

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5599834号
(P5599834)

(45) 発行日 平成26年10月1日(2014.10.1)

(24) 登録日 平成26年8月22日(2014.8.22)

(51) Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	5/0784	(2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 O 2 M
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	Z N A
G O 1 N	33/53	(2006.01)	G O 1 N	33/53	N
			G O 1 N	33/53	Y

請求項の数 12 (全 72 頁)

(21) 出願番号	特願2012-45127 (P2012-45127)	(73) 特許権者	502329153
(22) 出願日	平成24年3月1日(2012.3.1)		ミルテニイ バイオテック ゲゼルシャフ
(62) 分割の表示	特願2001-538976 (P2001-538976) の分割		ト ミット ベシュレンクテル ハフツン グ
原出願日	平成12年11月15日(2000.11.15)		ドイツ連邦共和国, 5 1 4 2 9 ベルギッ
(65) 公開番号	特開2012-152215 (P2012-152215A)		シュ グラドバッハ, フリードリッヒ-エ
(43) 公開日	平成24年8月16日(2012.8.16)		ベルト -シュトラ-セ 6 8
審査請求日	平成24年3月27日(2012.3.27)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	60/165,555		弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成11年11月15日(1999.11.15)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森田 耕司
(31) 優先権主張番号	60/167,076	(74) 代理人	100105991
(32) 優先日	平成11年11月23日(1999.11.23)		弁理士 田中 玲子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 樹状細胞に特異的な抗原結合フラグメント、その組成物および使用方法、それによって認識される抗原およびそれによって得られる細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B D C A - 4 (ニューロピリン - 1) に結合する抗体又は F a b、F (a b ')₂、F a b '、及び S c F v から選ばれるそのフラグメントによって血液から分離されたエキソピボ又はインピトロ樹状細胞集団であって、D C 1 c⁺であることを特徴とする細胞集団。

【請求項 2】

前記抗体が、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、モノクローナル抗体、ハイブリッド抗体、組換え抗体、又はヒト化抗体から選択される、請求項 1 に記載の細胞集団。

【請求項 3】

前記抗体又は F a b、F (a b ')₂、F a b '、及び S c F v から選ばれるそのフラグメントが、検出標識又は常磁性標識に結合されている、請求項 1 に記載の細胞集団。

【請求項 4】

前記検出標識が、放射性同位体、酵素、蛍光化合物、化学発光化合物、生物発光化合物、基質コファクター、又は基質インヒビターである、請求項 3 に記載の細胞集団。

【請求項 5】

前記抗体又は F a b、F (a b ')₂、F a b '、及び S c F v から選ばれるそのフラグメントが、コロイド状超常磁性ビーズに結合される、請求項 1 に記載の細胞集団。

【請求項 6】

配列番号 1 のエキソン 1 - 6 ; エキソン 1 及び 3 - 6 ; エキソン 1 - 2 及び 4 - 6 ; 又

はエキソン 1 - 3 及び 5 - 6 によりコードされる B D C A - 2 タンパク陽性である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の細胞集団。

【請求項 7】

ヒト細胞の混合物から樹状細胞を検出し、数え上げ、単離し、又は濃縮するための方法であって、

a) ヒト細胞の混合物中の細胞を、B D C A - 4 (ニューロピリン - 1) に結合する抗体又は F a b、F (a b ')₂、F a b '、及び S c F v から選ばれるそのフラグメントと、前記抗体又はそのフラグメントが B D C A - 4⁺細胞を特異的に認識する条件下で、接触させる工程、及び

b) 前記混合物中の他の細胞から、前記抗体又はそのフラグメントによって結合される樹状細胞を分離する工程を含む方法。

10

【請求項 8】

前記樹状細胞が、免疫磁気細胞ソーティング (M A C S) によって分離される請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記樹状細胞が、フローサイトメトリー (F A C S) によって分離される請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

ヒト細胞の混合物から樹状細胞を単離するための方法であって、

20

a) ヒト細胞の混合物中の細胞を、B D C A - 4 (ニューロピリン - 1) に結合する抗体又は F a b、F (a b ')₂、F a b '、及び S c F v から選ばれるそのフラグメントと、抗体又はそのフラグメントが B D C A - 4⁺細胞を特異的に認識する条件下で、接触させる工程、及び

b) 前記混合物中の他の細胞から、前記抗体又はそのフラグメントによって結合される樹状細胞を分離する工程を包含し、前記ヒト細胞の混合物が、骨髓、末梢血、又は細胞培養物に由来することを特徴とする方法。

【請求項 11】

前記ヒト細胞の混合物が、末梢血の白血球搬出 (leukapheresis) によって得られる、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

前記ヒト細胞の混合物が、臍帯血、扁桃、リンパ節、鼻粘膜、脾臓、皮膚、気道上皮、肺、肝臓、腸、胸腺、及びパイヤー班から選択される供給源に由来する、請求項 10 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

樹状細胞 (D C) の亜集団に特異的な抗体およびその誘導体に関する。組成物およびその使用方法がまた提供され、その方法は、D C およびその亜集団の単離および精製、ならびに抗体またはリガンド媒介免疫療法を含む。本発明はまた、実質的に単離された D C 亜集団を提供する。その使用の方法がまた、提供され、この方法には、D C ベースの免疫療法、種々の疾患の特徴づけ、および例えば、f l t 3 - リガンドを用いるインビボの数的な D C 増大を含む。

40

【背景技術】

【0002】

強力な抗原提示細胞 (A P C) である、樹状細胞の造血性の発達は明白であり、そして単球にいくらか密接に関連したいくつかの前駆経路に続き得る。D C は、リンパ球前駆体から誘導され得る。T h o m a s ら (1 9 9 3) J . I m m u n o l . 1 5 0 : 8 2 1 ~ 8 3 4。血中と同様、胸腺に存在する D C の 3 つの異なるサブセットが存在し得る：1) プ

50

ラスマ細胞様CD4 + CD11c - DC ; 2) CD4 + CD11c + DC、および3)互いに嵌め込み合うDC。胸腺DCおよびT細胞が共通の幹細胞から生じることが提唱されている。Thomasら(1996) Stem Cells 14:196~206。

【0003】

潜在的な臨床用途のための多数のDCの生成は、近年では、サイトカインの前駆体のインビトロ培養を通じて達成されている。種々のストラテジーを適合させて、樹状細胞へ抗原を導入し、それにより、それらは、同時刺激の場合にはT細胞に対して、より効率的に提示され得る。樹状細胞が抗原に対するT細胞応答に影響して体液性または全身性の経路のいずれかが続くことがまた示されている。

【0004】

T細胞は、プロセッシングされていないタンパク質には反応できず、むしろ、T細胞は、MHC分子と組み合わせて細胞表面で提示されるペプチドエピトープとして抗原を提示するためのアクセサリ細胞を必要とする。細胞の細胞質に内因性に生成された抗原は、代表的にはクラスI経路に存在し、そして細胞傷害性Tリンパ球(CTL)反応を刺激する。一方、外因性タンパク質は、MHCクラスIIコンパートメントでプロセッシングされて、ヘルパーT(CD4)細胞応答を誘導する。ナイーブなT細胞の刺激は、初回免疫の活性化における二次シグナルとして働く同時刺激分子の存在を必要とする。B細胞およびマクロファージのようなAPCは、代表的に初回応答を誘導し得ない。対照的に、樹状細胞は、同時刺激の接着ならびにMHCクラスIおよびII分子(効果的細胞免疫の開始に必須)の構成的な上方制御(アップレギュレーション)発現からその力価を駆動する。概説については、Avigan(1999) Blood Rev. 13:51~64を参照のこと。

【0005】

DCは、初回免疫応答の開始および耐性の発達に必須であるAPCである。DCは、ナイーブなT細胞集団の刺激に必要なMHCを発現する。DCの造血性の発達は、明白であり、そしていくつかの前駆経路を伴い得、そのいくつかは単球に密接に関連している。概説については、Avigan(1999) Blood Rev. 13:51~64を参照のこと。異なるDCサブセットは、異なる発達経路を有する。新たな概念は、1つのDCサブセットが、自己抗原に対する耐性の誘導に寄与し得る調節性機能を有するということである。Austyn(1998) Curr. Opin. Hematol. 5:3~15。逆に、DCまたはそのサブセットはまた、自己タンパク質に対する免疫応答の誘導に関与し得る。特定の自己免疫応答は、微小環境組織損傷、その後の局所DC活性化および引き続くT細胞との相互作用(免疫応答を誘導する)に起因し得る。Ibrahimら(1995) Immunol. Today 16:181~186。

【0006】

DCがT細胞応答を開始する能力は、DC癌ワクチンにおいて用いられている。Hartら(1999) Sem. Hematol. 36:21~25。例えば、DCは、CD34+細胞または単球からインビトロで生成され、腫瘍由来ペプチドまたはタンパク質でパルスされ、そして患者に戻されて癌特異的T細胞誘導においてAPCとして働く。Bruggerら(1999) Ann. N. Y. Acad. Sci. 872:363~371。動物モデルは、DC腫瘍ワクチンがT細胞アネルギーを逆にし、引き続く腫瘍拒絶を生じることを実証した。Avigan(1999); またTarteら(1999) Leukemia 13:653~663; Colaco(1999) Molec. Med. Today 5:14~17; Timmermanら(1999) Ann. Rev. Med. 50:507~529; Hartら(1999) Semin. Hematol. 36:21~25; Thurnherら(1998) Urol. Int. 61:67~71; およびHermansら(1998) N. Z. Med. J. 111:111~113を参照のこと。flt-リガンドの投与によりインビボでDCを増大する1つのアプローチが存在する。これは、VEGF-誘導DC抑制を補償する効果を有する。Ohmら(1999) J. Immunol. 163:3260~3268。DCは、ワクチン接種および組み換

10

20

30

40

50

えワクチンにおけるアジュバントとしての用途について提唱されている。F e m a n d e zら(1998) *Cyto. Cell. Mol. Ther.* 4: 53~65; および G i b c oら(1998) *Cancer Immunol. Immunother.* 46: 82~87。DCはまた、幹細胞移植の後の免疫を増強する用途についても提唱されている。B r u g g e rら(1999) *Ann. NY Acad. Sci.* 363~371。DCは、免疫学において多数の潜在的役割を果たす。例えば、DCは、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染に関与する。Z o e t e w e i jら(1998) *J. Biomed. Sci.* 5: 253~259。DCはまた、HIV治療における用途に適切であることが提唱されている。W e i s s m a nら(1997) *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 358~367。

10

【0007】

さらなる免疫学的機能が、DCに関連している。これは、例えば、Th1またはTh2応答の示差的誘導、自己免疫反応およびアレルギーである。R i s s o a nら(1999) *Science* 283: 1183~1186; H e r m a n sら(1998) *NZ Med. J.* 111: 111~113; および D e P a l m aら(1999) *J. Immunol.* 162: 1982~1987。

【0008】

循環するIFN- γ のレベルの増大およびIFN- γ 誘導因子(抗DNA抗体およびDNAの複合体のようなもの)のレベルの増大が、SLE患者において見出され、そして疾患活性に関連している。さらに、IFN- γ で処置された非自己免疫障害を有する患者は、しばしば自己抗体を、そして時にはSLEを発生させる。R o n n b l o mら、からのいくつかの報告((1999) *Clin. Exp. Immunol.* 115: 196~202; (1999) *J. Immunol.* 163: 6306~6316; および(2000) *J. Immunol.* 165: 3519~3526))から、患者から誘導されたIFN- γ 誘導因子が健常ドナー由来のPBMCにおいてIFN- γ の分泌を誘導すること、およびそれらが天然のIFN- γ 産生細胞を選択的に活性化することが示される(NIPC=プラズマ細胞様(plasmacytoid)DC)。

20

【0009】

血中でのDCに対する研究は、細胞の不足およびDC特異的細胞表面マーカーの相対的欠失によって阻害されている。DC単離の方法は、短時間培養後の成熟変化(低浮遊密度の獲得など)か、またはDC活性化/成熟抗原(CD83、CMRF-44およびCMRF-56)の発現のいずれかに基づく。Y o u n gら(1988) *Cell Immunol.* 111: 167; V a n V o o r h i sら(1982) *J. Exp. Med.* 155: 1172; Z h o uら(1995) *J. Immunol.* 154: 3821~3835; F e a r n l e yら(1997) *Blood* 89: 3708~3716; M a n n e r i n gら(1988) *J. Immunol. Met.* 219: 69~83; H o c kら(1999) *Tiss. Antigens* 53: 320~334; および H o c kら、*Immunol.* 83: 573~581。

30

【0010】

機能的CD1a+DCは、代表的には、単球からエキソピボで、そしてCD34+造血前駆細胞から生成される。B e n d e rら(1996) *J. Immunol. Met.* 196: 121~135; P i c k lら(1996) *J. Immunol.* 157: 3850~3859; R o m a n iら(1994) *J. Exp. Med.* 180: 83~93; S a l l u s t oら(1994) *J. Exp. Med.* 179: 1109-1118; C a u xら(1992) *Nature* 360: 258~261; M a c k e n s e nら(1995) *Blood* 86: 2699~2707; S z a b o l c sら(1995) *J. Immunol.* 154: 5851~5861; H e r b s tら(1996) *Blood* 88: 2541-2548; d e W y n t e rら(1998) *Stem Cells* 16: 387~396; S t r u n kら(1996) *Blood* 87: 1292-1302 米国特許番号第6,010,905号; および同第6,004,807号。DC

40

50

が単球および造血前記細胞からインビトロで生成される場合、インビボのDCの特徴の全てが保持または得られることは知られていない。

【0011】

さらに、ヒトDCに特異的なmAbを生成するいくつかの試みは失敗しており、DCおよび他の白血球の両方によって発現される抗原に結合するmAbのみを生じている。ヒトDCは、他の血球と、多数の免疫原性細胞表面構造を共有する。これには、HLA分子、CD18、CD29、CD31、CD43、CD44、CD45、CD54、およびCD58が挙げられる。これらの抗原は、注射されたDCに対する免疫応答を、DC特異的抗原に対する特異性を有するB細胞が、骨髄腫細胞との融合の能力を有するB細胞の間で、全く発現されないか、ごくまれにしか発現されないレベルまで支配し得る。

10

【0012】

多くの研究者らが、共有された抗原についての特異性を有するB細胞を除去するために、非DCおよびシクロフォスファミドを成体マウスに注射することにより、または共有された抗原のついての特異性を有するB細胞を寛容化するために非DCを新生仔マウスに注射することにより、この問題を克服しようとして努力してきた。O'Dohertyら(1993) *Adv. Exp. Med. Biol.* 329: 165~172; および Yamaguchiら(1995) *J. Immunol. Met.* 181: 115~124。

【0013】

CMRF44と名づけられたmAbは、幹細胞移植患者におけるDCのモニターに用いられてきた。Fearnsleyら(1999) *Blood* 93: 728~736。これらのCMRF44+細胞は、免疫応答を開始、維持、および指向するのにおける用途に適切であることが提唱された。Fearnsleyら(1997)。DCは、ほとんどの場合、細胞表面マーカーの組み合わせを用いることにより単離されてきた。例えば、米国特許第5,972,627号は、「少なくとも80%、CD34、CD45RA、およびCD10を発現するが、CD19、CD2、CD3、CD4、CD8、CD20、CD14、CD15、CD16、CD56およびグリコホリン(glycophorin)は発現しない」として、「ヒト造血樹状前駆細胞について富化された造血細胞」を記載している。

20

【0014】

血液からのDCの単離は、多数の免疫表現型基準、例えば、リンパ球系列(lin)-特異的抗原(例えば、CD3、CD14、CD19、およびCD56)のパネルの非存在、ならびにHLA-DR、CD4またはCD33の存在などに依存する。Romanisら(1996) *J. Immunol. Met.* 196: 137~151; Thomasら(1993) *J. Immunol.* 150: 821~834; Thomasら(1994) *J. Immunol.* 153: 4016~4028; O'Dohertyら(1994) *Immunol.* 82: 487~493; O'Dohertyら(1993) *J. Exp. Med.* 178: 1067~1076; Nijmanら(1995) *J. Exp. Med.* 182: 163~174; Ferbasら(1994) *J. Immunol.* 152: 4649~4662; Heuflerら(1996) *Eur. J. Immunol.* 26: 659~668; Itoら(1999) *J. Immunol.* 163: 1409~1419; Cellaraら(1999) *Nature Med.* 5: 919~923; Robinsonら(1999) *Eur. J. Immunol.* 29: 2769~2778; Olweusら(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 12551~12556; Robertら(1999) *J. Exp. Med.* 189: 627~636; および Kohrgruberら(1999) *J. Immunol.* 163: 3250~3259。

30

40

【0015】

非培養血液から単離されたDCの分析から、血液DCが、均一な細胞集団ではなく、少なくとも2つの集団の混合物であることが証明された。Thomasら(1994); O'Dohertyら(1994); Itoら(1999); Cellaraら(1999); Robinsonら(1999); Olweusら(1997); Kohrgruberら

50

(1999); Stroblら(1998) J. Immunol. 161: 740~748; および Risoanら(1999) Science 283: 1183~1186。最初の血液DC亜集団は、CD123^{bright}CD11c⁻DCであり、これは、プラズマ細胞様の形態および強力なT細胞刺激機能を有する。第二の血液DC亜集団は、CD123^{dim}、CD11c^{bright}であり、これは、むしろ単球様の外観であり、CD45ROを発現し、そして外因性サイトカインなしに培養された場合でさえ、自然に、代表的な成熟DCに発達する。プラズマ細胞様CD123^{bright}CD11c⁻DCは、いくつかの特徴(プレT細胞レセプター鎖の発現など)を示し、これは、その細胞がリンパ前駆体から生じ得ることを示す。Stroblら(1998); Risoanら(1999); および Brunoら(1997) J. Exp. Med. 185: 875~884。CD123^{dim}CD11c^{bright}DCは、骨髄腫DCの全ての基準を示す。O'Dohertyら(1994); および Itoら(1999)。Robinsonら(1999); Kohrgruberら(1999); および Stroblら(1998)。プラズマ細胞様CD123^{bright}CD11c⁻DCと似ているDCは、リンパの組織のT細胞富化領域で検出され、そしてその形態および表現型に起因して、最初に誤って、プラズマ細胞様T細胞またはプラズマ細胞様単球と名づけられた。Grouardら(1997) J. Exp. Med. 185: 1101~1111; Lennertら(1975) Lancet 1: 1031~1032; Lennertら(1984) Leukocyte Typing. Human Leukocyte differentiation antigens detected by monoclonal antibodies. Bernardら編、Springer-Verlag、Berlin; および Facchettiら(1988) Am. J. Pathol. 133: 15。CD123^{dim}CD11c^{bright}血液DCと似ているDCは、胚中心の黒いゾーンおよび明るいゾーンにおいて見出されている。Grouard(1996) Nature 384: 364~367。

【0016】

(スプライシング改変体(バリエーション))

発現された遺伝子の総数は、40,000~150,000を超える範囲にわたると見積もられる。この数は、コードされるタンパク質の数の正確な反映ではない。なぜなら、多くの場合、これらの遺伝子からは、このmRNA(転写物)から1つより多いスプライシング改変体が生じるからである。再度、見積もりは変化するが、おそらく500,000程度の多さの異なるmRNAがヒトにおいて産生される。ヒト遺伝子の少なくとも30%がいくつかのスプライシング改変体を有すると推定される。Mironovら(1999) Genome Research 9: 1288~1293)。これらの数は、ある程度保存されるべきであると考えられる。類似の数がマウスおよびラットについても正しく、そして下等な生物体(例えば、Drosophila melanogaster、およびCaenorhabditis elegans)でもまたオルタネーティブスプライシングが生じると考えられる。異なるスプライシング改変体(バリエーション)から翻訳されたタンパク質は、研究論文の数が増加していることによって証明されるように、有意に異なる機能を有し得る。異なるスプライシング改変体が、異なる組織、異なる発生段階、および異なる疾患状態で発現され得る。

【0017】

(C型レクチン)

C型レクチンは、炭水化物認識ドメイン(CRD)においてアミノ酸配列類似性を示し、そしてCa²⁺依存性様式において選択された炭水化物に結合する糖タンパク質のファミリーである。C型レクチンは、4つのカテゴリーに下位分類される(Vastaら、1994; および Spiess 1990)。第1の群は、II型膜結合タンパク質(例えば、アジア糖タンパク質レセプター、マクロファージガラクトースおよびN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)特異的レクチン、およびCD23(FcRII))を含む。この群の多くのメンバーは、ガラクトース/フコース、ガラクトサミン/GalNAcまたはGlcNAc残基に対する特異性を示す。第2の群は、軟骨および線維芽細胞のプロ

10

20

30

40

50

テオグリカンコアタンパク質を含む。第3の群は、いわゆる「コレクチン」(例えば、血清マンノース結合タンパク質、肺界面活性剤タンパク質SP-A、およびコングルチニン)を含む。第4の群は、LEC-CAM(例えば、Mel-14、GMP-140およびELAM-1)として公知の特定の接着分子を含む。

