/Ly6G<sup>-</sup>の単球を、GM-CSFの存在下で6日間培養した。CD48陰性/G<sub>r</sub>-1高DC<sup>com</sup>集団を、(CD45<sup>+</sup>である)C57BL/6マウスのBM培養物からFACS精製し、(CD45<sup>+</sup>である)B6/SJLマウスからの新しく単離したBM細胞とGM-CSFの存在下で共培養した。得られた単球由来DC(mo-DC)およびDC<sup>com</sup>由来DC(すなわち、共培養物中のCD45<sup>+</sup>細胞であり、“g<sub>r</sub>-DC”と表示する)を、次いでLy6Gの表面発現に関して比較した(黒いヒストグラム)。白いヒストグラムは、アイソタイプを合わせた対照のIgGを用いた染色パターンを示す。Ly6Gの発現は2種類のDCサブセットを識別するのに用いることができることを特筆する。

【図33】[00146] 図33. DC<sup>com</sup>由来DCの抗原提示能力: CD48陰性/G<sub>r</sub>-1高DC<sup>com</sup>集団を、(CD45<sup>+</sup>である)C57BL/6マウスのBM培養物からFACS精製し、(CD45<sup>+</sup>である)B6/SJLマウスからの新しく単離したBM細胞とGM-CSFの存在下で6日間共培養した。CD45<sup>+</sup>細胞をFACS精製し、OVAタンパク質(左のパネル)またはOVAペプチド(右のパネル)を用いてパルスし、次いでOT-IITランスジェニックマウスから精製したCD4<sup>+</sup>T細胞(上のパネル)またはOT-IITランスジェニックマウスから精製したCD8<sup>+</sup>T細胞(下のパネル)と共培養した。添加したg<sub>r</sub>-DCの数/ウェルをX軸においてプロットした。三角はg<sub>r</sub>-DCにT細胞を加えた抗原の非存在下での対照の共培養物を示す。丸はT細胞無しのg<sub>r</sub>-DCのみの対照培養物を示す。示したデータは、4日目における3H-チミジンの取り込み(3通りの培養物からの平均±SD)である。DC<sup>com</sup>由来するDC(すなわちg<sub>r</sub>-DC)はCD4およびCD8<sup>+</sup>T細胞の両方に効率的にOVA抗原を提示することを特筆する。

【図34】[00147] 図34. 野生型のマウスの脾臓におけるDC<sup>com</sup>集団の同定: 野生型C57BL/6マウスから新しく集めた粗精製の脾臓細胞を、CD48陰性/CD11b陽性細胞およびCD48陰性/G<sub>r</sub>-1高細胞の存在に関して調べた。脾臓細胞はDC<sup>com</sup>の特徴的な表現型を示す小さい画分(0.5%)の細胞を含むことを特筆する。

【図35】[00148] 図35. 野生型のマウスの脾臓における顆粒球由来DCの同定: 野生型C57BL/6マウスから新しく集めた粗精製の脾臓細胞を、CD11c<sup>+</sup>/MHCクラスII<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup>細胞の存在に関して調べた。右下の角のパネルは、CD11c<sup>+</sup>/MHCクラスII<sup>+</sup>集団内のLy6Gの発現を示す。CD11c<sup>+</sup>/MHCクラスII<sup>+</sup>脾臓DCのかなりの割合(2.5%)が顆粒球由来DCに関するマーカーであるLy6Gを発現していることを特筆する。

【図36】[00149] 図36. 野生型のマウスのリンパ節における顆粒球由来DCの不在: 野生型C57BL/6マウスから新しく単離した粗精製のリンパ節細胞を、CD11c<sup>+</sup>/MHCクラスII<sup>+</sup>/Ly6G<sup>+</sup>細胞の発現に関して調べた。顆粒球由来DCはリンパ節では定常状態においてほとんど検出できないことを特筆する。

【図37】[00150] 図37: ヒト末梢血におけるDC<sup>com</sup>集団の同定: ヒト末梢

10

20

30

40

50

血試料を、CD48およびMHCクラスIの発現に関して調べた。CD48 - およびMHCクラスI - の二重陰性であり大きさの小さい集団は、pIL1 - DsRedトランスジェニックマウスにおいて同定されたマウスのDC.comと識別不能な様な表面表現型を示す。

【図38】[00151] 図38：表1 - DC.com細胞の数( $\times 10^6$ )。IL-1 - DsRedマウスから単離したBM細胞を、GM-CSF(10ng/ml)、Flt3L(200ng/ml)、M-CSF(100ng/ml)またはビヒクルのみと共に5日間培養した。DC.comの数を、2日ごとにフローサイトメトリーにより分析した。

【図39】[00152] 図39：表2 - 四(4)種類の集団の間でのToll様受容体およびCCケモカイン受容体の相対的なmRNA発現。GM-CSF(10ng/ml)と共に3日間培養したBM細胞を、CD11cおよびDsRedの発現に基づいて4種類の画分にFACS精製した。精製の後、全RNAを抽出し、リアルタイムRT-PCRを実行して示した遺伝子の相対的な発現レベルを調べた。DC.com画分は独特の遺伝子発現プロファイルにより他の画分から識別可能であることを特筆する。

【図40】[00001] 図40：表3 - 四(4)種類の集団の間のサイトカインのプロファイル。GM-CSF(10ng/ml)と共に3日間培養したBM細胞を、CD11cおよびDsRedの発現に基づいて4種類の画分にFACS精製した。精製の後、4種類の画分をリポ多糖(LPS)(100ng/ml)、CpG(1000nM/ml)と共に、または刺激無しで、24時間培養し、培養上清を示したサイトカインに関してExcell Array(商標)により調べた。

【図41-1】[00002] 図41A-41C：表4A-4C - DC.comの表面表現型を、CD11b+/Gr-1+骨髄由来サブレッサー細胞集団と比較した。DC.comは表面表現型において既知のCD11b+/Gr-1+骨髄サブレッサー細胞集団のいずれとも識別可能であった。

【図41-2】[00002] 図41A-41C：表4A-4C - DC.comの表面表現型を、CD11b+/Gr-1+骨髄由来サブレッサー細胞集団と比較した。DC.comは表面表現型において既知のCD11b+/Gr-1+骨髄サブレッサー細胞集団のいずれとも識別可能であった。

【図41-3】[00002] 図41A-41C：表4A-4C - DC.comの表面表現型を、CD11b+/Gr-1+骨髄由来サブレッサー細胞集団と比較した。DC.comは表面表現型において既知のCD11b+/Gr-1+骨髄サブレッサー細胞集団のいずれとも識別可能であった。

【図41-4】[00002] 図41A-41C：表4A-4C - DC.comの表面表現型を、CD11b+/Gr-1+骨髄由来サブレッサー細胞集団と比較した。DC.comは表面表現型において既知のCD11b+/Gr-1+骨髄サブレッサー細胞集団のいずれとも識別可能であった。

【図41-5】[00002] 図41A-41C：表4A-4C - DC.comの表面表現型を、CD11b+/Gr-1+骨髄由来サブレッサー細胞集団と比較した。DC.comは表面表現型において既知のCD11b+/Gr-1+骨髄サブレッサー細胞集団のいずれとも識別可能であった。

【図41-6】[00002] 図41A-41C：表4A-4C - DC.comの表面表現型を、CD11b+/Gr-1+骨髄由来サブレッサー細胞集団と比較した。DC.comは表面表現型において既知のCD11b+/Gr-1+骨髄サブレッサー細胞集団のいずれとも識別可能であった。

【図42-1】[00003] 図42A-42D：表5A-5D - DC.comの表面表現型を、報告されているDC前駆体と比較した。DC.comはいずれの他のDC前駆体とも異なっている。

【図42-2】[00003] 図42A-42D：表5A-5D - DC.comの表面表現型を、報告されているDC前駆体と比較した。DC.comはいずれの他のDC前駆体

10

20

30

40

50

とも異なっている。

【図42-3】[00003] 図42A-42D：表5A-5D-DC.comの表面表現型を、報告されているDC前駆体と比較した。DC.comはいずれの他のDC前駆体とも異なっている。

【図42-4】[00003] 図42A-42D：表5A-5D-DC.comの表面表現型を、報告されているDC前駆体と比較した。DC.comはいずれの他のDC前駆体とも異なっている。

【図42-5】[00003] 図42A-42D：表5A-5D-DC.comの表面表現型を、報告されているDC前駆体と比較した。DC.comはいずれの他のDC前駆体とも異なっている。

【図42-6】[00003] 図42A-42D：表5A-5D-DC.comの表面表現型を、報告されているDC前駆体と比較した。DC.comはいずれの他のDC前駆体とも異なっている。

【図42-7】[00003] 図42A-42D：表5A-5D-DC.comの表面表現型を、報告されているDC前駆体と比較した。DC.comはいずれの他のDC前駆体とも異なっている。

【図42-8】[00003] 図42A-42D：表5A-5D-DC.comの表面表現型を、報告されているDC前駆体と比較した。DC.comはいずれの他のDC前駆体とも異なっている。

【発明を実施するための形態】

【0116】

[00004] この開示全体を通して、様々な刊行物、特許および公開された特許明細書を、確認する引用により参照する。これらの刊行物、特許および公開された特許明細書の開示を、この発明が関係する技術の状態をより完全に記述するために、本明細書により本開示の中に援用する。

【0117】

[00005] 樹状細胞(DC)は主要な抗原提示細胞として機能し、それは感染性微生物、ウイルス、癌細胞、自己免疫疾患、移植片拒絶、移植片対宿主拒絶疾患、および他の有害である可能性がある抗原に対する先天性および適応免疫応答の両方の誘導において保護的な役割を果たしている。定常状態におけるDCは、自己抗原および無害な環境抗原に対する免疫寛容の維持において同様に重要な役割を果たしている。しかし、DCの発生に関する経路はまだ比較的是っきりしないままである。

【0118】

[00006] 本明細書で記述するのは、DC.comと名付けたDCへ方向付けされた前駆体集団が以前に認められていなかったDCのサブセットへと分化する新しいDC発生経路である。DC.comはマウスIL-1プロモーターの制御下でDsRed遺伝子を発現するトランスジェニックマウスシステムを用いて発見された。同じ集団は、特徴的な表面表現型、すなわちCD11b+/CD11c-/Ly6G+/MHC I-/MHC II-に基づいて、健康なマウスにおいて、および健康なヒトにおいても発見されている。

【0119】

[00007] DC.com集団をGM-CSFの存在下で培養した場合、それは特徴的な樹状突起の形態、DCのマーカー(CD11c、DEC205、CD86、およびMHC II)ならびに外来のタンパク質およびペプチド抗原をCD4およびCD8 T細胞の両方に提示する強力な能力を示すDCに分化する。

【0120】

[00008] DC.com集団に由来するDCは、一般に顆粒球のマーカーであると考えられているLy6Gの表面発現により、単球から生じた従来型のDCと異なっている。実際、DC.comは、Ly6Gの独特の表面発現によってだけでなく光学および電子顕微鏡レベルの両方における形態学的特徴においても、好中球の直接の前駆体集団である“桿状核球”に似ている。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 1 】

[00009] 本明細書では、好中球前駆体が顆粒球由来DC (gr-DC)と名付けた独特のDCサブセットを生じさせる新規のDC発生経路も記述する。

## 【 0 1 2 2 】

[00010] 我々は、好中球前駆細胞集団(桿状核球として知られる)に似た独特のDCへ方向付けされた集団(DC.comと名付けられた)が以前に同定されたDC亜集団のいずれとも異なるDCサブセット(gr-DCと名付けられた)に分化する新規のDC発生経路を同定した。本明細書において、我々はDC.comおよびgr-DC集団の同定、精製、拡張、および使用のための方法を記述する。

## 【 0 1 2 3 】

[00011] 急速かつ深いIL-1 mRNAの発現がDCの活性化の印であるという観察(Mizumoto et al, 2005b)に基づき、我々は最近、マウスIL-1プロモーターの制御下で黄色蛍光タンパク質(YFP)を発現する安定なDC系XS106(図1)を設計することによりDCバイオセンサークローンを開発した。

## 【 0 1 2 4 】

[00012] 得られたXS106-pIL1-YFPバイオセンサークローンは、LPS、同様にDC刺激シグナルを送達することが既知である他の薬物で刺激するとYFP蛍光シグナルを示す(Mizumoto et al, 2005a)。このシステムの主な制限は長期DC系の使用であり、それは体内の本物のDC集団と完全には等価ではない可能性がある。これを克服するため、我々は同じIL-1プロモーターの制御下でDsRed遺伝子を発現するトランスジェニックマウス系統を構築した。次いで骨髄(BM)細胞を外来のGM-CSFの存在下で5~6日間培養することにより、pIL1-DsRedトランスジェニックマウスからDC培養物を生成した。XS106-pIL1-YFP DCバイオセンサークローンをを用いた我々の観察を裏づけるように、6日目のBM培養物中のCD11c+ DC集団はLPS処理に反応して著しく高いDsRedシグナルを示した(図2)。

## 【 0 1 2 5 】

[00013] 強いDsRedの発現がGM-CSFを補ったBM培養物においてLPS刺激の非存在下でも検出可能になったという我々の発見は、全く予期されていなかった(図3)。時間速度論の実験は、BM培養物中のDsRed+の細胞の急速(24~48時間以内)かつ際立った(>200倍)増加を明らかにした(図4)。

## 【 0 1 2 6 】

[00014] 表面表現型の分析は、DsRed+の細胞の圧倒的大部分(>95%)が、外来の顆粒球-マクロファージコロニー-刺激因子GM-CSFの存在下で、5日間の培養期間を通してCD11b(骨髄細胞のマーカー)を発現することを明らかにした(図5A)。それに対し、CD11c(最も信頼できるDCマーカー)は1日目においてDsRed+の細胞の約50%において検出され、5日目においてDsRed+の集団の中のCD11c+の細胞の割合は90%まで増大した(図5B)。

## 【 0 1 2 7 】

[00015] CD11b+/DsRed+の集団内のCD11cの発現の観察されたタイムコースは、DsRed+/CD11b+/CD11c-の細胞がCD11c+ DCの前駆体である可能性があることを示唆した。直接試験するため、我々は3日目のBM培養物から、DsRedおよびCD11cの発現に基づき、フローサイトメトリーを用いて4種類の異なる細胞集団を精製し、添加したGM-CSFの存在下での培養にそれらを戻した(図6)。DsRed+/CD11c-の画分(DC.comと表示した)は、それに続く培養の3日以内に一樣なCD11cの発現を獲得した。DsRed-/CD11c-の細胞の一部は、24時間以内で早くもDsRedを発現し始めた。DsRed+/CD11c+およびDsRed-/CD11c+のDC集団は両方ともCD11cの発現を維持していたが、DsRedの発現は前者(または後者)の集団において検出不能(または検出可能)になった。これらの観察は、CD11b+/DsRed+/CD11c-の集

10

20

30

40

50

団がDCの直接の前駆体であることを示している。従って、我々はこのDCへ方向付けされた集団を“DC.com”と名付けた。

【0128】

[00016] BM細胞をGM-CSF存在下で培養した場合、CD11b+/DsRed+/CD11c- DC.com細胞の数は最初の24時間で劇的に(40倍)増大する(図7)。それに対し、DsRed-/CD11c+ DCの数は培養の最初の6日間で次第に増大する。

【0129】

[00017] CD11b+/DsRed+/CD11c-/の細胞の出現は、BM培養条件に依存することが分かった(図5および図38-表1)。BM細胞を、一般にDCの生存および増殖を促進することも既知であるFlt3リガンドまたはM-CSFの存在下で培養した場合、ごくわずかな数の細胞がDC.comの表現型(CD11b+/DsRed+/CD11c-)を示した。

10

【0130】

[00018] 我々は次に、65種類の異なるサイトカインをBM培養におけるDsRed+の細胞の出現への作用に関してそれぞれ試験した(図8)。GM-CSFに加え、選ばれたサイトカインはDsRed+の細胞の出現または生成を支持するようであった。同じ65種類のサイトカインをGM-CSFと組み合わせて試験した場合、インターフェロンを含む選ばれたサイトカインがDsRed+の細胞のGM-CSFに依存する発生を阻害することが分かった(図9)。興味深いことに、(図10)において、BM培養においてDsRedの発現を促進するものと同じサイトカイン(IL-3、IL-18およびIL-33)が、CD11c+ DCの発生も支持した。

20

【0131】

[00019] これらのデータは、DC.com集団の発生およびそのそれに続くDCへの分化が共にサイトカインにより制御されていることを実証している。同時に、そのデータは、類似のアッセイ系をDC.com細胞の生成および分化を増進および/または阻害する化合物を同定するのに用いることができることを示している。

【0132】

[00020] DsRedおよびCD11cの発現に基づき、我々はGM-CSFを補ったBM培養物から4種類のCD11b+集団を精製した。そのDsRed+/CD11c-のDC.com集団は、形態および細胞の大きさにおいてCD11c+ DC画分と異なっていた(図11)。電子顕微鏡レベルで、DC.com画分はさらに、分葉状の核および少数の細胞質顆粒の封入により特徴づけられる独特の形態を示した(図12)。重要なことだが、DC.com集団は表面表現型、細胞の大きさ、粒状度、および形態に関して極めて均質であり、これは我々の精製計画が効率的であることを示している。

30

【0133】

[00021] 我々は、上記の4種類の画分の有糸分裂可能性を、BrdUの取り込みおよび7-AAD染色により調べた(図13)。DC.com集団はBM培養におけるCD11b+/DsRed-/CD11c-集団と比べて比較的限られた有糸分裂可能性を示した。

40

【0134】

[00022] DC.com集団は、表面表現型に基づいてCD11c+ DCと識別可能である(図14)。DC上で比較的高レベルで発現しているCD11c、CD48、ならびにMHCクラスIおよびクラスIIの分子は、DC.com集団において検出不能である。逆に、DC.com集団のみが一様にGr-1およびLy6Gを高レベルで発現する。抗Gr-1抗体は2種類の異なる抗原Ly6GおよびLy6Cを認識することも特筆すべきである。選ばれた単球およびDCサブセットがLy6Cを発現することが示されているが、単球またはDCによるLy6Gの発現の証拠を提供している報告は存在しない。従って、Ly6Gは一般に顆粒球の高度に特異的なマーカーであると考えられている。

【0135】

50

【00023】 DC . com 集団は、OVA タンパク質およびペプチドを（事実上全ての CD 8 および CD 4 T 細胞が OVA ペプチドを認識する）OT - I および OT - II T 細胞受容体トランスジェニックマウスから単離された CD 8 および CD 4 T 細胞に提示する能力により測定した際に、検出可能な抗原提示能力を示さなかった。それとは明らかに異なって、Ds Red + / CD 11c + DC および Ds Red - / CD 11c + DC は、OVA タンパク質およびペプチドを CD 8 細胞（図 15 A）および CD 4 T 細胞（図 15 B）の両方に提示する強い能力を示した。

【0136】

【00024】 DC . com 細胞による CD 11b および Gr - 1 の表面発現は、“骨髄由来サブレッサー細胞”として知られる最近同定された白血球集団へのそれらの機能的類似を示唆している可能性がある（Zhu et al, 2007）（Marhaba et al, 2007）（Makarenkova et al, 2006）（Gallina et al, 2006）（Bunt et al, 2006）（Sinha et al, 2005）。重要なことだが、BM 培養物からの CD 11b + / Ds Red - / CD 11c - 画分は OT - I CD 8 T 細胞の抗原特異的増殖を阻害する能力を示したが、CD 11b + / Ds Red + / CD 11c - 画分は示さなかった。従って、新規に同定された DC . com 集団は骨髄由来サブレッサー細胞とは機能的に異なっている（図 16）。

10

【0137】

【00025】 GeneChip 分析は、遺伝子発現プロファイルに関する 4 種類の画分の間の際立った多様性を明らかにした。実際、リアルタイム PCR 分析は、DC . com が Toll 様受容体およびケモカイン受容体発現プロファイルにおいて他の集団と異なるというこれらの発見の一部を確かめた（図 40 - 表 2）。

20

【0138】

【00026】 CD 11c + DC は、LPS または CpG オリゴヌクレオチドによる刺激の後に、大量のサイトカイン、例えば IL - 6 および TNF を作り出した。それに対し、DC . com 画分はごく少量のこれらの炎症誘発性サイトカインを放出した。

【0139】

【00027】 DC . com 画分の最も際立った特徴は、標準的な FITC - デキストラン 取り込みアッセイにより調べられるその強力な外来分子を内在化する能力である（図 17）。

30

【0140】

【00028】 BM 培養物からの DC . com 画分の単離に加え、我々は類似の集団をリンパ組織において同定することができることを決定した。pIL1 - Ds Red トランスジェニックマウスにおいて、Ds Red の発現が BM、末梢血、脾臓、およびリンパ節を含む様々なリンパ組織において検出可能であった（図 18）。さらに、それらの組織常在性の Ds Red + の細胞は事実上、細胞の大きさおよび表面の表現型に関して、元は BM 培養物中で同定された DC . com 集団と識別不能であった（図 19 ~ 22）。

【0141】

【00029】 リンパ組織中の DC . com 細胞の存在を確かめたので、我々は次に上皮組織におけるそれらの存在を調べた。pIL1 - Ds Red トランスジェニックマウスの耳の皮膚において、定常状態では Ds Red の細胞は見つからなかった（図 23）。しかし、我々は感作性化学物質（オキサゾンおよび DNFB）または皮膚に刺激を与える化学物質（乳酸）の局所的適用の後の Ds Red + の細胞の急速な出現を観察した。機械的処理（テープストリッピング）によって引き起こされる皮膚の炎症も、皮膚における Ds Red + の細胞の出現を誘導した。従って、我々は Ds Red + の細胞は上皮組織において炎症条件下でのみ出現すると結論付ける。

40

【0142】

【00030】 皮膚において、Ds Red + の細胞は主に真皮区画において、毛嚢の周辺で優先的に見つかった（図 24）。皮膚をモデル組織として用いて、我々は Ds Red の蛍

50

光シグナルがトランスジェニックマウスにおける I L - 1 の産生と確かに相関していることも確かめた ( 図 2 5 ) 。

【 0 1 4 3 】

[00031] これらの D s R e d + の皮膚細胞の F A C S 分析は、それらの我々が B M 培養系において同定した D C . c o m 集団との表現型の類似を明らかにした ( 図 2 6 および 図 2 7 ) 。

【 0 1 4 4 】

[00032] 我々は、野生型のマウスで D s R e d の蛍光シグナルの非存在下においても類似の集団を同定することができることを決定した。我々は、D C . c o m 集団は 2 種類の表面マーカー C D 4 8 および G r - 1 ( または L y 6 G ) のみを用いることにより同定 および精製できることを見出した。野生型のマウスからの B M 培養物中の C D 4 8 陰性 / G r - 1 高集団は、元は p I L 1 - D s R e d マウス系を用いて同定された D C . c o m と同じ表現型を示した ( 図 2 8 ) 。

10

【 0 1 4 5 】

[00033] さらに、野生型 B M 培養物から精製した C D 4 8 陰性 / G r - 1 高集団は、D C . c o m 細胞と同じ形態学的特徴を示した ( 図 2 9 ) 。この集団の H & E 染色パターンは、好中球の直接の前駆体である “ 桿状核球 ” に関して報告された H & E 染色パターンとほとんど識別不能であった。D C . c o m による顆粒球マーカー ( L y 6 G ) の表面発現はさらに D C . c o m 集団が桿状核球または未成熟な顆粒球と密接に似ているという考えを支持する。

20

【 0 1 4 6 】

[00034] 同じ C D 4 8 陰性 / G r - 1 高集団は、C D 1 1 c 、 M H C クラス I I 、 C D 8 6 、 および D E C 2 0 5 を発現する D C にも分化した ( 図 3 0 ) 。重要なことだが、( D C . c o m が発現する ) L y 6 G は D C . c o m に由来するそれらの D C の表面上に残っていた。さらに、その D C . c o m を G M - C S F と共に培養した場合、細胞の大部分が特徴的な樹状突起の形態を発現し始めた ( 図 3 1 ) 。一方で、少数の細胞が典型的な顆粒球に似た細胞に分化した。これらのデータは、D C . c o m が以前には認められていなかった D C のサブセットを生じさせることを示しており、我々はそれを顆粒球由来 D C または g r - D C と名付けた。

【 0 1 4 7 】

[00035] 単球に由来する従来型の D C は検出可能な L y 6 G の発現を示さなかった ( 図 3 2 ) 。それとは明らかに異なって、D C . c o m に由来する g r - D C は一様に L y 6 G を高レベルで発現していた。従って、L y 6 G は g r - D C サブセットを他の D C サブセットと識別する独特のマーカーとして用いることができる。

30

【 0 1 4 8 】

[00036] D C . c o m から生成した g r - D C 調製物は、外来の抗原を C D 8 および C D 4 T 細胞の両方に提示する強い能力を示した ( 図 3 3 ) 。

【 0 1 4 9 】

[00037] 同じマーカー ( すなわち C D 1 1 b 、 C D 4 8 、 および G r - 1 ) を用いて、我々は野生型マウスの脾臓において D C . c o m 集団を同定した ( 図 3 4 ) 。

40

【 0 1 5 0 】

[00038] さらに、マーカーの別のセット ( すなわち C D 1 1 c 、 M H C クラス I I 、 および L y 6 G ) を用いて、我々は野生型マウスの脾臓において g r - D C 集団を同定したが、リンパ節では同定できなかった ( 図 3 5 および 図 3 6 ) 。

【 0 1 5 1 】

[00039] 我々は、ヒト末梢血試料においても、細胞の大きさおよび C D 4 8 - / M H C クラス I - / C D 1 a - / C D 1 d - / C D 1 c - の表面表現型に基づいて D C . c o m 集団を同定した ( 図 3 7 ) 。マウスの L y 6 G に関するヒトの均等物は同定されていないが、上記のマーカーはヒトの D C . c o m 集団の同定および精製を可能にするであろうことを述べておくべきである。

50

## 【 0 1 5 2 】

[00040] DC.com 集団は、文献で報告されているいずれの骨髄由来サブレッサー細胞集団 (図 4 1 A - C - 表 4 A - C) およびいずれの DC 前駆体集団 (図 4 2 A - D - 表 5 A - D) とともに異なっている。

## 【 0 1 5 3 】

[00041] DC.com 集団は、桿状核球として既知である顆粒球の直接の前駆細胞と最も密接に似ている。

## 【 0 1 5 4 】

[00042] DC.com は (gr-DC と名付けた) 独特の DC サブセットに分化し、それは Ly 6 G の高レベルでの独特の発現により他の DC サブセットと異なっている。

10

## 【 0 1 5 5 】

[00043] 大量の試験試料を、それらの DC.com 細胞の発生を促進または阻害する可能性に関してスクリーニングするための方法も、本発明の意図された範囲内にある。

## 【 0 1 5 6 】

[00044] 加えて、これらの方法は DC.com の gr-DC への分化を促進または阻害する分子を同定するのに用いることができる。

## 【 0 1 5 7 】

[00045] 本発明は下記の実施例においてさらに説明され、そこでは別途記載しない限り全ての部 (parts) および百分率は重量によるものであり、度はセ氏である。これらの実施例は、本発明の好ましい態様を示しているが、説明のためにのみ与えられていることは理解されるべきである。上記の議論およびこれらの実施例から、当業者はこの発明の本質的な特徴を確かめることができ、その精神および範囲から逸脱すること無く、本発明の様々な変更および修正を、それを様々な用途および条件に適応させるためになすことができる。この明細書において参照された特許および非特許文献を含む全ての刊行物を、特別に援用する。

20

## 【 実施例 】

## 【 0 1 5 8 】

[00046] 実施例 I

[00047] 材料および方法

[00048] 動物

30

[00049] C 5 7 B L / 6、OT-I、および OT-II マウスは、Taconic Farms, Inc. (ニューヨーク州ジャーマンタウン) から得た。この試験における全ての動物は、トレド大学 (オハイオ州トレド) において動物研究センターの施設の中で特定病原体除去条件で繁殖され、維持された。全ての動物実験は治験審査委員会により認可され、国立衛生研究所 (メリーランド州ベテスダ) のガイドラインに従って実施された。

## 【 0 1 5 9 】

[00050] IL-1 - RFP マウスの生成

[00051] 非コードイントロン / エキソンを含む 1.2 k B のウサギ グロブリン遺伝子を、pSG-1 発現ベクターを BamHI および XhoI で消化することにより得た (参考文献 1、2)。その断片を pBK-CMV (Stratagene、カリフォルニア州ラーホヤ) の BamHI / XhoI 部位にサブクロニングして、プラスミド pBK-CMV-SG を生成した。赤色蛍光タンパク質 (RFP) 発現ベクターを生成するため、pDsRed-Express-DR プラスミド (Clontech、カリフォルニア州パロアルト) からプライマーセット 5' - GGG AATTC CGGTCGCCACCATGGCCCTC - 3' [配列番号: 1] および 5' - GGAGATCTACACATTGATCCTAGCAGAAAG - 3' [配列番号: 2] を用いて PCR 断片を増幅し、続いてそれを TAC クロニングベクター pCR4-TOPO (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) にライゲーションし、次いで pBK-CMV-SG の EcoRI および BglII 部位の間にサブクロニングした。