【0018】

C型レクチンは、アグルチニン、オプソニン、補体アクチベーターおよび細胞関連認識分子として機能することが公知である(Vastarら、1994; Spiess 1990; およびKery 1991)。例えば、マクロファージマンノースレセプターは、スカベンジャー機能(Shepherdら、1990)および病原性生物(Pneumocystis carinii(Ezekowitzら、1991)およびCandida albicans(Ezekowitzら、1990)を含む)の取り込みの媒介を果たす。血清マンノース結合タンパク質は、古典的経路を介して補体を活性化する能力において、C1qを模倣する。このレクチンにおける遺伝的変異は、重篤な再発感染、下痢および成長不全(failure to thrive)についての素因を与える(Reidら、1994)。従って、C型レクチンは、生物学的重要性を伴うさまざまな機能を示す。

10

【0019】

炭水化物部分は、必ずしもC型レクチンに対する「天然の」リガンドとして働くわけではない。例えば、CD23(FCRII)(Gal-Gal-Nacの結合(Kijimoto-Ochiaiら、1994)およびCRD配列により証明されるように、C型レクチンファミリーに属する)は、現在、炭水化物非依存性様式でIgEを認識することが公知である; 酵素的に脱グリコシル化された形態のIgEおよびE.coliにおいて生成された組換え(非グリコシル化)IgEは、ともに、CD23に結合する(Verceilliら、1989)。従って、いくつかのC型レクチンは、それらの天然のリガンドにおけるポリペプチド配列を認識する。

20

【0020】

いくつかのC型レクチンは、DCの表面で同定された。第1に、Jiangらは、最も広範に用いられる、マウスDCに対するmAbの1つであるNLDC-145 mAb(Jiangら、1995)により認識されるタンパク質をクローニングした。このタンパク質(現在は、DEC-205とよばれる)は、C型レクチンファミリーの新たなメンバーであることがわかった(これは、10の異なるCRDを含む)。第2に、Sallustorらは、ヒトDCが、マクロファージマンノースレセプター(MMR)を発現することを報告した。このマクロファージマンノースレセプターはまた、複数のCRDを含む(Sallustorら、1995)。両方のレセプターは、以下の観察に基づいて、DCによるグリコシル化分子のエンドサイトーシスを媒介すると提唱されている: a) DEC-205に対するポリクローナルウサギ抗体が、DC表面上のDEC-205に結合するのみならず、実質的にインターナライズされること; b) これらのDCは、ウサギIgGと反応性のT細胞株を有効に活性化したこと; およびc) DCによるFITC-デキストランのインターナリゼーションが、マンナン、マンノースレセプター競合体(competitor)で有効にブロックされたこと(Jiangら、1995; およびSallustorら、1995)。細胞型特異性に関して、DEC-205は、現在、低レベルではあるが、胸腺、腸、および肺においてB細胞および内皮細胞により発現されることもまた公知であり(Witmer-Packら、1995; およびInabaraら、1995)、そしてMMRもまた、マクロファージによって、さらにより豊富に発現される(Stahl 1992)。他にもまた、DC表面上で見出され、これらのものとしては、以下が挙げられる: DCIR、MDL-1、NURPIA、Dectin-1、Dectin-2、CLEC-1、CLEC-2、Langerin; およびDC-sign。

30

40

【0021】

(アレルギー)

アレルギー性応答(アレルギー性喘息およびアレルギー性鼻炎の応答を含む)は、初期応

50

答により特徴付けられ、この応答は、アレルゲン曝露の数秒から数分以内に発生し、そしてアレルゲン曝露の部位への好酸球の浸潤により特徴付けられる。具体的には、アレルギー性応答の初期の間にT_H2型リンパ球の活性化により、抗原特異的IgE抗体の生成が刺激される。抗原特異的IgE抗体は、続いて、ヒスタミン、ならびに肥満細胞および好塩基球からの炎症の他のメディエーターの放出を誘発する。遅延型応答の間に、CD4+ T_H2細胞によるIL-4およびIL-5生成が上昇する。これらのサイトカインは、アレルゲン曝露の部位(ここで、組織損傷および機能不全が生じる)へ好酸球を補充することにおいて重要な役割を果たすようである。

【0022】

現在、アレルギー性障害のための抗原免疫療法は、少量であるが、徐々に漸増量の抗原を脱感作療法といわれるプロセスにおいて皮下注射することを含む。抗原免疫療法は、現段階では、一時的に抑えるに過ぎず、治療的ではない。Weber(1997) JAMA 278:1881-1887; Stevens(1998) Acta Clinica Belgica 53:66-72; およびCanadian Society of Allergy and Clinical Immunology(1995) Can. Med. Assoc. J. 152:1413-1419。

10

【0023】

治療を始める多くの患者は、レジメンを完了せず、そして注射を1週間しそこなった場合、患者は、再び処置レジメン全体を開始しなければならない。種々の抗原が同定されており、組換え手段により生成されている。総説については、Baldo(1991) Curr. Opin. Immunol. 3:841-850; Blaser(1994) Ther. Umsch 51:19-23; およびValent(1996) Adv. Exp. Med. Bio. 409:185-196を参照のこと。

20

【0024】

抗原免疫療法処置は、潜在的に、致死的なIgE媒介性アナフィラキシーを誘導する危険性を示し、そしてアレルギー性遅延型応答のサイトカイン媒介性事象に対処しない。この治療は、「失敗の可能性を有する」と記載されている。Weber(1997)。抗原免疫療法に伴う別の重大な問題は、有害反応(特に、アナフィラキシー)の危険性が、1回の投与あたりに与えられる量および時間に対して与えられる量の両方に関して、抗原の投与量を有意に減少させることである。従って、伝統的なアレルギー免疫療法は長引くため、時間がかかり、不便、かつ高価である。

30

【0025】

IgE関連障害(例えば、アレルギー)の処置のための代替的アプローチは、ヒスタミン放出を阻害する化合物の投与を含む。多くのこのような薬物は、医師の処方箋なしで購入できる治療薬として入手可能である。他の薬物は、抗IgE結合抗体を含む。しかし、このアプローチの欠点は、症状がごまかされるに過ぎず、いずれの種類の恒久的な治療も防衛ももたらさない。

【発明の概要】

【0026】

(発明の簡単な説明)
本発明は、DCおよびそのサブセットが富化された造血細胞集団を富化するための方法に関する。この方法から得られた細胞および細胞集団が富化された組成物はまた、本発明により提供される。遺伝的に改変したDCを作製する方法もまた、提供される。遺伝的に改変したDCの組成物もまた、提供される。これらの細胞を使用する方法もまた含まれる。BDCA-2およびBDCA-3に特異的な抗原結合フラグメントおよびこれらにより認識される抗原もまた提供される。

40

【0027】

本発明は、AC144、AD5-1311、AD5-20E5、AD5-17F6、AD5-4B8、AD5-5E8、AD5-14H12またはAD5-8E7と名付けられた

50

抗体により特異的に認識されるDCのサブセットに特異的な抗原結合フラグメントを含む。本発明は、B D C A - 2 (配列番号2)と名付けられた抗原のエピトープに特異的な抗原結合フラグメントを含む。本発明は、B D C A - 3と名付けられた抗原のエピトープに特異的な抗原結合フラグメントを含む。

【0028】

本発明は、本発明の抗原結合フラグメントにより特異的に認識される、実質的に単離または濃縮されたDC集団または亜集団をさらに含む。これらの抗原結合フラグメントは、A C 1 4 4、A D 5 - 1 3 1 1、A D 5 - 2 0 E 5、A D 5 - 1 7 F 6、A D 5 - 4 B 8、A D 5 - 5 E 8、A D 5 - 1 4 H 1 2またはA D 5 - 8 E 7、あるいはB D C A - 1、B D C A - 2、B D C A - 3またはB D C A - 4に特異的な抗原結合フラグメントのいずれか1つであり得る。ニューロピリン(neuropilin)-1を認識する抗原結合フラグメントもまた、B D C A - 4を認識し、そして本明細書中における使用に適切である。

10

【0029】

本発明はさらに、細胞の実質的に全てが発現するか、またはB D C A - 1、B D C A - 2、B D C A - 3およびB D C A - 4のうち少なくとも1つの発現に基づいて単離、濃縮もしくは数え上げられたDCの集団または亜集団を含む。これらの細胞は、任意の生理学的に受容可能な賦形剤中に懸濁され得る。好ましくは、この賦形剤は、薬理的に受容可能である。

【0030】

本発明はさらに、ヒト造血細胞の混合物を画分に分離することによりDCが富化された造血細胞の組成物を得るための方法を包含し、この画分中の細胞の少なくとも80%がB D C A - 1⁺である。

20

【0031】

本発明はさらに、ヒト造血細胞の混合物を画分に分離することによりDCが富化された造血細胞の組成物を得るための方法を包含し、この画分中の細胞の少なくとも80%がB D C A - 2⁺である。

【0032】

本発明はさらに、ヒト造血細胞の混合物を画分に分離することによりDCが富化された造血細胞の組成物を得るための方法を包含し、この画分中の細胞の少なくとも80%がB D C A - 3⁺である。

30

【0033】

本発明はさらに、ヒト造血細胞の混合物を画分に分離することによりDCが富化された造血細胞の組成物を得るための方法を包含し、この画分中の細胞の少なくとも80%がB D C A - 4⁺である。

【0034】

本発明はさらに、以下の工程によりDCの実質的に純粋なサブセットを単離するための方法を包含する：a)ヒト造血細胞の混合物を得る工程；およびb)この混合物から、B D C A - 2と名付けられた抗原に特異的な抗原結合フラグメントにより特異的に認識される細胞を実質的に単離する工程。

40

【0035】

本発明はさらに、以下の工程によりDCの実質的に純粋なサブセットを単離するための方法を包含する：a)ヒト造血細胞の混合物を得る工程；およびb)この混合物から、B D C A - 3と名付けられた抗原に特異的な抗原結合フラグメントにより特異的に認識される細胞を実質的に単離する工程。

【0036】

本発明はさらに、以下の工程によりDCの実質的に純粋なサブセットを単離するための方法を包含する：a)ヒト造血細胞の混合物を得る工程；およびb)この混合物から、B D C A - 4と名付けられた抗原に特異的な抗原結合フラグメントにより特異的に認識される細胞を実質的に単離する工程。

50

【 0 0 3 7 】

本発明はさらに、以下の工程によりDCを数え上げるための方法を包含する：a)細胞の混合物を得る工程；およびb)この細胞を、抗原BDCA-1、BDCA-2、BDCA-3、およびBDCA-4のいずれか1以上に特異的な抗原結合フラグメントで標識する工程。

【 0 0 3 8 】

本発明はさらに、以下の工程によるDCの免疫能力を調節する方法を含む：DCの実質的に純粋な集団または亜集団を単離する工程；およびこのDCのカルシウム動員を調節する工程。

【 0 0 3 9 】

本発明はさらに、以下の工程により薬学的に有効な薬剤の存在について試験薬剤をスクリーニングする方法を包含する：抗原BDCA-1、BDCA-2、BDCA-3、およびBDCA-4のいずれか1以上に特異的な抗原結合フラグメントを有するDCの実質的に純粋な集団または亜集団を単離する工程；これらの単離された細胞を上記の試験薬剤を用いてスクリーニングする工程；この薬剤に対する細胞の応答をモニターする工程；上記の薬剤に曝した細胞の応答と、コントロール薬剤に曝した細胞の応答とを比較する工程；およびこの試験薬剤が単離された細胞のいずれか1つの免疫学的特性を調節したか否かを決定する工程。

10

【 0 0 4 0 】

本発明はさらに、DCがカルシウムを動員する能力を改変することによるDCの免疫学的特性を調節する方法を含む。

20

【 0 0 4 1 】

本発明はさらに、好ましくは生理学的に受容可能な賦形剤中のDCの免疫原性組成物および免疫調節組成物を含む。

【 0 0 4 2 】

本発明はさらに、DCの免疫原性組成物および免疫調節組成物の有効量を、必要とする被験体に投与する工程により、生理学的状態を処置する方法を含む。

【 0 0 4 3 】

本発明はさらに、以下の工程によりDCサイトカインを生成する方法を含む：BDCA-1、BDCA-2、BDCA-3、およびBDCA-4のいずれか1以上に特異的な抗原結合フラグメントを有するDCの実質的に純粋な集団または亜集団を単離する工程；およびこの細胞または細胞生成物または上清からサイトカインを単離する工程。

30

【 0 0 4 4 】

本発明はさらに、以下の工程によりDCサイトカイン生成を調節する方法を含む：BDCA-1、BDCA-2、BDCA-3、およびBDCA-4のいずれか1以上に特異的な抗原結合フラグメントを有するDCの実質的に純粋な集団または亜集団を単離する工程；およびDCサイトカイン生成を調節する薬剤で細胞を処理する工程。

【 0 0 4 5 】

本発明はさらに、DCサイトカイン生成を調節する薬剤の有効量を、必要とする被験体に投与する工程により、DCサイトカイン生成をインビボで調節する方法を含む。

40

【 0 0 4 6 】

本発明はさらに、以下の工程により抗原に特異的な抗体を生成する方法を含む：抗原を負荷し、そしてBDCA-1、BDCA-2、BDCA-3、およびBDCA-4のいずれか1以上に特異的な抗原結合フラグメントで単離したDCの実質的に純粋な集団または亜集団の有効量を、必要な被験体に投与する工程であって、このDCがTh2応答を誘導するように調節される、工程。

【 0 0 4 7 】

本発明はさらに、以下の工程により抗原に特異的なT細胞または体液性免疫応答を生成する方法を含む：抗原を負荷し、そしてBDCA-1、BDCA-2、BDCA-3、およびBDCA-4のいずれか1以上に特異的な抗原結合フラグメントで単離したDCの実質

50

的に純粋な集団または亜集団の有効量を、必要な被験体に投与する工程であって、この細胞が T h 1 応答を誘導するように調節される、工程。

【 0 0 4 8 】

本発明はさらに、組換え宿主細胞において、ポリペプチドを発現させ、この発現されたポリペプチドを総組換え宿主細胞成分から精製することにより調製されたポリペプチドを含み、ここで、このポリペプチドは、配列番号 2 の由来する約 5 つの連続したアミノ酸残基を含む。

【 0 0 4 9 】

本発明はさらに、精製したポリペプチドおよびそれらの組成物を含み、このポリペプチドは、配列番号 2 由来の約 5 個連続したアミノ酸残基を含む。

10

【 0 0 5 0 】

本発明はさらに、配列番号 2 でないポリペプチドのアミノ酸配列に連結するポリペプチドアミノ酸配列の融合タンパク質を含み、このアミノ酸配列は、配列番号 2 由来の約 5 個連続したアミノ酸残基を含む。

【 0 0 5 1 】

本発明はさらに、少なくとも 1 つの B D C A - 2 スプライス改変体を含むポリペプチドを含む。

【 0 0 5 2 】

本発明はさらに、B D C A - 2、そのスプライス改変体またはフラグメントの少なくとも 5 個連続したアミノ酸残基をコードするポリヌクレオチドまたはその相補体を含む。

20

【 0 0 5 3 】

本発明はさらに、B D C A - 2、そのスプライス改変体またはフラグメントの少なくとも 5 個連続したアミノ酸残基をコードするポリヌクレオチドまたはその相補体を含む組換え宿主細胞を含む。

【 0 0 5 4 】

本発明はさらに、D C と T 細胞を含む組成物を B D C A - 2、B D C A - 3 または B D C A - 4 と T 細胞との相互作用を阻害する有効量の薬剤と接触させることによって、D C と T 細胞の相互作用を阻害する方法を包含する。

【 0 0 5 5 】

本発明はさらに、被験体の炎症を減少させるのに有効な T 細胞と B D C A - 2、B D C A - 3 または B D C A - 4 の相互作用を阻害する薬剤量を、それが必要な患者に投与することにより炎症を処置する方法を包含する。

30

【 0 0 5 6 】

本発明はさらに、細胞で B D C A - 2 アンチセンスポリヌクレオチドを発現することによって、細胞における B D C A - 2 発現を抑制する方法を包含する。

【 0 0 5 7 】

本発明はさらに、B D C A - 2、そのスプライス改変体またはフラグメントの少なくとも 5 個連続したアミノ酸残基をコードするポリヌクレオチドまたはその相補体を含むトランスジェニック動物を含む。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 5 8 】

【 図 1 】 図 1 は、フィコールパック (F i c o l l - P a q u e) 密度勾配遠心分離によって単離された末梢血単核細胞 (P B M C) のフローサイトメトリー分析からの点プロットを示す。図 1 において、P B M C 上の B D C A - 2、B D C A - 3 および C D 1 c (B D C A - 1) を示す。図 1 A は、それぞれ、B D C A - 2 (A C 1 4 4)、B D C A - 3 (A D 5 - 5 E 8) および C D 1 c (A D 5 - 8 E 7) に対する F I T C 結合 m A b、および T C R ヘテロダイマー、C D 1 4、C A 1 9 および C D 5 6 に対する P E 結合 m A b による P B M C の染色を示す。数は、それぞれの象現の細胞の百分率を示す。ヨウ化プロピジウム蛍光および光散乱シグナルを、生細胞のゲーティングのために使用した。図 1 B は、(a) P B M C、(b) ゲーティングされた B D C A - 2⁺細胞、(c) ゲーテ

50

イングされたBDCA-3⁺細胞および(d)ゲーティングされたCD1c⁺細胞、の散乱プロフィールを示す。

【図2】図2は、BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4およびCD1c(BDCA-1)が、3つの別の血液DCサブセットで発現することを示す。血液DCは、CD3、CD11bおよびCD16ポジティブ細胞の枯渇、続いてCD4ポジティブ細胞の富化によってPBMCから単離された。血液DCの精製は、光散乱特性(左上点プロット)および抗-HLA-DR-Cy5 対抗-Lin-FITC(抗-TCR、CD14、CD19およびCD56)染色(上中央点プロット)によって示される。わずかなLin⁺細胞しか存在しないことに注意をすること。血液DC上のBDCA-2、BDCA-3、BDCA-4およびCD1cの発現は、CD11c、CD123および抗原自身に対するPE結合mAbおよびFITC結合mAbによる一連の二色染色で特徴付けられる。BDCA-2、BDCA-3、BDCA-4およびCD1cは、3つの別の血液DCサブセットのうち1つのみ排他的に発現することに注意をすること。サブセットは、CD123-PE 対 CD11c-FITC(左上点プロット): CD11c⁻CD123^{bright}血液DC; CD11c^{bright}CD123^{dim}血液DC; およびCD11c^{dim}CD123⁻血液DCによる血液DCの染色にしたがって規定される。

10

【図3】図3は、PBMCでのBDCA-4の発現を示す。BDCA-2(AC144)に対するFITC結合mAbおよびBDCA-4(AD5-17F6)に対するPE結合mAbによるPBMCの二色染色を示す。いくつかの単一のポジティブ(BDCA-2+BDCA-4-およびBDCA-2-BDCA-4+)なPRMCが検出されることに注意をすること。

20

【図4】図4は、IL-3の存在下における種々の培養期間後に精製された血液DCでのBDCA-2、BDCA-3およびBDCA-4の発現を示す。精製された血液DCを、rIL-3の存在下で、0時間、1時間、3時間、6時間、9時間、12時間、18時間、24時間、36時間、および48時間培養し、次いで、CD11c、BDCA-3、BDCA-2およびBDCA-4の発現についてフローサイトメトリーにより分析した。(A)ヒストグラムは、それぞれ、PE結合抗-BDCA-2mAb(AC144)および抗-BDCA-4mAb(AD-5-17F6)(太線)、およびPE結合アイソタイプ対応コントロールmAb(薄罫線)でゲーティングされたCD11c⁻、CD11c⁺血液DCの染色を示す。点プロットは、抗-BDCA-3(AD5-5E8)ビオチン/ストレプトアビジン-APCに対するCD11c-PEによる血液DCの染色を示す。(B)ダイアグラムは、それぞれ、CD11c⁻(黒三角)およびCD11c⁺(黒四角)DCの抗-BDCA-2-PE、抗-BDCA-4-PEおよび抗BDCA-3ビオチン/ストレプトアビジン-APC染色についての平均蛍光強度(MFI)値を示す。BDCA-2およびBDCA-4について、MFI値は、それぞれ、AC144およびAD-17F6で得られた値からアイソタイプコントロールmAbによって得られた値を減算することによって計算された。BDCA-3について、MFI値は、いずれの染色mAb(自己蛍光)もなしで得られた値をAD5-5E8によって得られた値から減算することによって計算された。

30

【図5】図5は、6つのエクソン全てが発現されているBDCA-2の1つのアイソフォームのアミノ酸配列を示す(配列番号2)。

40

【図6】図6は、BDCA-1-特異的mAb AD5-8E7がMOLT-4細胞へのCD1c mAb M241の結合をブロックすることを示す。MOLT-4細胞を、飽和量のAD5-8E7 mAb(太線)またはアイソトープコントロールmAb(薄罫線)とプレインキュベートし、次いで、PE結合CD1c mAb(M241)で染色した。

【図7】図7は、Mo-DCおよびCD34⁺細胞由来DC(CD34-DC)におけるBDCA-2、BDCA-3およびBDCA-4の発現を示す。CD14⁺単球およびCD34⁺造血前駆細胞を、それぞれ、CD14およびCD34 mAb結合マイクロビーズでの直接磁気標識を介して免疫磁性的に精製した。精製した単球を、rGM-CSFおよ