40

50

## 【0160】

[00052] 得られたベクター pBK - CMV - SG - Red は、グロブリンイントロン / エキソン - RFP 融合遺伝子の上流に CMV 最初期 (immediate early) プロモーターを有していた。CMV プロモーター領域を *VspI* および *NheI* による消化により除去した後、*Klenow* フラグメントを用いた両方の末端の平滑化およびセルフライゲーションを行った。次いでマウス IL - 1 プロモーターの 4, 138 bp の *BamHI* 断片 (参考文献 3) を *BamHI* 部位に挿入してプラスミド pBK - SG - IL - 1 - Red を生成した。プラスミド pBK - SG - IL - 1 - Red を *SalI* および *NotI* で消化してベクターの配列を排除し、導入遺伝子断片を *Elutip-D* (Schleicher & Schuell、ニューハンプシャー州キーン) により精製した。DNA を C57Bl / 6 マウスの受精卵の中にマイクロインジェクションした。34 匹のファウンダーが生まれ、プライマー 5' - TGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATC - S' [配列番号: 3] および 5' - CACGTACACCTTGGAGCCGTA CTG - 3' [配列番号: 4] を用いた PCR 分析により、それらの内の 10 匹が導入遺伝子を有することが確かめられた。

10

## 【0161】

[00053] 細胞の単離およびインビトロでの培養

[00054] 腰椎穿刺によりヘパリン処理されたチューブの中に血液を集めた。Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma - Aldrich、ミズーリ州セントルイス) を用いて赤血球 (RBC) を排除した後、フローサイトメトリー分析のために mAb を用いて染色した。器官の機械的な破碎 (disrupting) および RBC の溶解により脾臓およびリンパ節に関する単細胞懸濁液を調製した。完全 RPMI 1640 (cRPMI); 熱非働化 10% FBS、2 mM L - グルタミン、10 mM 非必須アミノ酸、1 x ペニシリン / ストレプトマイシン、10 mM ビルビン酸ナトリウム、25 mM HEPES および 50 μM 2 - ME (Sigma - Aldrich) を補った RPMI 1640 (Cellgro、バージニア州ハートン) を用いて大腿骨をフラッシュする (flushing) ことにより骨髓 (BM) 細胞を単離した。RBC を激減させた後、細胞 (2 x 10<sup>6</sup> 細胞 / ml) を 6 ウェル細胞培養プレート (Corning、マサチューセッツ州ローウェル) において、10 ng / ml GM - CSF、10 ng / ml M - CSF (共に R & D Systems、ミネソタ州ミネアポリスからのもの)、または 200 ng / ml FLT - 3 L (Peprotech EC、ロンドン) を補った cRPMI 中で培養した。非付着細胞の移動により、および付着細胞の回収のための 0.3% トリプシン / 0.025% EDTA (Cellgro) を用いた処理により、細胞を異なる時点で培養物から集めた。次いで細胞を非付着細胞画分と共にプールした。

20

30

## 【0162】

[00055] フローサイトメトリー

[00056] mAb と共に保温する前に、細胞を 5 μg / ml CD16 / CD32 (2.4G2) 抗 FcR mAb、1% 正常ラット血清、1% 正常ハムスター血清を補った FACS 染色緩衝液 (2% FBS および 10 mM HEPES を含むハンクス液) を用いて 4 度で 15 分間ブロッキングした。特筆しない限り、全ての mAb は BD Biosciences (カリフォルニア州パロアルト) から購入した。アイソタイプ対照に加え、次の mAb を用いた: CD1d (1B1)、CD4 (H129.19)、CD8 (53 - 6.7)、CD11b (M1 / 70)、CD11c (HL3)、CD19 (1D3)、CD24 (M1 / 69)、CD25 (7D4)、CD40 (3 / 23)、CD45RA (14.8)、CD48 (HM48 - 1)、CD49b (DX5)、CD80 (16 - 10A1)、CD172a (P84)、CD209 (5H10 / CI RE)、CD275 (HK5.3)、H - 2K<sup>b</sup> (AF6 - 88.5)、Ia<sup>b</sup> (AF6 - 120.1)、B220 (RA3 - 6B2)、Gr - 1 (RB6 - 8C5)、Ly6 - C (AL - 21)、Ly6 - G (1A8)、Sca - 1 (D7)、および Ly86 (MD14)、F4 / 80 (B

40

50

M8)、CD34 (RAM34)、CD135 (A2F10)、およびPDCA-1 (BST2) は eBioscience (カリフォルニア州サンディエゴ) から得た。CD205 (NLDC-145) および CD49a (HMalphal) はそれぞれ Miltenybiotec (カリフォルニア州オーバーン) および ABD Serotec (英国、オックスフォード) から購入した。死んだ細胞を分析から除外するため、最後の洗浄でヨウ化プロピジウム (Invitrogen、カリフォルニア州サンディエゴ) または DAPI (Pierce、イリノイ州ロックフォード) を添加し、死んだ細胞を分析から除外した。染色された細胞を、FACSCalibur または FACS Aria (共に BD Biosciences) を用いて獲得し、事象を CellQuest、FACSDiva (共に BD Biosciences)、または Weasel software (ウォルター・アンド・イライザ・ホール医学研究所 (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research)、オーストラリアメルボルン) を用いて分析した。

10

### 【0163】

#### [00057] 細胞の単離および培養

[00058] 細胞を、pIL1 - DsRed トランスジェニックマウスまたは野生型のマウスから増殖させた BM 培養物から、FACS Aria を用いるフローサイトメトリーにより選別した。細胞を FACS 染色緩衝液中で抗 CD11b - APC - Cy7 および抗 CD11c - APC mAb を用いて染色し、CD11bCD11cDsRed、CD11bCD11cDsRed、CD11bCD11cDsRed、および CD11bCD11cDsRed 画分に選別した。あるいは、DC.com 集団を CD11b+ / CD48- / Ly6G+ の表面表現型に基づいて FACS 精製した。

20

### 【0164】

[00059] 選別した細胞画分を、cRPMI を用いて 10 ng/ml GM-CSF の存在下で再度培養した後、フローサイトメトリー分析を行った。一部の実験において、DC.com 集団を CD45.2<sup>+</sup> である C57BL/6 マウスの BM 培養物から精製し、次いで CD45.1<sup>+</sup> である B6/SJL マウスからの新しく単離された BM 細胞と共培養した。DC.com に由来する細胞は、抗 CD45.2 および抗 CD45.1 抗体を用いた分染によりフィーダーから識別した。この共培養系において、DC.com 集団は生存可能であり、CD11c<sup>+</sup> / MHCII<sup>+</sup> DC に分化した。

30

### 【0165】

#### [00060] 表現型および機能の分析

[00061] 形態学的研究のため、選別された細胞 ( $2 \times 10^5$  細胞/スライド) からのサイトスプレパラートを、ギームザ溶液 (Sigma-Aldrich) で染色した。選別された細胞に関する増殖活性を、BrdU Flow Kit (BD Biosciences) を用いて、製造者の説示に従って調べた。すなわち、細胞を BrdU と共に 37 度で 18 時間培養した後、固定および透過処理 (permeabilization) を行った。細胞をフローサイトメトリー分析のために FITC コンジュゲート抗 BrdU 抗体を用いて 7-AAD と組み合わせて染色した。抗体の取り込みの能力を試験するため、選別した細胞を、5 マイクロ g/ml の FITC コンジュゲートデキストラン (分子量 70,000 Da; Sigma) を用いて 4 または 37 で 10 分間保温し、広範囲にわたって洗浄し、次いで FACSCaliber を用いて細胞内の FITC シグナルに関して調べた。

40

### 【0166】

[00062] BM 培養物から選別した細胞をオボアルブミン (OVA)、OVA<sub>323-339</sub>、または OVA<sub>323-339</sub> ペプチドを用いて示した濃度で 1 時間パルスした後、T 細胞と共培養した。ナイーブ CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞を、それぞれ OVA 特異的 T 細胞受容体 (TCR) - トランスジェニック OT-I または OT-III マウスの脾臓から、CD4<sup>+</sup> または CD8<sup>+</sup> T 細胞のためのネガティブ単離キット (Dyna1、ニューヨーク州レイクサクセス) を用いる免疫磁気細胞分離法により富ませた (enri

50

ched)。富ませたトランスジェニックTCRを発現するT細胞の百分率を、抗CD4-A PCまたは抗CD8-A PCおよび抗V<sub>2</sub>-FITC mAb (BD Pharmingen)を用いるフローサイトメトリーにより決定した(>90%)。

【0167】

[00063] 増殖アッセイに関して、 $2 \times 10^4$ 細胞/ウェルのナイーブT細胞を、96-U-ウェル細胞培養プレート(Corning)の中にまき、cRPMI(200 $\mu$ l/ウェル)中で異なる数のタンパク質またはペプチドでパルスしたBM細胞集団と共に培養した。培養物を37 $^{\circ}$ Cで72時間維持した。細胞を1 $\mu$ Ciの[<sup>3</sup>H]-チミジン(ICN Biomedicals、カリフォルニア州コストメサ)で16時間パルスすることにより増殖を分析した。培養の終了の時点で、細胞をグラスファイバーフィルター(Packard、コネチカット州メリデン)上に集め、放射活性をTopCount NTX(PerkinElmer、コネチカット州シェルトン)において計数した。

10

【0168】

[00064] 統計分析

[00065] データは平均 $\pm$ S.D.として表す。測定された変数の実験および対照グループの間の差を、分散分析法(ANOVA)およびダネット検定を用いて行った用量応答の分析以外は、両側スチューデントt検定を用いて評価した。3個より多くのグループの間での比較は、スチューデント-ニューマン-クルズ(SNK)多重比較検定により評価した。再現性を評価するため、それぞれの実験を少なくとも1回繰り返した。

20

【0169】

[00066] 皮膚におけるDsRedのシグナルの可視化

[00067] 病的状態を誘導するため、pIL1-DsRedトランスジェニックマウスに1.25%オキサゾロン(Sigma-Aldrich)またはビヒクル(アセトン/オリーブ油)のみの耳の上での局所的適用を受けさせた。一部の実験において、テープストリッピングにより耳の上で病的状態を誘導した。1日目において、耳全体の皮膚の試料を集めてZeiss LSM 510 META 2P共焦点顕微鏡を用いてDsRedの発現を調べた。真皮表皮接合部において2種類の区画を分離した後、酵素処理により上皮細胞懸濁液および真皮細胞懸濁液を調製した。

【0170】

[00068] 用途の例およびそれらの定義

30

[00069] 本発明の実施は、別途示さない限り、当技術(art)の技術(skill)内の薬理学、化学、生化学、組み換えDNAの技法および免疫学の一般的に用いられる方法を用いるであろう。その技法は文献において完全に説明されている。例えばHandbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編集、Blackwell Scientific Publications); A. L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc.、最新の追加(current addition)); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、1989); Methods In Enzymology (S. Colowick およびN. Kaplan編集、Academic Press, Inc.)を参照。

【0171】

[00070] そういうものとして、本明細書における定義はさらなる説明のために提供されるのであって、制限するものとして解釈されるべきではない。

40

【0172】

[00071] 冠詞“a”および“an”は本明細書においてその冠詞の文法上の対象の1個を、または1個より多くを(すなわち少なくとも1個を)指すために用いられる。例として、“要素(an element)”は1個の要素または1個より多くの要素を意味する。

【0173】

[00072] “マーカー”および“バイオマーカー”は、組織または細胞におけるその発現の、正常または健康な組織または細胞におけるその発現レベルから変化したレベルが、障害および/または疾患の状態と関係している分子および/またはその機能的変種である

50

。

## 【 0 1 7 4 】

[00073] マーカーの発現の“正常な”レベルは、障害および/または疾患の状態ですんでいないヒトの対象または患者の細胞中のそのマーカーの発現のレベルである。

## 【 0 1 7 5 】

[00074] マーカーの“過剰発現”または“発現のかなり高いレベル”は、発現を評価するために用いられるアッセイの標準誤差よりも大きい試験試料中の発現レベルを指し、特定の態様において、対照試料（例えば、そのマーカーが関係する障害および/または疾患の状態を有しない健康な対象からの試料）中のそのマーカーの発現レベル、および特定の態様においていくつかの対照試料中のそのマーカーの平均発現レベルの少なくとも2倍、および他の態様において、3、4、5または10倍を指す。

10

## 【 0 1 7 6 】

[00075] マーカーの“発現のかなり低いレベル”は、対照試料（例えば、そのマーカーが関係する障害および/または疾患の状態を有しない健康な対象からの試料）中のそのマーカーの発現レベル、および特定の態様においていくつかの対照試料中のそのマーカーの平均発現レベルよりも少なくとも2倍、および特定の態様において3、4、5または10倍低い試験試料中の発現レベルを指す。

## 【 0 1 7 7 】

[00076] 用途の例

[00077] 本明細書において記述されている組成物、キットおよび方法は、とりわけ次の限定的で無い用途を有する：

20

対象が障害および/または疾患の状態ですんでいるかどうかを評価する；

対象における障害および/または疾患の状態の病期を評価する；

対象における障害および/または疾患の状態のグレードを評価する；

対象における障害および/または疾患の状態の性質を評価する；

対象において障害および/または疾患の状態が発現する可能性を評価する；

対象における障害および/または疾患の状態と関係する細胞の組織学的なタイプを評価する；

対象における障害および/または疾患の状態を処置するのに有用である抗体、抗体断片または抗体の誘導体を作製する；

30

対象の細胞における障害および/または疾患の状態の存在を評価する；

対象における障害および/または疾患の状態を阻害するための1種類以上の試験化合物の有効性を評価する；

対象における障害および/または疾患の状態を阻害するための療法の有効性を評価する；

；

対象における障害および/または疾患の状態の進行を監視する；

対象における障害および/または疾患の状態を阻害するための組成物または療法を選択する；

障害および/または疾患の状態ですんでいる対象を処置する；

対象における障害および/または疾患の状態を阻害する；

40

試験化合物の有害な可能性を評価する；および

それに関する危険にさらされている対象における障害および/または疾患の状態の開始を予防する。

## 【 0 1 7 8 】

[00078] スクリーニング法

[00079] スクリーニング法も、本発明の意図された範囲内にある。ある限定的で無い例において、障害および/または疾患のための療法薬に関するスクリーニングの方法は、インピボまたはインピトロのどちらかで実施することができる。このスクリーニング法は、例えば次のことにより実行することができる：

候補化合物を動物の対象に投与する；

50

その動物の対象からの生物学的試料中の少なくとも1種類のマーカーの発現レベルを測定する；または

マーカーの発現レベルを、候補化合物がそれと接触していない対照中のマーカーの発現レベルと比較して増大または減少させる化合物を選択する。

【0179】

[00080] さらに別の観点において、動物の対象を候補化合物と接触させ、その動物の対象に由来する生物学的試料中のそのマーカーの発現レベルに対するその化合物の作用を監視することにより、医薬のための候補化合物の、少なくとも1種類のマーカーの発現レベルに対する有効性を評価するための方法を、本明細書において提供する。その動物の対象に由来する生物学的試料中のそのマーカーの発現レベルにおける変化は、上記の試験法において用いられるものと同じ技法を用いて監視することができる。さらに、評価に基づいて、医薬のための候補化合物をスクリーニングにより選択することができる。

10

【0180】

[00081] 対象における障害および/または疾患の状態を処置する、または予防するために有用である療法薬のスクリーニングを可能にするために、動物モデルを作り出すことができる。従って、その方法は対象における障害および/または疾患の状態を処置する、または予防するための療法薬を同定するために有用である。その方法は、候補薬剤を本明細書において記述される方法により作られた動物モデルに投与すること、およびその動物モデルにおける、その候補薬剤が投与されていない対照の動物モデルと比較した、少なくとも1種類の応答を評価することを含む。もし症状において少なくとも1種類の応答が低減する、または開始において遅れるならば、その候補薬剤はその疾患を処置または予防するための薬剤である。

20

【0181】

[00082] 候補薬剤は、当技術で既に知られている薬理的薬物であってよく、または何らかの薬理活性を有することが以前に知られていない薬剤であってよい。その薬剤は、天然に生じるもの、または実験室で設計されたものであってよい。それらは微生物、動物もしくは植物から単離されてよく、または組み替えで製造されてよく、またはいずれかの適切な化学的方法により合成されてよい。それらは小さい分子、核酸、タンパク質、ペプチドまたはペプチド模倣薬であってよい。特定の態様において、候補薬剤は50ダルトンより大きい、および約2,500ダルトンより小さい分子量を有する小さい有機化合物である。候補薬剤はタンパク質との構造的な相互作用に必要な官能基を含む。候補薬剤は次のものを含む生体分子の中にも見つかるが、それらに限定されない：ペプチド類、糖類、脂肪酸類、ステロイド類、プリン類、ピリミジン類、それらの誘導体、構造的類似体または組み合わせ。

30

【0182】

[00083] 候補薬剤は、合成または天然化合物のライブラリーを含む多種多様な源から得られる。例えば、多種多様な有機化合物および生体分子のランダムおよび方向づけられた合成のために利用できる、ランダム化されたオリゴヌクレオチドおよびオリゴペプチドの発現を含む非常に多くの手段が存在する。あるいは、細菌、菌類、植物および動物の抽出物の形の天然化合物のライブラリーが利用できる、または容易に製造される。加えて、天然の、または合成により製造されたライブラリーおよび化合物は、一般に用いられる化学的、物理的および生化学的手段により容易に修飾される。特定の態様において、候補薬剤は、コンビナトリアルライブラリー法 (combinatorial library method) の技術における非常に多くのアプローチのいずれかを用いて得ることができ、それは限定的で無い例：生物学的ライブラリー；空間的に位置を特定できる (spatially addressable) 平行固相または液相ライブラリー；デコンボリューション (deconvolution) を必要とする合成ライブラリー法；“1ビーズ1化合物 (one-bead one-compound)” ライブラリー法；および親和性クロマトグラフィー選別を用いる合成ライブラリー法によるものを含む。

40

【0183】

50

[00084] 特定のさらなる態様において、特定の薬理的薬剤は、方向づけられたまたはランダムな化学修飾、例えばアシル化、アルキル化、エステル化、アミド化等を受けて構造的類似体を生成してよい。

【0184】

[00085] 対象における障害および/または疾患の状態を処置するための療法薬を同定するためのものと同じ方法を、インビトロ試験から生成されたリード化合物/薬剤を実証するためにも用いることもできる。

【0185】

[00086] 候補薬剤は、対象の応答経路において1種類以上の障害および/または疾患の状態を上方または下方制御する薬剤であってよい。特定の態様において、候補薬剤はその経路に影響を与える拮抗薬であってよい。

10

【0186】

[00087] 障害および/または疾患の状態を処置するための方法

[00088] 障害および/または疾患の状態の応答を処置する、阻害する、緩和する、または逆行させるための方法も、本発明の意図された範囲内である。ある限定的で無い例において、シグナル伝達カスケードを妨げる薬剤が、それを必要とする個人、例えば、それに限定するわけではないが、その合併症がまだ明らかでは無い対象および既に少なくとも1種類のその応答を有する対象に投与される。

【0187】

[00089] 前者の例において、その処置はその応答の発生を予防する、および/またはそれらが起こる程度を低減するのに有用である。後者の例において、その処置はその応答が起こる程度を低減する、それらのさらなる発現を予防する、またはその応答を逆行させるのに有用である。

20

【0188】

[00090] 特定の態様において、応答カスケードを妨げる薬剤はその応答に特異的な抗体であってよい。

【0189】

[00091] マーカー ( M a r k e r ( s ) ) の発現

[00092] マーカーの発現は多くの方法で阻害することができ、それには限定的で無い例として、マーカー ( m a r k e r ( s ) ) の転写、翻訳、または両方を阻害するために細胞に与えることができるアンチセンスオリゴヌクレオチドが含まれる。あるいは、そのタンパク質の機能または活性を阻害するであろう細胞内抗体を生成するために、マーカータンパク質に特異的に結合する抗体、抗体の誘導体、または抗体断片をコードしており、適切なプロモーター/レギュレーター領域と操作可能な形で ( o p e r a b l y ) 連結されたポリヌクレオチドを、細胞に与えることができる。マーカーの発現および/または機能は、細胞をマーカータンパク質に特異的に結合する抗体、抗体の誘導体、または抗体断片を用いて処置することによっても阻害することができる。本明細書で記述されている方法を用いることで、特にそれらが細胞膜を横断することが可能であるのに十分に小さい分子を含む様々な分子を、マーカーの発現を阻害する、またはマーカータンパク質の機能を阻害する分子を同定するためにスクリーニングすることができる。そうして同定された化合物を、対象の障害および/または疾患の状態を阻害するために対象に与えることができる。

30

40

【0190】

[00093] あらゆるマーカーまたはマーカーの組み合わせ、さらにそのマーカーと組み合わせたあらゆる特定のマーカーを、本明細書で記述されている組成物、キットおよび方法において用いてよい。一般に、標的細胞中のそのマーカーの発現のレベルと正常な細胞中の同じマーカーの発現のレベルの間の差が可能な限り大きいマーカーを用いるのが望ましい。この差はマーカーの発現を評価するための方法の検出の限界と同じくらい小さいことが可能であるが、その差は少なくとも評価方法の標準誤差よりも大きく、特定の態様において、正常な組織/細胞中の同じマーカーの発現のレベルの少なくとも2、3、4、5

50

、6、7、8、9、10、15、20、100、500、1000倍またはそれより大きい差があるのが望ましい。

【0191】

[00094] その組成物、キット、および方法は1種類以上のマーカーの発現レベルの差の検出に頼っているため、マーカーの発現のレベルは、正常な細胞および標的細胞の少なくとも一方において、発現を評価するために用いられる方法の最小検出限界よりもかなり大きいのが望ましい。

【0192】

[00095] そのマーカーの内の1種類以上を用いる追加の対象試料の型にはまったスクリーニングにより、そのマーカーの内のいくつかは、対象における特定の障害および/または疾患の状態を含め、様々なタイプの細胞において過剰発現していることが実感されるであろうことが理解される。

10

【0193】

[00096] 加えて、より大きい数の対象試料がそのマーカーの発現に関して評価され、その試料を得た個々の対象の結果が関連している場合、マーカーの内のいくつかの変化した発現は対象における障害および/または疾患の状態と強く関連しており、他のマーカーの変化した発現は他の疾患と強く関連していることも確かめられるであろう。従って、その組成物、キット、および方法は、対象における障害および/または疾患の状態の病期、グレード、組織学的なタイプ、および性質の内の1種類以上を特徴づけるのに有用である。

20

【0194】

[00097] その組成物、キット、および方法が対象における障害および/または疾患の状態の病期、グレード、組織学的なタイプ、および性質の内の1種類以上を特徴づけるために用いられる場合、そのマーカーまたはマーカーの1団 (panel) は、対応する病期、グレード、組織学的なタイプ、および性質の障害および/または疾患の状態で苦しむ少なくとも約20%、および特定の態様において少なくとも約40%、60%、または80%、および実質的に全ての対象において、陽性の結果が得られるように選択されるのが望ましい。本発明のマーカーまたはマーカーの1団は、(限定的で無い例において、80%より大きいアッセイの特異性と合わせて) 母集団に関して約10%より大きい陽性的中率が得られるように選択することができる。

30

【0195】

[00098] その組成物、キット、および方法において複数のマーカーが用いられる場合、対象試料中のそれぞれのマーカーの発現のレベルを、単一の反応混合物中で(すなわち、それぞれのマーカーに関して異なる蛍光プローブのような試薬を用いる)、またはそのマーカーの内の1種類以上に対応する別個の反応混合物中でどちらかで、障害の無いおよび/または疾患の無い同じタイプの試料中のその複数のマーカーのそれぞれの正常な発現のレベルと比較することができる。

【0196】

[00099] その組成物、キット、および方法の感度を最大化するため(すなわち、対象試料中のシステム起源(system origin)の細胞に起因すると考えられる妨害により)、それにおいて用いられるマーカーは、限られた組織分布を有する、例えば普通は非システム組織(non-system tissue)において発現していないマーカーであるのが望ましい。

40

【0197】

[00100] その組成物、キット、および方法は、対象において障害および/または疾患の状態を発現する高められた危険性を有する対象および彼らの医学的アドバイザーに対して特別の有用性を有するであろうことが認められる。障害および/または疾患を発現する高められた危険性を有すると認められる対象には、例えばその障害または疾患の家族歴を有する対象が含まれる。

【0198】

50

[000101] 正常なヒトのシステム組織におけるマーカーの発現のレベルは、様々な方法により評価することができる。1 態様において、この正常な発現のレベルは、正常に見えるシステム細胞の一部におけるそのマーカーの発現のレベルを評価することにより、およびこの正常な発現のレベルを異常であると疑われるシステム細胞の一部における発現のレベルと比較することにより評価される。交互に、および特に本明細書で記述される方法の型にはまった実行の結果としてさらなる情報が入手できるようになると、マーカーの正常な発現に関する集団平均値を用いることができる。他の態様において、マーカーの発現の“正常な”レベルは、苦しんでいない対象から得られた対象試料中の、対象における障害および/または疾患の状態の疑われる開始の前に対象から得られた対象試料からの、保管所に保管されている ( a r c h i v e d ) 対象試料、および同様のものからのマーカーの発現を評価することにより決定してよい。

10

【 0 1 9 9 】

[000102] 本明細書において、試料（例えば、保管所に保管されている組織試料または対象から得られた試料）中の障害および/または疾患の状態の細胞の存在を評価するための組成物、キット、および方法も提供する。これらの組成物、キット、および方法は、必要であればその組成物、キット、および方法が対象試料以外の試料を用いる使用に適合されること以外は、上記の組成物、キット、および方法と実質的に同じである。例えば、用いられる試料がパラフィン処理された、保管所に保管されているヒト組織試料である場合、試料中のマーカーの発現のレベルを評価するために用いられる組成物中の、キットまたは方法中の化合物の比率を調節することが必要である可能性がある。

20

【 0 2 0 0 】

[000103] キットおよび試薬

[000104] キットは、マーカーの発現を特異的に検出するための少なくとも1種類の試薬、例えばプローブを含むあらゆる製品（例えばパッケージまたは入れ物）であることができる。そのキットは本発明の方法を実行するための単位として販売促進、流通、または販売されてよい。

【 0 2 0 1 】

[000105] そのキットは（例えば対象試料のような試料中の）標的細胞の存在を評価するのに有用である。そのキットは複数の試薬を含み、そのそれぞれがマーカーの核酸またはタンパク質と特異的に結合することができる。マーカータンパク質との結合に適した試薬には、抗体、抗体の誘導体、抗体断片、および同様のものが含まれる。マーカーの核酸（例えば、ゲノムDNA、MRNA、スプライシングされたMRNA、cDNA、または同様のもの）との結合に適した試薬には、相補的な核酸が含まれる。例えば、核酸試薬は基質に固定された（標識された、または標識されていない）オリゴヌクレオチド、基質と結合していない標識されたオリゴヌクレオチド、PCRプライマーのペア、分子ビーコン ( m o l e c u l a r b e a c o n ) プローブ、および同様のものを含んでいてよい。

30

【 0 2 0 2 】

[000106] そのキットは場合により本明細書で記述した方法を実行するのに有用な追加の構成要素を含んでいてよい。例として、そのキットは相補的な核酸のアニーリングに、または抗体のそれが特異的に結合するタンパク質との結合に適した流体（例えばSSC緩衝液）、1種類以上の試料区画、方法の実行を記述した指導用の資料、正常なシステム細胞の試料、冒された細胞の試料、および同様のものを含んでいてよい。

40

【 0 2 0 3 】

[000107] 抗体を生成する方法

[000108] 対象が障害および/または疾患の状態で苦しんでいるかどうかを評価するのに有用な抗体を生成する方法も、本発明の意図された範囲内である。ある限定的で無い例において、マーカータンパク質の全体または切片 ( s e g m e n t ) を含むタンパク質またはペプチドを（例えばそれが発現している細胞からの精製により、またはそのタンパク質またはペプチドをコードしている核酸のインピボもしくはインピトロでの転写および翻訳により）合成する、または単離する。脊椎動物、例えば哺乳類、例えばマウス、ラット

50

、ウサギ、またはヒツジを、そのタンパク質またはペプチドを用いて免疫する。その脊椎動物は場合により（および好ましくは）、その脊椎動物がそのタンパク質またはペプチドに対して強い免疫応答を示すように、そのタンパク質またはペプチドで少なくともさらに1回免疫されてよい。様々な方法のいずれかを用いて、免疫した脊椎動物から脾細胞を単離し、不死化した細胞系と融合させてハイブリドーマを形成する。次いでこの方法で形成されたハイブリドーマを標準的な方法を用いてスクリーニングし、マーカータンパク質またはその断片と特異的に結合する抗体を産生する1種類以上のハイブリドーマを同定する。本明細書において、この方法により作られたハイブリドーマおよびそのハイブリドーマを用いて作られた抗体も提供する。