50

び r I L - 4 の存在下で 7 日間培養し、そして精製した C D 3 4 - D C を r f l t 3 - リガンド、r T G F - 1、r T N F - 、r S C F および r G M - C S F の存在下で 1 1 日間培養した。培養期間後、細胞を C D 1 a - F I T C、C D 1 c - P E (A D 5 - 8 E 7)、抗 - B D C A - 2 P E (A C 1 1 4)、抗 - B D C A - 3 - P E (A D 5 - 5 E 8) および抗 - B D C A - 4 - P E (A D 5 - 1 7 F 6) で染色した。ヒストグラムは、それぞれ、(A) M o - D C および (B) C D 3 4 - D C (太線) を示す。薄罫線は、アイソタイプコントロール m A b による染色を示す。最も左部分のヒストグラムを除いて (C D 1 a 染色)、ゲーティングされた C D 1 a⁺細胞を (B) に示す。

【図 8】図 8 は、抗 - B D C A - 2 m A b 標識された B D C A 2⁺細胞の培養が、急速な m A b インターナリゼーションを引き起こすことを示す。P B M C を、4 で F I T C 結合抗 - B D C A - 2 m A b (A C 1 4 4、I g G 1) で標識し、3 7 で示される時間インキュベートした。次いで、4 で P E 結合ラット抗 - マウス I g G 1 m A b (X 5 6) および C y 5 結合 C D 1 2 3 m A b (A C 1 4 5、I g G 2 a) で染色した。ゲーティングされた B D C A - 2⁺C D 1 2 3 細胞の抗 - D B C A - 2 - F I T C (黒四角) およびラット抗 - マウス I g G 1 m A b - P E (黒三角) 染色の M F I 値を示す。

【図 9】図 9 は、免疫磁性的に精製した C D 1 c⁺、B D C A - 2⁺および B D C A - 3⁺血液 D C の形態を示す。D C 1 c⁺、B D C A - 2⁺および B D C A - 3⁺細胞を、P E 結合 1 次 m A b (A D a 5 - 8 E 7、A C 1 4 4 および A D 5 - 5 E 8) および抗 - P E m A b 結合マイクロビーズで間接磁性標識することによって P B M C から単離し、続いて、M A C S によって標識した細胞の富化を行った。点プロットは、それぞれ、C D 1 c⁺ (上点プロット)、B D C A - 2⁺ (中点プロット) および B D C A (下点プロット) の磁性的な富化の前 (左点プロット) および後 (右点プロット) の H L A - D R - F I T C および P E 結合 m A b による P B M C の染色を示す。右側の 3 つの像は、細胞遠心分離後の単離された C D 1 c⁺ (上点プロット)、B D C A - 2⁺ (中点プロット) および B D C A 3⁺細胞のメイ - グリュンヴァルト / ギームザ染料を示す。富化された C D 1 c⁺細胞の像において小さなリンパ球が見られ得ることに注意をすること。これらは、C D 1 c⁺B 細胞である。

【図 10】図 10 は、培養時の、C D 1 c⁺、B D C A - 2⁺および B D C A - 3⁺血液 D C 上の M H C クラス I I、C D 8 3 および同時刺激分子のアップレギュレーションを示す。精製した C D 1 c⁺ (A)、B D C A - 2⁺ (C) および B D C A - 3⁺ (B) を、それぞれ、培地中で 1 日間 (C D 1 c⁺ および B D C A - 3⁺ B D C) または C D 3 2 - 形質導入 L 細胞上の r I L - 3 および抗 - C D 4 0 m A b を含む培地で 2 日間 (B D C A - 2⁺) 培養した。単球を r G M - C S F および r I L - 4 の存在下で培地中で 7 日間培養することによって、「未熟な」M o - D C (D) を作製した。T N F の存在下で未熟な M o - D C を培地中でさらに 3 日間培養することによって、「成熟した」M o - D C (E) を作製した。ヒストグラムは、それぞれ、C D 1 a - F I T C、C D 8 0 - P E、C D 8 3 - P E、C D 8 6 - P E および H L A - D R - P E による細胞染色を示す (太線)。薄罫線は、アイソタイプおよび蛍光染色対応コントロール m A b による細胞染色を示す。

【図 11】図 11 は、精製した C D 3⁺T 細胞と比較した、新たに単離された C D 1 c⁺、B D C A - 2⁺および B D C A - 3⁺血液 D C のエンドサイトーシス容量を示す。単離された C D 1 c⁺D C (黒菱形)、B D C A - 2⁺B D C (黒三角)、B D C A - 3⁺D C (黒四角) および C D 3⁺T 細胞 (*) を、3 7 で 1 m g / m l のルシファーイエロー (L Y) を含む培地中で 0、1 5、4 5 および 7 5 分間インキュベートし、氷冷の P B S / E D T A / B S A 中で 3 度洗浄し、次いでフローサイトメトリーで分析した。M F I 値を減算後の L Y 蛍光について M F I 値を示す。これは L Y 非存在下での 4 でのインキュベーションで得られた。

【図 12】図 12 は、B D C A - 2 の c D N A 配列を示す (配列番号 1)。

【図 13】図 13 は、抗 - B D C A - 2 m A b 単独 (A) および / または抗 B D C A - 2 および架橋二次 m A b (B、D、E) を介する細胞内 C a 2⁺動員が、免疫磁性的に精製した B D C A - 2⁺B D C A - 4⁺血液 D C (A、B) および B D C A - 2 トランスフェク

10

20

30

40

50

トU937細胞(D)において誘導されるが、非トランスフェクトU937細胞(E)において誘導されないことを示す。免疫磁性的に精製したBDCA-2⁺BDCA-4⁺BDCA-4におけるBDCA-4の抗-BDCA-4 mAbおよび架橋二次mAbとの連結は、細胞内Ca²⁺動員を誘導しない。時間(X-軸、1024の値は、204, 80秒に対応する)に対するインド-1-フルオレッセンス(Y-軸)Ca²⁺依存性の405nm/525nm比が示される。Aは、BDCA-2+BDCA-4+血液DC、抗-BDCA-2(AC144、IgG1)である。Bは、BDCA-2+BDCA-4+血液DC、抗-BDCA-2(AC144、IgG1)およびラット抗-マウスIgG1(X56)である。Cは、BDCA-2+BDCA-4+血液DC、抗BDCA-4(AD5-17F6、IgG1)およびラット抗マウスIgG1(X56)である。Dは、BDCA-2トランスフェクトU937細胞、抗-BDCA-2(AC144、IgG1)およびラット抗-マウスIgG1(X56)である。Eは、非トランスフェクトU937細胞、抗-BDCA-2(AC144、IgG1)およびラット抗-マウスIgG1(X56)である。

10

【図14】図14は、特異的mAb、続いて二次架橋mAbとのBDCA-2の連結(しかしBDCA-4は連結していない)が、インフルエンザウイルス株PR8による刺激に反応して、血液または扁桃由来のプラズマ細胞様BDCA-2⁺BDCA-4⁺DCによるI型インターフェロンの分泌を阻害することを示す。新たに単離された血液(A)または扁桃(B)由来のプラズマ細胞様BDCA-2⁺BDCA-4⁺DCをIL-3単独(コントロール); IL-3、抗-BDCA-2 mAbおよびラット抗-マウスIgG1 mAb(AC144+RamG1); IL-3、抗-BDCA-2 mAb、ラット抗-マウスIgG1 mAbおよびインフルエンザウイルス株PR8(AC144+RamG1+FLU); IL-3およびインフルエンザウイルス株PR8(FLU); IL-3、抗-サイトケラチンmAb、ラット抗-マウスIgG1 mAbおよびインフルエンザウイルス株PR8(CK3+RamG1+FLU); IL-3、抗-BDCA-4 mAb、ラット抗-マウスIgG1 mAbおよびインフルエンザウイルス株PR8(17F6+RamG1+FLU)の存在下で24時間培養した。培養上清中の分泌されたI型インターフェロン(U/ml)を、I型インターフェロン(U/ml)標準曲線を参照にしてバイオアッセイによって測定した。

20

【図15】図15は、単離されたBDCA-2およびBDCA-4発現プラズマ細胞様DCによるマウスIgG1に特異的なT細胞クローンに対する抗-BDCA-2-mAb(AC144、IgG1)の存在を示す。BDCA-2⁺BDCA-4⁺プラズマ細胞様DCは、T細胞に対して、抗-ILT-3 mAb(ZM3.8、IgG1、黒三角)および抗-サイトケラチンmAb(CK3-11D5、IgG1、黒丸)よりも抗-BDCA-2 mAb(AC144、IgG1、黒四角)をずっと効果的に提示する。

30

【図16】図16は、扁桃プラズマ細胞様CD123⁺DCにおけるBDCA-2およびBDCA-4の発現を示す。

【図17】図17は、ニューロピリン(neuropilin)-1(ジーンバンク受託番号003873)は、抗-BDCA-4 mAb AD5-17F6(抗-NRP-1(ML))により、ニューロピリン-1-トランスフェクトPAE細胞(NP)の細胞溶解産物から免疫沈澱するが、非トランスフェクトPAE細胞(P)の細胞溶解産物から免疫沈澱しないことを示す。沈殿タンパク質を、Shay Soker、Children's Hospital、Boston、MA(S)からのBDCA-4特異的mAb AD5-17F6(ML)またはニューロピリン-1特異的mAbを用いSDS-PAGEおよびウエスタンブロッティングによって分析した。

40

【図18】図18は、特異的mAb、続いて二次架橋mAbとのBDCA-2の連結(しかしBDCA-4は連結していない)が、ポリI:Cによる刺激に反応して血液または扁桃由来のプラズマ細胞様BDCA-2⁺BDCA-4⁺DCによるINF- γ の分泌を阻害することを示す。血液由来のプラズマ細胞様BDCA-2+BDCA-4+DCを、10 μ g/mlのAC144 mAb(2および4)またはマウスIgG1 mAb(CF

50

6 B、抗 - T P O、1 および 3) で 3 7 で 3 0 分間培養した。

【図 1 9】図 1 9 は、B D C A - 2 c D N A についての、C L O N T E C H から得たヒトの複数の組織の c D N A パネルの分析 (レーン 1 : 心臓 ; レーン 2 : 脳 ; レーン 3 : 胎盤 ; レーン 4 : 肺 ; レーン 5 : 肝臓 ; レーン 6 : 骨格筋 ; レーン 7 : 腎臓 ; レーン 8 : 膵臓 ; レーン 9 : 脾臓 ; レーン 1 0 : 胸腺 ; レーン 1 1 : 精巣 ; レーン 1 2 : 卵巣 ; レーン 1 3 : 小腸 ; レーン 1 4 : リンパ節 ; レーン 1 5 : 骨髄 ; レーン 1 6 : 胎児の肝臓 ; レーン 1 7 : 扁桃) および血液白血球の異なる集団から調製された c D N A の分析 (レーン 1 8 : T 細胞 ; レーン 1 9 : B 細胞 ; レーン 2 0 : N K 細胞 ; レーン 2 1 : 単球 ; レーン 2 2 : C D 1 1 c ^{bright} C D 1 2 3 ^{low} B D C ; レーン 2 3 : C D 1 1 c - C D 1 2 3 ^{bright} プラズマ細胞様 D C) を示す。コントロールは、G 3 P D H である。

10

【図 2 0】図 2 0 は、B D C A - 2 転写物のスプライス改変体を示す。スプライス改変体を、発現分析において使用する B D C A - 2 に対して特異的なプライマーを用いて、R T - P C R によって分析した。増幅したフラグメントはプラスミドベクターにクローニングし、そして配列決定された。

【図 2 1】図 2 1 は、デクチン - 2 転写物のスプライス改変体を示す。

【図 2 2】図 2 2 は、B D C A - 2 およびマウスデクチン - 2 の m R N A 配列の配列を示される推定イントロンの正確な位置とともに示す。図 2 3 において、* は、全ての整列された配列における同一の保存された残基を表し、: は保存的置換を表し、. は、半保存的置換を表し、影付き領域は、保存的炭水化物認識ドメイン (C R D) を示し、イタリックは、推定膜貫通ドメインを示す。以下のシンボルは、C R D において C 型レクチン間で強く保存された残基を強調表示する。

20

【化 1】

H	疎水性
A	脂肪族
C	システイン
G	グリシン
E	グルタミン酸
W	トリプトファン
Δ	芳香族アミノ酸
+	炭水化物のカルシウム依存性結合に関与する残基
+P++	炭水化物の結合特異性を決定する領域

30

【図 2 3】図 2 3 は、ヒト B D C A - 2、ヒト D C I R およびマウスデクチン - 2 のアミノ酸配列の配列を示す。

【図 2 4】図 2 4 は、B D C A - 3 特異的 m A b A D 5 - 1 4 H 1 2 (I g G 1) を用いて表面ビオチン化 H D - M Y - Z 細胞の細胞溶解産物から免疫沈殿した B D C A - 3 を示す。特異性のコントロールのために、C D 1 9 - 特異的 m A b S J 2 5 - C 1 (I g G 1) を使用した。沈殿タンパク質を、S D S - P A G E (4 ~ 1 2 %) およびストربتアビジンペルオキシダーゼを用いたウエスタンブロッティングによって分析した。B D C A - 3 特異的 m A b A D 5 - 1 4 H 1 2 は、H D - M Y - Z 細胞由来の約 1 0 0 k D の細胞表面タンパク質を特異的に免疫沈殿することに注意すること。従って、B D C A - 3 は、見かけの 1 0 0 k D の分子量を有する。

40

【発明を実施するための形態】

【0059】

(発明の詳細な説明)

本発明は、D C において富化された細胞集団およびそれらのサブセットについて富化する方法に関する。D C について富化された組成物およびそれらから得られた細胞集団もまた、本発明によって提供される。改変された細胞についての方法および組成物も提供される。遺伝的に改変された細胞を含む、改変された細胞の組成物もまた提供される。改変と非改変の両方の細胞の使用方法が提供される。抗原結合フラグメントおよびそれらによって認識される抗原も提供される。

50

【0060】

免疫磁性的に精製したCD4⁺Lin⁻DC（これらは、3つのDC抗原を同定する：BDCA-2、BDCA-3およびBDCA-4）に対して惹起される新規のmAbのパネルが本明細書中に記載される。BDCA-2、BDCA-3は新規である。BDCA-4の場合、DC特異的抗原として以前に記載されていないが、抗原はニューロピリン（neuropilin）-1（神経細胞誘導を媒介するコラプシン/セマホリンファミリーに対するレセプター）として同定された。Heら（1997）Cell 90：739-751。

【0061】

非培養ヒト血液において、BDCA-2およびBDCA-4の発現は、プラズマ細胞様CD123^{bright}CD11c⁻DCに厳密に制限され、一方、BDCA-3は、CD123⁻CD11c^{dim}DCの小集団に制限される。このBDCA-3⁺集団は、伝統的なCD123^{dim}CD11c^{bright}DCと多くの免疫表現型特性を共有するが、CD123^{dim}CD11c^{dim}DCと異なって、BDCA-3⁺DCはCD1c（BDCA-1）、CD2およびいくつかのFcレセプターの発現を欠く。

10

【0062】

精製されていないDCの供給源は、当該分野において公知の任意のもの（例えば、骨髄、胎児、新生児または成体あるいは他の造血細胞供給源（例えば、胎児の肝臓、末梢血または臍帯血液扁桃、リンパ節、鼻粘膜、脾臓、皮膚、気道上皮、肺、肝臓消化管、パイエル腺叢など））であり得る。DCはまた、前駆細胞由来のDCのような培養細胞から単離され得る。種々の技術が細胞を分離するために利用され得る。例えば、ネガティブ選択法によって、非DCを最初に除去し得る。mAbは、ポジティブ選択とネガティブ選択との両方に対して特定の細胞系統および/または分化の段階に関する同定マーカーとして特に有用である。

20

【0063】

所望される場合、最終的に分化した細胞の大集団が、比較的粗いネガティブ分離を用いて最初に除去され得る。例えば、磁気ビーズ分離は、多くの関連しない細胞を除去するために最初に使用され得る。全細胞の少なくとも約80%、通常少なくとも約70%が、DCの単離前に除去される。好ましくは、DCは、ポジティブ選択によって細胞供給源から直接単離される。

30

【0064】

分離のための手順としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：密度勾配遠心分離；ロゼティング（rosetting）；細胞密度を改変する粒子とのカップリング；抗体でコーティングされた磁気ビーズまたは抗体でコーティングされたfero流体（非粒子（nonoparticle））を用いた磁性分離；アフィニティークロマトグラフィー；mAbに結合するか、またはmAbと組み合わせて使用される細胞毒性剤（相補体および細胞毒素を含むが、これらに限定されない）；および固体マトリックス（例えば、プレート）に付着した抗体によるパニング、洗浄または任意の他の便利な技術。

【0065】

正確な分離および分析を提供する技術としては、以下があげられるが、これらに限定されない：磁気ビーズ分離およびフローサイトメトリー（これらは、洗練さの程度を変化し得る（例えば、複数の色チャンネル、ローアングルおよび鋭い光散乱検出チャンネル、インピーダンスチャンネルなど））。

40

【0066】

細胞は、ヨウ化プロピジウム（PI）のような死細胞に関連する染料を利用して、死細胞と対比して選択され得る。好ましくは、細胞は、ウシ胎仔血清（FCS）のような2%血清、またはヒト血清アルブミン（HSA）を含む培地、あるいは任意の他の適切な、好ましくは、無菌の等張培地中を収集される。生理学的指標として、HSAが好ましい。細胞の遺伝的改変は、RNAでトランスフェクトされた組換えDNA構築物を有する実質的に均質な細胞組成物の形質導入、細胞融合、抗原の充填および当該分野において公知の種々

50

の方法および/または本明細書に中で記載される種々の方法によってそれらが維持される間の任意の点で達成され得る。

【0067】

細胞の改変のために、レトロウイルスベクターが利用され得るが、任意の他の適切なベクター、送達システムまたは細胞改変が利用され得る。これらは、例えば、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、人工染色体、酵母または腫瘍のような抗原供給抗原由来のRNAを含む。遺伝子改変は、あるならば、成熟DCが有限の寿命を有するので永続する必要がない。遺伝子アプローチは、免疫または寛容を誘導するために、DCにおいて外来（腫瘍、ウイルス、寄生物など）の抗原または自己抗原を発現するために使用される。改変の寿命はまた、（T細胞によるように）治療を制限する自殺遺伝子によって制御され得る。

10

【0068】

形質導入の方法としては、当該分野において周知の任意の以下のものが挙げられるが、これらの限定されない：例えば、Bregniら（1992）Blood 80：1418-1422によって記載される方法によって、プロデューサー細胞と共に細胞を直接同時培養する方法、または、例えば、Xuら（1994）Exp. Hemat. 22：223-230；およびHughesら（1992）J. Clin. Invest. 89：1817によって記載される方法によって、適切な増殖因子およびポリカチオンと共に、あるいはそれらなしで、ウイルス上清のみと共に培養すること。

【0069】

宿主への抗原を発現するための抗原を発現するか、または抗原を充填された改変細胞の再導入実施形態に、T細胞は活性化されるか、アネルギー（anergize）されるか、または除去され、そして抗原に対して特異的に指向する。通常、適切な抗原としては、ウイルス的に感染された細胞、または癌細胞によって発現された抗原、微生物、酵母、原生動物、自己抗原（寛容源）およびアレルギー源が挙げられる。より具体的に、適切な抗原としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない；ウイルスタンパク質、癌細胞のタンパク質、組織特異的タンパク質または免疫寛容タンパク質。T細胞の「誘導」は、欠失またはアネルギーによるような抗原特異的T細胞の不活性化を含み得る。不活性化は、それぞれ器官移植および自己免疫疾患におけるような寛容を確立または再確立するために特に有用である。改変されたDCは、当該分野において公知の任意の方法によって投与され得、これは、静脈内、皮下内、結節内および胸腺に直接を含むが、これらに限定されない。好ましくは、投与は静脈内（IV）である。

20

30

【0070】

しばしば、細胞免疫治療は、骨髓血球搬出収集物またはヒト宿主由来の他の細胞の供給源の除去、供給源からの細胞の単離を含む。一方、宿主は、造血幹細胞移植が行われる場合、ネイティブの造血能力を部分的、実質的または完全に除去するために処置され得る。単離された細胞は、所望の改変を有する細胞を提供するために、この時間の間改変され得る。完全な造血除去の場合、幹細胞増強がまた必要とされる。次いで、細胞または改変された細胞は、宿主に貯蔵され、新規の能力を提供する。細胞除去の方法、宿主除去および幹/前駆細胞再増殖が当該分野において公知である。

【0071】

改変された細胞は、通常、静脈内、結節内および皮下内に、任意の生理学的に受容可能なピヒクルの形態で投与され得る。通常、少なくとも、 1×10^5 の細胞、好ましくは、 1×10^6 以上の細胞が投与される。細胞は、注射、カテーテルなどによって導入され得る。所望される場合、因子はまた以下を含み得るが、これらに限定されない；インターロイキン（例えば、IL-2、IL-3、IL-4、IL-12およびflt-リガンド）および他のインターロイキン、コロニー刺激因子（例えば、G-、M-およびGM-CSF）インターフェロン（例えば、 α -インターフェロン）。

40

【0072】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸残基のポリマーをいうために、本明細書中で交換可能に使用される。ポリマーは、直鎖また

50

は分枝であり得、これは、改変されたアミノ酸残基またはアミノ酸アナログを含み得、そしてこれは、アミノ酸残基以外の化学的部分によって中断され得る。この用語はまた、自然にまたは介入によって改変されたアミノ酸ポリマーを含み、これは以下を含むが、これらに限定されない：ジスルフィド結合フォメーション、グリコシル化、脂質化 (lipidation)、アセチル化、リン酸化、あるいは任意の他の操作または改変 (例えば、標識または生物活性化成分との結合)。他に記述または示されない場合、用語、抗原結合フラグメントは、免疫学的な特異性を有する任意のポリペプチドモノマーまたはポリマー (これは、インタクトな抗体を含む)、および本明細書中に記載されるような、より小さい、およびより大きい機能的に等価なポリペプチドを含む。

1. 抗原結合フラグメントおよびそれらの組成物

10

本発明は、DCを特異的に認識する抗原結合フラグメントを含む。すなわち、抗原は、DC上で見出され、その結果、抗原を認識する抗原結合フラグメントは優先的にDCまたはそれらのサブセットを認識するか、または結合する。あるいは、BDCA-4によるように、抗原は、他の細胞型で見出される；しかし、造血細胞内で、抗原はDC上に主に発現する。

【0073】

本発明はさらに、少なくとも1つのDC抗原に結合する単離された抗原結合フラグメントを含む物質の組成物を包含する。好ましくは、抗原結合フラグメントは、AC144、AD5-13A11、AD5-20E5、AD5-17F6、AD5-4B8、AD5-5E8、AD5-14H12およびAD5-8E7と命名されたmAbであるか、またはこれに由来する。表1は、各mAbによって認識される抗原およびエピトープ、ならびにDCに特異的なmAbのアイソタイプを示す。

20

【0074】

【表1】

表1

抗原	抗体	エピトープ	アイソタイプ	CD11c ^{bright} CD123 ^{low} DC	CD11c ^{low} DC123 ⁻ DC	CD11c ⁻ DC123 ^{bright} DC	他の白血球
CD1c	AD5-8E7	1A	IgG2a	+	-	-	B細胞サブセット
BDCA-2	AC144	2A	IgG1	-	-	+	-
BDCA-2	AD5-13A11	2A	IgG2a	-	-	+	-
BDCA-2	AD5-5B8	2A	IgG1	-	-	+	-
BDCA-3	AD5-5E8	3A	IgG1	-	+	-	-
BDCA-3	AD5-14H12	3B	IgG1	-	+	-	-
BDCA-4	AD5-17F6	4A	IgG1	-	-	+	-

30

非培養ヒト血液において、BDCA-2およびBDCA-4はCD123^{bright}CD11c⁻DC集団により発現される。このDC集団は、現在一般にプラズマ細胞様DC (plasmacytoid DC) といわれている。BDCA-2またはBDCA-4をプラズマ細胞様DCの免疫磁気性単離および/またはフローサイトメトリー同定のための表面マーカーとして用いることで、本明細書に記載されるこれらの細胞の頻度、免疫表現型、形態、エンドサイトーシス能および成熟化についての結果は、白血球抗原のラージパネルが用いられる以前の報告と完全に一致した。このことは、両方の抗原が、非培養ヒト血液中のプラズマ細胞様DCに対する有用なマーカーであることをはっきりと説明する。扁桃細胞の染色は、末梢リンパ器官のプラズマ細胞様DCに関連するT細胞域がまた、他のリンパ組織関連DC集団 (例えば、BDCA-2およびBDCA-4の発現に基づく、胚

40

50

中心DC、樹枝状DC (interdigitating DC)、および小胞DC)からも区別され得ることを示す(図16)。

【0075】

B D C A - 2と異なり、B D C A - 4はまた、インビトロでの種々の分化型DC集団で発現される：(1) B D C A - 2と対比して、B D C A - 4は、M o - D CおよびC D 3 4 - D Cの両方で発現される；(2) B D C A - 2の発現は、培養中でいったんI L - 3媒介成熟化を受けると、プラズマ細胞様DCにおいて完全にダウンレギュレートされるが、B D C A - 4の発現は、培養されたプラズマ細胞様DCにおいて実際にアップレギュレートされる；および(3) B D C A - 2と対比して、B D C A - 4は、培養されたC D 1 1 c⁺DCの大部分によって12時間以内に発現される。これにより、このことが、C D 1 1 c⁺DC 1 1 c^{bright}の大集団にとってのみ事実なのか、またはC D 1 c⁻C D 1 1 c^{dim} C D 1 2 3⁻の小集団にとってもまた事実なのか不明確にしている。プラズマ細胞様DC以外のB D C A - 4⁺細胞が非培養ヒト血液中存在しないという発見は、実際に、上述の分化型B D C A - 4⁺DC集団のインビトロでの対応物が血液中に存在しないことを示す。

10

【0076】

抗B D C A - 2 m A bを用いたB D C A - 2の架橋は、抗原 - A b複合体の急速なインターナリゼーションを誘導する。DCに対する他のエンドサイトーシスレセプターと類似して、これらは、ランゲリン(Langerin)のように成熟に対してダウンレギュレートされる(Valladeauら、(2000) Immunity 12 : 71 - 81)。

したがって、B D C A - 2は抗原捕捉機能を有するレセプターであり得る。B D C A - 2は、C型レクチンであり、連結後に急速にインターナリゼーションされ(図8)、そしてB D C A - 2リガンドはプロセスを受けてT細胞に対して提示される(図15)。従って、D E C - 2 0 5のように、B D C A - 2は、T細胞に対するリガンドとして抗原取り込み機能および提示機能を有する。

20

【0077】

B D C A - 3の発現は、非培養ヒト血液中でC D 1 c⁻C D 1 1 c^{dim} C D 1 2 3⁻DCの小集団に限定される。表現型、形態、エンドサイトーシスの能力および成熟の必要条件に関して、このDC集団はC D 1⁺C D 1 1 c^{bright} C D 1 2 3^{dim} DC集団と全く同一である。しかし、B D C A - 3およびC D 1 c⁺発現自体は別にして、免疫表現型分析により、いくつかの決定的な相違が明らかにされた。：C D 1 c⁺B D Cと対比して、B D C A - 3⁺は、F cレセプターC D 3 2、C D 6 4、およびE c o R Iを発現しない、そしてこれらはC D 2を発現しない。F cレセプター発現の欠損は、C D 1 c⁺B D Cと異なりB D C A - 3⁺は、I g媒介の抗原取り込み能を有しないことを示す(Fangerら(1996) J . Immunol . 157 : 541 - 548 ; Fangerら(1997) J . Immunol . 158 : 3090 - 3098 ; およびMaurerら(1996) J . Immunol . 157 : 607 - 616)。本明細書で示されるように、B D C A - 3は100kDのタンパク質である。

30

【0078】

C D 1 c⁻C D 1 1 c^{dim} DCと対比して、D C 1 c⁺C D 1 1 c^{bright} DCが、G M - C S F、I L - 4およびT G F - 1と共に培養された場合、ランゲルハルス細胞の特性(Lag抗原、E-カドヘリン、およびランゲリンの発現、ならびにパーベック顆粒の存在)を取得する能力を有することについての証拠がある。B D C A - 3⁺DCおよびC D 1 c⁺DCが小細胞型の成熟工程を示す場合、このことは、B D C A - 3⁺DCがランゲルハルス細胞に分化する能力をすでに失っているかまたはまだ獲得していないかのいずれかであることを示す。

40

【0079】

本明細書で示される結果とは逆に、I t oら(1999)は、C D 1 c⁻C D 1 1 c^{dim} DCと異なり、C D 1 c⁺C D 1 1 c^{bright} DCが、C D 1 aを発現することを報告した。B L - 6およびB 5の2つのm A bは、C D 1 aの染色のために使用され、そしてこの2

50

つのmAbを比較した場合、染色強度の違いが実際に観察された(B-B5での染色がおそらくより鮮やかであった)。本明細書中で示されるように、DCの染色は、CD1a mAbであるBL-6およびHI49の至適滴定量を用いた場合明らかに陰性であったが、B-B5を用いた場合陽性であった。さらに、BL-6およびHI149と異なり、B-B5は血液中の高い割合のCD19⁺B細胞を染色した。従って、B-Bの染色パターンは、CD1a mAbよりもCD1c mAbのはっきりとした暗示であり、そして実際にCD1c mAb AD5-8E7は、B-B5のMOLT-4細胞への結合を阻害する。従って、本発明者らは、B-5がCD1cを認識すること、およびCD1c⁺DCがCD1aを発現しないことを結論づける。

【0080】

CD1c、CD2およびCD14についてのCD1c⁺DCの染色は、低い割合のDCが、変動し得る程度でCD14を発現すること、およびこれらの細胞でのCD1cおよびCD2の発現レベルが、CD14の発現レベルと反比例することを明らかにした。この観察は、直系の分化モデル従い、CD1c⁺CD2⁺CD11c^{bright}CD14⁻DCは、両方の細胞型の共通の前駆体の子孫というよりはCD14⁺CD1c⁻CD2⁻単球の子孫である。かなりの割合のCD14⁺単球がすでに非常に低レベルのCD2を発現し、そしてGM-CSFおよびIL-4と共に培養された場合に、代表的な樹枝状の形態および強力なT細胞刺激性を有する成熟DCに急速に分化する能力を有することの観察によりこの概念はさらに支持される(Crawfordら(1999)J. Immunol. 163: 5920-5928)。

【0081】

CD1c(BDCA-1)、BDCA-2、BDCA-3およびBDCA-4のmAbの使用は利便性、および明白な機能的摂動なしにPBMC、白血球搬出物質、全血、扁桃などからDCを迅速に検出、列挙および単離する簡便かつ有効な方法を提供する。これは、これらのさらなる機能的および分子的な特徴付けに対する補助として価値があり、これらの相互関係を明らかにする際に有用であり得る。さらに、非常に均質にDC集団を容易に単離する能力はこれらの病理的な使用を容易にする。この抗原結合フラグメントはまた、組織(非造血組織(限定することなく、気道上皮、皮膚、腸、肺および肝臓が挙げられる)および造血組織(限定することなく、扁桃、脾臓、リンパ節および胸腺が挙げられる)の両方)からのDCの検出、列挙および/または単離の際に有用である。

【0082】

抗体を分泌するハイブリドーマもまた、本発明に含まれ、それらの抗原結合フラグメントを発現する他の細胞についても同様に本発明に含まれる。BDCA-2またはBDCA-3またはBDCA-4を特異的に認識する任意の抗原フラグメントもまた本発明に含まれる。表1および本発明で提供される実施例に見られるように、これらの抗原を特異的に認識する複数のタイプのmAbが産生され得る。また、本明細書に示される結果に見られるように、抗原結合フラグメントは、同じ抗原に対する同じエピトープであると認識する必要はない。このような全ての抗原結合フラグメントおよびこれらの組成物は、本発明に含まれる。

【0083】

用語「抗原結合フラグメント」は、優先的にDCまたはこれらの亜集団に結合する任意の一部を含む。適切な一部分としては、所望の標的分子と結合するアプターとして公知のオリゴヌクレオチド(HermannおよびPantel(2000)Science 289: 820-825)、炭水化物、レクチン、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv(単量体形態および多量体形態の両方)および単離されたH鎖およびL鎖のようなIgフラグメント、が挙げられるがこれらに限定されない。抗原結合フラグメントは、インタクティブなIgの特異性を保持するが、アビディティおよび/またはアフィニティは変化され得る。

【0084】

該して、本明細書中に記載される特定の化合物、組成物および方法は、含有する抗原決定

10

20

30

40

50

基が提供されれば、標準的な免疫化学技術により慣用的に生成され得る抗体およびこれらの誘導体に関する。これらとしては、例えば、化学結合により、もしくは賦形剤またはアジュバンドと混合することにより結合した別の化合物と結合した抗原結合フラグメントが挙げられるがこれらに限定されない。特異的な結合パターンおよびこれらを作製する方法は、本明細書中に記載されており、そして当該分野で公知である。

【0085】

抗原結合フラグメント（これらの「誘導体」もまた含む）は、代表的に遺伝子操作により生成されるが、これらは他の方法および方法の組み合わせにより代替的に獲得され得る。これらの種別としては、加工ペプチドフラグメントおよび融合タンパク質が挙げられるがこれらに限定されない。好ましい化合物として、抗DC CDRを含むポリペプチドフラグメント、サイトカインエフェクター要素を含む抗体融合タンパク質、アジュバンドまたは薬剤を含む抗体融合タンパク質、腫瘍細胞由来の抗原を含む抗体融合タンパク質、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原、酵母抗原、自己抗原またはそれから誘導された抗原性ペプチド（T細胞エピトープ）、および単鎖V領域タンパク質が挙げられる。抗原結合フラグメントは、これらがヒト供給源から単離された場合、ヒト起源の抗原結合フラグメントであると考えられ、そして直接使用されるかあるいは他の細胞型およびこれらの誘導体またはヒト染色体全体もしくはその一部分（例えば、 V_H 、 D_H 、 J_H 、 V_L 、 J_L 、 C_H 、 C_L の遺伝子セグメントをコードするヒト染色体を有するマウス）においてクローン化されそして発現される。

【0086】

「融合ポリペプチド」は、天然で見出されるものとは異なる位置で連続するペプチド領域を含むポリペプチドである。この領域は、通常別々のタンパク質に存在し得、1つにされて融合タンパク質となる；これらは通常同じタンパク質内に存在し得るが、この融合ポリペプチドにおいて新しい配置に置かれる；またはこれらは合成的に配置され得る。例えば、本発明は、抗原結合フラグメントの機能的部分およびトキシンのような別のペプチドからなる組換えタンパク質（およびこのタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはこれに相補なポリヌクレオチド）を含む。これらの融合タンパク質を作製する方法は当該分野で公知であり、例えばこれらは、WO 93 / 07286に記載される。

【0087】

ポリペプチドの「機能的に等価なフラグメント」は、付加、欠損、置換の任意の組み合わせによりネイティブの配列と異なるが、用いられる状況に関連するフラグメントの少なくとも1つの機能的特性は保護されている。

【0088】

抗原結合フラグメントは、免疫性疾患に関連する臨床的状态を緩和する際に有用である。本発明はさらに、抗原結合フラグメントのポリペプチド誘導体および診断、処置、および新規薬剤の製造においてこれらの組成物を使用するための方法を包含する。

【0089】

本発明はまた、科学的機能部分と結合した抗原結合フラグメントを包含する。代表的には、この部分は、検出可能なシグナルを生成し得る標識である。これらの複合化した抗原結合フラグメントは、例えば、幹細胞移植後および化学療法のような免疫切除療法後の種々の組織、種々の疾患におけるDCの定量、ならびに例えば化学療法または自己免疫療法後のDCの照射および画像化のような決定システムにおいて有用である。このような標識は当該分野で公知であり、放射性同位体、酵素、蛍光化合物、化学発光化合物、生物発光化合物、基質コファクターおよび基質インヒビターならびに磁粉が挙げられるがこれらに限定されない。これらの標識の使用を教示する特許の例については、例えば、米国特許番号第3,817,837号；3,850,752号；3,939,350号；3,996,345号；4,227,437号；4,275,149号；および4,366,241号を参照のこと。この部分は、共有結合され得るか、組換え的に結合され得るか、または第2の薬剤（例えば、二次抗体、プロテインA、またはビオチン-アビジン複合体）を通じて（共有的にまたは非共有的に）結合され得る。

【0090】

他の機能的部分としては、シグナルペプチド、免疫学的応答性を増強する薬剤、固体支持体との結合を容易にする薬剤、ワクチンキャリアー、生物応答修飾因子、常磁性標識および常磁性薬物が挙げられるがこれらに限定されない。シグナルペプチドは、原核生物形態および真核生物形態を含む。免疫学的応答性を増強する薬剤としては、細菌スーパー抗原およびアジュバンドが挙げられるがこれらに限定されない。固体支持体との結合を容易にする薬剤としては、ビオチン、アビジンまたはこれらの誘導体が挙げられるがこれらに限定されない。免疫原キャリアーとしては、任意の生理学的に受容可能なバッファーが挙げられるがこれに限定されない。生物応答修飾因子としては、サイトカイン、特定の腫瘍壊死因子(TNF)、IL-2、インターロイキン-4(IL-4)、GM-CSF; IL-10、IL-12、TGF- α および特定のインターフェロン、ならびにケモカイン(MIP-3、SDF-1、リンホタクチン、DC-CK1、エオタキシン、IP-10、TARC、ランテス、MIP-1 α 、MIP-1 β 、SLC、1-TAC、MIG、MDC、MCP-1、TCA-3、MCP-2、-3、-1)が挙げられるがこれらに限定されない。米国特許第5,750,119号;およびWO特許公開:96/10411;98/34641;98/23735;98/34642;97/10000;97/10001;および97/06821もまた参照のこと。このように、ケモカインは、T細胞のような他の細胞を誘引するのに有用であり得る。

10

【0091】

「シグナルペプチド」または「リーダー配列」は、細胞膜(通常は真核生物細胞における小胞体(ER)で)ならびに細菌の内膜か、もしくは内膜および外膜の両方のいずれかを通じて、新たに合成されたタンパク質を指向する短いアミノ酸配列である。シグナルペプチドは、代表的にポリペプチドのN末端に存在し、そして生合成と細胞からまたはER膜を通じたポリペプチドの分泌との間に酵素的に除去される。従って、シグナルペプチドは、分泌タンパク質には存在しないが、タンパク質産生時にのみ存在する。

20

【0092】

単鎖複合体を含む免疫毒素は、組換え手段により生成され得る。種々の免疫毒素の生成は、当該分野で公知であり、そして例えばその方法は、「Monoclonal Antibody-toxin Conjugates: Aiming the Magic Bullet」、Thorpeら(1982)、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine、Academic Press、168-190頁;Vitatta(1987)Science 238:1098-1104;およびWinterおよびMilstein(1991)Nature 349:293-299で見出される。適切な毒素としては、リシン、放射性核種、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、Pseudomonas外毒素A、ジフテリア毒素、リシンA鎖、真菌毒素(例えば、真菌リボソーム不活性化タンパク質(例えば、ゲロニン、レストリクトシンおよびホスホリパーゼ酵素))が挙げられるがこれらに限定されない。該して、「Chimeric Toxins」、OlsensおよびPihl、Pharmac. Ther. 15:355-391(1981);および「Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy」、BaldwinおよびByers編、159-179頁、224-266頁、Academic Press(1985)を参照のこと。

30

40

【0093】

化学的に機能的な部分は、例えば抗原結合フラグメントおよび機能領域をコードする融合遺伝子を、他の遺伝子から作製することにより(例えば、酵素)、組換え的に作製され得る。遺伝子融合の場合、2つの成分が同じ遺伝子内に存在することになる。あるいは、抗原結合フラグメントは、周知の種々の化学的手順にいずれかにより、この部分に化学的に結合され得る。例えば、この部分がタンパク質である場合、この結合は、ホモ二機能性クロスリンカーまたはヘテロ二機能性クロスリンカー(例えば、SPDP、SMCC、カルボジイミド、グルタルアルデヒドなど)によりなされ得る。この部分は、二次的な薬剤(二

50

次抗体、プロテインA、またはビオチン - アビジン複合体が挙げられるがこれらに限定されない)を通じて共有的に結合または複合化され得る。常磁性部分および抗体に対するこれらの複合体は当該分野で周知である。例えば、Miltényiら(1990) Cytometry 11:231-238を参照のこと。

【0094】

ここで、本出願人は、当該分野において記載される問題(O'Dohertyら(1993);およびYamaguchiら(1995))を、近年記載された対側性(contralateral)フットパッド免疫化手順を用いて克服した。Yinら、(1997) Blood 90:5002-5012を参照のこと。このシステムは、抗原に遭遇しない限り末梢リンパ器官を継続的に再循環するが、いったん抗原により活性化された場合1週間でないとしても、数日間末梢リンパ器官に直ちに保持されるナイーブな抗原特異的T細胞およびB細胞を使用する。PICKERら(1992) Annu. Rev. Immunol. 10:561-591; Butcherら(1996) Science 272:6066; Bradleyら(1996) Curr. Opin. Immunol. 8:312-320; Watsonら(1998) Cell. Adhes. Commun. 6:105-110; Kearneyら(1994) Immunity 1:327-339; Jacobら(1992) J. Exp. Med. 176:679-687; Ridderstaadら(1998) J. Immunol. 160:4688-4695; およびTarlington(1998) Curr. Opin. Immunol. 10:245-251を参照のこと。本明細書で提供される実施例において、-3、0、4、7、11および14日目にプリストロール-8 Bリンパ芽球腫細胞をマウスの左フットパッドに注射し、一方で0、4、7、11および14日目にDCを右フットパッドに注射した。共有抗原に対する特異性を有するナイーブなB細胞およびT細胞(例えば、HLAクラスII分子)は、-3日目と0日目との間の左膝窩リンパ節において、プリストロール-8細胞により活性化され、その上そこで保持される。他方、DCに対する固有の抗原に対して特異性を有する全てのリンパ球は0日目以降の右膝窩リンパ節において活性化について利用可能なまま維持される。

【0095】

この免疫化技術を、大多数のDCの迅速な単離のための強力な手順と組み合わせ、そして3つの新規のDC抗原(BDCA-2、BDCA-3およびBDCA-4)を認識するmAbのパネルの生成を可能にした。さらなるDC特異的抗体を生成する際でのこの抗原の使用により、より多くの成功の機会を有する抗体生成のより伝統的な方法の使用が可能になる。