【0204】

[000109] 有効性を評価する方法

[000110] 標的細胞の阻害に関する試験化合物の有効性を評価する方法も、本発明の意図された範囲内である。ある限定的で無い例において、本明細書で記述されているように、マーカーの発現のレベルの差は対象の細胞の異常な状態と相関している。マーカーの内のいくつかの発現のレベルにおける変化はその細胞の異常な状態に起因するらしいことが認められているが、マーカーの内の他のものの発現のレベルにおける変化がそれらの細胞の異常な状態を誘発、維持および促進することも同様に認められている。従って、対象において障害および/または疾患の状態を阻害する化合物は、マーカーの内の1種類以上の発現のレベルをそのマーカーに関する正常な発現のレベル（すなわち、正常な細胞におけるそのマーカーに関する発現のレベル）により近いレベルへと変化させるであろう。

【0205】

[000111] その方法は、第1の細胞試料中の、試験化合物の存在下で維持されているマーカーの発現と、第2の細胞試料中の、試験化合物の非存在下で維持されているマーカーの発現を比較することを含むことができる。試験化合物の存在下で有意に低減したマーカーの発現は、その試験化合物が障害または関連する疾患の状態を阻害することを示すものである。細胞の試料は、例えば、対象から得られた正常な細胞の単一の試料の一定部分、対象から得られた正常な細胞のプールされた試料、正常な細胞系の細胞、対象から得られた関連する疾患の細胞の単一の試料の一定部分、対象から得られた関連する標的細胞のプールされた試料、障害もしくは疾患細胞系の細胞、または同様のものであってよい。

【0206】

[000112] 1態様において、試料は対象から得られた冒された細胞であり、様々な炎症に関連する障害および/または疾患を阻害するのに有効であると信じられている複数の化合物を、対象における障害および/または疾患を最もよく阻害しそうである化合物を同定するために試験する。

【0207】

[000113] この方法は同様に、対象における関連する障害および/または疾患を阻害するための療法の有効性を評価するために用いられてよい。この方法において、試料のペア（一方にその療法を施し、他方にはその療法を施さない）における1種類以上のマーカーの発現のレベルを評価する。試験化合物の有効性を評価する方法におけるように、もしその療法がマーカーの発現の有意により低いレベルを誘導すれば、その療法は障害および/または疾患を阻害するのに有効である。上記のように、選択された対象からの試料がこの方法において用いられた場合、対象における障害および/または疾患を阻害するのに最も有効でありそうである療法を選択するために、代替りの療法をインビトロで評価することができる。

【0208】

[000114] 本明細書において記述されているように、ヒトの細胞の異常な状態はマーカーの発現のレベルにおける変化と相関している。試験化合物の有害な可能性を評価するための方法も提供する。この方法は、試験化合物の存在下および非存在下でヒトの細胞の別の一定部分を維持することを含む。それぞれの一定部分におけるマーカーの発現を比較する。試験化合物の存在下で維持されている一定部分におけるマーカーの発現の、（試験化

10

20

30

40

50

化合物の非存在下で維持されている一定部分と比較して)有意により高いレベルは、その試験化合物が有害な可能性を有していることを示すものである。様々な試験化合物の相対的に有害である可能性は、関係のあるマーカーの発現のレベルの増進または阻害の程度を比較することにより、それに関して発現のレベルが増進もしくは阻害されるマーカーの数を比較することにより、または両方を比較することにより、評価することができる。様々な観点を、下記の小区分においてさらに詳細に記述する。

【0209】

[000115] 単離されたタンパク質および抗体

[000116] マーカータンパク質またはその断片に対して向けられた抗体を生じさせるための免疫源としての使用に適した、単離されたマータンパク質およびその生物学的に活性な部分、さらにポリペプチド断片も、本発明の意図された範囲内である。

10

【0210】

[000117] ある限定的で無い例において、未変性のマータンパク質を細胞または組織の源から標準的なタンパク質精製技法を用いる適切な精製スキームにより単離することができる。別の態様において、そのマータンパク質の全体または切片を含むタンパク質またはペプチドは、組み換えDNAの技法により生成される。組み換えでの発現の代わりに、そのタンパク質またはペプチドは標準的なペプチド合成の技法を用いて化学的に合成することができる。

【0211】

[000118] “単離された”もしくは“精製された”タンパク質またはそれらの生物学的に活性な部分は、そのタンパク質が由来する細胞もしくは組織の源からの細胞物質もしくは他の混入したタンパク質を実質的に含まない、または化学的に合成された場合に化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。“細胞物質を実質的に含まない”という用語は、そのタンパク質が、それからそれを単離した、または組み替えで生成した細胞の細胞構成要素から分離された、タンパク質の調製品を含む。従って、細胞物質を実質的に含まないタンパク質には、(乾燥重量により)約30%、20%、10%、または5%未満の異種タンパク質(本明細書において“混入タンパク質”とも呼ばれる)を有するタンパク質の調製品が含まれる。

20

【0212】

[000119] そのタンパク質またはその生物学的に活性な部分が組み替えで生成される場合、それは好ましくは培地も実質的に含まず、すなわち、培地はそのタンパク質調製品の体積の約20%、10%、または5%未満である。そのタンパク質が化学合成により生成される場合、それは好ましくは化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まず、すなわち、それはそのタンパク質の合成に関わっている化学的前駆体または他の化学物質から分離されている。従って、そのタンパク質の調製品は、(乾燥重量により)約30%、20%、10%、または5%未満の化学的前駆体または関心のあるポリペプチド以外の化合物を有する。

30

【0213】

[000120] マーカータンパク質の生物学的に活性な部分には、マータンパク質のそのアミノ酸配列に十分に一致する、またはそれに由来するアミノ酸配列を含むポリペプチドが含まれ、それは完全長のタンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、対応する完全長のタンパク質の少なくとも1種類の活性を示す。典型的に、生物学的に活性な部分は、対応する完全長のタンパク質の少なくとも1種類の活性を有するドメインまたはモチーフを含む。マータンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば10、25、50、100またはより多くのアミノ酸長であるポリペプチドであることができる。さらに、そのマータンパク質の他の領域が削除された他の生物学的に活性な部分を、組み換えの技法により調製し、そのマータンパク質の未変性の形の機能的活性の1種類以上に関して評価することができる。特定の態様において、有用なタンパク質はこれらの配列の内の1種類と実質的に(例えば少なくとも40%、および特定の態様において50%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%)同じであり、対応する天然に生じるマーカー

40

50

タンパク質の機能活性を保持しているが、天然の対立遺伝子の変化または変異生成によりアミノ酸配列が異なる。

【0214】

[000121] 加えて、マーカータンパク質の切片のライブラリーを、スクリーニングおよびそれに続く様々なマーカータンパク質またはその切片の選択のためのポリペプチドの多様な集団を生じさせるために用いることができる。

【0215】

[000122] 予測医学

[000123] 診断アッセイ、予後 ( p r o g n o s t i c ) アッセイ、薬理ゲノム学、および監視的臨床試験が予後 ( 予測 ) 目的で用いられ、それにより個人を予防的に処置する予測医学の分野における動物モデルおよびマーカーの使用も、本発明の意図される範囲内である。ある限定的で無い例において、診断アッセイは、個人が特定の障害および/または疾患を発現する危険にさらされているかどうかを決定するために1種類以上のマーカータンパク質または核酸の発現のレベルを測定するのに用いられる。そのアッセイは予後または予測目的で用いられ、それにより障害および/または疾患の開始の前に個人を予防的に処置することができる。

10

【0216】

[000124] 別の観点において、その方法は少なくとも同じ個人の、その個人が彼の/彼女の発現パターンを変化させる化学物質または毒物にさらされたかどうかを調べるための定期的なスクリーニングに有用である。

20

【0217】

[000125] さらに別の観点は、障害および/または疾患を阻害するため、またはいずれかの他の障害および/または疾患を処置もしくは予防するために投与される薬剤 ( 例えば薬物または他の化合物 ) の、臨床試験におけるマーカーの発現または活性に対する影響を ( 例えば、その処置が有している可能性があるいずれかのシステム作用を理解するために ) 監視することに関する。

【0218】

[000126] 医薬組成物

[000127] 医薬組成物も本発明の意図される範囲内である。ある限定的で無い例において、その化合物は、適切な医薬的キャリアー中で、局所的に ( t o p i c a l l y , l o c a l l y )、または全身に投与するための配合物中であってよい。E. W. MartinによるRemington's Pharmaceutical Sciences、第15版 (Mark Publishing Company, 1975) は、典型的なキャリアーおよび調製の方法を開示している。その化合物は、細胞へのターゲティングのために生分解性もしくは非生分解性ポリマーまたはタンパク質またはリポソームで形成された適切な生体適合性のマイクロカプセル、微粒子またはマイクロスフェア中に封入されていてもよい。そのシステムは当業者には周知であり、適切な核酸と共に使用するために最適化されてよい。

30

【0219】

[000128] 別の例として、その医薬組成物は、例えばSambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, ニューヨーク; およびAusubel et al., 1994, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, ニューヨークにおいて記述されている核酸の送達のための様々な方法で構成されることができる。その核酸送達システムは、望まれる核酸を、例として、および限定するものではなく、“裸の”核酸として“裸の”形で、または送達に適したビヒクル中に、例えば陽イオン性分子もしくはリポソームを形成する脂質との複合体中に配合されて、またはベクターの構成要素、もしくは医薬組成物の構成要素としてのいずれかで含む。その核酸送達システムは、細胞に直接、例えばそれを細胞と接触させることにより、または間接的に、例えばいずれかの生物学的プロセスの働きにより、のどちらかで与えることができる。

40

【0220】

[000129] 局所的投与のための配合物には、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロ

50

ップ、坐剤、スプレー、液体および粉末が含まれていてよい。一般に用いられる医薬的キャリアー、水性、粉末もしくは油性基材、または増粘剤を、必要に応じて用いることができる。

#### 【0221】

[000130] 例えば関節内（関節中で）、静脈内、筋内、皮内、腹膜内、および皮下経路によるような非経口投与に適した配合物には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤、およびその配合物を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含むことができる水性および非水性の等張の無菌の注射溶液、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、分散剤、安定剤、および保存剤を含むことができる水性および非水性の無菌の懸濁液、溶液または乳濁液が含まれる。注射のための配合物は単位剤形で、例えばアンプル中で、または多数回用量の入れ物中で、添加された保存剤と共に与えられてよい。当業者はその組成物を調製する、および配合するための様々なパラメーターを、過度の実験に頼ること無くすぐに決定することができる。化合物は単独で、または他の適切な構成要素との組み合わせで用いることができる。

10

#### 【0222】

[000131] 一般に、化合物を投与する方法は当技術において周知である。特に、既に様々な療法に関して用いられている投与経路は、目下の用途における配合物と共に、好ましい投与経路を提供し、配合はもちろん個々の配合物、処置される対象の状態の重症度、および療法的有効性に必要な投与量のような因子に依存するであろう。本明細書で一般的に用いられる“有効量”は、その配合物が投与される対象において、その化合物を与えられない対等な対象と比較して、その障害の1種類以上の症状を処置する、その障害および/または疾患の1種類以上の症状の進行を逆行させる、その障害および/または疾患の1種類以上の症状の進行を止める、またはその障害および/または疾患の1種類以上の症状の発生を予防することが可能である量である。化合物の実際の有効量は、利用される具体的な化合物またはその組み合わせ、配合される個々の組成物、投与の方式、およびその個人の年齢、体重、状態、および処置される症状または状態の重症度に従って異なり得る。

20

#### 【0223】

[000132] 当業者に既知のあらゆる許容できる方法を、配合物を対象に投与するために用いてよい。投与は処置される状態に依存して局所的（すなわち特定の部分、生理的システム、組織、器官、または細胞のタイプに対して）または全身に対してであってよい。

30

#### 【0224】

##### [000133] 薬理ゲノム学

[000134] 薬理ゲノム学的マーカーも本発明の意図される範囲内である。ある限定的で無い例において、“薬理ゲノム学的マーカー”はその発現レベルが対象における特定の臨床薬物応答または感受性と相関する客観的な生化学的マーカーである。薬理ゲノム学的マーカーの発現の存在または量は、対象の、より詳細には対象の腫瘍の、特定の薬物または特定のクラスの薬物を用いた療法に対する予測される応答と関係する。対象における1種類以上の薬理ゲノム学的マーカーの発現の存在または量を評価することにより、その対象に最も適した、またはより大きい程度の成功をもたらすと予測される薬物療法を選択することができる。

40

#### 【0225】

##### [000135] 臨床試験の監視

[000136] 薬剤（例えば薬物の化合物）のマーカーの発現のレベルに対する影響を監視することも本発明の意図される範囲内である。ある限定的で無い例において、その監視は基本的な薬物スクリーニングにおいてだけでなく臨床試験においても適用することができる。例えば、薬剤のマーカー発現に影響を与える有効性を、障害および/または疾患に関する処置を受けている対象の臨床試験において監視することができる。

#### 【0226】

[000137] ある限定的で無い態様において、本発明は、次の工程を含む、薬剤（例えば作動薬、拮抗薬、ペプチド模倣薬、タンパク質、ペプチド、核酸、小さい分子、または他

50

の薬物の候補)を用いた対象の処置の有効性を監視するための方法を提供する:

その薬剤の投与の前に対象から投与前の試料を得る;

投与前の試料中の1種類以上の選択されたマーカの発現のレベルを検出する;

対象から1種類以上の投与後の試料を得る;

投与後の試料中のマーカ(単数又は複数)の発現のレベルを検出する;

投与前の試料中のマーカ(単数又は複数)の発現のレベルを投与後の試料(単数)又は試料(複数)中のマーカ(単数又は複数)の発現のレベルと比較する;および

それによってその薬剤のその対象への投与を変更する。

#### 【0227】

[000138] 例えば、処置の過程の間のマーカの増大した発現は、効果的でない投薬量および投薬量を増大させるのが望ましいことを示している可能性がある。逆に、マーカの減少した発現は、有効な処置および投薬量を変える必要が無いことを示している可能性がある。

10

#### 【0228】

[000139] 電子機器で読むことのできる媒体、システム、アレイおよび同じものを用いる方法

[000140] 電子機器で読むことのできる媒体、システム、アレイおよび同じものを用いる方法も、本発明の意図される範囲内である。ある限定的で無い例において、“電子機器で読むことのできる媒体”は、電子機器により直接読む、およびアクセスすることができるデータまたは情報を保管する、保持する、または含むあらゆる適切な媒体を指す。その媒体は次のものを含むことができるが、それらに限定されない:磁気記憶媒体、例えばフロッピー(登録商標)ディスク、ハードディスク記憶媒体、および磁気テープ;光学記憶媒体、例えばコンパクトディスク;電子的記憶媒体、例えばRAM、ROM、EPROM、EEPROM、および同様のもの;ならびに一般的なハードディスクおよびこれらのカテゴリの混成物、例えば磁気/光学記憶媒体。その媒体は、本明細書で記述したようなマーカをその上に記録するために適合される、または設計される。

20

#### 【0229】

[000141] 本明細書で用いられる用語“電子機器”は、データまたは情報を保管するために設計された、または適合されたあらゆる適切なコンピューティングもしくはプロセッシング機器または他の装置を含むことを意図する。本発明での使用に適した電子機器の例には、スタンドアロンのコンピューティング機器;ローカルエリアネットワーク(LAN)、ワイドエリアネットワーク(WAN)のインターネット、イントラネット、およびエクストラネットを含むネットワーク;電子的な器具、例えば個人用携帯情報端末(PDA)、携帯電話、ページャおよび同様のもの;ならびに局所型および分散型プロセッシングシステムが含まれる。

30

#### 【0230】

[000142] 本明細書で用いられる“記録した”は、電子機器で読むことのできる媒体上に情報を保管する、またはコードするためのプロセスを指す。当業者は、本明細書で記述されたマーカを含む資料を作るために、情報を記録するためのあらゆる方法または媒体をすぐに採用することができる。

40

#### 【0231】

[000143] 様々なソフトウェアプログラムおよびフォーマットを、本発明のマーカ情報を電子機器で読むことのできる媒体上に保管するために用いることができる。あらゆる数のデータプロセッサ構築フォーマット(例えばテキストファイルまたはデータベース)を、その上に記録されたマーカを有する媒体を得る、または作り出すために用いてよい。そのマーカを読むことのできる形で提供することにより、そのマーカ配列情報に様々な目的のために日常的にアクセスすることができる。例えば、当業者は、その読むことのできる形のヌクレオチドまたはアミノ酸配列を、標的配列または標的構造モチーフをデータ保管手段内に保管されている配列情報と比較するために用いることができる。特定の標的配列または標的モチーフと合う配列の断片または領域を同定するために検索手段が

50

用いられる。

【0232】

[000144] 従って、本明細書において、対象が障害および/または疾患または障害および/または疾患に対する素因を有するかどうかを決定するための方法を実行するための指示を保持するための媒体も提供し、ここで、その方法は、マーカーの存在または欠如を決定する、ならびにそのマーカーの存在または欠如に基づいてその対象が障害および/または疾患またはそれに対する素因を有するかどうかを決定する、および/またはその障害および/または疾患またはその障害および/または疾患状態に対する素因のための個別の処置を推奨する工程を含む。

【0233】

[000145] 本明細書において、電子的システムおよび/またはネットワークにおいて対象がマーカーと関係する障害および/または疾患またはそれに対する素因を有するかどうかを決定するための方法も提供し、ここで、その方法は、マーカーの存在または欠如を決定する、ならびにそのマーカーの存在または欠如に基づいてその対象が特定の障害および/または疾患またはその障害および/または疾患に対する素因を有するかどうかを決定する、および/またはその疾患もしくは障害および/またはその障害および/または疾患状態に関するその素因のための個別の処置を推奨する工程を含む。その方法はさらに、その対象と関係する表現型の情報を受け取る、および/またはネットワークからその対象と関係する表現型の情報を獲得する工程を含んでよい。

【0234】

[000146] 本明細書において、対象がマーカーと関係する障害および/または疾患または障害および/または疾患に対する素因を有するかどうかを決定するためのネットワーク、方法も提供し、その方法は、そのマーカーと関係する情報を受け取る、その対象と関係する表現型の情報を受け取る、そのマーカーおよび/または障害および/または疾患に対応するネットワークからの情報を受け取る、ならびにその表現型の情報、マーカー、および獲得した情報の内の1種類以上に基づいて、対象が障害および/または疾患またはそれに対する素因を有するかどうかを決定する工程を含む。その方法はさらに、その障害および/または疾患またはそれに対する素因のための個別の処置を推奨する工程を含んでよい。

【0235】

[000147] 本明細書において、対象が障害および/または疾患またはそれに対する素因を有するかどうかを決定するためのビジネス手法も提供し、その方法は、そのマーカーと関係する情報を受け取る、その対象と関係する表現型の情報を受け取る、そのマーカーおよび/または障害および/または疾患に対応するネットワークからの情報を獲得する、ならびにその表現型の情報、マーカー、および獲得した情報の内の1種類以上に基づいて、対象が障害および/または疾患またはそれに対する素因を有するかどうかを決定する工程を含む。その方法はさらに、そのための個別の処置を推奨する工程を含んでよい。

【0236】

[000148] 本明細書において、アレイ中の1種類以上のマーカーの発現を分析するために用いることのできるアレイも提供する。1態様において、そのアレイは組織における発現を分析してそのアレイにおけるそのマーカーの組織特異性を確かめるために用いることができる。この方式で、約7000種類以上までのマーカーを発現に関して同時に分析することができる。これは1種類以上の組織において特異的に発現している一連のマーカーを示す一覧表を開発することを可能にする。

【0237】

[000149] その質的決定に加えて、本明細書においてその発現の定量を提供する。従って、組織特異性だけでなく、その組織における発現のレベルも確かめることができる。従って、マーカーをそれらの組織発現自体およびその組織における発現のレベルに基づいてグループ分けすることができる。これは例えば組織間 ( b e t w e e n o r a m o n g ) の発現の関係を確かめるのに有用である。従って、ある組織を攪乱させる ( p e r t

10

20

30

40

50

urbed)ことができ、第2の組織での発現へのその作用を決定することができる。この状況において、ある細胞型の、生物学的刺激に応答した別の細胞型への作用を決定することができる。

【0238】

[000150] その決定は、例えば細胞間相互作用の作用を発現のレベルで知るために有用である。もしある薬剤がある細胞型を処置するために療法的に投与されるが別の細胞型に望ましくない作用を有する場合、その方法はその望ましくない作用の分子的基础を決定するためのアッセイを提供し、そうして相殺的薬剤と一緒に投与する、またはそうでなければその望ましくない作用を処置する機会を提供する。同様に、単一の細胞型内においてさえも、望ましくない生物学的作用を分子レベルで決定することができる。従って、薬剤の標的遺伝子以外の発現に対する作用を確かめ、相殺することができる。

10

【0239】

[000151] 別の態様において、そのアレイはそのアレイ中の1種類以上のマーカーの発言の時間経過を監視するために用いることができる。これは、本明細書で開示するように、様々な生物学的状況、例えば障害および/または疾患の発現、その進行、およびプロセス、例えばそれと関係する細胞のトランスフォーメーションにおいて起こり得る。

【0240】

[000152] そのアレイは、同じ細胞内の、または異なる細胞内の、その発現または他のマーカーの発現の作用を確かめるためにも有用である。これは例えば、最終的な、または下流の標的を制御できない場合に、療法的介入のための代替の分子標的の選択を提供する。

20

【0241】

[000153] そのアレイは、正常な、および異常な細胞における1種類以上のマーカーの差異のある発現パターンを確かめるためにも有用である。これは診断または療法的介入のための分子標的として役立つことができるであろう一連のマーカーを提供する。

【0242】

[000154] 代用マーカー (Surrogate Markers)

[000155] 代用マーカーも本発明の意図される範囲内である。ある限定的で無い例において、そのマーカーは1種類以上の障害もしくは疾患状態に関する、またはそれに至る状態に関する代用マーカーとして役立つ可能性がある。“代用マーカー”は、障害および/または疾患の欠如もしくは存在と、または疾患および/または障害の進行と相関する客観的な生化学的マーカーであることができる。そのマーカーの存在または量は、その障害および/または疾患と無関係である。従って、これらのマーカーは処置の特定の過程が障害および/または疾患状態を減らすのに有効であるかどうかを示すのに役立つ可能性がある。代用マーカーは、障害および/または疾患状態の存在または程度を標準的な方法論を通して評価するのが難しい場合、または危険である可能性がある臨床的エンドポイントに到達する前に進行の評価が望まれる場合に特に有用である。

30

【0243】

[000156] そのマーカーは薬力学的マーカーとしても有用である。本明細書で用いられる“薬力学的マーカー”は、薬物の作用と特異的に相関する客観的な生化学的マーカーである。薬力学的マーカーの存在または量は、そのためにその薬物が投与される障害および/または疾患状態と関係しない；従って、そのマーカーの存在または量は、対象におけるその薬物の存在または活性を示している。例えば、薬力学的マーカーは生物学的組織中のその薬物の濃度を示している可能性があり、その場合、そのマーカーはその組織においてその薬物のレベルに関して発現される、もしくは転写される、または発現されない、もしくは転写されないかのどちらかである。この方式で、その薬物の分布または取り込みを薬力学的マーカーにより監視することができる。同様に、薬力学的マーカーの存在または量は、薬物の代謝産物の存在または量に関係している可能性があり、その結果、そのマーカーの存在または量はその薬物のインピボでの相対的な分解速度を示す。

40

【0244】

50

[000157] 薬力学的マーカーは、薬物の作用の検出の感度の増大において、特にその薬物が低い用量で投与される場合に、特に有用である。例えば少量の薬物でも多数回のマーカー転写または発現を活性化するのに十分である可能性があるため、その増幅されたマーカーはその薬物自体よりも容易に検出できる量である可能性がある。また、そのマーカーはそのマーカー自体の性質のため、より容易に検出される可能性がある；例えば、本明細書で記述した方法を用いて、抗体をタンパク質マーカーに関する免疫に基づく検出システムにおいて用いることができ、またはmRNAマーカーを検出するためにマーカーに特異的な放射性標識したプローブを用いることができる。さらに、薬力学的マーカーの使用は、可能な直接的な観察の範囲を超えて、薬物処置による危険性の機構に基づく予測を提供することができる。

10

## 【0245】

[000158] 試験のためのプロトコル

[000159] 試験のためのプロトコルも本発明の意図される範囲内である。ある限定的で無い例において、障害および/または疾患に関する試験の方法は、例えば対象からの生物学的試料中のそれぞれのマーカーの発現レベルを経時的に測定すること、およびそのレベルを対照の生物学的試料中のそのマーカーのレベルと比較することを含んでよい。

## 【0246】

[000160] そのマーカーが本明細書で記述したマーカーの内の1種類であり、その発現レベルが異なって発現している（例えば、対照におけるそれよりも高い、または低い）場合、その対象は障害および/または疾患に冒されていると判定される。そのマーカーの発現レベルが許容できる範囲内に収まる場合、その対象はそれに犯されているとは考えにくい。

20

## 【0247】

[000161] 対照に関する基準値は、発現レベルを比較するために、対照におけるマーカーの発現レベルを測定することにより予め決められてよい。例えば、基準値は上述のマーカーの発現レベルに基づいて決めることができる；特定の態様において、許容できる範囲は基準値に基づいて $\pm 2 S . D .$ と考えられる。一度基準値が決定されれば、試験法は対象からの生物学的試料中の発現レベルのみを測定することおよびその値を対照に関する決定された基準値と比較することにより実行されてよい。別の例において、マーカーの発現レベルはマーカーのmRNAへの転写、およびタンパク質への翻訳を含む。従って、障害および/または疾患に関する試験の1つの方法は、マーカー遺伝子に対応するmRNAの発現の強度またはマーカー遺伝子によりコードされるタンパク質の発現レベルの比較に基づいて実行される。

30

## 【0248】

[000162] 障害および/または疾患に関する試験におけるマーカーの発現レベルの測定は、様々な分析法に従って実施することができる。例えば、これらの遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとして用いるハイブリダイゼーションの技法、またはマーカー遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとして用いる遺伝子増幅の技法を用いることができる。

## 【0249】

[000163] 試験のために用いられるプローブまたはプライマーは、マーカーのヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。それぞれのマーカー遺伝子のヌクレオチド配列に関する識別番号を本明細書で記述する。

40

## 【0250】

[000164] さらに、高等動物の遺伝子は一般に高頻度で多型性を伴うことが理解されるべきである。スプライシングのプロセスの間に互いに異なるアミノ酸配列を含むイソ型を生成する多くの分子も存在する。あるマーカーの活性に類似した活性を有する、障害および/または疾患と関係するあらゆるマーカーは、たとえそれが多型性またはイソ型であることによるヌクレオチド配列の違いを有していても、そのマーカーに含まれる。

## 【0251】

50

[000165] そのマーカ―はヒトに加えて他の種と同族体を含むことができることも理解されるべきである。従って、別途明記しない限り、“マーカ―”という表現は、その種に特有のそのマーカ―の同族体または個人の中に導入された外来のマーカ―を指す。

【0252】

[000166] “マーカ―の同族体”は、ヒト以外の種に由来し、ストリンジェントな条件の下でプローブとしてヒトのマーカ―にハイブリダイズすることができるマーカ―を指すことも理解されるべきである。そのストリンジェントな条件は当業者には既知であり、当業者は同等のストリンジェンシーを生成するのに適した条件を実験的に、または経験的に選択することができる。例えば、マーカ―のヌクレオチド配列またはマーカ―のヌクレオチド配列の相補鎖に相補的なヌクレオチド配列を含み、少なくとも15ヌクレオチドを有するポリヌクレオチドを、プライマーまたはプローブとして用いることができる。このように、“相補鎖”は、二本鎖DNAの、他方の鎖に関しての一方の鎖を意味し、それはA:T(RNAに関してはU)およびG:C塩基対で構成される。加えて、“相補的”は少なくとも15個の連続したヌクレオチドの領域に完全に相補的であるそれらだけでなく、ある例において少なくとも40%、ある例において50%、ある例において60%、ある例において70%、ある例において80%、ある例において90%、ある例において95%、またはそれより高いヌクレオチド配列の相同性を有するそれらも意味する。ヌクレオチド配列間の相同性の程度は、アルゴリズム、BLAST等により決定することができる。そのポリヌクレオチドは、マーカ―を検出するためのプローブとして、またはマーカ―を増幅するためのプライマーとして有用である。プライマーとして用いられる場合、そのポリヌクレオチドは通常15bp~100bp、およびある態様において15bp~35bpのヌクレオチドを含む。プローブとして用いられる場合、DNAはマーカ―遺伝子(またはその相補鎖)の全体のヌクレオチド配列、または少なくとも15bpのヌクレオチドを有するその一部の配列を含む。プライマーとして用いられる場合、その3'領域はマーカ―遺伝子に相補的でなくてはならないが、その5'領域は制限酵素認識配列またはタグにつながっていることができる。“ポリヌクレオチド”はDNAまたはRNAのどちらかであってよい。これらのポリヌクレオチドは、合成によるもの、または天然に生じたもののどちらかであってよい。また、ハイブリダイゼーションのためのプローブとして用いられるDNAは通常は標識されている。当業者は、その標識法をすぐに理解することができる。本明細書において、用語“オリゴヌクレオチド”は比較的低い程度の重合を有するポリヌクレオチドを意味する。オリゴヌクレオチドはポリヌクレオチドに含まれる。

【0253】

[000167] ハイブリダイゼーションの技法を用いた障害および/または疾患に関する試験は、例えばノーザンハイブリダイゼーション、ドットプロットハイブリダイゼーション、またはDNAマイクロアレイの技法を用いて実行することができる。さらに、遺伝子増幅技法、例えばRT-PCR法を用いてよい。RT-PCRにおける増幅段階の間にPCR増幅監視法を用いることにより、マーカ―の発現のより定量的な分析を得ることができる。

【0254】

[000168] PCR遺伝子増幅監視法において、検出標的(DNAまたはRNAの逆転写物)は蛍光染料および蛍光を吸収するクエンチャーで標識されたプローブにハイブリダイズする。PCRが進行し、Taqポリメラーゼがその5'-3'エキソヌクレアーゼ活性によりプローブを分解すると、蛍光染料およびクエンチャーが互いから引き離され、蛍光が検出される。蛍光はリアルタイムで検出される。標的のコピー数が既知である標準試料を同時に測定することにより、PCR増幅が線形であるサイクル数で、対象試料中の標的のコピー数を決定することができる。また、当業者はあらゆる適切な方法を用いてPCR増幅監視法を実施することができることを認識している。

【0255】

[000169] 障害および/または疾患に関する試験の方法は、マーカ―によりコードされるタンパク質を検出することにより実施することもできる。以下、マーカ―によりコード

10

20

30

40

50

されるタンパク質を“マーカータンパク質”と記述する。その試験法に関して、例えば、それぞれのマーカータンパク質に結合する抗体を用いるウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、およびELISA法を用いることができる。検出において用いられる、マーカータンパク質に結合する抗体は、あらゆる適切な技法により生成してよい。また、マーカータンパク質を検出するために、その抗体を適切に標識してよい。あるいは、その抗体を標識する代わりに、その抗体に特異的に結合する物質、例えばプロテインAまたはプロテインGを標識してそのマーカータンパク質を間接的に検出してよい。より具体的には、その検出法はELISA法を含むことができる。抗原として用いられるタンパク質またはその一部のペプチドを、例えばマーカーまたはその一部を発現ベクターの中に挿入し、そのコンストラクトを適切な宿主細胞の中に導入して形質転換体を生成し、その形質転換体を培養して組み換えタンパク質を発現させ、発現した組み換えタンパク質を培養物または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、マーカーによりコードされるアミノ酸配列または完全長cDNAによりコードされるアミノ酸配列の一部を含むオリゴペプチドを化学的に合成して免疫源として用いる。

10

20

30

40

50

**【0256】**

[000170] さらに、障害および/または疾患に関する試験は、生物学的試料中のマーカーの発現レベルに関してだけでなくマーカータンパク質の活性に関しても指数として用いて実行することができる。マーカータンパク質の活性は、そのタンパク質に本来備わっている生物学的活性を意味する。それぞれのタンパク質の活性を測定するために、様々な方法を用いることができる。

**【0257】**

[000171] たとえ対象がその障害および/または疾患を示唆する症状にも関わらず型にはまった試験において障害および/または疾患に冒されていると診断されなかったとしても、その対象が障害および/または疾患を患っているか否かは本明細書で記述した方法に従う試験を実行することにより容易に決定することができる。

**【0258】**

[000172] より具体的には、特定の態様において、そのマーカーが本明細書で記述したマーカーの内の1種類である場合、その症状が少なくとも障害および/または疾患に対する感受性を示唆する対象におけるそのマーカーの発現レベルの増大または減少は、その症状が主にそれにより引き起こされていることを示す。

**【0259】**

[000173] 加えて、その試験は対象において障害および/または疾患が改善しているかどうかを決定するのに有用である。言い換えると、本明細書で記述した方法は、それに関する処置の療法的効果を判定するために用いることができる。さらに、そのマーカーが本明細書で記述した遺伝子の内の1種類である場合、それに冒されていると診断された対象におけるそのマーカーの発現レベルの増大または減少は、その障害および/または疾患がより進行したことを意味する。

**【0260】**

[000174] 障害および/または疾患に対する重症度および/または感受性も、発現レベルにおける違いに基づいて決定されてよい。例えば、そのマーカーが本明細書で記述したマーカーの内の1種類である場合、そのマーカーの発現レベルの増大の程度は、障害および/または疾患の存在および/または重症度と相関している。

**【0261】****【000175】 動物モデル**

[000176] 1種類以上のマーカーまたはそのマーカーに機能的に均等なマーカーの発現レベルがその動物モデルにおいて高められた、障害および/または疾患に関する動物モデルも、本発明の意図される範囲内である。ある限定的で無い例において、本明細書で用いられる“機能的に均等なマーカー”は、一般にそのマーカーの既知の活性に類似の活性を有するマーカーである。

**【0262】**

[000177] 動物モデルは障害および/または疾患による生理的变化を検出するのに有用である。特定の態様において、動物モデルはマーカーの追加の機能を明らかにするのに、およびその標的がそのマーカーである薬物を評価するのに有用である。

【0263】

[000178] 動物モデルはカウンターパート遺伝子の発現レベルを制御する、またはカウンターパート遺伝子を投与することにより作り出すことができる。その方法は、遺伝子の発現レベルを制御することにより動物モデルを作り出すことを含むことができる。別の態様において、その方法は遺伝子によりコードされるタンパク質を投与すること、またはそのタンパク質に対する抗体を投与することにより動物モデルを作り出すことを含むことができる。特定の他の態様において、次いでそのマーカーを適切な方法を用いて測定することができるように、そのマーカーを過剰発現することができることも理解されるべきである。別の態様において、動物モデルはそのグループの遺伝子から選択された遺伝子を導入することにより、またはその遺伝子によりコードされるタンパク質を投与することにより作り出すことができる。別の態様において、そのグループの遺伝子から選択された遺伝子の発現またはその遺伝子によりコードされるタンパク質の活性を抑制することにより、障害および/または疾患を誘導することができる。アンチセンス核酸、リボザイム、またはRNAiを用いてその発現を抑制することができる。その活性を阻害する物質、例えば抗体を投与することにより、タンパク質の活性を効果的に制御することができる。

10

【0264】

[000179] 動物モデルは障害および/または疾患の基礎となる機構を解明するのに、およびスクリーニングにより得られた化合物の安全性を試験するのに有用である。例えば、動物モデルが特定の障害および/または疾患の症状を発現している場合、または特定の障害および/または疾患にかかわる測定された値がその動物において変化している場合、その障害および/または疾患を緩和する活性を有する化合物を探索するためのスクリーニングシステムを構築することができる。

20

【0265】

[000180] 本明細書で用いられる表現“発現レベルの増大”は、次の内のいずれか1つを指す：外来遺伝子として導入されたマーカー遺伝子を人為的に発現させている場合；その対象動物に本来備わっているマーカー遺伝子の転写およびそのタンパク質への翻訳が増進されている場合；または翻訳産物であるタンパク質の加水分解が抑制されている場合。

30

【0266】

[000181] 本明細書で用いられる表現“発現レベルの減少”は、対象の動物のマーカーの転写およびそのタンパク質への翻訳が阻害されている状態、または翻訳産物であるタンパク質の加水分解が増進されている状態のどちらかを指す。遺伝子の発現レベルは、例えばDNAチップ上のシグナル強度の違いにより決定することができる。さらに、翻訳産物 - - タンパク質 - - の活性は、正常な状態におけるそれと比較することにより決定することができる。

【0267】

[000182] 動物モデルは、例えばマーカー遺伝子が導入されており人為的に発現させている動物；マーカー遺伝子のノックアウト動物；およびマーカー遺伝子を別の遺伝子で置き換えたノックイン動物を含むトランスジェニック動物を含むことができることも、意図される範囲内である。その中にマーカー遺伝子のアンチセンス核酸、リボザイム、RNAi効果を有するポリヌクレオチド、またはデコイ核酸もしくはそのようなものとして機能するDNAが導入されているトランスジェニック動物を、そのトランスジェニック動物として用いることができる。そのトランスジェニック動物は、例えば、マーカータンパク質の活性がその遺伝子のコード領域の中に変異（単数又は複数）を導入することにより増進もしくは抑制されている、またはそのアミノ酸配列が修正されて加水分解に耐性もしくは感受性になっている動物も含む。アミノ酸配列における変異には、置換、欠失、挿入、および付加が含まれる。

40

【0268】

50

[000183] “対象”は、処置または療法のために選択されたヒトまたはヒトでは無い動物を意味する。“有すると疑われる対象”は、障害、疾患または病気の1種類以上の臨床指標を示す対象を意味する。

【0269】

[000184] “予防する”または“予防”は、病気または障害および/または疾患の開始、発現または進行を、数週間、数ヶ月間、または数年間を含むある期間の間遅らせる、または未然に防ぐことを指す。“処置”または“処置する”は、障害および/または疾患の治療または改善のために用いられる1種類以上の特定の手順の適用を意味する。特定の態様において、その特定の手順は1種類以上の医薬的薬剤の投与である。

【0270】

[000185] “改善”は、障害および/または疾患の少なくとも1種類の指標の重症度を低減することを意味する。特定の態様において、改善は障害および/または疾患の少なくとも1種類の指標の進行を遅らせる、または遅くすることを含む。指標の重症度は、当業者に既知の主観的または客観的な尺度により決定されてよい。

【0271】

[000186] “それを必要とする対象”は、療法または処置を必要とすることが確認された対象を意味する。

【0272】

[000187] “投与する”は、対象に医薬的薬剤または組成物を与えることを意味し、医学の専門化による投与および自己投与を含むがそれらに限定されない。

【0273】

[000188] “機能を向上する”は、その変化が正常なパラメーターに向かって機能することを意味する。特定の態様において、機能は対象において見つかる分子を測定することにより評価される。

【0274】

[000189] “変調 (Modulation)”は、機能または活性の攪乱を意味する。特定の態様において、変調は遺伝子発現の増大を意味する。特定の態様において、変調は遺伝子発現の低下を意味する。

【0275】

[000190] “発現”は、それにより遺伝子にコードされる情報が細胞内に存在して作動する構造に変換されるあらゆる機能を意味する。

【0276】

[000191] 本明細書で記述した方法および試薬は、好ましい態様を表すものであり、典型的なものであり、本発明の範囲に対する限定として意図するものではない。当業者はそれにおける修正および他の用途を思いつくであろう。これらの修正は本発明の精神の内に含まれ、特許請求の範囲により定められる。本明細書で開示される本発明に対して、本発明の範囲および精神から逸脱すること無く様々な置換および修正がなされてよいことも、当業者にはすぐに明らかであろう。

【0277】

[000192] 本発明は好ましい態様および任意の特徴により具体的に開示されたが、当業者は本明細書で開示されたその概念の修正および変形に頼ってよく、その修正および変形は添付した特許請求の範囲により定義されるこの発明の範囲内であると考えられることは理解されるべきである。

【0278】

[000193] 本明細書で引用される全ての特許、特許出願および参考文献をそのまま援用する。本発明は当業者にとってそれを作り使用するのに十分に詳細に記述され、例証されたが、様々な代替、修正および向上が本発明の精神および範囲から逸脱すること無く明らかであるはずである。加えて、個別の状況または材料を本発明の教えに適応させるために、その本質的な範囲から逸脱すること無く多くの修正がなされてよい。

【0279】

10

20

30

40

50

[000194] 参考文献

[000195] 本発明を明らかにするために、または本発明の実施に関する追加の詳細を提供するために本明細書で用いられた刊行物および他の資料を本明細書に援用し、便宜のために下記の参考文献一覧において提供する。

【 0 2 8 0 】

[000196] 本明細書で列挙された文書のいずれかの引用は、前述のもののいずれかが関係する先行技術であるという自認として意図するものではない。これらの文書の日付に関する全ての声明または内容に関する描写は、出願者に利用可能な情報に基づくものであり、これらの文書の日付または内容の正しさに関して自認を構成するものではない。

【 0 2 8 1 】

【化 1】

- 1 Bruno L, Seidl T, Lanzavecchia A: Mouse pre-immunocytes as non-proliferating multipotent precursors of macrophages, interferon-producing cells, CD8alpha(+) and CD8alpha(-) dendritic cells. *Eur J Immunol* 31:3403-3412 (2001).
- 2 Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S: Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol* 176:284-290 (2006). 10
- 3 D'Amico A, Wu L: 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 (2003).
- 4 Dakic A, Wu L: Hemopoietic precursors and development of dendritic cell populations. *Leuk Lymphoma* 44:1469-1475 (2003).
- 5 del Hoyo GM, Martin P, Vargas HH, Ruiz S, Arias CF, Ardavin C: Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* 415:1043-1047 (2002). 20
- 6 Diao J, Winter E, Cantin C, Chen W, Xu L, Kelvin D, Phillips J, Cattral MS: In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue. *J Immunol* 176:7196-7206 (2006).
- 7 Diao J, Winter E, Chen W, Cantin C, Cattral MS: Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow. *J Immunol* 173:1826-1833 (2004).
- 8 Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F: A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* 311:83-87 (2006). 30
- 9 Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, De SC, Marigo I, Colombo MP, Basso G, Brombacher F, Borrello I, Zanovello P, Biccato S, Bronte V: Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* 116:2777-2790 (2006).
- 10 Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubreau M, Dai XM, Stanley ER, Randolph GJ, Merad M: Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7:265-273 (2006). 40
- 11 Iijima N, Linehan MM, Saeland S, Iwasaki A: Vaginal epithelial dendritic cells renew from bone marrow precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:19061-19066 (2007).
- 12 Karsunky H, Merad M, Cozzio A, Weissman IL, Manz MG: Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo. *J Exp Med* 198:305-313 (2003).

【 0 2 8 2 】

【化 2】

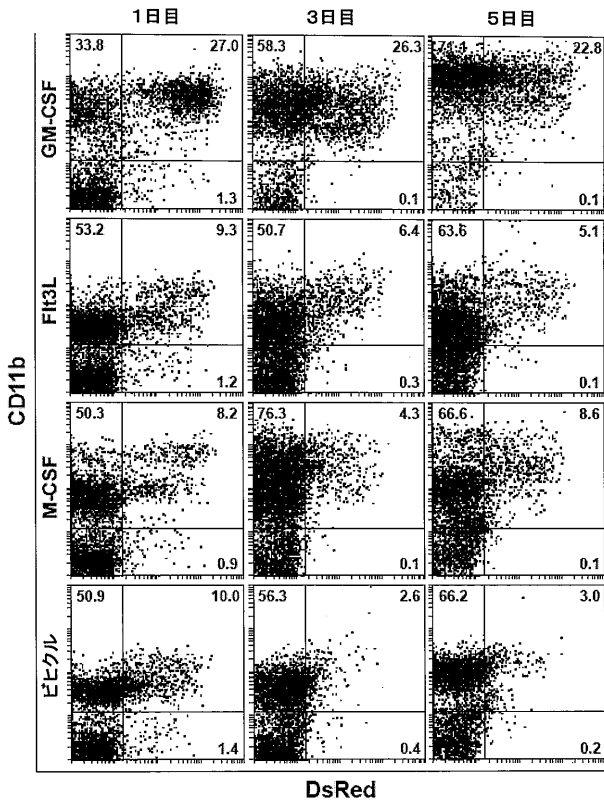
- 13 Larregina AT, Morelli AE, Spencer LA, Logar AJ, Watkins SC, Thomson AW, Falo LD, Jr.: Dermal-resident CD14<sup>+</sup> cells differentiate into Langerhans cells. *Nat Immunol* 2:1151-1158 (2001).
- 14 Makarenkova VP, Bansal V, Matta BM, Perez LA, Ochoa JB: CD11b<sup>+</sup>/Gr-1<sup>+</sup> myeloid suppressor cells cause T cell dysfunction after traumatic stress. *J Immunol* 176:2085-2094 (2006). 10
- 15 Marhaba R, Vitacolonna M, Hildebrand D, Baniyash M, Freyschmidt-Paul P, Zoller M: The importance of myeloid-derived suppressor cells in the regulation of autoimmune effector cells by a chronic contact eczema. *J Immunol* 179:5071-5081 (2007).
- 16 Mende I, Karsunky H, Weissman IL, Engleman EG, Merad M: Flk2<sup>+</sup> myeloid progenitors are the main source of Langerhans cells. *Blood* 107:1383-1390 (2006).
- 17 Mizumoto N, Gao J, Matsushima H, Ogawa Y, Tanaka H, Takashima A: Discovery of novel immunostimulants by dendritic cell-based functional screening. *Blood* 106:3082-3089 (2005a). 20
- 18 Mizumoto N, Hui F, Edelbaum D, Weil MR, Wren JD, Shalhevet D, Matsue H, Liu L, Garner HR, Takashima A: Differential activation profiles of multiple transcription factors during dendritic cell maturation. *J Invest Dermatol* 124:718-724 (2005b).
- 19 Naik SH: Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol Cell Biol* 86:439-452 (2008).
- 20 Naik SH, Metcalf D, van NA, Wicks I, Wu L, O'Keeffe M, Shortman K: Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes. *Nat Immunol* 7:663-671 (2006). 30
- 21 Naik SH, Sathe P, Park HY, Metcalf D, Proietto AI, Dakic A, Carotta S, O'Keeffe M, Bahlo M, Papenfuss A, Kwak JY, Wu L, Shortman K: Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nat Immunol* 8:1217-1226 (2007).
- 22 O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Scott B, Hertzog P, Tatarczuch L, Shortman K: Dendritic cell precursor populations of mouse blood: identification of the murine homologues of human blood plasmacytoid pre-DC2 and CD11c<sup>+</sup> DC1 precursors. *Blood* 101:1453-1459 (2003). 40
- 23 Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, Ohteki T, Jarrossay D, Manz MG: Identification of clonogenic common Flt3<sup>+</sup>M-CSFR<sup>+</sup> plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol* 8:1207-1216 (2007).

【 0 2 8 3 】

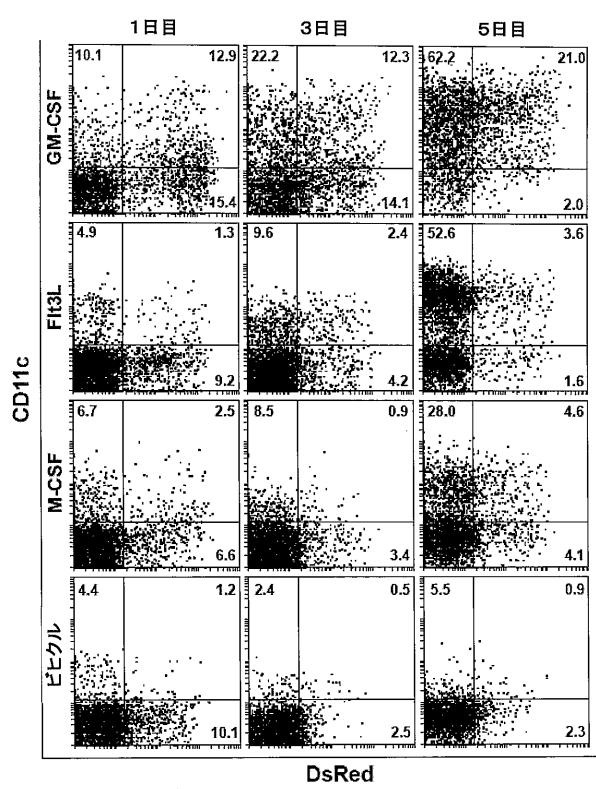
【化3】

- 24 Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA: Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11:753-761 (1999).
- 25 Rossner S, Voigtlander C, Wiethe C, Hanig J, Seifarth C, Lutz MB: Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur J Immunol* 35:3533-3544 (2005).
- 26 Shortman K, Liu YJ: Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2:151-161 (2002). 10
- 27 Shortman K, Naik SH: Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 7:19-30 (2007).
- 28 Sinha P, Clements VK, Ostrand-Rosenberg S: Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol* 174:636-645 (2005).
- 29 Villadangos JA, Schnorrer P: Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 7:543-555 (2007). 20
- 30 Wang Y, Zhang Y, Yoneyama H, Onai N, Sato T, Matsushima K: Identification of CD8alpha+CD11c- lineage phenotype-negative cells in the spleen as committed precursor of CD8alpha+ dendritic cells. *Blood* 100:569-577 (2002).
- 31 Welner RS, Pelayo R, Garrett KP, Chen X, Perry SS, Sun XH, Kee BL, Kincade PW: Interferon-producing killer dendritic cells (IKDCs) arise via a unique differentiation pathway from primitive c-kit<sup>hi</sup>CD62L<sup>+</sup> lymphoid progenitors. *Blood* 109:4825-4931 (2007).
- 32 Wu L, Dakic A: Development of dendritic cell system. *Cell Mol Immunol* 1:112-118 (2004). 30
- 33 Wu L, Liu YJ: Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 26:741-750 (2007).
- 34 Zhu B, Bando Y, Xiao S, Yang K, Anderson AC, Kuchroo VK, Khoury SJ: CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179:5228-5237 (2007).
- 35 Zuniga EI, McGavern DB, Prunedo-Paz JL, Teng C, Oldstone MB: Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat Immunol* 5:1227-1234 (2004). 40

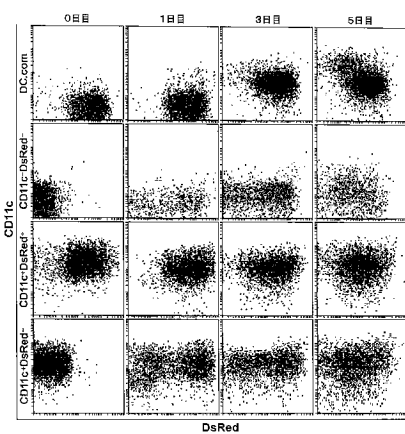
【 図 5 A 】



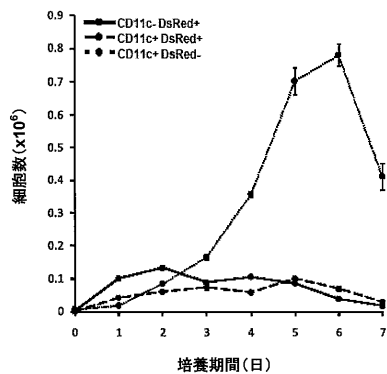
【 図 5 B 】



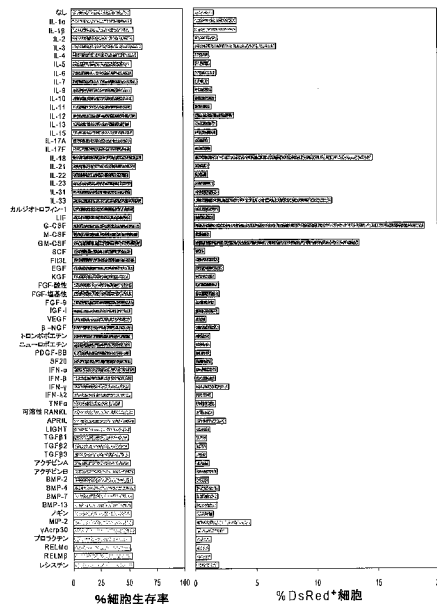
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】





【 図 3 9 】

表 2

4つの集団におけるTLRおよびCCRの相対mRNA発現

	CD11c- DsRed-	DC.com	CD11c+ DsRed+	CD11c+ DsRed-
TLR1	1.0	2.0	1.0	0.7
TLR2	1.0	2.2	0.3	0.4
TLR3	1.0	1.6	1.1	1.0
TLR4	1.0	5.7	0.6	1.1
TLR5	1.0	3.8	0.5	0.9
TLR6	1.0	4.9	0.6	0.5
TLR7	1.0	1.9	0.2	0.4
TLR8	1.0	1.4	0.2	0.6
TLR9	1.0	4.0	2.0	2.2
TLR11	1.0	1.7	0.7	0.6
CXCR1	1.0	2.1	0.1	n.d.
CXCR2	1.0	4.0	0.2	0.1
CXCR3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CXCR4	1.0	4.5	0.4	0.3
CXCR5	1.0	0.6	0.7	0.7
CXCR6	1.0	1.5	1.1	0.7
CX3CR1	1.0	8.2	0.1	0.4
CCR1	1.0	4.5	0.8	1.2
CCR2	1.0	0.6	0.7	1.1
CCR3	1.0	3.0	1.4	1.1
CCR4	n.d.	n.d.	1.0	0.8
CCR5	1.0	0.8	2.6	3.2
CCR6	n.d.	n.d.	1.0	2.0
CCR7	1.0	8.1	110	31
CCR8	1.0	2.7	0.7	1.3
CCR9	1.0	3.9	1.4	1.2

n. d. : 検出不能

【 図 4 0 】

表 3

分画	刺激	サイトカイン (pg/ml)			
		IL-6	IL-10	IL-12	TNF-α
DC.com	なし	54	< 36	< 36	120
	LPS	290	< 36	56	820
	CpG	220	< 36	< 36	570
CD11c- DsRed-	なし	260	< 36	< 36	310
	LPS	1590	140	< 36	1160
	CpG	2440	76	< 36	720
CD11c+ DsRed+	なし	620	< 36	48	< 36
	LPS	> 3000	< 36	< 36	860
	CpG	> 3000	110	670	> 3000
CD11c+ DsRed-	なし	470	< 36	210	930
	LPS	> 3000	< 36	< 36	2400
	CpG	> 3000	120	250	> 3000

【 図 4 1 - 1 】

図 41A 表 4a 分布	DC.com	MO-MDSC	MO-MDSC	PMN-MDSC	PMN-MDSC
	BM, SP, PB	SP	SP	SP	SP
モデル	無傷	腫瘍 (EG7)	腫瘍 (SP3)	腫瘍 (EG7)	腫瘍 (SP3)
参照 #		3	3	3	3
MHC I	-	+++	+++	+++	+++
MHC II	-	-	-	-	-
CD1d	-	+	+	-	-
CD4	-	-	-	-	-
CD8	-	-	-	-	-
CD11a	+	++	++	++	++
CD11b	+	+	+	+	+
CD11c	-	-	-	-	-
CD14	-	-	-	-	-
CD19	-	-	-	-	-
CD24	+	-	-	-	-
CD25 (IL-2Rα)	-	-	-	-	-
CD31	-	+	+	-	-
CD34	-	-	-	-	-
CD40	-	-	-	-	-
CD43	+	+++	+++	+++	+++
CD45R (B220)	-	-	-	-	-
CD45RA	-	-	-	-	-
CD48	-	-	-	-	-
CD49a	-	-	-	-	-
CD49b	-	-	-	-	-
CD62L	+	+++	+++	+++	+++
CD80	-	++	++	++	++
CD86	-	-	-	-	-
CD103	-	-	-	-	-
CD117	-	-	-	-	-
CD135 (Flt3)	-	-	-	-	-
CD172a (Slrp-α)	+	-	-	-	-
CD184 (CXCR4)	-	-	-	-	-
CD185 (CXCR5)	-	-	-	-	-
CD192 (CCR2)	-/+	++	++	+	+
CD193 (CCR3)	-	-	-	-	-
CD195 (CCR5)	-	-	-	-	-
CD196 (CCR6)	-	-	-	-	-
CD197 (CCR7)	-	-	-	-	-
CD205 (DEC 205)	-	-	-	-	-
CD209a (DC-SIGN)	-	-	-	-	-
CD275	-	-	-	-	-
CD281	-	-	-	-	-
Gr-1	+	+	+	+	+
Ly6C	+	+++	+++	++-/+	++-/+
Ly6G	+	-	-	+	+
F4/80	-	++	++	-/+	-
Ly86	-	-	-	-	-
PDCA-1	-	-	-	-	-
Sca-1	-/+	-	+	-	-
CD1a	-	-	-	-	-
CD2	-	+	+	-	-

【 図 4 1 - 2 】

図 41A 表 4a 分析	DC.com	MO-MDSC	MO-MDSC	PMN-MDSC	PMN-MDSC
	BM, SP, PB	SP	SP	SP	SP
モデル	無傷	腫瘍 (EG7)	腫瘍 (SP3)	腫瘍 (EG7)	腫瘍 (SP3)
参照 #		3	3	3	3
CD13	-	-	-	-	-
CD16/32	+	+	+	+	+
CD22/35	-	-	-	-	-
CD23	-	-	-	-	-
CD33	-	-	-	-	-
CD36	-	-	-	-	-
CD44	-	+++	+++	+++	+++
CD49d	-	+++	+++	+	+
CD54	-	+++	+++	+	+
CD68	-	-	-	-	-
CD71	-	+	+	-	-
CD83	-	-	-	-	-
CD83 (AA4.1)	-	-	-	-	-
CD115 (MCSFR)	-/+	+	+	-	-
CD119 (BV4-90)	-	-	-	-	-
CD120a (TNFR1)	-	-	-	-	-
CD121 (IL-3R)	-	-	-	-	-
CD123 (IL-3Rα)	-	-	-	-	-
CD124 (IL-3Rβ)	-	-	-	-	-
CD131	-	-	-	-	-
CD135 (NK1.1)	-	+++	+++	+++	+++
CD182	-	-	-	-	-
CD189	-	-	-	-	-
CDw128 (CD8b)	-	-	-	-	-
CD202b (Tie-2)	-	-	-	-	-
CD204	-	-	-	-	-
CD207 (ラングレリン)	-	-	-	-	-
CD273 (BTDC)	-/+	-	-	-/+	-
CD274 (B7H1)	+	+	+	+	+
CD284 (TLR4)	-	-	-	-	-
CD267a/b (MGL1/2)	-	-	-	-	-
CX3CR1	-	-	-	-	-
MAC-2	++	++	+	+	+
7/4	+++	+++	++-/+	++-/+	++-/+
B7H4	-	-	-	-	-
EGFP99	-	-	-	-	-
アズロ GM1	-	-	-	-	-
33D1	-	-	-	-	-
FA11	-	-	-	-	-
MOXA1	-	-	-	-	-
CD150	-	-	-	-	-
CD226	-	-	-	-	-
FcγRIIa	-	-	-	-	-
インテグリン β7	-	-	-	-	-