【0096】

抗体の産生および単離の方法は当該分野で周知である。例えば、HarlowおよびLane(1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New Yorkを参照のこと。一般的な抗体精製方法としては、塩析(例えば、硫酸アンモニウムを用いる塩析);イオン交換クロマトグラフィー(例えば、カチオンまたはアニオン交換カラムを中性pHで行い、そして漸増イオン強度の段勾配で溶出するイオン交換クロマトグラフィー)、ゲル濾過クロマトグラフィー(ゲル濾過HPLCを含む);およびアフィニティー樹脂(例えば、プロテインA、プロテインG、ヒドロキシアパタイトまたは抗Ig)でのクロマトグラフィーが挙げられるがこれらに限定されない。抗原結合フラグメントはまた、DCまたはこれらの抗原部分を含むアフィニティーカラムで精製され得る。好ましくは、フラグメントは、Protein-A-CL-Sepharose™4Bクロマトグラフィー、その後DEAE-Sepharose™4Bイオン交換カラムを用いて精製される。

【0097】

本発明はまた、ハイブリッド抗体を包含する。この抗体において、一对のH鎖およびL鎖は一次抗体からえられ、他の対のH鎖およびL鎖は異なる二次抗体から得られる。本発明

10

20

30

40

50

の目的のためには、一对のL鎖およびH鎖は抗DC抗体由来である。1つの例において、それぞれのL-H鎖は、DC特異的抗原の異なるエピトープに結合する。このようなハイブリッドはまた、ヒト化したH鎖またはL鎖を用いて形成し得る。本発明はまた、他の二特異性抗体（例えば、定常領域を通じて共有結合した2つの別々の抗体を含む抗体）を包含する。

【0098】

本発明に包含される他の抗原特異的フラグメントは、H鎖またはL鎖が付加的な特性を提供するため改変された抗体である。例えば、アミノ酸配列の変化は、生じたポリペプチドの免疫原性の減少を引き起こし得る。この変化は、1つ以上のアミノ酸残基からC領域ドメインのような領域の完全な再設計までの範囲に及ぶ。代表的な変化としては、補体結合、膜レセプターとの相互作用および他のエフェクター機能に関与する変化が挙げられるがこれらに限定されない。組換え抗体はまた、基質（例えば、サイトカイン）の細胞への特異的な送達を補助するために設計され得る。種々のIgドメインが天然で存在するものとは異なる秩序に置かれたペプチドもまた、本発明に包含される。

10

【0099】

抗原結合フラグメントの大きさは、所望の機能を提供するために必要な最小限の大きさのみであり得る。これは、必要に応じてさらなるアミノ酸配列（望ましくは、この抗原結合フラグメントにネイティブなアミノ酸配列またはヘテロ供給源由来のアミノ酸配列のいずれか）を含み得る。抗DC抗原結合フラグメントは、抗体V領域配列由来の5つの連続したアミノ酸残基のみを含み得る。抗体L鎖またはH鎖V領域由来の7個のアミノ酸残基、より好ましくは約10個のアミノ酸残基、より好ましくは約15個のアミノ酸残基、より好ましくは約25個のアミノ酸残基、より好ましくは約50個のアミノ酸残基、より好ましくは約75個のアミノ酸残基を含むポリペプチドもまた含まれる。抗体L鎖またはH鎖V領域の全体を含むポリペプチドでさえ、より好ましい。

20

【0100】

置換は、1つ以上のアミノ酸残基の交換または改変からV領域のような領域の完全な再設計までの範囲に及び得る。もし存在する場合、アミノ酸残基の置換は、好ましくはペプチドのフォールディングまたは機能的性質が悪化するよう影響を及ぼさない保存的置換である。保存的置換がなされ得る機能的に関連するアミノ酸残基のグループは、グリシン/アラニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；セリン/スレオニン/メチオニン；リジン/アルギニン；およびフェニルアラニン/チロシン/トリプトファンである。抗原結合フラグメントは、グリコシル化され得るかもしくはグリコシル化され得ないか、翻訳後に改変され得るか（例えば、アセチル化およびリン酸化）または合成的に改変され得る（例えば、標識基の結合）。

30

【0101】

L鎖およびH鎖の両方を含むポリペプチド誘導体は、L鎖およびH鎖を分離し、次いで合成されて形成され得るか、またはインサイチュで両鎖の発現系により合成されて形成され得る。このような発現系は、L鎖およびH鎖について別々に転写可能な領域を含有するプラスミドでトランスフェクトするか、またはそれぞれの鎖に対するプラスミドで同じ細胞を同時トランスフェクトするかにより作製され得る。第3の方法では、H鎖をコードする領域を有する適切なプラスミドを、H鎖欠損変異体にトランスフェクトする。

40

【0102】

H鎖欠損変異体は、フルオレセイン標識ウサギ抗マウスIgG（H鎖特異的、DAKO Corporation、Carpinteria、CA）を有する細胞が産生する抗DC抗体を販売元の説明書に従って処理することにより獲得され得る。染色した細胞集団および染色していない細胞集団を、フローサイトメトリーにより分析する。染色していない細胞を滅菌チューブに回収し、そして限界希釈により1細胞/ウェルで96ウェルプレートに置く。次いで培養上清を、ヤギ抗マウスIgG（H鎖特異的）およびヤギ抗マウスを用いてELISAでアッセイする。ポジティブ、IgGネガティブの表現型を有するクローンを少なくとも3回サブクローニングし、安定な抗DC^(-H)変異体を得た。推定H

50

鎖欠損変異体由来の mRNA を単離し得、そして L 鎖 V 領域 cDNA の配列を決定する。V_H についての mRNA のリバー PCR を、2 セットの 5' プライマーおよび 3' プライマーを用いて行い、抗 DC^(-H) cDNA のクローニングに用いた。H 鎖欠損変異体は、これらのプライマーを含む検出可能な DNA を産生しなかった。この細胞のトランスフェクションを、適切な H 鎖プラスミドを用いて進めた。

【0103】

本発明に包含される別の抗原結合フラグメント融合体は、H 鎖および L 鎖の定常領域が改変されて付加的な特性を提供する抗体である。例えば、アミノ酸配列の変化は、生じたポリペプチドの免疫原性の変化を引き起こし得る。この変化は、1 つ以上のアミノ酸残基から定常領域ドメインの完全な再設計までの範囲に及ぶ。予想される変化は、補体結合、膜レセプターとの相互作用、および他のエフェクター機能に影響を及ぼすものである。組換え抗体はまた、基質（例えば、リンホカインまたは抗原もしくは腫瘍、ウイルス、寄生虫または細菌由来の抗原性ペプチド、あるいは寛容原（自己抗原））の細胞への特異的な送達を補助するよう設計され得る。種々の Ig ドメインが天然とは異なる順序で配置されているタンパク質もまた、本発明に包含される。

10

【0104】

本発明はまた、抗 DC 抗体の単鎖 V 領域フラグメント（「scFv」）を包含する。単鎖 V 領域フラグメントは、短い連結ペプチドを用いて L 鎖および / または H 鎖 V 領域を連結することにより作製される（Birdら（1988）Science 242:423-426）。十分な可撓性および長さを有する任意のペプチドが scFv のリンカーとして用いられ得る。通常このリンカーは、免疫原性がほとんど有さないか全く有さないよう選択される。連結ペプチドの例は、(GGGGS)₃ である。これは、ある V 領域のカルボキシ末端と別の V 領域のアミノ末端との間の約 3.5 nm を橋渡しする。他のリンカー配列もまた用いられ得、そしてさらなる機能（例えば、薬物または固体支持体との結合あるいは基質（例えば、リンホカインまたは抗原もしくは腫瘍、ウイルス、寄生虫または細菌由来の抗原ペプチド、あるいは寛容原（自己抗原））の細胞への特異的な送達）が提供され得る。

20

【0105】

全てのまたは任意の H 鎖または L 鎖が任意の組み合わせで用いられ得る。代表的に、V 領域全体が、scFv に含まれる。例えば、L 鎖 V 領域は、H 鎖 V 領域と連結され得る。あるいは、L 鎖 V 領域の一部は、H 鎖 V 領域またはその一部と連結され得る。H 鎖 V 領域は、本明細書中に記載される抗体に由来し、そして L 鎖 V 領域が別の Ig に由来するような scFv もまた意図される。1 つの成分が抗原結合フラグメントであり、そして別の成分が T 細胞エピトープのような異なるポリペプチドである二相性の scFv が作製され得る。

30

【0106】

この scFv は、任意の順序で合成され得る（例えば、V_H - (リンカー) - V_L または V_L - (リンカー) - V_H）。特定の発現系におけるこれら 2 つの構成の発現レベルにおいて差異があり得る。この場合、これらの形態の 1 つが優先され得る。(X) - (リンカー) - (X) - (リンカー) - (X) のような直列 scFv もまた作成され得る（ここで、X は scFv またはこれらの他のポリペプチドとの組み合わせである）。別の実施形態において、単鎖抗体ポリペプチドは、リンカーポリペプチドを有さないか、またはごく短い、可撓性のないリンカーを有する。可能な構成は、V_L - V_H および V_H - V_L である。この連結は、短すぎてこの鎖内の V_L と V_H との間の相互作用を許さず、そしてこの鎖は、それぞれの末端に V_L / V_H 抗原結合部位を有するホモ二量体を形成する。このような分子は、「二重特異性抗体 (diabodies)」と呼ばれる。

40

【0107】

scFv は、組換え的にかまたは合成的に生成され得る。scFv の合成的な生成に関して、自動合成装置が用いられ得る。scFv の組換え生成に関して、scFv をコードするポリヌクレオチドを含有する適切なプラスミドが、適切な宿主細胞（真核生物細胞（例

50

えば、酵母細胞、植物細胞、昆虫細胞または哺乳動物細胞）かまたは原核細胞生物（例えば、*Escherichia coli*）のいずれか）に導入され得、そして発現したタンパク質が、標準的なタンパク質精製技術を用いて単離され得る。s c F v はまた、ファージ提示ライブラリーから獲得され得る。

【0108】

s c F v の生成について特定の有用な系は、プラスミド p E T - 2 2 b (+) (N o v a g e n 、 M a d i s o n 、 W I) である。*Escherichia coli* p E T - 2 2 b (+) は、6 個の連続するヒスチジン残基からなるニッケルイオン結合ドメインを含有し、これは適切なアフィニティー樹脂上で、発現したタンパク質を精製することを可能にする。適切なベクターの別の例は、p c D N A 3 (I n v i t r o g e n 、 S a n D i e g o 、 C A) である。

10

【0109】

遺伝子発現の条件は、好ましくは s c F v が適切な三次構造をとることを保証する。用いられるプラスミド（特にプロモーター活性）および宿主細胞に依存して、生成率を改変することが必要であり得る。例えば、原核細胞系においてより弱いプロモーターの使用、またはより低い温度での発現が、適切に折り畳まれた s c F v の産生を最適化するために必要であり得る；またはこれは真核生物細胞において s c F v を発現するために用いられ得る。

【0110】

本発明はまた、複数の D C 特異的抗原結合フラグメントを含む抗原結合フラグメントのポリマー形態を包含する。1 つの実施形態は、抗原結合フラグメントの直鎖ポリマーであり、必要に応じてキャリアと複合体化される。これらの直鎖ポリマーは、単一抗原結合フラグメントポリペプチドの複数のコピーまたは異なるポリペプチドの組み合わせを含み得、そして直列ポリペプチドまたは他のアミノ酸配列により切り離されるポリペプチドを有し得る。

20

【0111】

別の実施形態は、多抗原ペプチド (M A P) である。M A P は、放射状にリシン樹状突起に枝分かれした免疫学的な小インサートコアを有し、ここに多くの抗原結合フラグメントポリペプチドが共有結合している。例えば、P o s n e t t ら (1 9 8 8) J . B i o l . C h e m . 2 6 3 : 1 7 1 9 - 1 7 2 5 ; および T a m (1 9 8 9) M e t . E n z . 1 6 8 : 7 - 1 5 を参照のこと。この結果は、コアに対して高モル比の抗原結合フラグメントポリペプチドを有する大きな高分子である。M A P は有効な免疫原であり、そして免疫アッセイについての有用な抗原である。M A P を生成するためのコアは、標準的なペプチド合成技術により作製され得るか、または商業的に獲得され得る (Q u a l i t y C o n t r o l l e d B i o c h e m i c a l s 、 I n c . 、 H o p k i n t o n 、 M A) 。代表的なコアマトリックスは3つのレベルでのリシンおよび8つのアミノ酸残基から構成される。

30

【0112】

本発明はさらに、本発明の D C 特異的抗原結合フラグメントに対する抗イディオタイプ抗原結合フラグメントを含む。このような抗イディオタイプは、当該分野で公知の任意の方法によって作成され得る。

40

【0113】

癌患者は、しばしば免疫抑制されており、そしていくつかの腫瘍関連抗原 (T A A) に対して耐性である。このような T A A に対する活性な免疫応答を誘引することは、癌治療における重要なチャレンジを示す。所定の抗原での免疫化は、C T L 応答を含む免疫応答、好ましくは強力な C T L 応答を生成する。この抗原に対する抗体の産生は、腫瘍細胞が A D C C (抗体依存性細胞性細胞傷害) によって殺傷される場合に、役立ち得る。本発明は、当該分野で公知の方法により特定の免疫応答を誘導するにおける、本発明の抗原結合フラグメントの使用によって、同定および単離された D C の使用を包含する。免疫応答は、癌、感染性ウイルス、感染性細菌、感染性寄生生物、感染性酵母、および自己免疫疾患 (

50

耐性誘導)に関連したものを含むが、これに限定されない、任意の抗原に対して特異的であり得る。このような応答を誘導するのに特に適している小集団を単離する能力により、小集団の混合物よりも効果的なDCの調製を生じる。ハイブリッド細胞(例えば、DC/腫瘍細胞)はまた、癌特異的療法として用いられ得る。改変細胞(細胞のヘルパーT細胞分極能力に関して活性化された、インビトロ成熟された、調節された(T_h1 v T_h2 v T_h3 / T_h-R)、そして細胞のT細胞刺激、またはアネルギー化、または欠失能力に関して調節された、細胞を含むがこれに限定されない)が、同様に、本発明に包含され、そして遺伝子改変された細胞またはトランスフェクトされた細胞、および抗原提示または内部移行について適切なペプチドまたはタンパク質とともにインキュベートされた細胞を含むがこれに限定されない。小集団は、分化の1つの系列および別の系列の1つ

10

【0114】

本発明はさらに、DC、その小集団およびその混合物を提供する。この細胞は、当該分野で公知の任意の分別方法によって、本明細書で提供される抗原結合フラグメントを用いて選択される。単離された細胞を含む組成物はまた、本発明によって包含される。これらは、薬学的組成物および治療組成物、ならびに単離された細胞を含む任意の他の組成物を含む。本明細書に記載の方法によって単離されたDC小集団は、好ましくは実質的に均質である。すなわち、BDCA特異的抗原結合フラグメントによって単離された細胞は、好ましくは、約80%BDCA+を超え、より好ましくは約90%BDCA+を超え、そして最も好ましくは約95%BDCA+を超える。当然ながら、この細胞と他のDC、または

20

【0115】

同様に、本明細書に記載の方法によって得られるDCは、当該分野で公知の任意の処置方法における使用に適切である。これらの方法を達成するために変更されたDCはまた、本発明によって包含される。これらの方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない:

a) 自己免疫疾患、アレルギー、移植片対宿主病(GvHD)、異種同種移植変拒絶における、特定のT細胞耐性(刺激の代わりに殺傷またはアネルギー)を誘導するための、単離されたDCを用いた治療。例えば、このようなT細胞に特異的なDCは、溶解、不活性化、または死誘導部分を含み、これにより、例えば、CD95Lトランスフェクションにおけるような抗原標識または遺伝子改変による望ましくない免疫反応に参与するT細胞を特異的に標的するように、改変され得る。T細胞に対するDC特異性は、主に、MHC IおよびIIを介した適切なT細胞エピトープ(ペプチド)の提示により生じる。耐性誘導機能を有するDCの特定のサブセットは、患者に直接投与され得る。末梢耐性は、改変されたDCによって媒介され得、T細胞の欠失(殺傷)、アネルギーおよび抑制/調節を誘導し得る;

30

b) 特定のT細胞において、特定のサイトカイン発現プロファイルを誘導するための、単離されたDCを用いる免疫調節。これは、T_h1(特定の炎症性免疫応答についてのサイトカイン)、T_h2(特定の体液性免疫応答のサイトカイン)、またはT_h3(特定の免疫抑制のサイトカイン)の産生に影響するのに特に有用である。例えば、アレルギーおよび喘息の場合、T_h1応答の誘導は、T_h2応答を生じる兆候を減少または排除し得る;

40

c) 腫瘍抗原、ウイルス抗原、および細胞抗原を含むがこれに限定されない、DC提示抗原での治療;

d) 免疫反応を誘導するのに十分な量および条件下での、DC(提示抗原とともにまたは提示抗原なしに)および種々のコファクター(補助因子)(これは、サイトカイン、同時刺激分子、およびエフェクター分子を含むがこれに限定されない)を用いた治療;および

【0116】

本明細書に記載される抗原結合フラグメントはまた、多くの処置方法に適切である。これ

50

らとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：

a) 自己免疫あるいは至適のおよび選択的な取り込み/トランスフェクションについてDCに対する抗原または核酸(ウイルス、プラスミドDNA、RNAなど)のインビボ標的化に關与するDC(例えば)のリガンド-またはリガンド媒介免疫治療を模倣する抗体。BDCA-2が、抗原取り込みおよびプロセッシング機能を有する分子であるらしいのと同様に、この文脈において特に有用であり得る。

【0117】

b) 免疫モニタリング：例えば、種々の疾患においておよび、例えば、増殖誘導リガンド(例えば、flt3-リガンドまたはG-CSF)を用いた、動員の際の、BDCA-2⁺、BDCA-3⁺、およびBDCA-4⁺DCの列挙および特徴付け。

10

【0118】

宿主に対して有害でない任意のキャリアが、DCに用いられ得る。適切なキャリアは、代表的には、大きく、緩徐に代謝された高分子(例えば、タンパク質)；ポリサッカライド(例えば、ラテックス機能化セファロース、アガロース、セルロース、セルロースビーズなど)；ポリマー性(重合体)アミノ酸残基(例えば、ポリグルタミン酸、ポリリジンなど)；アミノ酸コポリマー；および不活性なウイルス粒子または弱毒化細菌(例えば、サルモネラ)である。

【0119】

2.さらなるDC特異的抗原結合フラグメントの獲得方法。

【0120】

本発明は、DC特異的抗原結合フラグメントを得る方法を包含する。

20

【0121】

詳細には以下に記載のように、新しいDC特異的抗原結合フラグメントを生成する方法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：1)ファージディスプレイ技術の使用(これにより抗体レパートリーをコードするcDNAは、好ましくは、PCRおよび種特異的V領域に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、リンパ球または脾臓RNAから増幅される)；2)抗原を用いた哺乳動物の免疫、およびポリクローナル抗体またはmAbの生成工程；ならびに3)ファージ(非常に大きく多様なV遺伝子レパートリー)上での提示による、事前免疫なしに抗体を作成するためのファージディスプレイの使用。一般に、Hoogenboomら(1998)Immunotechnol.4:1~20を参照のこと。好ましくは、治療目的のために、非ヒト抗原結合フラグメントが用いられるべき場合、これらは、当該分野で公知の方法によってヒト化され得る。

30

【0122】

Medezら(1997)Nature Genetics 18:410により記載の方法が用いられ得る。要するに、精製した抗原を用いて、ナイーブなマウス抗体レパートリーを欠き、代わりに生殖細胞系においてほとんどのヒト抗体V遺伝子を有するトランスジェニックマウスを免疫する。続いて、ヒト抗体がマウスB細胞により産生される。この抗体遺伝子は、PCRライブラリー選択または古典的ハイブリドーマ技術によりB細胞から回収される。

【0123】

あるいは、抗体は、精製されたDC特異的抗原での注射後、マウス(例えば、BALB/c)マウスから得られ得る。mAbは、標準的ハイブリドーマ技術を用いて生成される。Maltiら(1997)Biotechnol.Int.1:85~93(ヒトハイブリドーマ)；およびKohlerおよびMilstein(1975)Nature 256:495~497(マウスハイブリドーマ)。引き続き、マウス抗体は、例えば、Rosokら(1996)J.Biol.Chem.271:22611~22618；Bacaraら(1997)J.Biol.Chem.272:10678~10684；Raderら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:8910~8915；およびWinterおよびMilstein(1991)Nature 349:293~299に記載の方法により、ヒト化され得る。

40

50

【0124】

ファージディスプレイアプローチをまた用いて、DCに対するヒト抗体を迅速に生成し得る。このアプローチは、Henderikxら(1998)Cancer Res. 58:4324~32によって記載の方法を使用し得る。ファージ上で提示された抗体フラグメントは、固定された抗原またはDCに結合する抗体を分離することにより、異なる単鎖抗体を含む大きいナイーブなファージ抗体/フラグメントライブラリーから選択される。ヒト抗体フラグメントを、生殖系列Vドメインから構築するか、またはフレームワークおよびCDR領域の両方において、多くの変異(変異は、相同遺伝子再配列(re-assortment)またはエラープローン(error prone)PCRのいずれかによって標的される)により合成したナイーブなレパートリーから選択する。DCと特異的に反応性の抗原結合フラグメントは、本明細書に記載のように、腫瘍および正常細胞に対するスクリーニングによって同定され、DC特異的抗原結合フラグメントを同定し得る。