DC.com及びCD11b+Gr-1+群を自家マウス脾臓細胞集団間の表面発現量の比較。DC.comは公知のGr-1+CD11b+骨髄マウス脾臓細胞集団のいずれとも表面発現型で区別可能である点に留意されたい。

【 図 4 1 - 3 】

図 41B -表 4B 分布	抑制性 単球	MDSC	MSC	MSC	MDSC
	SP	SP	SP	SP	SP
モデル	EAE	円形脱毛症	外傷性ストレス	無傷	腫瘍 (MAC26)
参照 #	4	5	6	6	7
MHC I			+	-	
MHC II	-		lo	lo	
CD1d					
CD4			-	-	
CD8			-	-	
CD11a	+				
CD11b	+	+	+	+	+
CD11c	-		lo	lo	
CD14			-	-	
CD19			-	-	
CD24					
CD25 (IL-2Rα)					
CD31		+	lo	lo	
CD34			lo	-	
CD40	-		lo	-	
CD43		+			
CD45R (B220)			-	-	
CD45RA					
CD48					
CD49a					
CD49b					
CD62L	-				
CD80	-		lo	lo	
CD86	-		lo	lo	
CD103					
CD117					
CD135 (Flt3)					
CD172a (SIRP-α)					
CD184 (CXCR4)					
CD185 (CXCR5)					
CD192 (CCR2)					
CD193 (CCR3)					
CD195 (CCR5)					
CD196 (CCR6)					
CD197 (CCR7)					
CD205 (DEC 205)			-	-	
CD209a(DC-SIGN)					
CD275					
CD281					
Gr-1	+	+			+
Ly6C	+				
Ly6G	-				
F4/80	+		lo	lo	+
Ly86					
PDCA-1					
Sca-1					
CD1a					
CD2	-				
CD3			-	-	
CD13			-	-	

【 図 4 1 - 4 】

図 41B -表 4B 分布	抑制性 単球	MDSC	MSC	MSC	MDSC
	SP	SP	SP	SP	SP
モデル	EAE	円形脱毛症	外傷性ストレス	無傷	腫瘍 (MAC26)
参照 #	4	5	6	6	7
CD16/32			lo	lo	
CD21/35					
CD23					
CD33					
CD36			-	-	
CD44		+			
CD49d	+				
CD54					
CD68			-	-	
CD71					
CD83					
CD93 (AA4.1)	+				
CD115 (MCSFR)					+
CD119 (IFN-gRa)		+			
CD120a (TNFR1)		+			
CD121 (IL-1R)					
CD123 (IL-3Rα)					
CD124 (IL-4Rα)					
CD131			-	-	
CD161c (NK1.1)			-	-	
CD162					
CD169					
CDw198 (CCR8)		+			
CD202b (Tie-2)					
CD204					
CD207 (ラングリン)					
CD273 (B7DC)					
CD274 (B7H1)	-				
CD284 (TLR4)					
CD301a/b (MGL1/2)					
CX3CR1					
MAC-2					
7/4					
B7H4					
ER-MP58					
アシアロ GM1					
33D1					
FA11					
MOMA1					
CD150					
CD326					
FcεR1a					
インテグリン β7					
ST2					

DC.com 及び CD11b+/Gr-1+ 骨髄由来サブプレッサー細胞集団の間の表面表現型の比較。DC.com は  
 公知の Gr-1+/CD11b+ 骨髄サブプレッサー集団のいずれとも表面表現型で区別可能である点に留意されたい。

【 図 4 1 - 5 】

図 41C -表 4C 分布	MSC	MSC	MSC	MSC	MSC
	SP	SP	SP	SP	BM
モデル	腫瘍 (C26-GM)	腫瘍 (4T1)	腫瘍 (4T1/IL-1b)	腫瘍 (4T1)	無傷 (培養)
参照 #	8	9	9	10	11
MHC I		+	+	+	+
MHC II		-	-	-	-
CD1d					+
CD4		-	-	-	-
CD8		+	+	+	-
CD11a					
CD11b	+	+	+	+	+
CD11c		-	-	+	-
CD14		-	+		-
CD19					
CD24					
CD25 (IL-2Rα)					-
CD31		+	-		+
CD34		-	-		+
CD40		-	-	+	-
CD43					
CD45R (B220)		+	+	+	-
CD45RA					
CD48					
CD49a					
CD49b					-
CD62L	+				+
CD80		-	+	-	+
CD86		+	+	+	+
CD103					
CD117					
CD135 (Flt3)					
CD172a (SIRP-α)					
CD184 (CXCR4)					
CD185 (CXCR5)					
CD192 (CCR2)	+				
CD193 (CCR3)					
CD195 (CCR5)					
CD196 (CCR6)					
CD197 (CCR7)					
CD205 (DEC 205)		-	-	-	-
CD209a(DC-SIGN)					
CD275					
CD281					
Gr-1	+	+	+	+	+
Ly6C					+
Ly6G					+
F4/80		-	-	-	+
Ly86					
PDCA-1					
Sca-1					
CD1a					
CD2					
CD3		-	-	-	
CD13					-

【 図 4 1 - 6 】

図 41C -表 4C 分布	MSC	MSC	MSC	MSC	MSC
	SP	SP	SP	SP	BM
モデル	腫瘍 (C26-GM)	腫瘍 (4T1)	腫瘍 (4T1/IL-1b)	腫瘍 (4T1)	無傷 (培養)
参照 #	8	9	9	10	11
CD16/32		+	+	-	+
CD21/35					
CD23		+	+		
CD33				-	
CD36					
CD44		+	+	+	
CD49d					
CD54					+
CD68					
CD71					
CD83		-	+		
CD93 (AA4.1)					
CD115 (MCSFR)					
CD119 (IFN-gRa)					
CD120a (TNFR1)					
CD121 (IL-1R)		-	-		
CD123 (IL-3Rα)					-
CD124 (IL-4Rα)		+	+		
CD131					
CD161c (NK1.1)					-
CD162					
CD169					-
CDw198 (CCR8)					
CD202b (Tie-2)					
CD204					
CD207 (ラングリン)	+				
CD273 (B7DC)		-	-	-	
CD274 (B7H1)					
CD284 (TLR4)					-
CD301a/b (MGL1/2)					
CX3CR1					
MAC-2					
7/4					
B7H4					
ER-MP58					+
アシアロ GM1					+
33D1					-
FA11					-
MOMA1					-
CD150					
CD326					
FcεR1a					
インテグリン β7					
ST2					

DC.com 及び CD11b+/Gr-1+ 骨髄由来サブプレッサー細胞集団の間の表面表現型の比較。DC.com は  
 公知の Gr-1+/CD11b+ 骨髄サブプレッサー集団のいずれとも表面表現型で区別可能である点に留意されたい。

【 図 4 2 - 1 】

表 5A 分布 参照 #	DC.com BM, SP, PB	pre-DC BM	pro-DC BM	食作用性 単球 皮下組織 13	炎症性 単球 PB 14	Vβ7 <sup>+</sup> リンパ 単球 PB 14
MHC I	-	-	-	-	-	-
MHC II	-	-	-	-	-	-
CD16	-	-	-	-	-	-
CD4	-	-	-	-	-	-
CD8	-	-	-	-	-	-
CD11a	+	+	+	-	-	++
CD11b	+	+	-/+	+	+	+
CD11c	-	+	-	-	-	-
CD14	-	-	-	-	-	-
CD19	-	-	-	-	-	-
CD24	+	-	-	-	-	-
CD25 (IL-2Rα)	-	-	-	-	-	-
CD31	-	-	-	-	++	+
CD34	-	-	-	-	-	-
CD40	-	-	-	-	-	-
CD43	+	+	+/+	-	-	-
CD45R (B220)	-	-/+	-	-	-	-
CD45RA	-	-/+	-	-	-	-
CD48	-	-	-	-	-	-
CD49a	-	-	-	-	-	-
CD49b	-	-	-	-	-	-
CD62L	+	-	-	-	+	-
CD80	-	-	-	-	-	-
CD86	-	-	-	-	-	-
CD103	-	-	-	-	-	-
CD117	-	-	-	+	-	-
CD133 (Flk3)	-	-	-	-	-	-
CD172a (Sirp- α)	+	-	-	-	-	-
CD184 (CXCR4)	-	-	-	-	-	-
CD185 (CXCR5)	-	-	-	-	-	-
CD192 (CCR2)	-/+	-	-	-	+	-
CD193 (CCR3)	-	-	-	-	-	-
CD195 (CCR5)	-	-	-	-	-	-
CD196 (CCR6)	-	-	-	-	-	-
CD197 (CCR7)	-	-	-	-	-	-
CD205 (DEC 205)	-	-	-	-	-	-
CD209a(DC- SIGN)	-	-	-	-	-	-
CD275	-	-	-	-	-	-
CD281	-	-	-	-	-	-
Gr-1	+	-	-	-	+	-
Ly6C	+	+	-	-	-	-
Ly6G	+	-	-	-	+	+
F4/80	-	-/+	-	-	-	-

【 図 4 2 - 2 】

表 5A 分布 参照 #	DC.com BM, SP, PB	pre-DC BM	pro-DC BM	食作用性 単球 皮下組織 13	炎症性 単球 PB 14	Vβ7 <sup>+</sup> リンパ 単球 PB 14
Ly6E	-	-	-	-	-	-
PDCA-1	-	-	-	-	-	-
Sca-1	-/+	+	-/+	-	-	-
CD1a	-	-	-	-	-	-
CD3	-	-	-	-	-	-
CD9	-	-	-	-	-	-
CD16/32	-	-	-	-	-	-
CD18	-	-	-	-	-	-
CD38	+	-	-	-	-	-
CD44	-	-	-	-	-	-
CD45	-	-	-	-	-	-
CD45RO	-	-	-	-	-	-
CD45d	-	-	-	-	-	-
CD51	-	-	-	-	-	-
CD54	-	-	-	-	-	-
CD69	-	-	-	-	-	-
CD83	-	-	-	-	-	-
CD90.1(Thy1.1)	-	-	-	-	-	-
CD93 (AA.1)	-	-	-	-	-	-
CD115 (MCSFR)	-/+	+	+	-	-	-
CD116 (GM- CSFR)	-	-	-	-	-	-
CD122 (IL- 2Rβ)	-	-	-	-	-	-
CD123 (IL- 3Rα)	-	-	-	-	-	-
CD127 (IL- 7Rα)	-	-	-	-	-	-
CD130	-	-	-	-	-	-
CD154	-	-	-	-	-	-
CD161c (NK1.1)	-	-	-	-	-	-
CD207 (ラングリン)	-	-	-	-	-	-
CD326	-	-	-	-	-	-
CXCR1	-	-	-	-	-	-
FcγRIIa	-	-	-	-	-	-
インテグリン β7	-	-	-	-	-	-
MAC-2	-	-	-	-	-	-
MAC-3	-	-	-	-	-	-
ST2	-	-	-	-	-	-
TCRβ	-	-	-	-	-	-
Ter-119	-	-	-	-	-	-

DC.com 及び公報の DC 前駆体の間の表面発現量の比較。  
DC.com の表面発現量は、既に公報の DC 前駆体のそれとは完全に異なる点に留意されたい。

【 図 4 2 - 3 】

表 5B 分布 参照 #	MDP BM	DC 前駆 前駆体 PB	LC 前駆体 (ヒト) 表皮 17	Flt3+ CMP BM	B220- DCp BM, SP	FLT3+ M-CSFR+ DCp BM
MHC I	-	-	-	-	-	-
MHC II	-	-	-	-	-	-
CD1d	-	-	-	-	-	-
CD4	-	-	-	-	-	-
CD8	-	-	-	-	-	-
CD11a	-	-	-	-	-	-
CD11b	-	+	+	-	-	-
CD11c	-	+	-	-	+(sub)	-
CD14	-	-	-	-	-	-
CD19	-	-	-	-	-	-
CD24	-	-	-	-	-	-
CD25 (IL-2Rα)	-	-	-	-	-	-
CD31	-	-	-	-	-	-
CD34	+	-	-	+	-	+
CD40	-	-	-	-	-	-
CD43	-	+	-	-	-	-
CD45R (B220)	-	-	-	-	-	-
CD45RA	-	-	-	-	-	-
CD48	-	-	-	-	-	-
CD49a	-	-	-	-	-	-
CD49b	-	-	-	-	-	-
CD62L	-	+	-	-	lo	+
CD80	-	-	-	-	-	-
CD86	-	-	-	-	-	-
CD103	-	-	-	-	-	-
CD117	+	-	-	+	-	Int
CD133 (Flk3)	-	-	-	+	-	+
CD172a (Sirp- α)	-	-	-	-	-	-
CD184 (CXCR4)	-	-	-	-	-	-
CD185 (CXCR5)	-	-	-	-	-	-
CD192 (CCR2)	-	-	-	-	-	-
CD193 (CCR3)	-	-	-	-	-	-
CD195 (CCR5)	-	-	-	-	-	-
CD196 (CCR6)	-	-	-	-	-	-
CD197 (CCR7)	-	-	-	-	-	-
CD205 (DEC 205)	-	-	-	-	-	-
CD209a(DC- SIGN)	-	-	-	-	-	-
CD275	-	-	-	-	-	-
CD281	-	-	-	-	-	-
Gr-1	-	-	-	-	-	-
Ly6C	-	-	-	-	-	-
Ly6G	-	-	-	-	-	lo
F4/80	-	-	-	-	-	-

【 図 4 2 - 4 】

表 5B 分布 参照 #	MDP BM	DC 前駆 前駆体 PB	LC 前駆体 (ヒト) 表皮 17	Flt3+ CMP BM	B220- DCp BM, SP	FLT3+ M-CSFR+ DCp BM
Ly6E	-	-	-	-	-	-
PDCA-1	-	-	-	-	-	-
Sca-1	-	-	-	-	-	-
CD1a	-	-	-	-	-	-
CD3	-	-	-	-	-	-
CD9	-	-	-	-	-	-
CD16/32	+	+	-	-	lo	-
CD18	-	-	-	-	-	-
CD38	-	-	-	-	-	-
CD44	-	-	-	-	-	-
CD45	-	-	-	-	-	-
CD45RO	-	-	-	-	-	-
CD45d	-	-	-	-	-	-
CD51	-	-	-	-	-	-
CD54	-	-	-	-	-	-
CD69	-	-	-	-	-	-
CD83	-	-	-	-	-	-
CD90.1(Thy1.1)	-	-	-	-	-	-
CD93 (AA.1)	-	-	-	-	-	-
CD115 (MCSFR)	-	-	-	-	-	lo
CD116 (GM- CSFR)	-	-	-	-	-	-
CD122 (IL- 2Rβ)	-	-	-	-	-	-
CD123 (IL- 3Rα)	-	-	-	-	-	-
CD127 (IL- 7Rα)	-	-	-	-	-	-
CD130	-	-	-	-	-	-
CD154	-	-	-	-	-	-
CD161c (NK1.1)	-	-	-	-	-	-
CD207 (ラングリン)	-	-	-	-	-	-
CD326	-	-	-	-	-	-
CXCR1	-	-	-	-	-	-
FcγRIIa	+	-	-	-	-	-
インテグリン β7	-	-	-	-	-	-
MAC-2	-	-	-	-	-	-
MAC-3	-	-	-	-	-	-
ST2	-	-	-	-	-	-
TCRβ	-	-	-	-	-	-
Ter-119	-	-	-	-	-	-

DC.com 及び公報の DC 前駆体の間の表面発現量の比較。  
DC.com の表面発現量は、既に公報の DC 前駆体のそれとは完全に異なる点に留意されたい。

【 図 4 2 - 5 】

図 42C 表 5C 分布 参照 #	CD11c lo CD45RA hi preDC PB 21	CD116 int CD45RA- preDC PB 21	pre-DC SP 22	Gr-1 hi 系球 PB 23	pDC BM 24	pre- 免疫細胞 BM, PB 25	pre CD8+ DC SP 26
生成	pDC						
MHC I							
MHC II							
CD1d							
CD4							
CD8							
CD11a							
CD11b							
CD11c	lo	int	+	+	+	+	+
CD14							
CD19							
CD24							
CD25 (IL-2Rα)							
CD31							
CD34							
CD46	lo	lo					
CD43							
CD45R (B220)	+	lo	-/+	-	+	+	-
CD45RA	hi		-/+				
CD48							
CD49a							
CD49b							
CD62L	lo	lo	-/+	+	+	+	-
CD80							
CD86							
CD103							
CD117							
CD135 (Flt3)							
CD172a (Sirp- c)			+				
CD184 (CXCR4)							
CD185 (CXCR5)							
CD192 (CCR2)							
CD193 (CCR3)							
CD195 (CCR5)							
CD196 (CCR6)							
CD197 (CCR7)							
CD205 (DEC 205)			-/+				
CD209a(DC- SIGN)							
CD275							
CD281							
Gr-1				+	+	+	-
Ly6C				+	+	+	-
Ly6G				-/+	+	-	-
F4/80							
Ly86							

【 図 4 2 - 6 】

図 42C 表 5C 分布 参照 #	CD11c lo CD45RA hi preDC PB 21	CD11c int CD45RA- preDC PB 21	pre-DC SP 22	Gr-1 hi 系球 PB 23	pDC BM 24	pre- 免疫細胞 BM, PB 25	pre CD8+ DC SP 26
生成	pDC						
PDCA-1							
Sca-1	+	lo					
CD1a							
CD3							
CD9							
CD16/32							
CD18							
CD38	lo	+					
CD34							
CD45							
CD45RO							
CD49d							
CD51							
CD54							
CD59							
CD83							
CD90.1(Thy1.1)							
CD93 (AA4.1)							
CD115 (MCSFR)							
CD116 (GM- CSFR)							
CD122 (IL-2Rβ)							
CD123 (IL-3Rα)							
CD127 (IL-7Rα)							
CD150							
CD154							
CD161c (NK1.1)							
CD207 (ラングリン)							
CD326							
CXCR1 FcεR1a					lo		
インテグリン β7							
MA6-2							
MA6-3							
ST2							
TCRβ							
Tcr-119							

DC.com 及び公知の DC 前駆体の間の表型差の比較。  
DC.com の表型差現型は、既に公知の DC 前駆体のそれとは完全に異なる点に留意されたい。

【 図 4 2 - 7 】

図 42D 表 5D 分布 参照 #	Flt3+ CMP BM 27	B220- DCp BM 28	B220+ DCp BM 28	Flt3+ CMP BM 29	Flt3+ CLP BM 29	VEDC 前駆体 BM 30	LSP BM 31
生成	LC						
MHC I							
MHC II							
CD1d							
CD4							
CD8							
CD11a							
CD11b		+					
CD11c		+					
CD14							
CD19							
CD24							
CD25 (IL-2Rα)							
CD31							
CD34	+						
CD40							
CD43							
CD45R (B220)							
CD45RA							
CD48							
CD49a							
CD49b							
CD62L							
CD80							
CD86							
CD103							
CD117	hi						hi
CD135 (Flt3)	+		lo	+	+		-/+
CD172a (Sirp- c)							
CD184 (CXCR4)							
CD185 (CXCR5)							
CD192 (CCR2)							
CD193 (CCR3)							
CD195 (CCR5)							
CD196 (CCR6)							
CD197 (CCR7)							
CD205 (DEC 205)							
CD209a(DC- SIGN)							
CD275							
CD281							
Gr-1			+	+	+		hi
Ly6C			+	+	+		
Ly6G							
F4/80							+
Ly86							

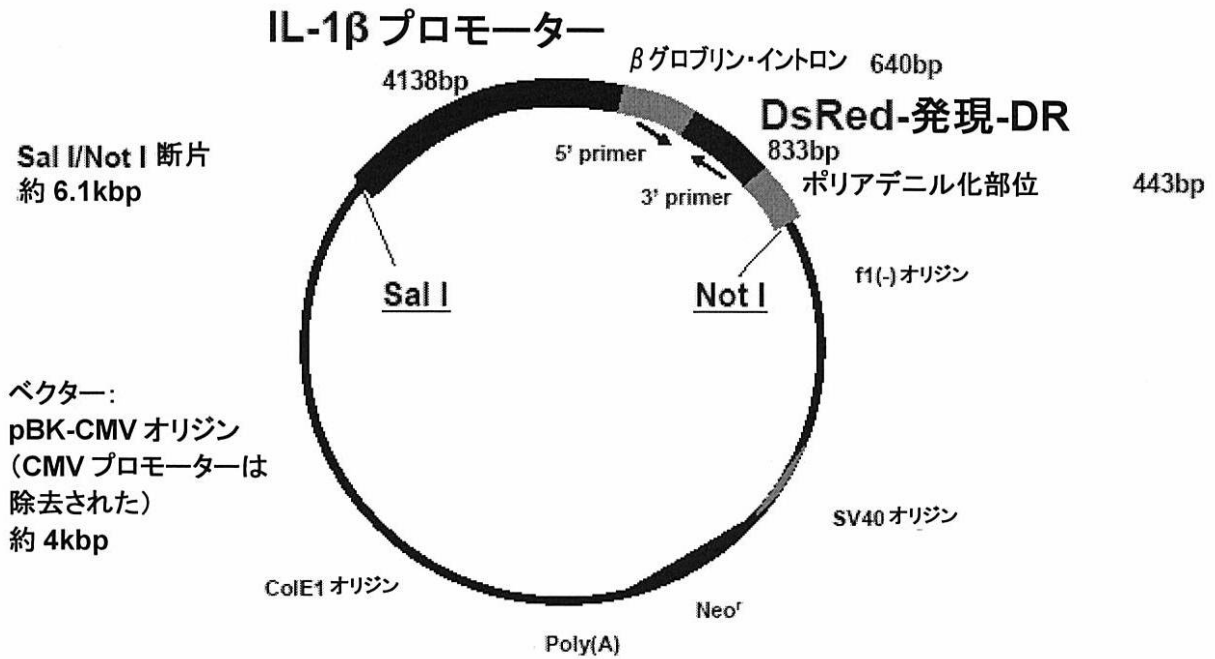
【 図 4 2 - 8 】

図 42D 表 5D 分布 参照 #	Flt3+ CMP BM 27	B220- DCp BM 28	B220+ DCp BM 28	Flt3+ CMP BM 29	Flt3+ CLP BM 29	VEDC 前駆体 BM 30	LSP BM 31
生成	LC						
PDCA-1							
Sca-1	+	lo					
CD1a							
CD3							
CD9							
CD16/32					lo		
CD18							
CD38							
CD44							
CD45							
CD45RO							
CD49d							
CD51							
CD54							
CD59							
CD83							
CD90.1(Thy1.1)							
CD93 (AA4.1)							
CD115 (MCSFR)							
CD116 (GM- CSFR)							
CD122 (IL-2Rβ)							
CD123 (IL-3Rα)		lo	lo				
CD127 (IL-7Rα)							
CD150							
CD154							
CD161c (NK1.1)							
CD207 (ラングリン)							
CD326							
CXCR1 FcεR1a							
インテグリン β7							
MA6-2							
MA6-3							
ST2							
TCRβ							
Tcr-119							

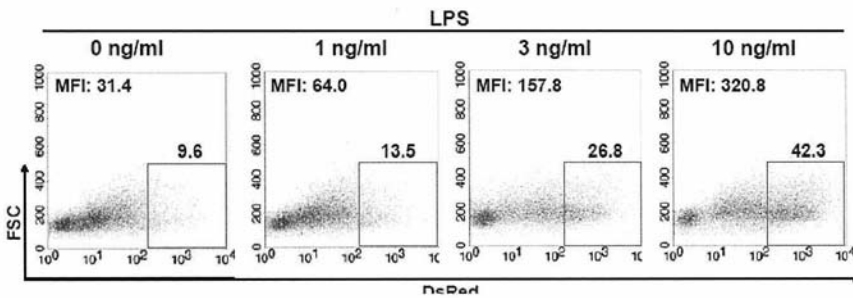
DC.com 及び公知の DC 前駆体の間の表型差の比較。  
DC.com の表型差現型は、既に公知の DC 前駆体のそれとは完全に異なる点に留意されたい。

【 図 1 】

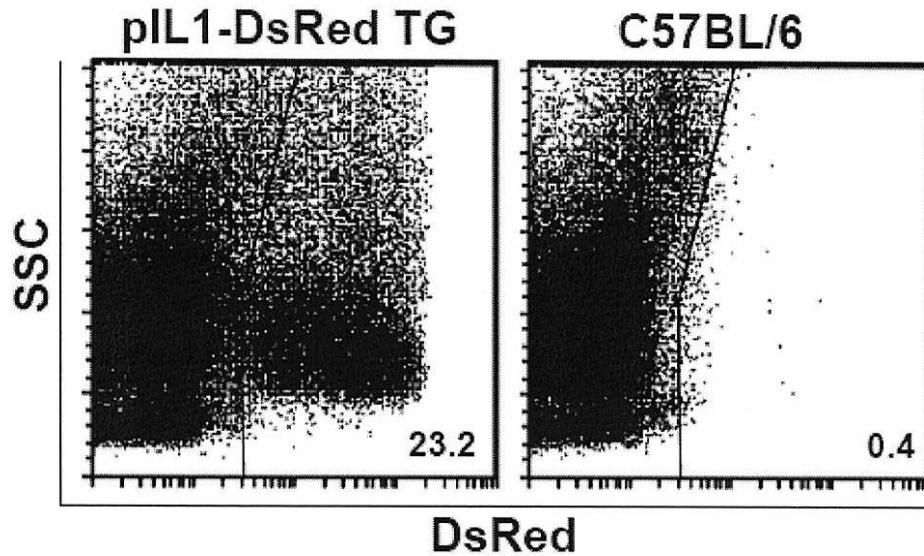
# pIL1-DsRed TG マウス



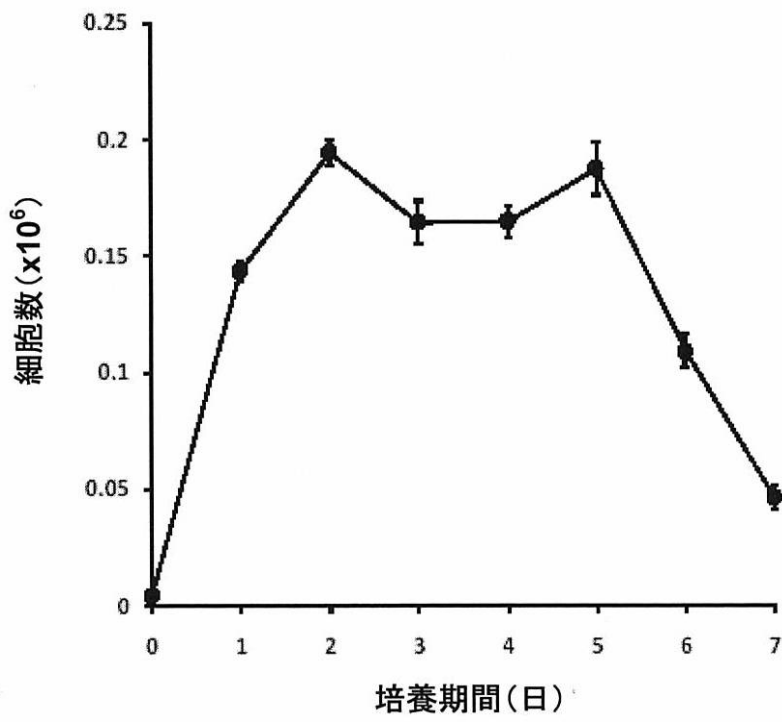
【 図 2 】



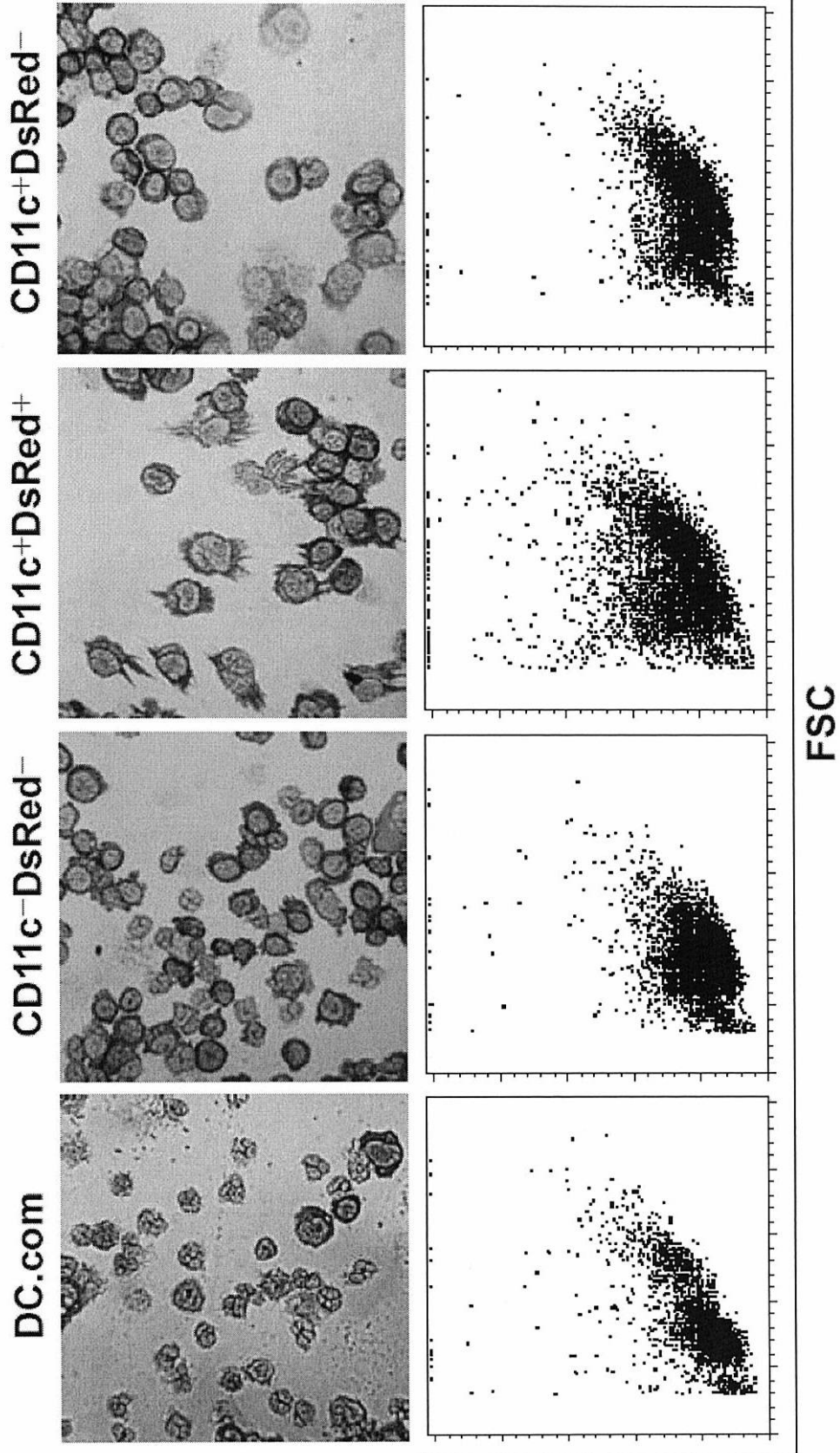
【 図 3 】



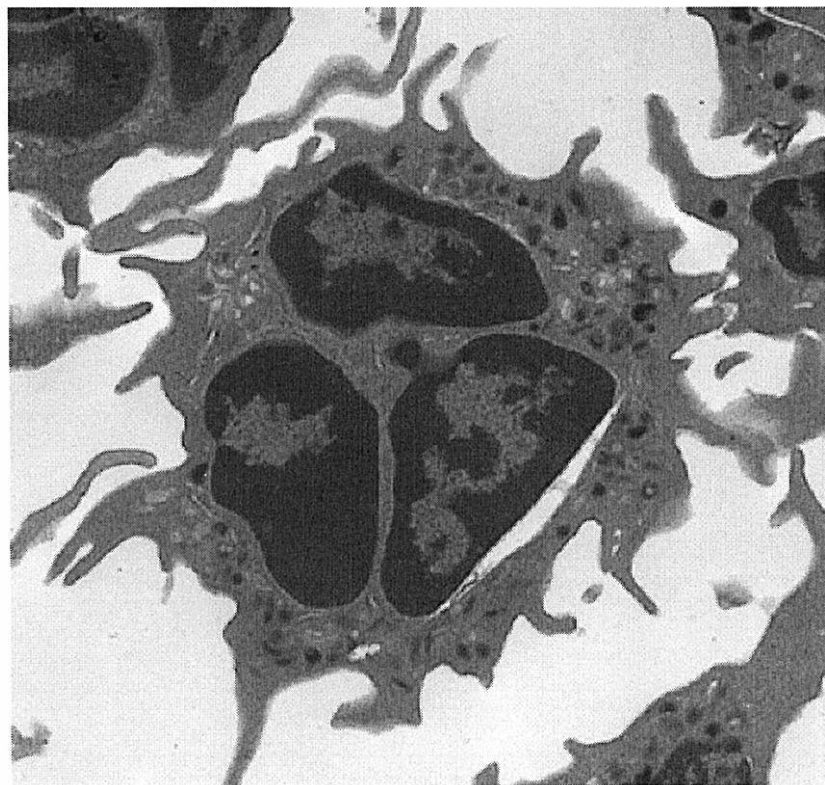
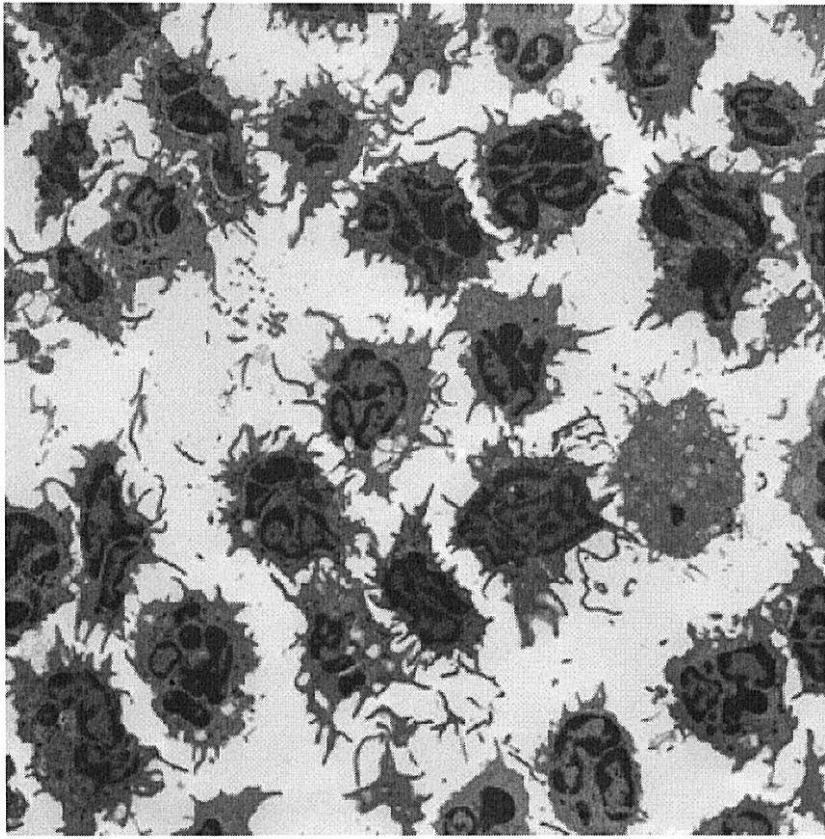
【 図 4 】



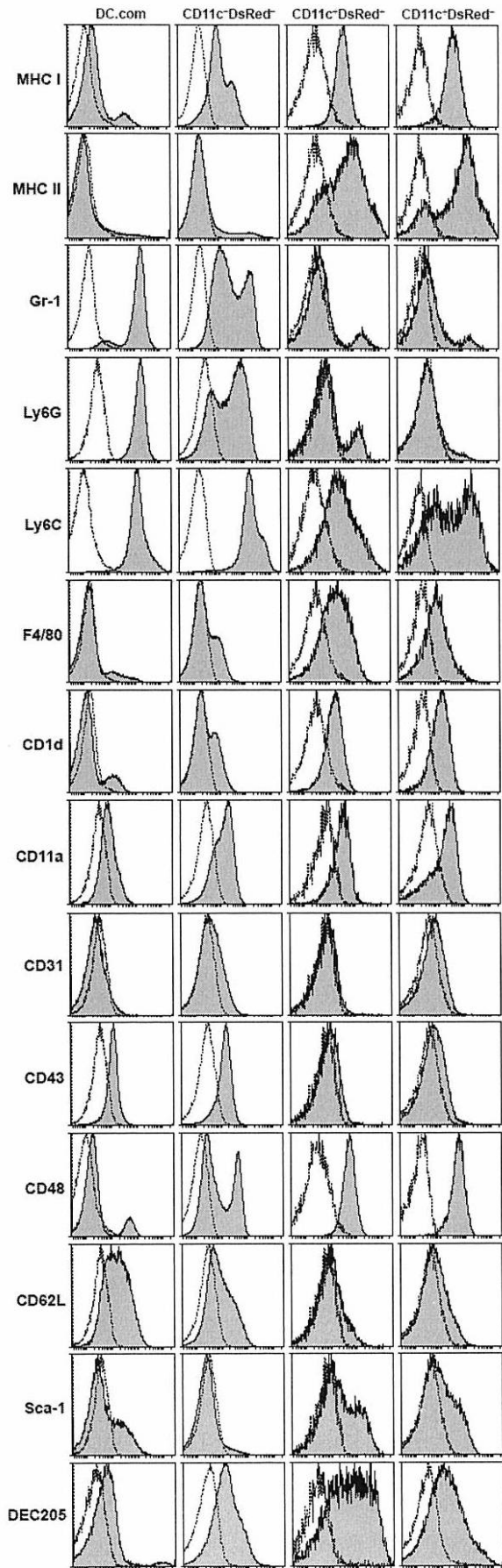
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 4 】



【 図 15 】

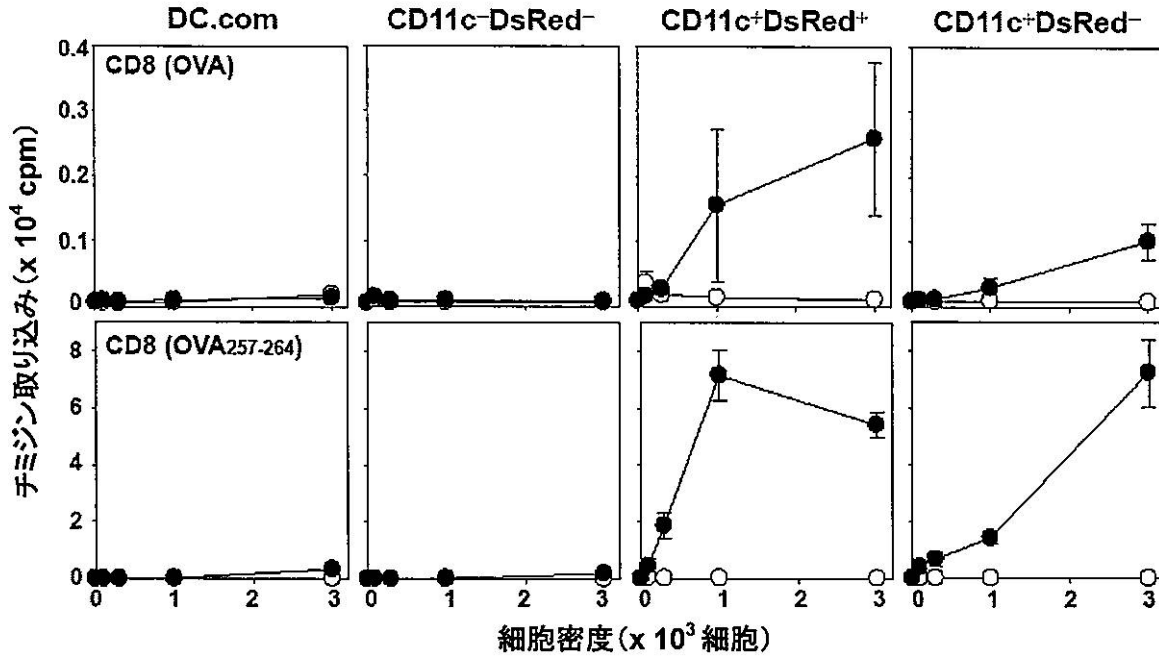


図 15A

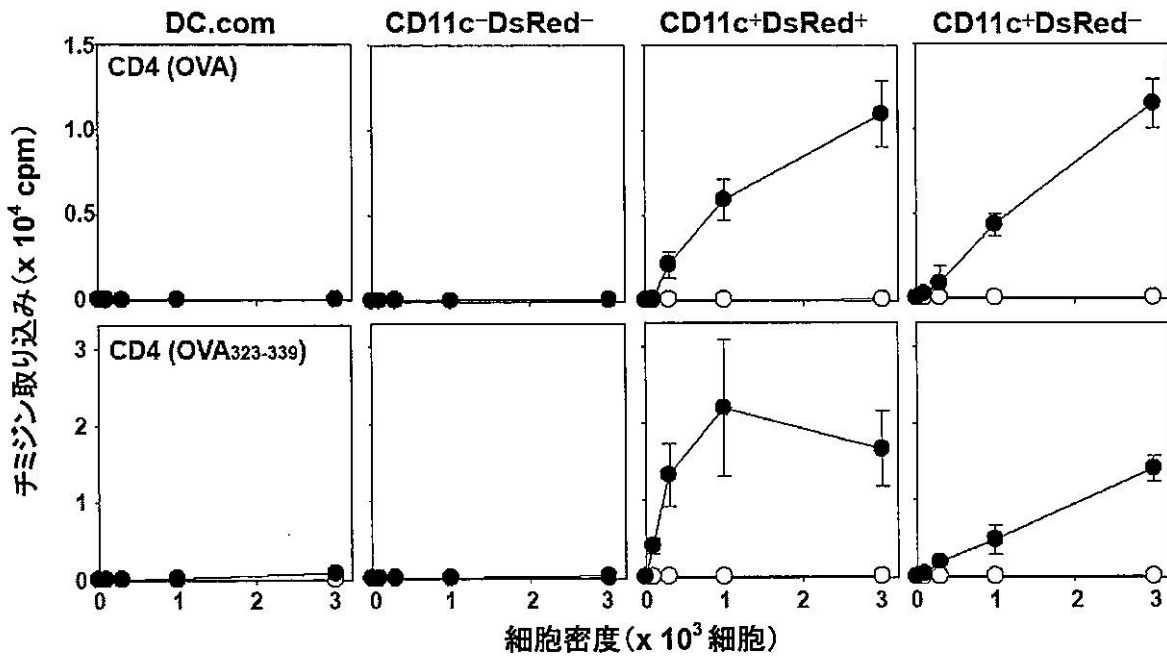
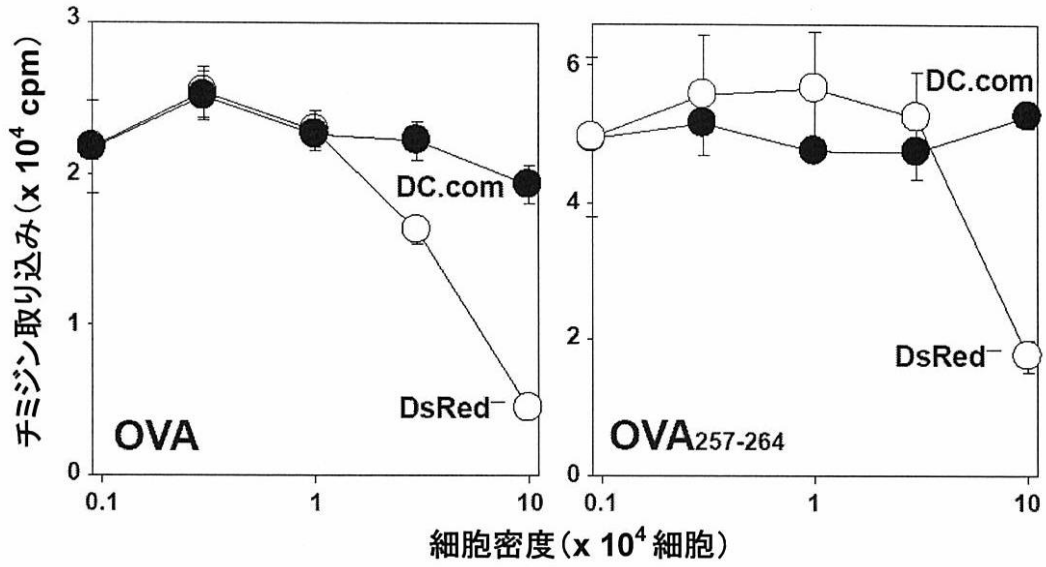
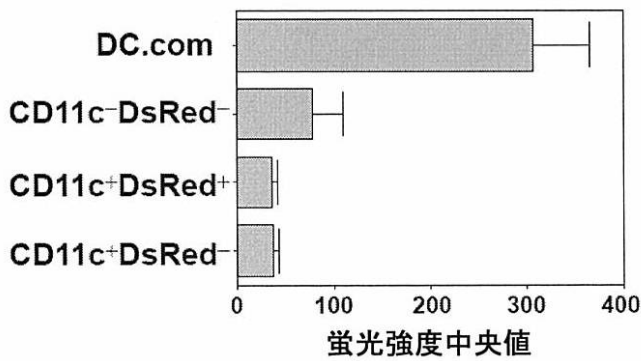
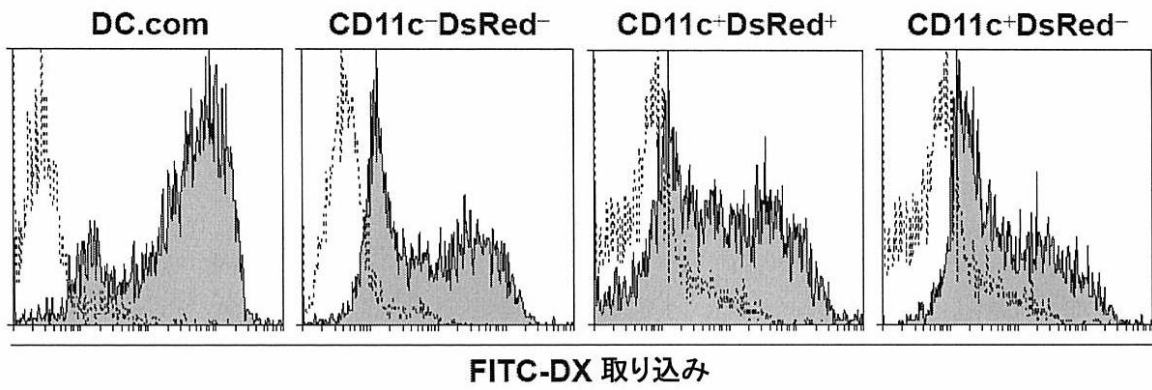