10

【0125】

本発明はまた、適切なファージディスプレイライブラリーを作成することにより、DCに特異的な抗原結合フラグメントを同定する方法; DC特異的抗原を単離する方法; DCに特異的に結合する抗原結合フラグメントを提示するファージを得るための標準的免疫化学技術による、抗原を用いたファージディスプレイライブラリーのスクリーニング方法; またはDCおよび他の関連細胞(例えば、APC)に対するスクリーニングおよびDCに優先的に結合するファージの選択によって、DC特異的抗原結合フラグメントについて得られたファージディスプレイライブラリーをスクリーニングする方法、を包含する。ファージディスプレイによる抗原結合フラグメントを生成する方法は、当該分野で周知である。Hoogenboomら(1998)。

20

【0126】

リンパ球(PBL)または脾臓RNAを代表的には用いて、抗体フラグメントレパートリーを作成する。相同体再整列(homologous reassortment)またはエラープローン(error prone)PCRを用いる変異誘発が多様性を増大する。当該分野で公知の任意の方法を用い得る。

【0127】

抗体遺伝子のレパートリーは、PCRを用いて、免疫したマウスまたはヒトから増幅され得る。そしてそれによって得られたscFvまたはFab抗体フラグメントが、クローニングされてバクテリオファージの表面上で発現され得る。抗体遺伝子レパートリーは、PCRおよび宿主動物特異的V領域に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、リンパ球または脾臓RNAから増幅される。ファージディスプレイをまた用いて、ファージ上で非常に大きくかつ多様なV遺伝子レパートリーを提示することにより、事前免疫なしに、抗体を作成し得る。PBLに存在する天然のV遺伝子レパートリーが、PCR増幅によって単離され、そしてVHおよびVL領域が、PCRを用いて一緒にランダムにスライシングされる。変異は、相同遺伝子再配列番号またはエラープローンPCRによって、Vドメイン遺伝子に対して標的化され得る。Zhaoら(1998)Nat. Biotechnol. 15:258; およびHoogenboomら(1998)。合成ヒトライブラリーをまた全体的に作成し、そしてDC特異的抗体フラグメントをスクリーニングするために用い得る。ファージディスプレイライブラリーを操作するために用いた方法にかかわらず、得られたファージの各々は、その表面に提示された機能的抗体フラグメントを有し、そしてファージゲノムにおいて抗体フラグメントをコードする遺伝子を含む。例えば、WO97/02342を参照のこと。

30

40

【0128】

結合抗体が非結合抗体から差引きされ得るアフィニティークロマトグラフィーは、かねて確立されている。Nissimら(1994)EMBO J. 13:692~698; およびVaughanら(1996)Nat. Biotechnol. 14:309~314. 成功に影響する重大なパラメーターは、特定の抗原に対して生成された抗体フラグメントの数およびアフィニティーである。最近まで、多くの多様なライブラリーの産生は、

50

いづれも困難なままであった。歴史的に、s c F v レパートリーは、V H および V L R T - P C R 産物から直接アセンブルされてきた。R N A のアベイラビリティおよび R T - P C R の効率は、利用可能な V 遺伝子の数という因数を制限している。また、アセンブルには、3つのフラグメント（すなわち、V H および V L ならびにリンカー領域）を連結することが必要であった。M a r k s ら (1 9 9 1) J . M o l . B i o l . 2 2 2 : 5 8 1 ~ 5 9 7 .

【 0 1 2 9 】

改善されたライブラリー構築方法は、別のプラスミドベクターにおいて、クローニングされた V H および V L 遺伝子レパートリーを用いて、s c F v アセンブリのための物質の安定かつ無限の適用をもたらす。S h e e t s ら (1 9 9 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 5 : 6 1 7 5 ~ 6 1 6 2 . また、効率性は、V L ライブラリーの 5'末端でリンカー領域をコードする D N A を有することにより増大される。従って、3つでなく、連結されるべき2つのフラグメントしか有さない。

10

【 0 1 3 0 】

抗 D C 抗原結合フラグメントをまた、送達または操作し得る。例えば、L 鎖および H 鎖の V 領域の免疫原性活性は、一連の短いポリペプチド（V 領域アミノ酸配列全体にまたがる）を調製することによりスクリーニングされ得る。20または50アミノ酸残基長の一連のポリペプチドを用いて、各 V 領域が、有用な機能的特性について調査され得る。タンパク質配列のコンピューター分析を実行して潜在的に免疫原性のポリペプチドを同定することも可能である。次いで、このようなペプチドを合成して試験し得る。

20

【 0 1 3 1 】

本発明はさらに、所望の特性を有する他の抗 D C 抗原結合フラグメントを生成するために種々の様式で合わされた、本明細書に記載の抗原結合フラグメントの種々の適合を包含する。例えば、改変残基を有する抗原結合フラグメントが、M A P に含まれ得る。別の例において、s c F v をサイトカイン（例えば、I L - 2）に融合する。このような組み合わせの全てが本発明によって包含される。

【 0 1 3 2 】

抗原結合フラグメントは、任意の適切な手順（タンパク質分解、組み換え方法または化学的合成）によって作成され得る。これらの方法は、当該分野で公知であるので詳細に記載する必要はない。タンパク質分解酵素の例としては、トリプシン、キモトリプシン、ペプシン、パイン、V 8 プロテアーゼ、スブチリシン、プラスミン、およびトロンピンが挙げられるがこれらに限定されない。インタクトな抗原結合フラグメントは、同時にまたは引き続いて、1つ以上のプロテアーゼとともにインキュベートされ得る。あるいは、またはさらに、インタクトな抗体は、ジスルフィド還元剤で処理され得る。次いで、ペプチドは、当該分野で公知の技術（ゲルろ過クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、および逆相 H P L C が挙げられるがこれらに限定されない）によって互いに分離され得る。

30

【 0 1 3 3 】

抗 D C 抗原結合フラグメントがまた、当該分野で公知の任意の方法による適切な発現系において、このペプチドをコードするポリヌクレオチドからの発現によって作成され得る。代表的には、適切なポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、適切なプロモーターの制御下で発現ベクターに連結され、そして意図される宿主細胞を遺伝子的に変更するために用いられる。真核生物および原核生物の両方の宿主系を用い得る。次いで、ポリペプチドが溶解した細胞から、または培養培地から単離され、そしてその意図される用途に必要な程度まで精製される。本発明の用途に適切な原核生物宿主細胞の例としては、E . c o l i , B a c i l l u s s u b s t i l i s , および任意の他の適切な宿主細胞が挙げられる。真核生物宿主細胞の例としては、酵母、鳥類、昆虫、植物、および動物細胞（例えば、C O S 7 細胞、H e L a 細胞、および C H O 細胞）が挙げられるがこれらに限定されない。

40

【 0 1 3 4 】

必要に応じて、マトリックスコートしたチャネルまたはビーズおよび細胞同時培養が、抗

50

原結合フラグメント産生細胞の増殖を強化するために含まれ得る。大量のmAbの産生のため、腹水を得ることが一般に、より都合がよい。腹水を得る方法は、免疫学的にナイーブな、組織適合性または免疫耐性の哺乳動物（特にマウス）にハイブリドーマ細胞を注射する工程を一般的に含む。この哺乳動物は、適切な組成物；例えば、Pristaneの事前投与による腹水産生のためにプライミングされ得る。腹水を動物から取り出し、そして抗体を単離するために処理する。

【0135】

あるいは、抗原結合フラグメントは、タンパク質合成の標準的方法と組み合わせて、アミノ酸配列データおよび本開示において提供される他の情報を用いて化学的に合成され得る。適切な方法は固相メリフィールド法である。Applied Biosystems, Inc. (Foster City, CA)により製造されたような、自動ペプチドシンセサイザーは商業的に入手可能である。

10

【0136】

抗DC抗原結合フラグメントを得る別の方法は、BDCA-2、BDCA-3、および/またはBDCA-4を用いて適切な宿主動物を免疫し、次にポリクローナル抗体またはmAb産生および単離の標準的な技術を行うことである。このように産生されたmAbは、当該分野で公知の方法によって「ヒト化」され得る。従って、本発明はヒト化mAbを包含する。

【0137】

「ヒト化された」抗体においては、配列の少なくとも一部がその最初の形態から変更され、それは、よりヒトI_gらしくされている。1つのバージョンでは、H鎖領域およびL鎖領域が、ヒト配列で置換される。これは、抗DC V領域および異種I_g(C)領域を含む融合ポリペプチドである。別のバージョンでは、CDR領域は、抗DCアミノ酸配列を含み、一方Vフレームワーク領域はまた、ヒト配列に変換されている。例えば、EP 0329400を参照のこと。第三のバージョンでは、V領域は、ヒトおよびマウスV領域のコンセンサス配列を設計することにより、ならびにコンセンサス配列の間で異なるCDR外側の残基を変換することにより、ヒト化される。

20

【0138】

ヒト化抗体の作成において、フレームワーク残基の選択が、高い結合親和性を保持することを助け得る。原理的には、任意のヒト抗体由来のフレームワーク配列が、CDR接合(グラフティング)のためのテンプレートとして働き得る；しかし、このようなフレームワークへの直鎖状CDR置換は、抗原結合アフィニティーの有意な損失を導き得る。Glaserら(1992) J. Immunol. 149:2606; Tempestら(1992) Biotechnol. 9:26; およびShalabyら(1992) J. Exp. Med. 17:217。元来のマウス抗体に対してより相同なヒト抗体であればあるほど、ヒトフレームワークは、アフィニティー(親和性)を減じ得るマウスCDRへと歪みを誘導する可能性が低くなる。抗体配列データベースに対する配列相同性検索に基づいて、ヒト抗体IC4は、muM4TS.22に対して良好なフレームワーク相同体を提供するが、他の高度に相同なヒト抗体(特にヒトサブグループI由来のL鎖またはヒトサブグループIII由来のH鎖)が同様に適切である。Kabataら(1987)。種々のコンピュータープログラム(例えば、ENCAD)は、V領域の理想的配列を予想する。Levittrら(1983) J. Mol. Biol. 168:595。従って、本発明は、異なるV領域を有するヒト抗体を包含する。適切なV領域配列を決定し、そしてこれらの配列を至適化することは、当業者の範囲内である。免疫原性の低下した抗体を得るための方法はまた、米国特許第5,270,202号およびEP699,755に記載されている。

30

40

【0139】

特定の適用(例えば、抗原結合フラグメントまたはDCAが、植物種子のような適切な貯蔵媒体で発現される場合)において、抗原結合フラグメントが、精製なしに保存され得る。Fielderら(1995) Biotechnol. 13:1090~1093。ほ

50

とんどの適用について、このポリペプチドが他の細胞性成分から少なくとも部分的に精製されていることが一般に好ましい。好ましくは、このペプチドは、総タンパク質の少なくとも約50重量%程度までの純度である。より好ましくは、このペプチドは少なくとも50~75%純粋である。臨床使用には、このペプチドは好ましくは少なくとも約80%純粋である。

【0140】

このペプチドが個体に投与されるべき場合、好ましくはそれは、少なくとも80%純粋であり、より好ましくは少なくとも90%純粋、なおより好ましくは少なくとも95%純粋、そして発熱物質(ピロジェン)および他の混入物を含まない。この文脈では、純度%は、調製物の総タンパク質含量の重量パーセントとして算出され、そして組成物精製に意図的に添加される成分を含まない。

10

【0141】

本発明はまた、生物学的サンプルにおいて、DCおよびそのサブセットを検出、列挙、および/または同定する方法、ならびに体液中で可溶性BDCA-2、BDCA-3もしくはBDCA-4のような抗原および/またはDCを測定する工程を包含する。この方法は、生物学的サンプルを獲得する工程、コントロールの生物学的サンプルに対して比較した場合、このサンプルに対する抗体の抗体-抗原結合および結合の検出(もしあれば)を可能にする条件下で、本明細書に記載の抗原結合フラグメントとこのサンプルを接触する工程を包含する。

【0142】

生物学的サンプルが、例えば、DC濃度または抗原濃度について富化することにより、適切に調製された後、DCまたは抗原と抗体との間の複合体の形成を可能にする条件下で、過剰の抗原結合フラグメントとこれを混合する。次いで、形成された複合体の量または複合体の数(DCを保有する)を決定し、そして予期されるまたは既知のDC濃度の範囲に既知の量の標的抗原を含む標準的サンプルと形成された複合体と最終的に比較する。複合体形成は、免疫沈澱または比濁法によって観察され得るが、これは、標識(例えば、¹²⁵Iのような放射性同位体、ペルオキシダーゼおよびガラクトシダーゼのような酵素、またはフルオレセインのような蛍光色素)で標識した試薬を用いて、一般により高感度である。細胞および抗原を検出する方法は、当該分野で周知である。細胞検出のためには、フローサイトメトリーが特に有用であり、抗原を用いる、ELISAが好ましい。

20

30

【0143】

抗原に対する抗DC抗原結合フラグメントの特異的認識は、当該分野で公知の任意の免疫アッセイによって試験され得る。直接結合アッセイの任意の形式が適切である。このようなアッセイの1つでは、結合パートナーの1つ、抗原または推定抗原結合フラグメントが標識される。適切な標識としては、¹²⁵Iのような放射性同位体、ペルオキシダーゼのような酵素、フルオレセインのような蛍光標識および化学発光標識が挙げられるがこれらに限定されない。代表的には、他の結合パートナーが、(例えば、マイクロタイタープレートのような固相へのコーティングによって)不溶化され、未結合の可溶性結合パートナーの除去を容易にする。標識した結合パートナーと未標識の結合パートナーを合わせた後、固相を洗浄し、そして結合した標識の量を決定する。

40

【0144】

免疫療法に用いる場合、本明細書に記載の抗原結合フラグメントは、本明細書に記載の、および当該分野で公知の治療剤で、未標識であってもまたは標識されていてもよい。これらの試薬は、本発明の抗原結合フラグメントに直接または間接的にのいずれかで結合され得る。間接結合の1例は、スペーサー部分の使用による。これらのスペーサー部分は、順に、不溶性または可溶性のいずれかであり得(Dienerら(1986)Science 231:148)、そして標的部位で薬物を放出できるように選択され得る。免疫療法のための抗原結合フラグメントに結合され得る治療剤の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない: 抗原(腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生生物由来抗原、および自己抗原を含む)、生体反応修飾因子、薬物、放射性同位体、レクチンおよび毒

50

素。生体反応修飾因子としては、サイトカインおよびケモカインが挙げられ、これには、以下：IL - 2、IL - 3、IL - 4、G - CSF、GM - CSF、IL - 10、IL - 12、TGF - 、MTP - AB、SDF - 1、リンホタクチン、DC - CK1、エオトキシン (Eotaxin)、IP - 10、TARC、Rantes、MIP - 1、MIP - 1、SLC、ITAC、MIE、MDC、MCP - 1、TCA - 3、MCP - 2、- 3、- 4およびインターフェロンが挙げられるがこれらに限定されない。それによって抗原結合フラグメントが標識され得るインターフェロンとしては、IFN - 、IFN - 、およびIFN - 、ならびにそれらのサブタイプが挙げられ得る。

【0145】

免疫療法のための放射性同位体的に結合体化された抗原結合フラグメントを用いることにおいて、特定の同位体が、同位体の安定性および放射のような因子に依存して他のものよりも好ましくあり得る。所望の場合、抗原結合フラグメントによる細胞集団認識は、以下に記載されるインビボ診断技術により評価され得る。一般に、および粒子を放射する放射性同位体が免疫療法に好ましい。例えば、組織に数ミリメートル浸透し得る高エネルギーエミッター (例えば、 ^{90}Y) が、好ましくあり得る。一方ではショートレンジの高エネルギーエミッター (例えば、 ^{212}Bi) が、好ましくあり得る。治療目的のため、本発明の抗原結合フラグメントに結合し得る放射性同位体の例としては、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{67}Cu 、 ^{212}Bi 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb 、 ^{47}Sc 、 ^{109}Pd 、および ^{188}Re が挙げられるがこれらに限定されない。

【0146】

レクチンは、植物材料から通常単離されるタンパク質であり、これは、特定の糖部分に結合する。多くのレクチンがまた、細胞を凝集させ、そしてリンパ球を刺激する。しかし、リシンは免疫療法的に用いられる毒性のレクチンである。これは、好ましくは、リシンのペプチド (これが毒性を担う) を抗体分子に結合して、毒性効果の特異的送達を可能にすることによって達成される。

【0147】

毒素は、植物、動物、または微生物によって産生される毒性物質であり、十分な用量ではしばしば致死性である。ジフテリア毒素は、治療的に用いられ得る *Corynebacterium diphtheria* により産生される物質である。この毒素は、サブユニットおよびサブユニット (適切な条件下では分離可能である) からなる。この毒性のA鎖成分は、本明細書に記載される抗原結合フラグメントに結合し得、そしてDCの特定のサブユニットへの部位特異的送達に用いられ得る。

【0148】

組み換え方法が当該分野で周知である。本発明の実行は、他に示さない限り、当業者の範囲内である、分子生物学 (組み換え技術を含む)、微生物学、細胞生物学、生物化学および免疫学の従来技術を用いる。このような技術は、文献、例えば、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」第二版 (Sambrookら、1989)；「Oligonucleotide Synthesis」(Gait編、1984)；「Animal Cell Culture」(Freshney編、1987)；「Methods in Enzymology」(Academic Press, Inc)；「Handbook of Experimental Immunology」(Wei & Blackwell編)；「Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells」(Miller & Calos編、1987)；「Current Protocols in Molecular Biology」(Ausubelら編、1987)「PCR: The Polymerase Chain Reaction」(Mullisら編、1994)；および「Current Protocols in Immunology」(Coliganら編、1991)。これらの技術は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの産生に適用され、そしてそれ自体、本発明を作成および実施するのに考慮され得る。特に有用な技術は、以下の節に考察される。

【 0 1 4 9 】

本発明は、B D C A 抗原をコードする種々のポリヌクレオチドを提供する。本発明はまた、これらの抗原およびその機能的に等価なフラグメントの機能的に等価な改変体および誘導体をコードするポリヌクレオチドを包含する。これらは、これによってコードされるポリペプチドの特性を強化し得るか、減少し得るか、または有意に影響しない。これらの機能的に等価な改変体、誘導体およびフラグメントは、そのそれぞれの抗体に特異的に結合する能力を示し得る。例えば、コードされたポリペプチドの特性に有意に影響しない変化としては、コードされたアミノ酸配列を変化しないDNA配列における変化、ならびにアミノ酸残基の保存的置換、1または数個のアミノ酸残基の欠失または付加、およびアミノ酸アナログによるアミノ酸残基の置換を生じる変化が挙げられるがこれらに限定されない。保存的置換は、保存的アミノ酸置換がグリシン/アラニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；セリン/トレオニン/メチオニン；リジン/アルギニン；およびフェニルアラニン/チロシン/トリプトファンである、保存的置換である。

10

【 0 1 5 0 】

本発明のポリヌクレオチドは、以下のようなさらなる配列を含み得る：同じ転写単位内のさらなるコード配列、プロモーターのような制御エレメント、リボソーム結合部位、およびポリアデニル化部位、同じまたは異なるプロモーターの制御下のさらなる転写単位、宿主細胞のクローニング、発現および形質転換を可能にする配列、ならびに本発明の実施形態を提供するのに所望され得るような任意の構築物。

20

【 0 1 5 1 】

本発明は、B D C A - 2 および B D C A - 3 をコードするポリヌクレオチド（好ましくは、図12に見い出されるcDNA配列）と安定なハイブリッドを形成する、少なくとも約15個連続するヌクレオチド、好ましくは、少なくとも約20ヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約25個連続するヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約35連続するヌクレオチド、より好ましくは、少なくとも約50個連続するヌクレオチド、さらにより好ましくは、少なくとも約75ヌクレオチド、なおより好ましくは、少なくとも約100ヌクレオチド、なおより好ましくは、少なくとも約200ヌクレオチド、そしてさらにより好ましくは、少なくとも約300ヌクレオチドのポリヌクレオチドを包含する。任意の条件設定が、この試験に使用され得るが、ただし、少なくとも1つの設定は、この試験ポリヌクレオチドが、その必要とされる特異性を示すところに存在する。

30

【 0 1 5 2 】

ハイブリダイゼーション反応は、異なる「ストリンジェンシー」の条件下で行われ得る。ハイブリダイゼーション反応のストリンジェンシーを増加する条件は、開示されている。例えば、SambrookおよびManiatisを参照のこと。関連する条件の例（ストリンジェンシーを増加するための）は、以下を含む：25、37、50 および68 でのインキュベーション温度；10×SSC、6×SSC、1×SSC、0.1×SSC（ここで、SSCは、0.15M NaClおよび15mM クエン酸緩衝液）および他の緩衝液系を使用するそれらの等価物の緩衝液濃度；0%、25%、50%および75%のホルムアミド濃度；5分～24時間のインキュベーション時間；1回、2回またはそれ以上の洗浄工程；1分、2分または15分の洗浄インキュベーション時間；ならびに6×SSC、1×SSC、0.1×SSCまたは脱イオン水の洗浄溶液。