図 15B

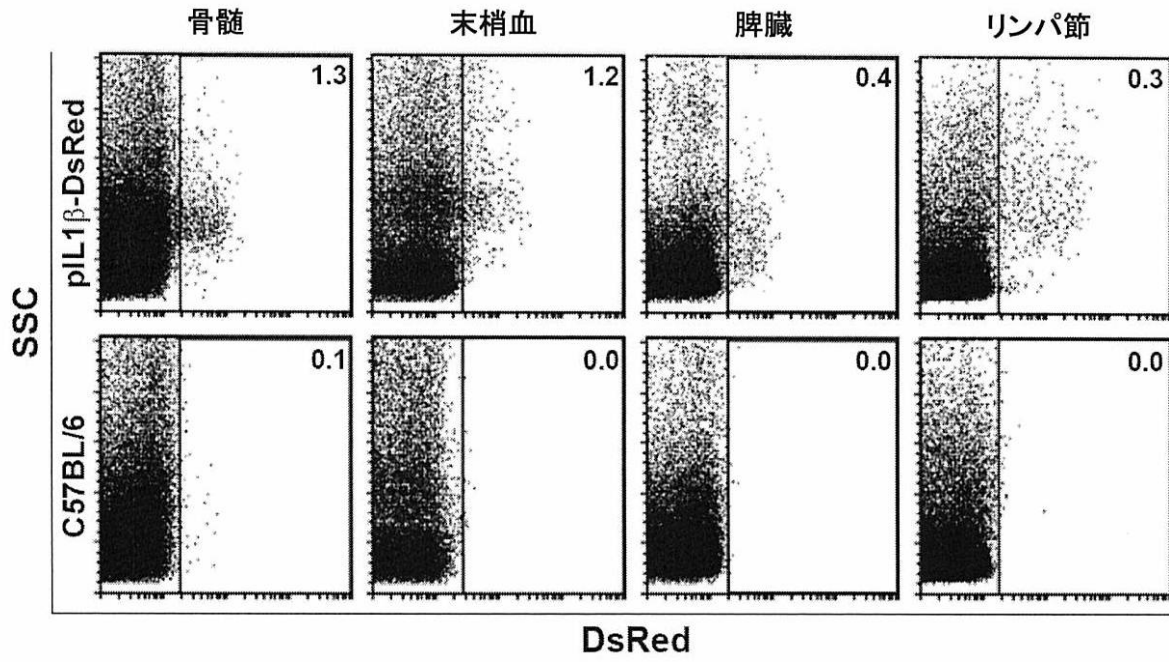
【 図 1 6 】



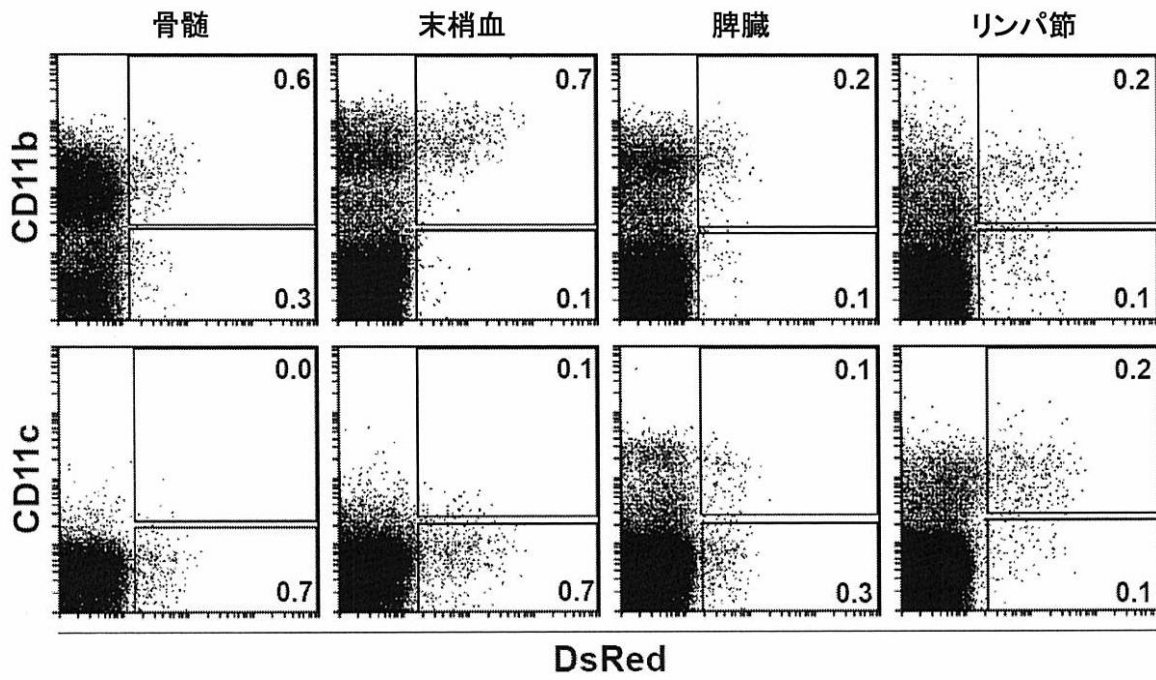
【 図 1 7 】



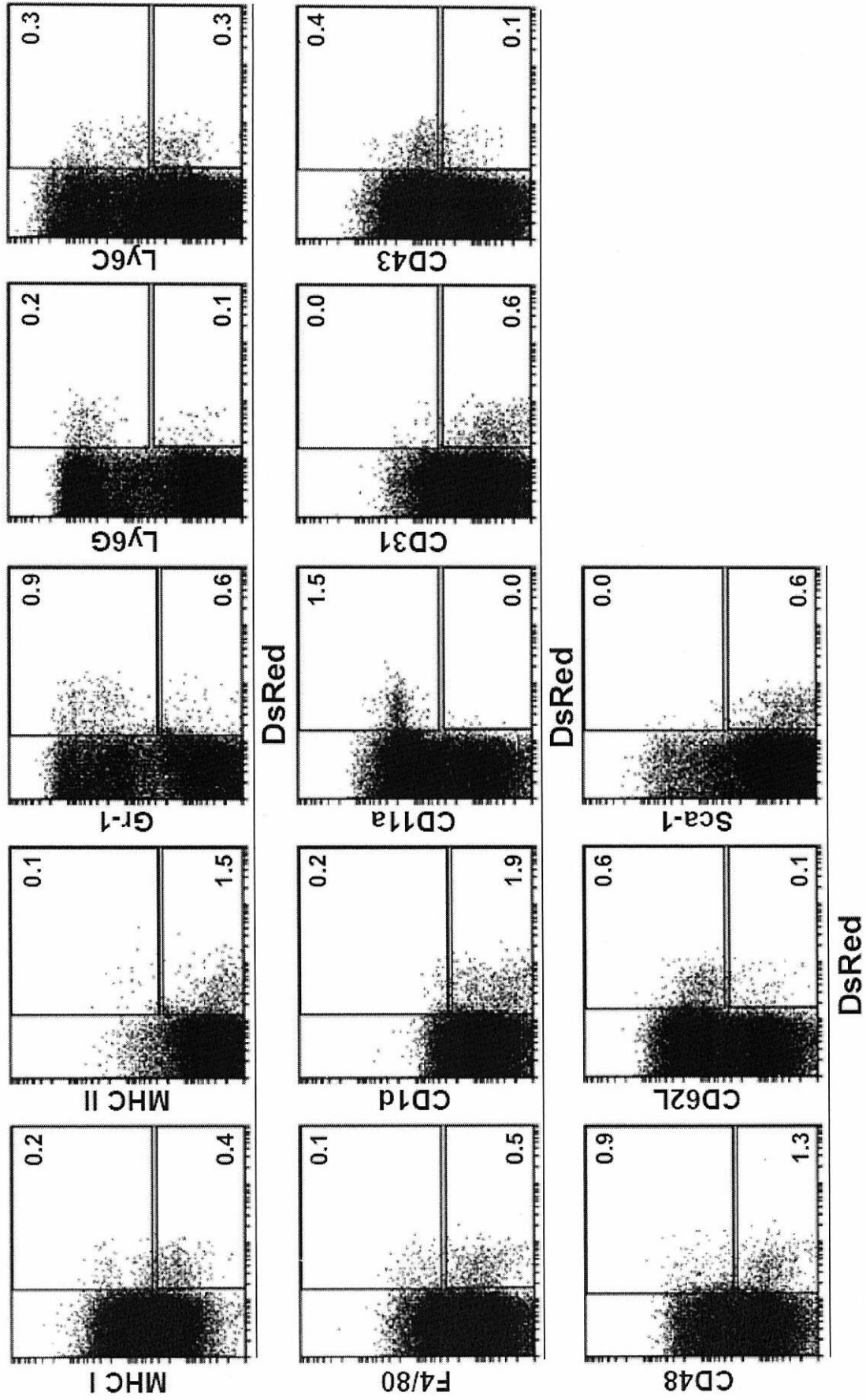
【 図 1 8 】



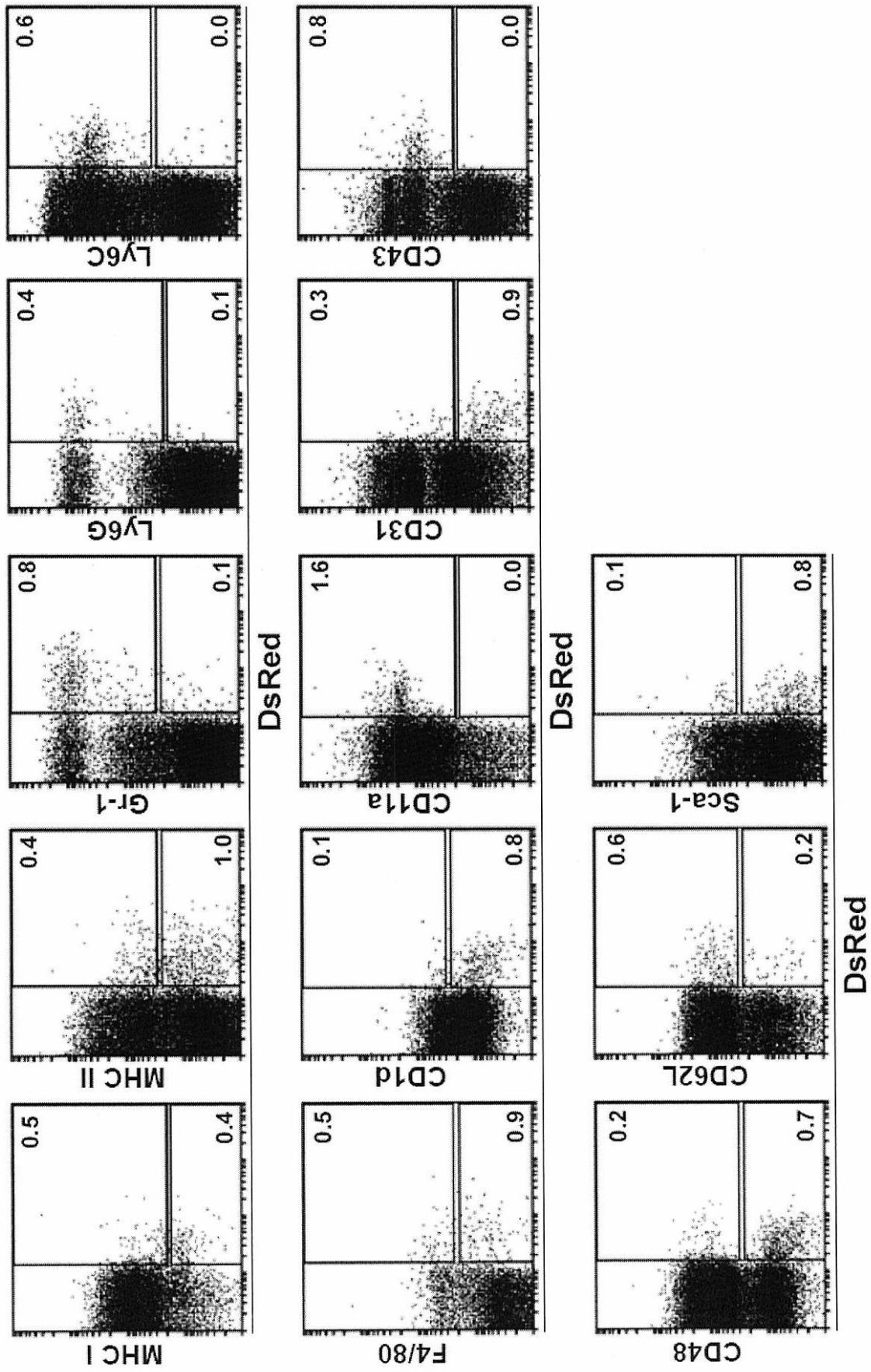
【 図 1 9 】



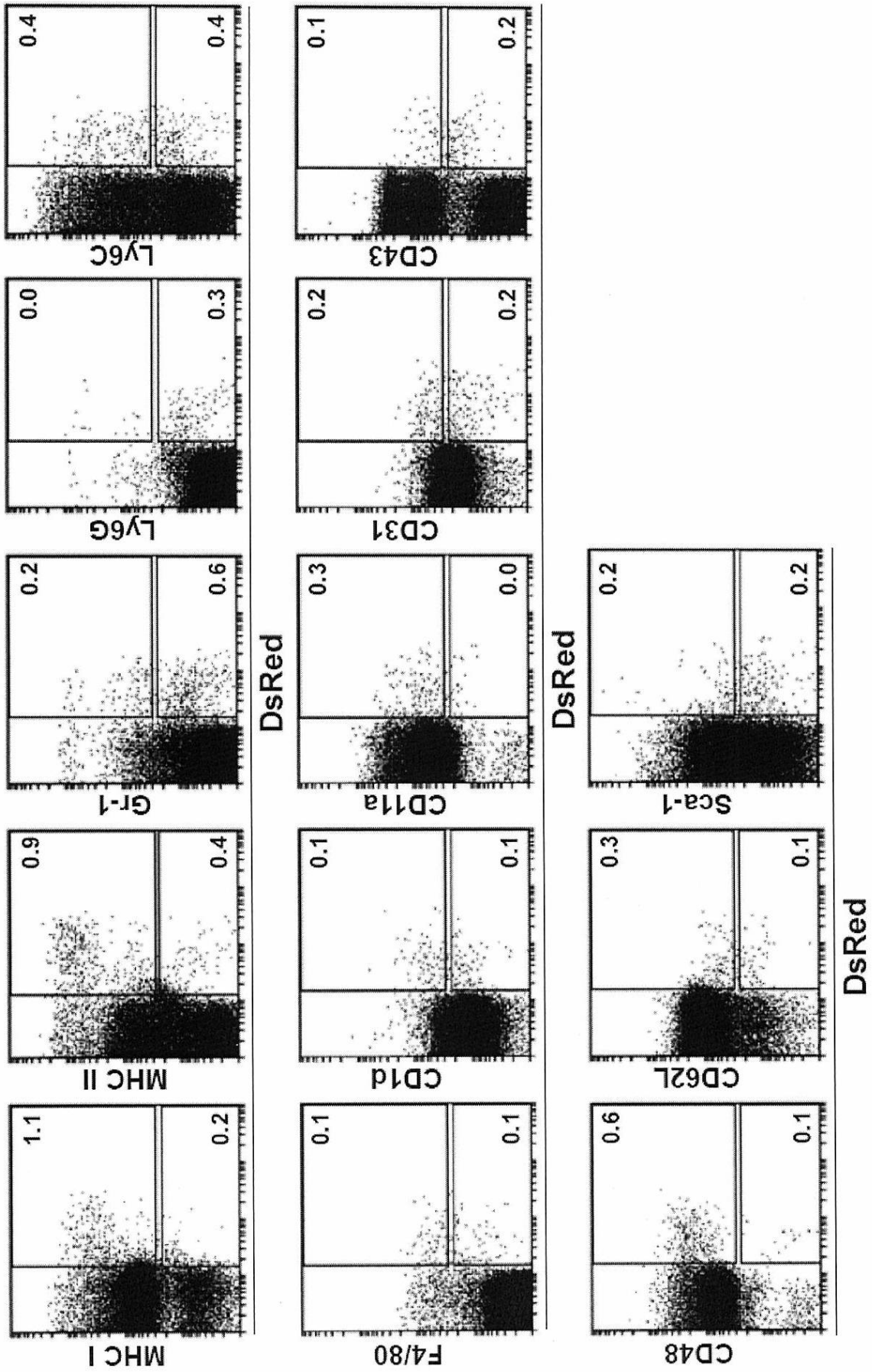
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 2 2 】



【 図 2 3 】

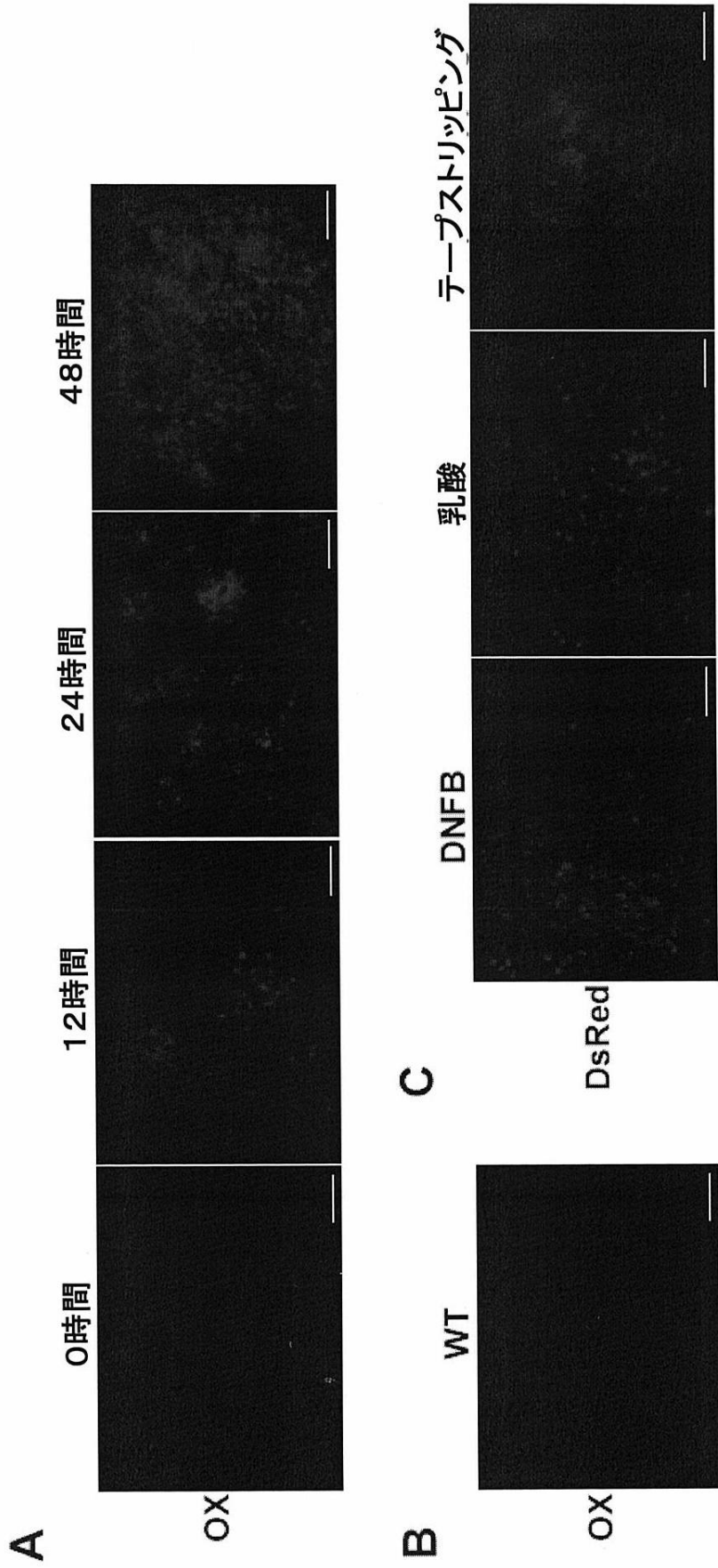
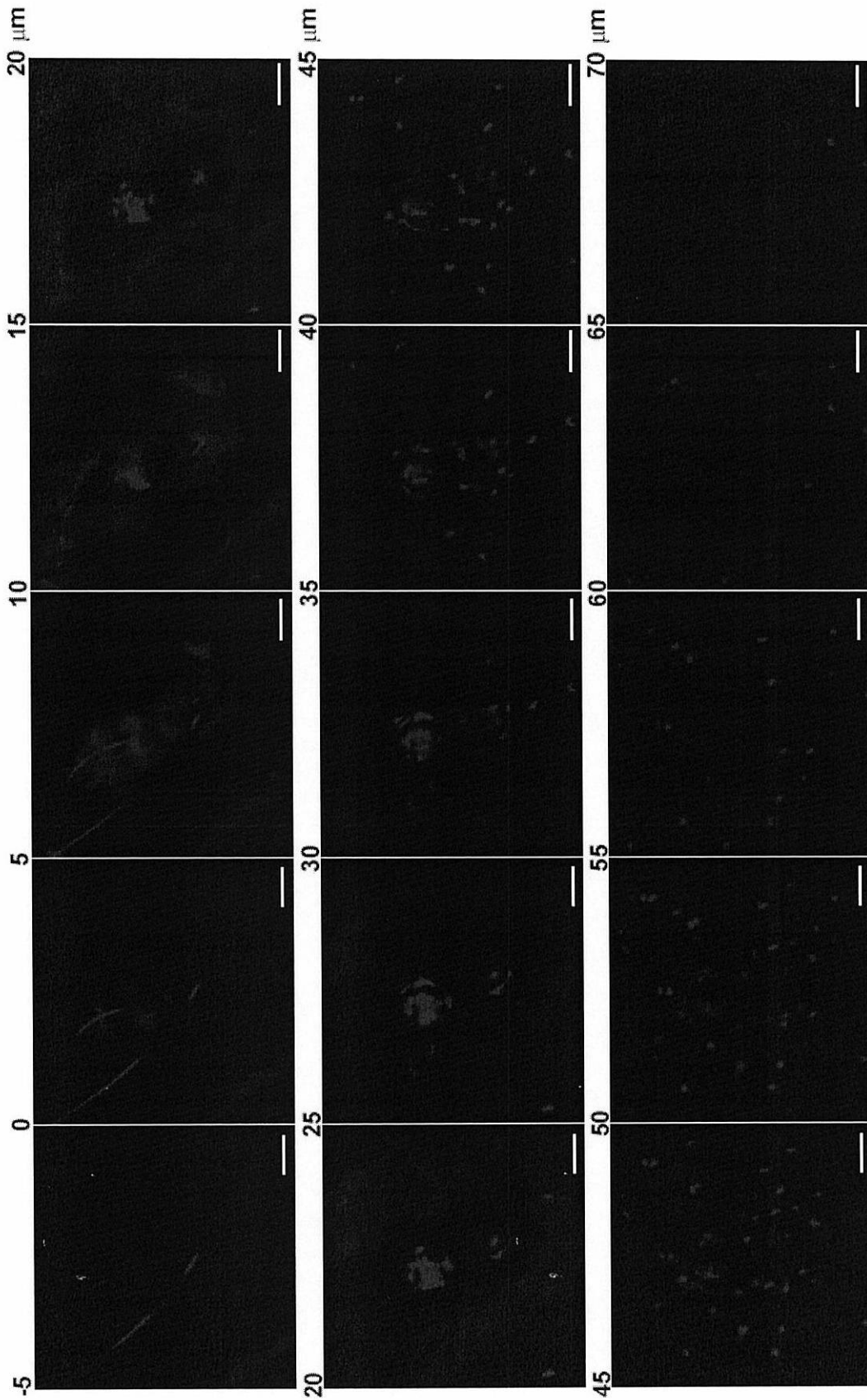


図 23A-23C

【 図 2 4 】



【 図 2 6 】

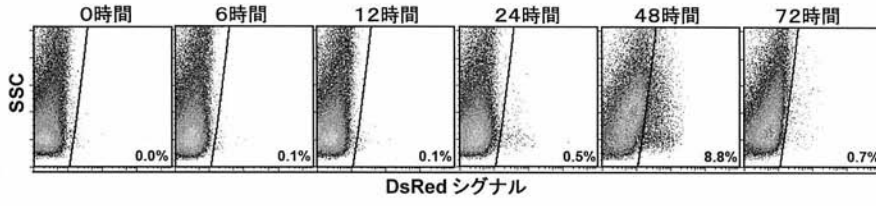


図 26A

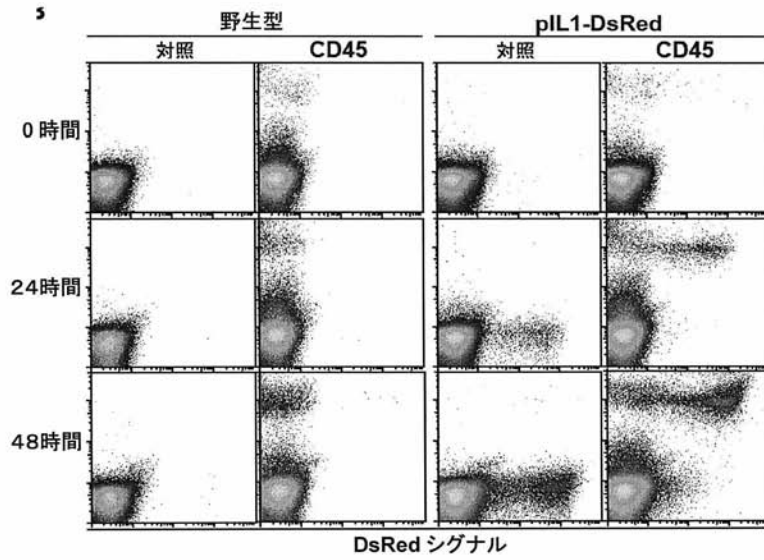


図 26B

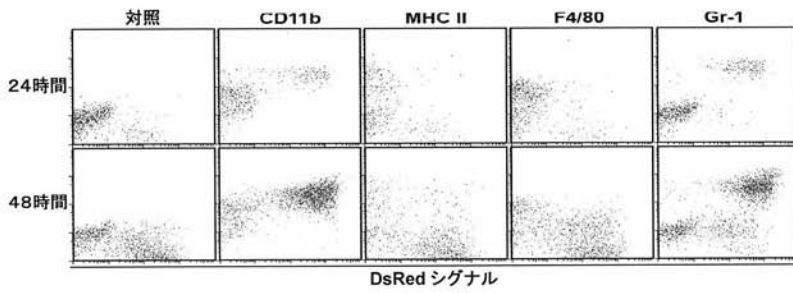


図 26C

【 図 2 7 】

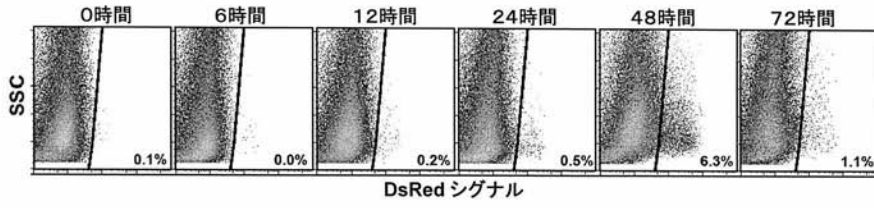


図 27A

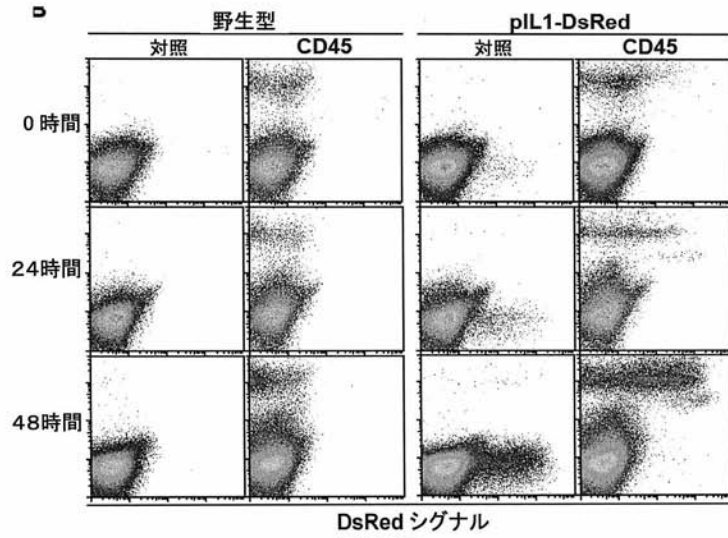


図 27B

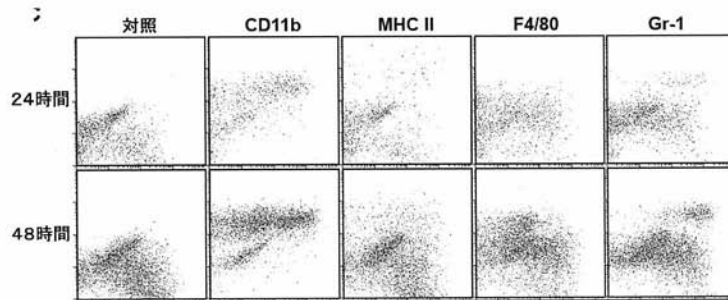
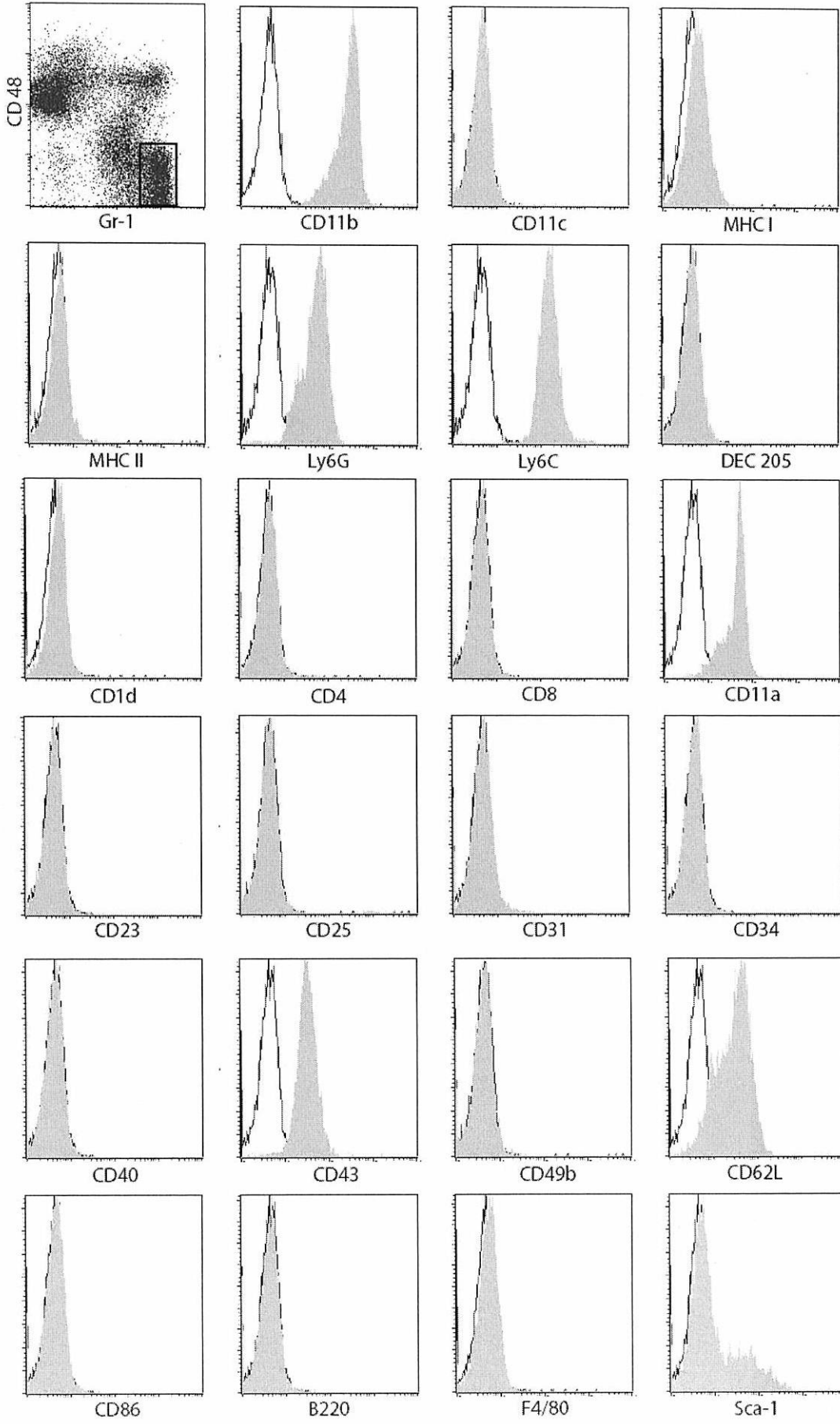