40

【 0 1 5 3 】

本発明はまた、B D C A ポリヌクレオチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。好ましくは、これらのポリヌクレオチドは、図12のポリヌクレオチドであるかまたは図12のポリヌクレオチドから誘導される。

【 0 1 5 4 】

本発明はまた、検出可能な標識を共有結合連結したポリヌクレオチドを提供する。このようなポリヌクレオチドは、例えば、関連するヌクレオチド配列の検出のためのプローブとして有用である。

50

【0155】

本発明のポリヌクレオチドは、化学合成、組換えクローニング方法、PCR、またはそれらの任意の組み合わせを使用して得られる。化学ポリヌクレオチド合成の方法は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に詳細に記載する必要はない。当業者は、本明細書中に提供されるデータを使用して、DNA合成機を使用するかまたは商業的サービスへ注文することによって、所望のポリヌクレオチドを獲得し得る。

【0156】

あるいは、BDCAをコードするヌクレオチドおよびそれらにコードされるペプチドは、プロデュース細胞株、クローニングベクターまたは発現ベクターから得られ得る。所望の配列をコードするRNAまたはDNAは、標準的な組換え技術によって単離、増幅およびプロセッシングされ得る。このような技術としては、制限ヌクレアーゼでの消化、およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)による増幅、またはそれらの適切な組み合わせが挙げられる。PCR技術は、米国特許第4,683,195号;同第4,800,159号;同第4,754,065号;および同第4,683,202号、ならびにPCR: The Polymerase Chain Reaction, Mullisら編、Birkauer Press, Boston(1994)に記載される。それによってコードされるペプチドの単離および精製は、当該分野で公知の任意の方法により得る。

【0157】

所望の配列を含むポリヌクレオチドは、適切なベクターに挿入され得、次いで、このベクターは、複製および増幅のために適切な宿主細胞に導入され得る。ポリヌクレオチドは、当該分野で公知の任意の手段によって宿主細胞に挿入され得る。細胞は、直接的な取り込み、エンドサイトーシス、トランスフェクション、f-接合またはエレクトロポレーションにより外因性ポリヌクレオチドを導入することによって、形質転換される。一旦導入されると、外因性ポリヌクレオチドは、非組み込みベクター(例えば、プラスミド)として細胞内に維持されるか、または宿主細胞ゲノムに組み込まれ得る。増幅されたDNAは、標準的な方法によって宿主細胞から単離され得る。例えば、Sambrookら(1989)を参照のこと。RNAもまた、形質転換された宿主細胞から得られ得、これは、DNA依存性RNAポリメラーゼを使用することによって得られ得る。

【0158】

本発明はさらに、BDCA-2および/またはBDCA-3をコードするポリヌクレオチドを含む種々の発現ベクターを包含する。これらのベクターは、組換えポリペプチドの発現ならびにBDCAコードポリヌクレオチドの供給源のために使用され得る。クローニングベクターは、ポリヌクレオチドの複製コピーを得るためか、または将来の回収のために寄託機関でこれらのポリヌクレオチドを保存するために使用され得る。発現ベクター(およびこれらの発現ベクターを含む宿主細胞)は、それらが含むポリヌクレオチドから産生されるポリペプチドを得るために使用され得る。これらはまた、個体中でBDCA-2および/またはBDCA-3を発現し、そしてこれによって、このポリペプチドを合成し得るインタクティブな細胞を有することが所望される場合(例えば、遺伝子治療において)に、使用され得る。適切なクローニングベクターおよび発現ベクターとしては、例えば、細菌、哺乳動物、酵母および昆虫の発現系における使用のための、当該分野で公知のベクターが挙げられる。特定のベクターおよび適切な宿主細胞は、当該分野で公知であり、そして本明細書中に詳細に記載しない。例えば、GacesaおよびRamji、Vectors, John Wiley & Sons(1994)を参照のこと。

【0159】

クローニングベクターおよび発現ベクターは、代表的に、選択マーカー(例えば、そのベクターで形質転換された宿主細胞の生存または増殖に必要なタンパク質をコードする遺伝子)を含むが、このようなマーカー遺伝子は、宿主細胞に同時導入される別のポリヌクレオチド配列に保持され得る。選択遺伝子が導入されている宿主細胞のみが、選択条件下で増殖する。代表的な選択遺伝子は、(a)抗生物質または他の毒性物質(例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート)に対する耐性を付与するか;(b)栄養要求

10

20

30

40

50

性の欠損を相補するか；または(c)複合培地から利用可能でない重要な栄養素を供給する。適切なマーカー遺伝子の選択は、宿主細胞に依存し、そして異なる宿主について適切な遺伝子が、当該分野で公知である。ベクターはまた、代表的に、宿主によって認識される複製系を含む。

【0160】

適切なクローニングベクターは、標準的な技術に従って構築され得るか、または当該分野で利用可能な多くのクローニングベクターから選択され得る。選択されるクローニングベクターは、使用されることが意図される宿主細胞に従って変更し得るが、有用なクローニングベクターは、一般に、自律複製能力を有するか、特定の制限エンドヌクレアーゼに対する単一の標的を保有し得るか、またはそのベクターを含むクローンの選択において使用され得るマーカーの遺伝子を保持し得る。適切な例としては、プラスミドおよび細菌ウイルス、例えば、pUC18、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、ファージDNA、ならびにpSA3およびpAT28のようなシャトルベクターが挙げられる。これらのクローニングベクターおよび多くの他のクローニングベクターが、市販業者(例えば、BioRad、StratageneおよびInvitrogen)から入手可能である。

10

【0161】

発現ベクターは、一般に、目的のBDCAをコードするポリヌクレオチドを含む、複製可能なポリヌクレオチド構築物である。BDCAをコードするポリヌクレオチドは、適切な転写制御エレメント(例えば、プロモーター、エンハンサーおよびターミネーター)に作動可能に連結される。発現(すなわち、翻訳)のために、1以上の翻訳制御エレメントがまた、通常必要とされる(例えば、リボソーム結合部位、翻訳開始部位、および終止コドン)。これらの制御エレメント(転写および翻訳の)は、BDCAをコードする遺伝子に由来し得るか、またはそれらは、異種(すなわち、他の遺伝子または他の生物に由来する)であり得る。シグナルペプチドをコードするポリヌクレオチド配列もまた、BDCAを、細胞膜を横切るかまたは細胞膜中に留まるか、あるいは細胞から分泌されるのを可能にするために、含まれ得る。真核生物細胞(酵母、鳥類および哺乳動物細胞を含む)における発現に適切な多くの発現ベクターが、当該分野で公知である。発現ベクターの1例は、pcDNA3(Invitrogen, San Diego, CA)であり、ここでは、転写は、サイトメガロウイルス(CMV)初期プロモーター/エンハンサーによって駆動される。このベクターはまた、目的のポリヌクレオチドの挿入のための、複数の制限酵素認識部位を含む。発現ベクター(系)の別の例は、バキュロウイルス/昆虫系である。BDCAをコードするポリヌクレオチドを含む、抗体標的化遺伝子治療における使用に適切な他のベクターも存在する。適切な系は、例えば、Brownら(1994) *Virology* 198: 477-488; およびMiyamuraら(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 8507-8511によって記載される。

20

30

【0162】

目的のポリヌクレオチドを含むベクターは、以下を含む多くの適切な手段のいずれかによって、宿主細胞に導入され得る：エレクトロポレーション、あるいは塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAEデキストランまたは他の物質を使用するトランスフェクション、；微粒子銃；リポフェクション；および感染。BDCAをコードするベクターまたはポリヌクレオチドを導入する手段の選択は、しばしば、宿主細胞の特徴に依存する。

40

【0163】

一旦適切な宿主細胞に導入されると、BDCAの発現は、当該分野で公知の任意のアッセイを使用して決定され得る。例えば、それらの存在は、培養上清(ポリペプチドが分泌される場合)または細胞溶解物のRIAまたはELISAによって検出され得る。

【0164】

本発明のベクターは、BDCAをコードする1以上のポリヌクレオチドを含み得る。これはまた、所望の結果を増強、促進または調節する他のポリペプチド(例えば、サイトカイ

50

ン(I L - 2、I L - 4、G M - C S F、T N F - および I F N - を含むが、これらに限定されない) をコードするポリヌクレオチド配列を含み得る。組換え B D C A をコードするワクシニアベクターもまた、本発明に含まれる。

【 0 1 6 5 】

本発明の他の実施形態は、上記のような、B D C A をコードするポリヌクレオチドで形質転換した宿主細胞およびこのポリヌクレオチド配列を含むベクターで形質転換した宿主細胞である。原核生物細胞および真核生物細胞の両方が、使用され得る。原核生物宿主としては、細菌細胞(例えば、E . c o l i および M y c o b a c t e r i a) が挙げられるが、これらに限定されない。真核生物宿主としては、酵母、昆虫、鳥類、植物および哺乳動物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。宿主系は、当該分野で公知であり、そして本明細書中に詳細に記載する必要はない。哺乳動物宿主細胞の例としては、C H O および N S 0 (E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f C e l l C u l t u r e s (E n g l a n d) から入手可能) が挙げられるが、これらに限定されない。プラスミド(例えば、C M V プロモーターによって駆動される)での N S 0 細胞のトランスフェクション、その後の、グルタミンシンセターゼを使用におけるこのプラスミドの増幅は、タンパク質産生の有用な系を提供する。C o c k e t t ら(1 9 9 0) B i o / T e c h n o l o g y 8 : 6 6 2 - 6 6 7。

10

【 0 1 6 6 】

本発明の宿主細胞は、とりわけ、B D C A をコードするポリヌクレオチドの貯蔵所として、またはその産生のためのビヒクルとして、使用され得る。これらは、B D C A のインビボ発現のためのビヒクルとしてもまた使用され得る。

20

【 0 1 6 7 】

本発明のポリヌクレオチドは、いくつかの用途を有する。これらは、例えば、B D C A の産生のための発現系において有用である。これらはまた、当該分野で周知の方法を使用してサンプル中の B D C A または関連する配列をコードするポリヌクレオチドの存在についてアッセイするためのハイブリダイゼーションプローブとして有用である。さらに、これらのポリヌクレオチドはまた、所望のポリヌクレオチドの増幅をもたらすためのプライマーとして有用である。本発明のポリヌクレオチドはまた、薬学的組成物(ワクチンを含む)において、および遺伝子治療のために有用である。

【 0 1 6 8 】

これらのポリヌクレオチドはまた、B D C A コード配列の検出のためのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。適切なハイブリダイゼーションサンプルとしては、遺伝子治療における使用のためにエキソビボで形質転換された細胞が挙げられる。1つの例において、D N A または R N A は、サンプルから抽出され、そして必要に応じて、ゲル上で泳動しそして/または制限ヌクレアーゼで消化する。この処理したサンプルポリヌクレオチドは、代表的に、洗浄に適切な媒体に移される。次いで、このサンプルポリヌクレオチドに、B D C A コードポリヌクレオチドプローブを接触させる。これは、このサンプルが相補的ポリヌクレオチド配列を含む場合に安定な二重鎖が形成するのを可能にする条件下で行う。形成される任意の適切な二重鎖を、任意の適切な手段によって検出する。例えば、ポリヌクレオチドプローブは、標識された形態で供給され得、そして洗浄後にサンプルと共に残存する標識は、形成された安定な二重鎖の量を反映する。第2の例において、ハイブリダイゼーションを、インサイチュで行う。適切に調製された組織サンプルに、標識プローブを被せて、B D C A コード配列の位置を示す。

30

40

【 0 1 6 9 】

短いポリヌクレオチドもまた、P C R 反応のためのプライマー(特に、このプライマーとハイブリダイズする領域を含む長い配列を増幅するための)として使用され得る。これは、さらなる遺伝子操作のためのポリヌクレオチドを産生するために、分離目的で行われる。これはまた、B D C A コードポリヌクレオチドが、例えば、診断目的のサンプルに存在するか否かを決定するために、分析目的で行われる。

【 0 1 7 0 】

50

これらのポリヌクレオチドの別の用途は、ワクチンおよび遺伝子治療における。一般原理は、このポリヌクレオチドを投与して、その結果、これによってコードされるポリペプチドの発現を促進するかまたは減弱することである。従って、本発明は、免疫応答を誘導する方法および処置方法を包含し、これらは、B D C Aをコードする有効量のポリヌクレオチドを個体に投与する工程を包含する。これらの方法において、B D C Aをコードするポリヌクレオチドは、直接的にかまたはこのポリヌクレオチドをトランスフェクトした細胞を介して、個体に投与される。好ましくは、このポリヌクレオチドは、環状プラスミド（好ましくは、スーパーコイル形態にある）の形態にある。好ましくは、このポリヌクレオチドは、細胞内で複製される。従って、このポリヌクレオチドは、適切なプロモーター（例えば、標的組織型の細胞において内因的に活性である異種プロモーター）に作動可能に連結されている。好ましくは、一旦細胞核に存在すると、プラスミドは、環状の非複製エピソーム分子として存続する。インビトロ変異は、例えば、より高い親和性および/または結合力を有する分子をコードするように、プラスミド構築物に対して行われ得る。

10

【0171】

B D C Aポリヌクレオチドを含有するプラスミドが、真核生物細胞において発現可能であるか否かを決定するために、細胞（例えば、C O S - 7、C H OまたはH e L a）を、これらのプラスミドでトランスフェクトし得る。次いで、発現を、イムノアッセイ；例えば、ウエスタンブロットによって、決定する。小さいB D C Aは、例えば、得られたポリペプチドがタグ（例えば、標的エピトープまたは酵素標識）と融合されるようなプラスミドを構築することによって、検出され得る。発現されたポリペプチドのさらなる特徴づけは、ポリペプチドを精製し、次いで、本明細書中に記載の機能的アッセイの1つを行うことによって、達成され得る。

20

【0172】

遺伝子治療の1つの様式において、本発明のポリヌクレオチドは、エキソビボで細胞を遺伝的に改変するために使用される。このストラテジーにおいて、ドナーから取り出した細胞または細胞株から得た細胞を、B D C Aベクターで形質導入またはトランスフェクトし、次いで、レシピエントに投与する。トランスフェクションのために適切な細胞株としては、末梢血単核細胞が挙げられる。

【0173】

遺伝子治療の別の様式において、本発明のポリヌクレオチドは、インビボで細胞を改変するために使用される。この目的には、種々の型の癌を処置することが含まれ得るが、これらに限定されない。

30

【0174】

これらのポリヌクレオチドはまた、B D C A - 2を発現しない細胞、およびB D C A - 2を発現するトランスジェニック動物を産生するために使用され得る。

【0175】

本発明から、B D C A - 2を発現しないかまたは有意に減少されたレベルでB D C A - 2を発現するように操作された細胞が得られる。このような細胞は、細胞（好ましくは、D C）を選択し、そしてその細胞にB D C A - 2をコードするポリヌクレオチドを含む発現構築物を提供することによって産生され、ここで、このポリヌクレオチドは、アンチセンスの状態でありかつプロモーターに作動可能に連結される。このようなポリヌクレオチドの発現は、B D C A - 2欠損性の細胞を効果的に産生する。

40

【0176】

他の実施形態において、本発明は、B D C A - 2を有意に減少された量で産生するかまたはさらにB D C A - 2の産生を「ノックアウト」する、組換え宿主細胞を調製するために方法を提供する。これらの組換え宿主細胞は、当該分野で周知の1以上の手段を使用することによって調製され得る。例えば、遺伝子発現は、ゲノム内へのアンチセンスD N AまたはR N Aの構築物の組み込みによって阻害され得る。内因性B D C A - 2遺伝子の欠失または変異は、これらを非機能的にし得る。B D C A - 2 m R N Aを特異的に切断するリボザイム（R N A切断酵素）をコードする核酸を、この組換え宿主細胞に導入し得る。

50

【 0 1 7 7 】

用語「ノックアウト」とは、細胞中の内因性DNA配列（例えば、B D C A - 2）によってコードされるタンパク質の少なくとも一部の発現の、部分的または完全な抑制をいう。用語「ノックアウト構築物」とは、細胞中の内因性DNAによってコードされるタンパク質の発現を減少または抑制するように設計された核酸配列をいう。

【 0 1 7 8 】

これらの組換え構築物は、ノックアウト動物に組み込まれ、その結果、B D C A - 2の産生がDCにおいて抑制される。ノックアウトおよびトランスジェニック動物の調製は、当該分野で公知であり、そして米国特許第5,434,340号、同第5,530,179号および同第5,557,032号に記載される。

10

【 0 1 7 9 】

本発明はさらに、B D C A - 2を過剰発現する動物を産生するための方法およびB D C A - 2を過剰発現するように産生された動物を提供する。これらの方法は、一般に、動物に細胞を導入する工程を包含し、これらの動物細胞は、その中にB D C A - 2ポリペプチドをコードするDNAセグメントを挿入するためにインビトロで処置され、これらの動物細胞は、この動物中でインビボにてB D C A - 2を発現する。

【 0 1 8 0 】

(D . キット)

本発明は、血清および他の供給源におけるB D C A - 2（可溶性B D C A - 2（そのアイソフォームを含む）を含む）を測定するための、抗DC特異的抗原結合フラグメントを含むキットを包含する。これらのキットを使用する診断手順は、診断室、実験室、医師、または個人によって行われ得る。臨床サンプルは、試験される標的の富化のために、必要に応じて前処理される。次いで、使用者は、キットに含まれる試薬を適用して、その診断成分における変化したレベルまたは変更を検出する。

20

【 0 1 8 1 】

必要に応じて、試薬は、標識と結合体化され得、サンプル中の標的と共に形成される任意の複合体の検出を可能にする。別の選択肢において、第1の試薬がその標的を見出した後にその第1の試薬と結合し得ることでそれによって検出可能な標識を供給し得る、第2の試薬が、提供される。例えば、標識した抗マウスIgGは、二次試薬として提供され得る。標識したアビジンは、一次試薬が、ビオチンと結合体化されている場合の、二次試薬である。

30

【 0 1 8 2 】

これらのキットは、種々の生物学的サンプル（液体サンプル、細胞懸濁物および組織サンプルを含む）に対して使用され得る。キット形態で供給され得る適切なアッセイとしては、本明細書中に記載のアッセイが含まれる。

【 0 1 8 3 】

各試薬は、固体形態で供給されるか、または貯蔵およびその後に行う時の反応媒体の交換または反応媒体への添加のために適切な液体緩衝液中に溶解/懸濁されている。適切なパッケージングが提供される。このキットは、必要に応じて、この手順に有用なさらなる成分を提供する。これらの任意の成分としては、緩衝液、捕捉試薬、発色試薬、標識

40

【 0 1 8 4 】

(E . 治療組成物)

(1 . 合成物)

本明細書中に記載される薬学的組成物の調製は、薬学的調製物の調製のための一般に受け入れられた手順に従って行われる。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 第18版(1990)、E.W. Martin編、Mack Publishing Co., PAを参照のこと。意図される用途および投与形態に依存して、薬学的組成物の調製において活性成分をさらに処理することが望ましく

50

あり得る。適切な処理としては、滅菌、適切な非イオン性かつ非干渉成分との混合、用量単位への分割、および送達デバイスへの封入が挙げられる。1つの実施形態において、治療組成物は、DC、その亜集団またはその混合物を含む。別の実施形態において、組成物は、本明細書中に記載される抗原結合フラグメントを含む。好ましくは、この抗原結合フラグメントは、表1に列挙したmAbであるか、またはこれらのmAbに由来する。好ましくは、これらのDC組成物は、これらの抗原結合フラグメントのうちの1つで単離されたDCを含む。

【0185】

(a) 一般的な投与形態

本発明の薬学的組成物は、この形態の組成物に適切な様式によって投与される。代表的な経路としては、静脈内、皮下、筋内、腹腔内、経皮、経口、鼻内、皮内、および肺内（すなわち、エアロゾルによる）が挙げられる。ヒトのための薬学的組成物は、代表的には、非経口経路、最も代表的には、静脈内、皮下、筋内で投与される。必要ではないが、薬学的組成物は、好ましくは、正確な量の投与のために適切な単位投薬形態で供給される。徐放形態または持続放出形態もまた本発明によって意図され、これによって、比較的一定レベルの活性化化合物が、長期間にわたって提供される。

10

【0186】

(b) 液体処方物

液体の薬学的に受容可能な組成物は、例えば、液体賦形剤（例えば、水、生理食塩水、水性デキストロース、グリセロールまたはエタノール）中に、本発明の実施形態のポリペプチドまたはポリヌクレオチドを溶解または分散させることによって調製され得る。組成物はまた、必要に応じて、他の医療因子、薬学的因子、キャリアおよび補助物質（例えば、湿潤剤または乳化剤、およびpH緩衝剤）を含み得る。注射用組成物は、液体の溶液または懸濁液として、エマルジョンとして、または注射前の液体中での溶解または懸濁に適切な固体形態として供給され得る。

20

【0187】

経口、鼻内または局所投与のための薬学的組成物は、固体、半固体または液体形態（錠剤、カプセル、粉末、液体および懸濁液を含む）で供給される。気道を介する投与のために、好ましい組成物は、適切なエアロゾルデバイスを用いたときに固体、粉末または液体エアロゾルを提供する組成物である。