図 27C

【 図 2 8 】



【 图 29 】

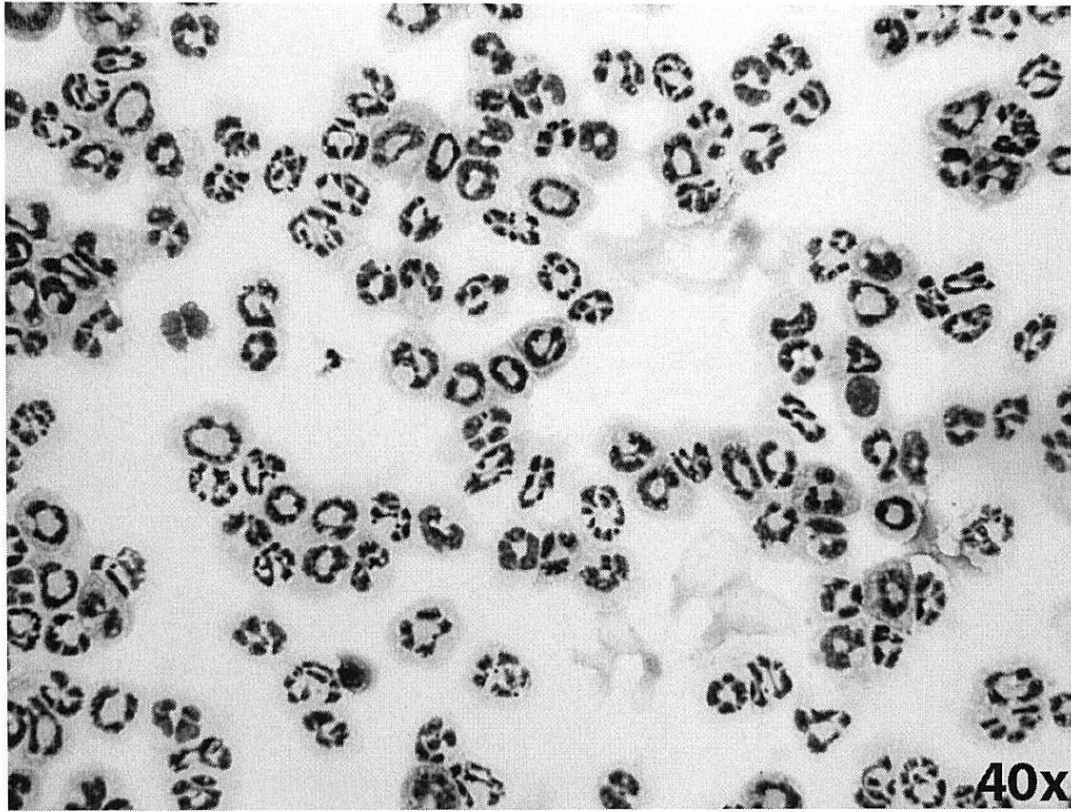


图 29A

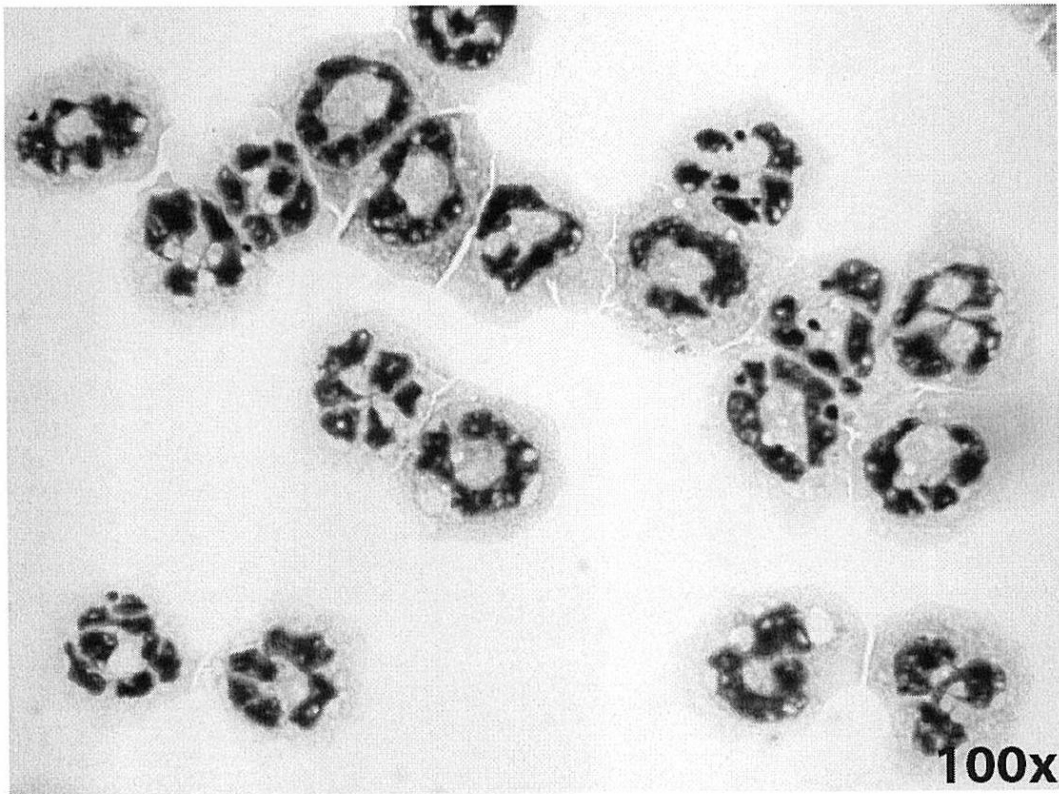


图 29B

【 図 30 】

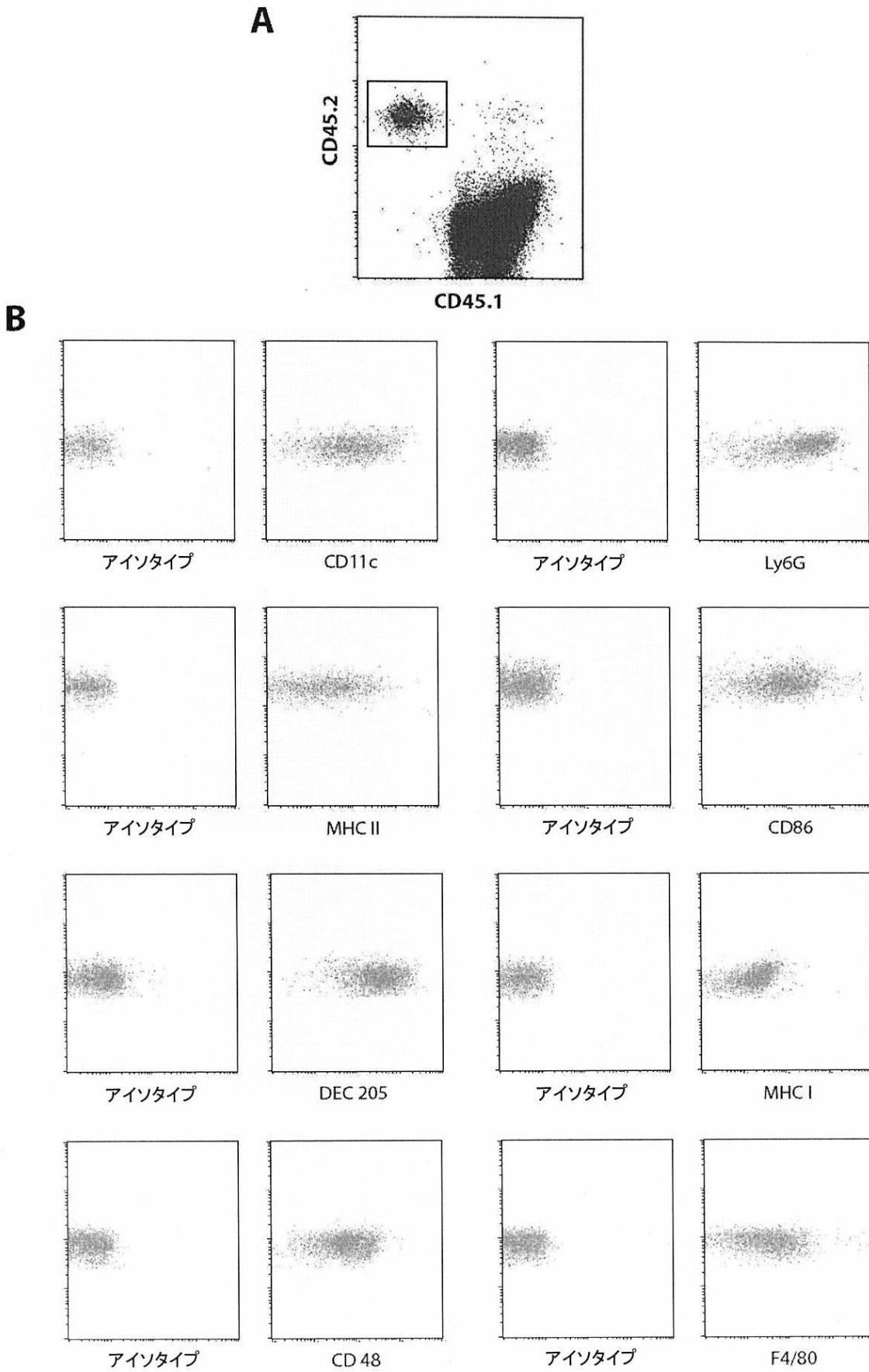


図 30A-30B

【 図 3 1 】

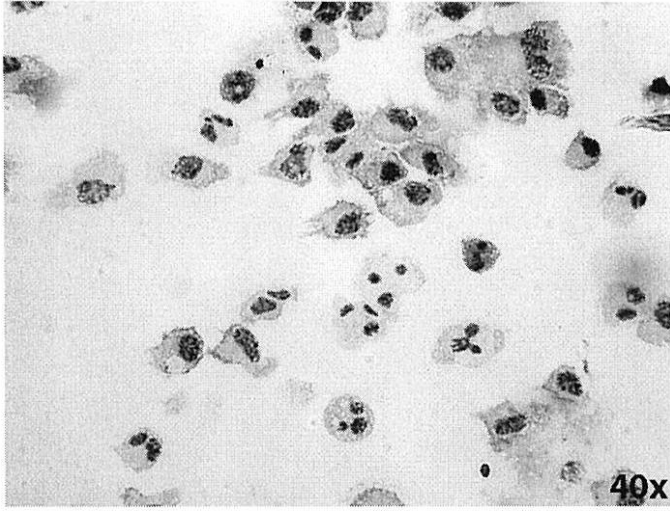


図 31A

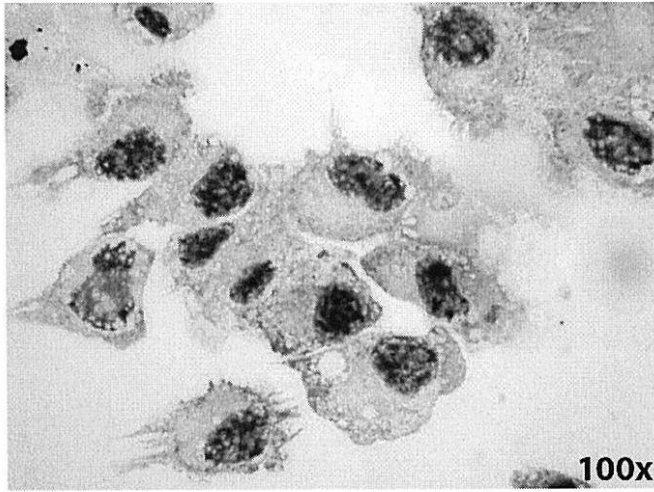
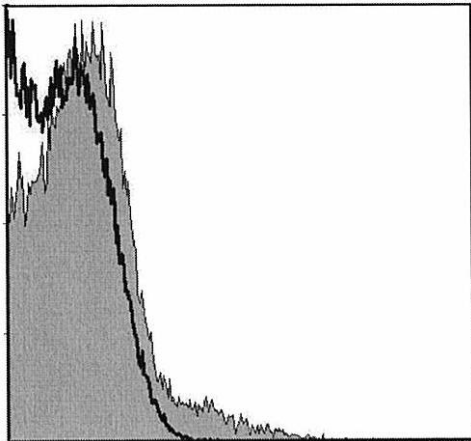


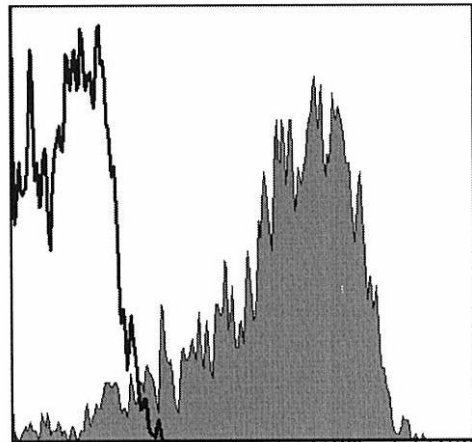
図 31B

【 図 3 2 】

mo-DC



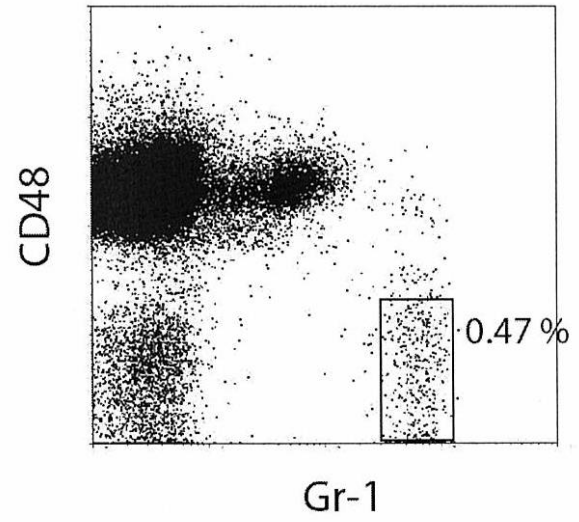
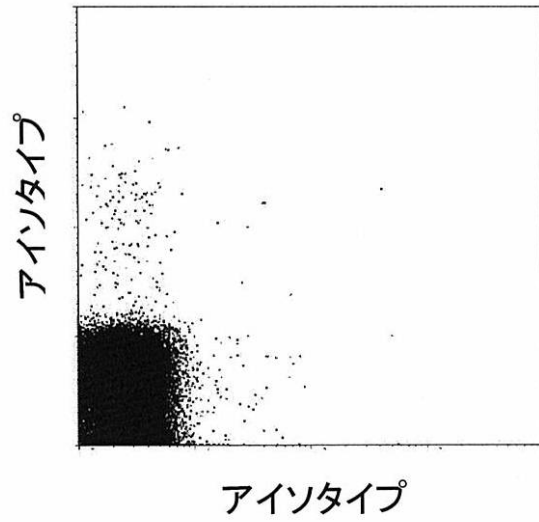
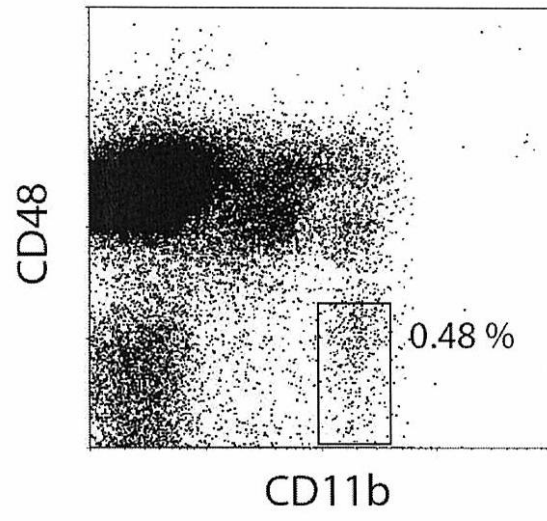
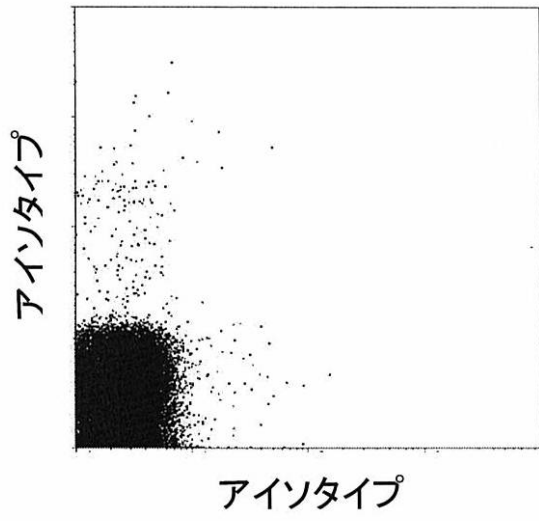
gr-DC



【 図 3 3 】

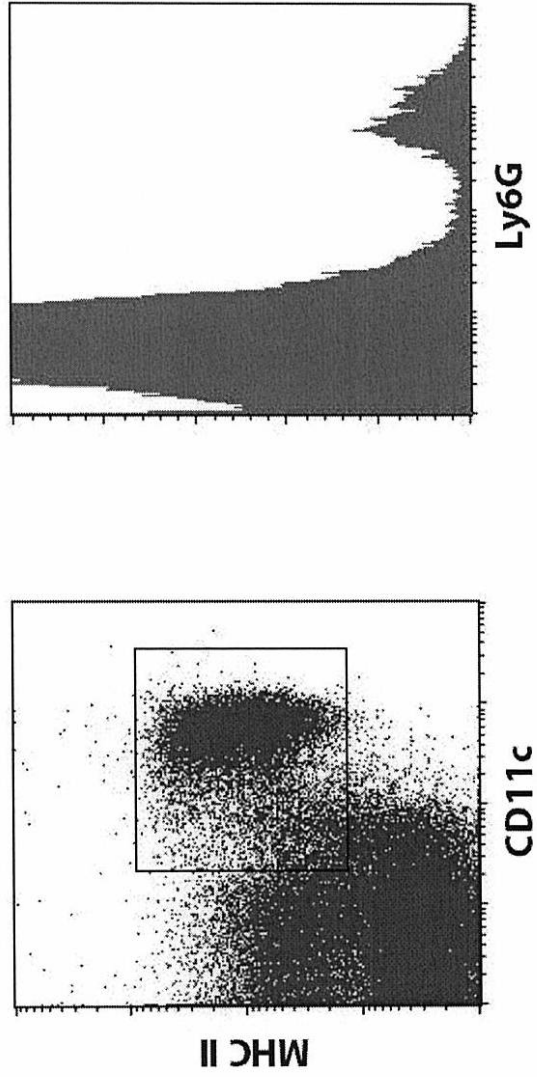
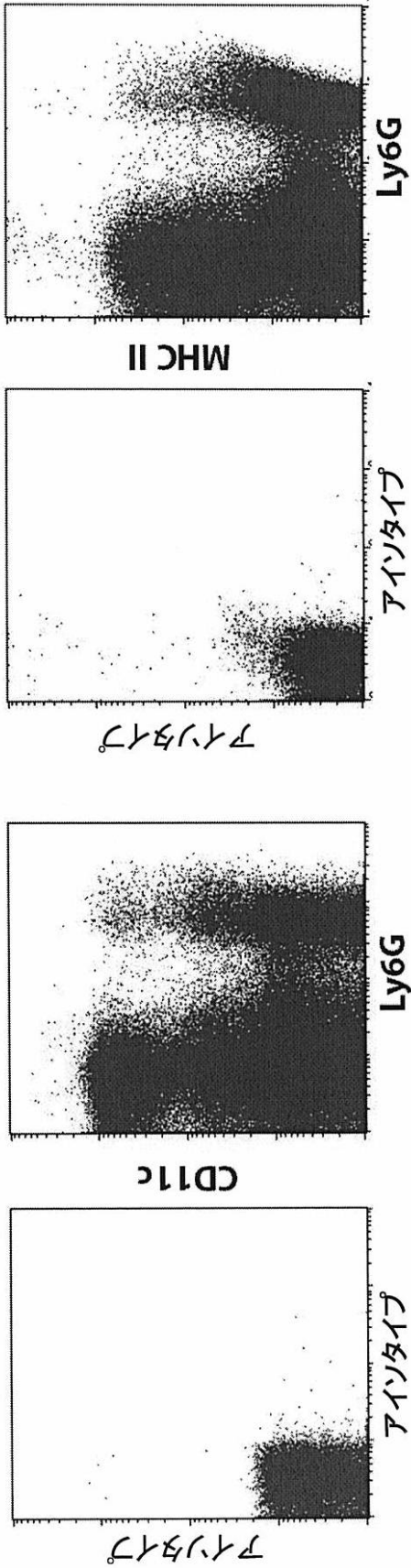


【 図 3 4 】



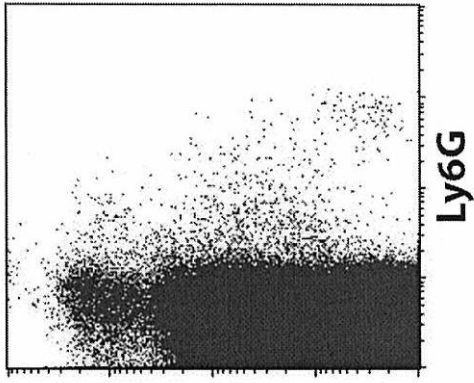
【 図 3 5 】

脾臓における CD11b + 分画



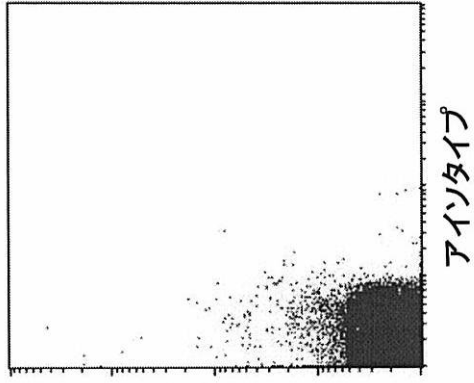
【図 36】

リンパ節において



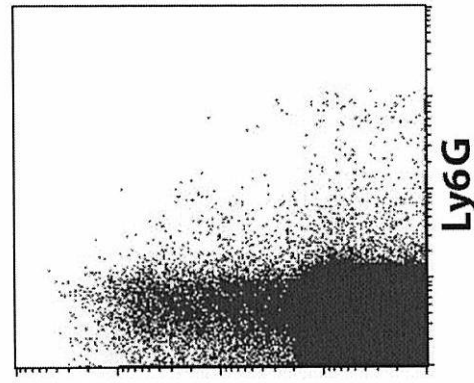
MHC II

Ly6G



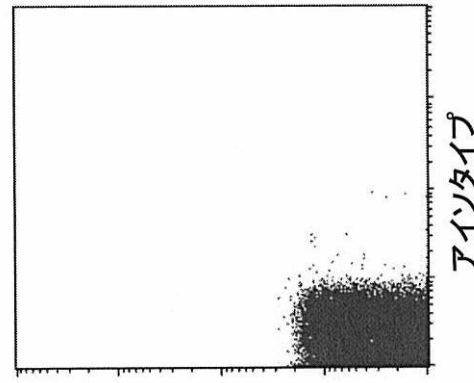
Ly6G

Ly6G



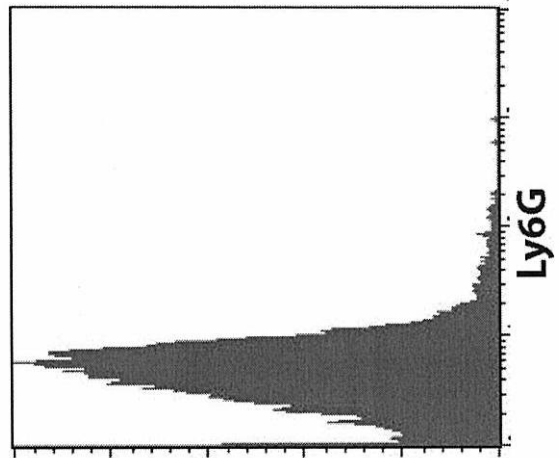
Ly6G

CD11c

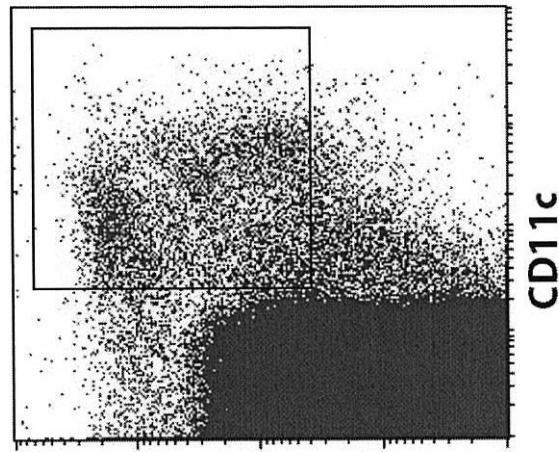


Ly6G

CD11c



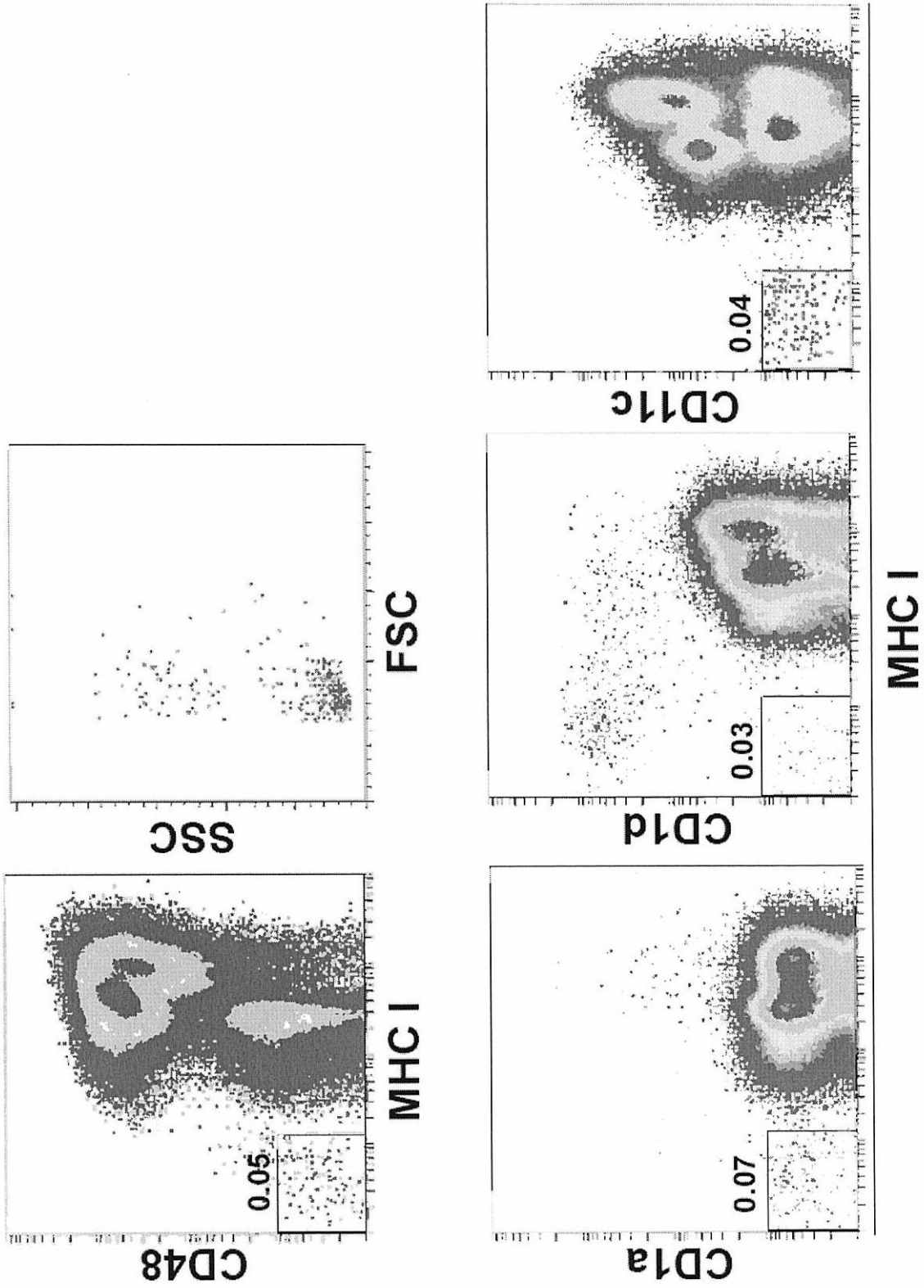
Ly6G



CD11c

MHC II

【 図 3 7 】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 09/35727

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12N 5/06, A61K 35/12 (2009.01) USPC - 435/372, 435/377 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 435/372, 435/377		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/325, 372, 375, 377		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Electronic Data Bases: (PGPB, JPAB, EPAB,USPT); Google Scholar Search Terms: dendritic precursor cells (DC precursor), Gr-1+, Ly6G+, CD48-, MHC II-, MHC I-, CD11c-, CD1a-, CD1d-, myeloid precursor DC (mDC-1, mDC-2), plasmacytoid precursor DC, GM-CSF, DC.com, granulocyte-derived DC (gr-DC), DEC205+, MHC II+, CD86+, CD11c+		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KAHN et al., Characterization of dendritic cells generated in vivo by an E. coli derived chimeric dual receptor agonist. Med Sci Monit, December 2002, Vol 8, No 12, Pages BR504-BR514. Especially abstract.	23,25,52,69,70,120,125,135
Y		39,40,71,72,136,137
X	SIOUD et al., TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34+ progenitors into CD11c+ CD80/86+ DC capable of inducing a Th1-type response. Eur Jour Immunol, October 2007, Vol 37, No 10, Pages 2834-2846. Especially pg 2835 left col para 3, pg 2836 fig 1 legend, pg 2837 left col para 1 and right col para 2.	108-110
Y		38,41
X	DIETLIN et al., Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. Jour Leuko Biol, May 2007 (Epub 16 Feb 2007), Vol 81, No 5, Pages 1205-1212. Especially pg 1208 left col para 3.	118,124
Y		
Y	EBIHARA et al., Immortalized dendritic cell line with efficient cross-priming ability established from transgenic mice harboring the temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene. Jour Biochem, September 2004, Vol 136, No 3, Pages 321-328. Especially pg 322 left col para 1 and 2, pg 322 right col para 3, pg 324 left col para 3. Especially pg 322 left col para 1-2, pg 322 right col para 3, pg 324 left col para 3.	27-32,38-41
Y	PILLARISETTY et al., GM-CSF Expands Dendritic Cells and Their Progenitors in Mouse Liver. Hepatology, March 2003, Vol 37, No 3, Pages 641-652. Especially abstract.	27-32
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 June 2009 (29.06.2009)		Date of mailing of the international search report 27 JUL 2009
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 09/35727

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2007/0269414 A1(OKANO et al.). 22 November 2007 (22.11.2007). Especially para [0189].	71,72
Y	WANG et al. Antigen targeting to dendritic cells with bispecific antibodies. J Immunol Methods. 30 November 2005, Vol 306, No 1-2, Pages 80-92. Abstract only.	136,137
A	NAIK. Distinct precursors of the dendritic cell subtypes. March 2006. Ph.D. Thesis at The Walter & Eliza Hall Institute of Medical Research, University of Melbourne, Melbourne, Australia. [online]. [Retrieved on 2009.06.29]. Retrieved from the internet: <URL: <a href="http://eprints.infodiv.unimelb.edu.au/archive/00001885">http://eprints.infodiv.unimelb.edu.au/archive/00001885</a> >. Especially pages 145,153,154,159.	1-22,33-37,42-51,53-68,73-118,121-123,126-134,138,139
A	SHORTMAN et al., Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. Nat Rev Immunol, January 2007 (Epub 15 December 2006), Vol 7, No 1, Pages 19-30. Especially pg 19-20.	1-22,33-37,42-51,53-68,73-118,121-123,126-134,138,139
A	JAX DATA SHEET. Strain Name: B6.Cg-Tg(ACTB-DsRed*MST)1Nagy/J. 5 January 2008. [online]. [Retrieved on 2009.08.30]. Retrieved from the internet: <URL: <a href="http://web.archive.org/web/20080105221828/http://jaxmice.jax.org/strain/006051.html">http://web.archive.org/web/20080105221828/http://jaxmice.jax.org/strain/006051.html</a> >. Especially pg 1 Strain Description.	140

## 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 P 37/00	(2006.01)	A 6 1 P 37/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 37/08	(2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02	Z N A
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	Y
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
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,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,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,K,E,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,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100128750

弁理士 廣瀬 しのぶ

(72)発明者 高島 明

アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 5 6 0 , シルバニア , ウィンターグリーン・コート 9 2 3 5

(72)発明者 松嶋 宏典

アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 5 2 8 , トレド , ハートフォード・レーン 1 9 1 5

(72)発明者 グオン , シュオ

アメリカ合衆国オハイオ州 4 3 6 1 4 , トレド , オーク・ヒル・コート 1 2 4 5 , アパートメント 2 5 5

Fターム(参考) 2G045 AA25

4B024 AA01 CA04 EA04 GA11

4B063 QA01 QQ52 QR08 QR62 QS25

4B065 AA90Y AA91X AB01 BA02 CA44

4C084 AA13 NA14 ZB05 ZB051 ZB052 ZB07 ZB071 ZB072 ZB08 ZB081

ZB082 ZB11 ZB111 ZB112 ZB13 ZB131 ZB132 ZB21 ZB211 ZB212

ZB26 ZB261 ZB262 ZB32 ZB321 ZB322 ZB33 ZB331 ZB332 ZB35

ZB351 ZB352 ZB37 ZB371 ZB372

4C087 AA01 AA02 BB37 BB38 BB63 BB64 NA14 ZB05 ZB07 ZB08

ZB11 ZB13 ZB26 ZB32 ZB33 ZB35 ZB37

专利名称(译)	树突细胞前体群，由其衍生的树突细胞群及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2011512846A</a>	公开(公告)日	2011-04-28
申请号	JP2010549786	申请日	2009-03-02
申请(专利权)人(译)	托莱多大学		
[标]发明人	高島明 松嶋宏典 グオンシュオ		
发明人	高島 明 松嶋 宏典 グオン,シュオ		
IPC分类号	C12N5/10 A61K35/14 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P29/00 A61K48/00 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12N15/09 A61K35/12 A61K35/15 C12N5/0784		
CPC分类号	A61K35/15 A61K2035/124 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 C12N5/0639 C12N2501/22 G01N33/5047 G01N33/56972 G01N2500/10 G01N2800/24		
FI分类号	C12N5/00.102 A61K35/14.Z A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 A61P29/00 A61K48/00 C12Q1/02.ZNA C12Q1/68.A G01N33/53.Y G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 4B024/AA01 4B024/CA04 4B024/EA04 4B024/GA11 4B063/QA01 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR62 4B063/QS25 4B065/AA90Y 4B065/AA91X 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA44 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZB05 4C084/ZB051 4C084/ZB052 4C084/ZB07 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB08 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB11 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB13 4C084/ZB131 4C084/ZB132 4C084/ZB21 4C084/ZB211 4C084/ZB212 4C084/ZB26 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB32 4C084/ZB321 4C084/ZB322 4C084/ZB33 4C084/ZB331 4C084/ZB332 4C084/ZB35 4C084/ZB351 4C084/ZB352 4C084/ZB37 4C084/ZB371 4C084/ZB372 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB37 4C087/BB38 4C087/BB63 4C087/BB64 4C087/NA14 4C087/ZB05 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB13 4C087/ZB26 4C087/ZB32 4C087/ZB33 4C087/ZB35 4C087/ZB37		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	61/067870 2008-03-03 US		
其他公开文献	JP2011512846A5 JP5808915B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

公开了树突细胞前体群，由其衍生的树突细胞群，分离，扩增和使用的方法。【选择图】无

【 7 】