30

【0188】

本発明はまた、腫瘍細胞または新生物細胞の領域あるいは免疫系にリポソームを特異的に送達するための、膜に結合したペプチドを有するリポソームを含有する組成物を包含する。これらのリポソームは、これらが、ペプチドに加えて、上記のような免疫療法剤を含むように産生され得、これらの免疫療法剤は、次いで、認識部位に放出される。Wolfら(1984) *Biochem. Biophys. Acta* 802:259。別のこのような送達系は、抗原結合フラグメントの提示のために、キメラパルボウイルスB19キャプシドを利用する。Brownら(1994) *Virology* 198:477-488; およびMiyamuraら(1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8507-8511。このようなキメラ系は、本明細書中に記載の使用のために包含される。

40

【0189】

本発明の実施形態の組成物は、多くの方法でそれらの効力について評価され得る。従って、試験化合物は、適切な薬学的組成物として調製され、そして試験被験体に投与される。初期研究は、好ましくは、小動物（例えば、マウスまたはウサギ）においてなされ、必要に応じて、次に、非ヒト霊長類において、そして最後に、ヒトにおいてなされる。免疫原性は、好ましくは、以前に抗体応答を有さない個体において試験される。適切な試験用量の試験組成物が、適切な処置スケジュールで投与される。予測される範囲内の異なる用量およびスケジュールを比較することが適切であり得る。抗原結合フラグメントの投与についての投薬範囲は、所望の効果を生じるのに十分大きく、ここで、疾患の症状は、過度の

50

副作用（例えば、望ましくない交差反応およびアナフィラキシー反応）を引き起こすことなく回復される。一般に、投薬は、患者の年齢、状態、性別および疾患の程度に伴い変化し、そして当業者によって決定され得る。投薬は、任意の合併症が生じる場合に個々の医師によって調整され得る。一般に、これらの組成物が、治療因子と共に結合体化されて投与される場合に、より低用量（インビボ免疫診断画像化に使用される用量に匹敵する）で使用され得る。

【0190】

（2．抗原結合フラグメント）

本発明は、本明細書中に記載の抗原結合フラグメントを含む薬学的組成物を包含する。このような薬学的組成物は、単独でかまたは他の治療形態（化学療法、放射線療法または免疫療法（WO 98 / 23735；WO 98 / 34642；WO 97 / 10000；WO 97 / 10001；およびWO 97 / 06821に記載される））と組み合わせて、免疫応答の誘導または補助および新生物疾患の処置、あるいは自己免疫疾患（GVHD、同種移植片拒絶、アレルギーなど）の寛容および処置に有用である。他の処置方法は、本明細書中に記載され、そして／または当該分野で公知である。適切な疾患としては、ウイルス疾患、寄生生物疾患、細菌疾患、真菌疾患、新生物疾患および自己免疫疾患が挙げられるが、これらに限定されない。

【0191】

マウス乳癌モデルにおいて、Flt3-Ligand (Flt3-L) (DCおよびB細胞を含む種々の造血系に対する刺激性サイトカイン) は、ワクチンとして、マウス乳癌細胞と組み合わせて使用されている。Chenら(1997) Cancer Res. 57:3511-6。DCはまた、腫瘍抗原で負荷され得るかまたは腫瘍抗原を発現するように形質導入され得；次いで、これらの細胞は、腫瘍ワクチン接種に対するアジュバントとして使用される。DCは、適切なMHC拘束状況下で輸入リンパ系に、内因的に腫瘍関連抗原を提示する。Wanら(1997) Hum. Gene Ther. 8:1355-63；Peiperら(1997) Surgery 122:235-41；およびSmithら(1997) Int. Immunol. 9:1085-93。現在の黒色腫ワクチンは、抗原提示網を操作し、そして腫瘍保護免疫の媒介に効果的な最良の細胞性免疫応答と抗体抗腫瘍免疫応答を合わせる。これらの治療は、副作用を伴わずに、いくつかの場合において、後退、疾患の進行の遅延、または生存の改善を生じた。Kuhnら(1997) Dermatol. Surg. 23:649-54。黒色腫ワクチンはまた、Confortiら(1997) J. Surg. Oncol. 66:55-64に概説される。

【0192】

ワクチンは、薬学的に受容可能なキャリアにパッケージングされ得るか、当該分野で公知のアジュバントまたは他の成分（例えば、サイトカイン）と混合される。獣医学用途のワクチンは、細菌および細菌成分を含むアジュバント（フロイント完全アジュバントまたはフロイント不完全アジュバント）が、処方物において許容されるという例外を除いて、実質的にヒトのワクチンと類似する。

【0193】

（F．処置方法）

種々の障害（本明細書中に記載され、そして／または当該分野で公知のような）を処置するための方法もまた、本発明に含まれる。これらの方法は、所望の効果を達成する（既存の状態を軽減するかまたは再発を防止する）のに有効量の本発明の組成物を含有する、ある量の薬学的組成物を投与する工程を包含する。癌の処置について、投与される薬学的組成物の量は、その所望の効果を精製するのに有効な量である。有効量は、1回または一連の投与において提供され得る。有効量は、ポラスまたは連続灌流によって提供され得る。適切な活性薬剤としては、抗新生物薬剤、生物応答（bioreponse）変更因子およびエフェクター細胞（例えば、Douillardら(1986) Hybridomas（補遺1:5139）に記載されるような）が挙げられる。

【0194】

10

20

30

40

50

薬学的組成物および処置様式は、新生物に対する免疫応答を直接的または間接的に誘導することによって患者を処置するために適切である。「個体」、「患者」または「被験体」は、脊椎動物、好ましくは、哺乳動物、より好ましくは、ヒトである。哺乳動物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：ヒト、野生動物 (wild animal)、野生動物 (feral animal)、家畜動物、スポーツ用動物、およびペット。「癌被験体」は、悪性疾患または新生物を有するかあるいはそれらの危険性があると診断された、哺乳動物、好ましくは、ヒトである。

【0195】

本明細書中で使用される場合、「処置」とは、処置される個体または細胞の疾患経過を変更する試みにおける、臨床的介入をいい、そして予防的にかまたは臨床的病状の経過中に行われ得る。処置の治療的効果としては、疾患の発生または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理学的結果の減少、転移の防止、疾患進行速度の減少、疾患状態の回復または軽減、および環開または予後の改善が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0196】

疾患状態に関係する「病理学」とは、罹患した個体の生活の幸福、正常な生理学、または生活の質を含む任意の状態である。これは、以下を含み得るがこれらに限定されない：以前に罹患していない領域への罹患した組織の破壊的挿入、正常な組織機能を犠牲にする増殖、不規則な生物学的活性もしくは抑制された生物学的活性、炎症応答もしくは免疫学的応答の悪化もしくは抑制、他の病原性生物または因子に対する増加した感受性、ならびに望ましくない臨床的症状（例えば、痛み、熱、悪心、疲労、気分の変化ならびに主治医により決定され得るような他の疾患特徴）。

20

【0197】

「有効量」とは、処置の際の有益な臨床結果または所望の臨床結果をもたらすに十分な量である。有効量は、1用量以上で患者に投与され得る。処置に関して、有効な量は、疾患の進行を緩和、軽減、安定化、逆行または遅延するに十分であるか、あるいは疾患の病理学的結果を減少するに十分である、量である。この有効量は、一般的に、症例に応じて医師により決定され、この有効量は、当業者の範囲内である。いくつかの因子が、有効量を達するために適切な投薬量を決定する場合に、代表的に考慮される。これらの因子としては、患者の年齢、性別、および体重、処置する状態、その状態の重篤度、および投与される抗原結合フラグメントの形態および有効濃度が挙げられる。

30

【0198】

用語「免疫調節性」または「免疫応答を調節する」は、本明細書中で使用される場合、免疫刺激効果ならびに免疫抑制効果を含む。免疫刺激効果としては、細胞性免疫応答または体液性免疫応答を直接的または間接的増強する効果が、挙げられるがこれらに限定されない。免疫刺激効果の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：増加した抗原特異的抗体産生；リンパ球集団（例えば、NK細胞、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、マクロファージなど）の活性化または増殖；サイトカインまたはケモカイン（IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-12、インターフェロン、TNF-、IL-10、TGF- などを含むが、これらに限定されない）の増加した合成。免疫抑制効果としては、細胞性免疫応答または体液性免疫応答を直接または間接的に減少する効果が挙げられる。免疫抑制効果の例としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗原特異的抗体産生の減少（例えば、減少したIgE生成）；免疫抑制活性（例えば、免疫寛容を生じる活性）を有するリンパ球または他の細胞集団の活性化；ならびに特定の細胞機能に対する抑制効果を有するサイトカイン（IL-10およびTGF-を含むが、これらに限定されない）の増加した合成。この1つの例は、IFN-であり、これは、IgEおよびIgG1へのIL-4誘導性クラス変換をブロックし、それによりこれらの抗体サブクラスのレベルを減少するようである。

40

【0199】

癌治療に適切なヒト被験体は、2つの処置群をさらに含み、これらの群は、臨床基準によ

50

り区別され得る。「進行した疾患」または「高腫瘍負荷」を有する患者は、臨床的に測定可能な腫瘍を保有する患者である。臨床的に測定可能な腫瘍は、腫瘍塊に基づいて（例えば、触診により、CATスキャンによるか、ソノグラムによるか、乳房X線像によるか、またはX線により；生化学的ポジティブマーカーまたは組織病理学的マーカーそれ自体では、この集団を同定するために不十分である）検出され得る腫瘍である。本発明において具体化される薬学的組成物は、その状態を緩和する目的で、抗腫瘍応答を惹起するためにこれらの患者に投与される。理想的には、腫瘍塊の減少が、結果として生じるが、任意の臨床的改善が利益を構成する。臨床的改善は、腫瘍の進行の危険もしくは進行の減少、または腫瘍の病理学的結果の減少を含む。

【0200】

適切な被験体の第2の群は、「アジュバント群」として当該分野で公知である。これらは、癌の病歴を有したが別の治療様式に応答した個体である。事前治療は、外科的切除、放射線療法、および従来の化学療法を含み得た（が、これらに限定されない）。結果として、これらの個体は、臨床的に測定可能な腫瘍を有さない。しかし、これらは、もとの腫瘍部位付近でかまたは転移によってのいずれかで、疾患の進行の危険があると疑われる。

【0201】

「アジュバント」とは、本明細書中で使用される場合、いくつかの意味を有し、そのすべてが、この用語が使用される状況に依存して明らかである。薬学的調製物の状況において、アジュバントは、抗原とともに（皮下にかまたは他の方法で）与えられるか、または抗原に組換え融合されて、その抗原の免疫原性を増強する、化学的因子または生物学的因子である。概説について、Singhら（1999）Nature Biotech. 17: 1075~1081を参照のこと。単離されたDCもまた、アジュバントとしての使用について示唆されている。その中における使用のための組成物が、本発明中に包含される。癌診断または癌処置の状況で、アジュバントは、臨床的に検出可能な腫瘍塊を有さないが、再発の危険が疑われる、癌患者の種類をいう。

【0202】

この群は、さらに高リスク個体および低リスク個体へと部分分割され得る。この部分分割は、最初の処置の前または後に観察される特徴に基づいてなされる。これらの特徴は、臨床的分野で公知であり、そして種々の各癌について適切に規定される。高リスク部分群を代表する特徴は、腫瘍が隣接組織に侵襲したか、リンパ節の関与を示す、特徴である。

【0203】

別の適切な群は、癌に対する遺伝的素因を有するが、なお癌の臨床的徴候を有未だ示さない、群である。例えば、乳癌に関連する遺伝子変異について試験の結果がポジティブであるがなお妊娠可能な年齢である女性は、予防手術を実施するのが適切であるまで、癌の発症を予防するような予防的処置において本明細書中に記載される抗原結合フラグメントの1つ以上を受けることを望み得る。

【0204】

ヒト癌患者（神経膠芽細胞、黒色腫、神経芽細胞腫、腺癌、神経膠腫、軟部組織肉腫および種々の癌腫（小細胞肺癌を含む）を含むが、これらに限定されない）は、特に適切な被験体である。適切な癌腫は、さらに、以下を含むがこれらに限定されない、腫瘍学の分野で公知の任意の癌腫を含む：神経膠星状細胞腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、乏突起神経膠腫、脳室上衣細胞腫、髄芽細胞腫、未分化神経外胚葉性腫瘍（primitive neural ectodermal tumor）（PNET）、軟骨肉腫、骨原性肉腫、膵管腺癌、小細胞肺腺癌および大細胞肺腺癌（small and large cell lung adenocarcinoma）、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫（endotheliosarcoma）、扁平上皮癌、気管支肺胞癌腫（bronchoalveolar carcinoma）、上皮腺癌（epithelial adenocarcinoma）、およびその肝臓転移、リンパ管肉腫、リンパ管内皮腫、肝細胞癌、胆管癌、骨膜腫、中皮腫、ユーイング肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌腫（colon carcinoma）、基底細胞癌、汗腺癌、乳頭状癌、汗腺癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄

10

20

30

40

50

様癌、気管支原生癌、腎細胞癌、胆管癌腫 (b i l e d u c t c a r c i n o m a)、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、髄芽細胞腫、頭蓋咽頭腫、脳室上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起神経膠腫、髄膜腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、およびH鎖病、腺管癌および小葉癌のような乳癌、子宮頸の扁平上皮癌および子宮頸の腺癌、子宮上皮癌腫瘍、卵巣上皮癌腫瘍、前立腺腺癌、膀胱の移行性扁平上皮癌、B細胞リンパ腫およびT細胞リンパ腫 (結節性およびびまん性) プラズマ細胞腫、急性および慢性白血病、悪性黒色腫、軟部組織肉腫ならびに平滑筋肉腫。

【 0 2 0 5 】

患者は、疾患の進行形態を有し得、その症例において、処置目標は、疾患進行の緩和もしくは逆転、および/または副作用の軽減を含み得る。その患者は、処置された状態の病歴を有し得、その症例において、治療目標は、代表的には、再発の危険の減少または遅延を含む。

10

【 0 2 0 6 】

自己免疫障害は、種々の細胞、組織および器官の自己破壊を生じる、方向を誤った免疫応答により生じる。これらの障害の原因は、未知である。MHCを介する自己の認識は、免疫応答において重要であることが公知である。しかし、自己免疫応答の予防および自己免疫を担う細胞は、十分には理解されていない。

【 0 2 0 7 】

自己免疫は、因子 (遺伝的影響、体液性影響および環境的影響を含む) の組み合わせから生じる。多くの自己免疫障害は、B細胞機能亢進により特徴付けられ、これは、B細胞および自己抗体の増殖ならびに高ガンマグロブリン血症により顕著である。B細胞機能亢進は、おそらくT細胞異常に関連する。ホルモン因子および遺伝的因子は、自己免疫障害の発症に強力に影響する (例えば、エリテマトーデスは、妊娠可能な年齢の女性に優勢に影響し、そして特定のHLAハプロタイプは、特定の自己免疫障害の危険の増加と関連する)。

20

【 0 2 0 8 】

一般的自己免疫障害としては、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、シェーグレン症候群、エリテマトーデス、グッドパスチャー症候群、ライター症候群、強皮症、脈管炎、多発性筋炎および皮膚筋炎が挙げられるが、これらに限定されない。これらの状態の多くは、免疫学的障害に関連する異常な炎症反応を含む。本明細書中に記載されるDCは、特に、その障害に関与するT細胞を不活性化するかまたはT細胞における寛容原化を誘導するために使用される場合、これらの障害の処置における使用に適切である。処置の方法は、当該分野で公知である。本明細書中で考察されるように、本明細書中に記載の方法により得られるDCのサブセットの1つ以上が、自己免疫の処置における使用に適切である。

30

【 0 2 0 9 】

抗原結合フラグメントの「免疫原性活性」は、インタクトな抗体が認識する抗原に特異的に結合することをいう。このような結合は、免疫応答を惹起しても惹起しなくてもよい。特定の免疫応答は、抗体、B細胞応答、T細胞応答、それらの任意の組み合わせ、ならびにこれらから生じ得るエフェクター機能を惹起し得る。限定はしないが、抗体媒介性機能ADCCおよび補体媒介性細胞溶解(CDC)が含まれる。T細胞応答としては、Tヘルパー細胞機能、細胞傷害性T細胞機能、炎症/誘導物質T細胞機能、およびT細胞媒介性免疫抑制が挙げられるが、限定はしない。直接または間接的のいずれかで、これらの基準のいずれかに従う特定の免疫応答を惹起し得る化合物 (単独またはキャリアもしくはアジュバントとの組み合わせでのいずれかで) は、「免疫原性」と呼ばれる。抗原結合フラグメント「活性」または「機能」は、抗体の免疫学的活性のいずれか (癌の検出、改善または緩和を含む) をいう。

40

【 0 2 1 0 】

「免疫応答」は、悪性組織または疾患組織、身体が曝露される疾患原因因子および他の外

50

来因子に対する免疫学的応答の誘導または増強をいう。免疫応答は、抗体産生により示されるように、体液性であり得；そして/またはナチュラルキラー細胞または細胞傷害性Tリンパ球（CTL）およびそれらにより産生されるサイトカインのような細胞によって示される細胞溶解性免疫応答によって示されるように、細胞媒介性であり得る。免疫応答は、感染または悪性疾患の部位の単核細胞浸潤によりモニターされ得る。代表的には、このようなモニタリングは、組織病理学による。「癌特異的免疫応答」は、悪性疾患に対して生じるが非癌性細胞に対しては生じない、免疫応答である。本明細書中に記載の処置は、代表的には、細胞媒介性免疫応答を誘導または増強するが、抗体媒介性免疫応答もまた誘導または増強し得る。この処置はまた、抗原に対する免疫応答の型に影響し得る。

【0211】

本発明による組成物はまた、抗原特異的Th1免疫応答を誘導する際の使用に適切である。Th1型免疫応答を刺激することは、本発明に従って処置される宿主において測定され得、そして以下を含むがこれらに限定されない、当該分野で公知の任意の方法により決定され得る：抗原チャレンジ前後に測定したIL-4のレベルの減少；あるいは抗原刺激したかもしくは刺激およびチャレンジした、本発明の組成物を用いずに処置したコントロールと比較して、処置した宿主におけるIL-4のより低いレベル（またはレベルを欠く）の検出；抗原刺激したかもしくは刺激およびチャレンジしたコントロールと比較して、処置した宿主におけるIL-12、IL-18および/もしくはIFN（、もしくは、好ましくはIFN-）のレベルにおける増加；未処置のコントロールと比較して、処置した宿主におけるIgG2a抗体生成；抗原刺激したかもしくは刺激およびチャレンジした、未処置宿主と比較して、抗原チャレンジ前後に測定した抗原特異的IgEのレベルの減少、あるいは処置した宿主における抗原特異的IgEのより低いレベル（またはレベルを欠く）の検出。種々のこれらの決定は、APCおよび/またはリンパ球、好ましくはDCおよび/またはT細胞により生成されるサイトカインを、本明細書中に記載されそして当該分野で公知の方法を使用してインビトロまたはエキソビボで測定することによって、なされ得る。抗体産生を決定するための方法としては、当該分野で公知の任意のものが挙げられる。

【0212】

Th1に偏ったサイトカイン誘導は、増強した細胞性免疫応答（例えば、NK細胞、細胞傷害性キラー細胞、Th1ヘルパーおよび記憶細胞によって行われる免疫応答）を生成する。これらの応答は、ウイルス、真菌、原生動物寄生生物、細菌、アレルギー性疾患および喘息、ならびに腫瘍に対する予防的または治療的ワクチン接種における使用に特に有益である。

【0213】

本発明は、BDCA-2の連結を介するI型インターフェロン産生のダウンレギュレーション、BDCA-2の連結を介するTh1免疫応答のダウンレギュレーション、およびBDCA-2の連結を介するTh2への免疫応答の分極（偏向：polarization）をさらに含む。これらの指標は、BDCA-2の連結を妨害することによって逆転され得る。本発明はさらに、BDCA-2の連結を妨害するために適切な部分およびこれらの部分の組成についてスクリーニングすることを包含する。

【0214】

抗原結合フラグメントは、種々の治療薬剤と組み合わせて使用され、両方の投与は、通常、実質的に同時に生じる。用語「実質的に同時に」は、それらが時間に関して合理的に近接して投与されることを意味する。治療薬剤の投与は、毎日であってもまたは他の適切な任意の間隔であってもよく、例えば、病気の性質、患者の状態および薬剤の半減期のような因子に依存する。

【0215】

治療組成物は、注射によってか、または経時的な漸次灌流によって、投与され得る。抗原結合フラグメントは、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、腔内（intracavity）、結節内（intranodal）、鞘内または経皮的に、単独でかまたは他の治療剤と

10

20

30

40

50

組み合わせて、投与され得る。

【0216】

投与の別の方法は、例えば、腫瘍中への直接の注射による、病変内局注である。癌患者への種々の形態の免疫療法の病変内局注投与は、免疫学的因子の全身投与に伴って観察される毒性を生じない。Fletcherら(1987) *Lymphokine Res.* 6: 45; Rabinowichら(1984) *Cancer Res.* 47: 173; Rosenbergrら(1989) *Science* 233: 1318; およびPizzら(1984) *J. Int. Cancer* 34: 359。

【0217】

さらに、処置が必要な領域へ局所的にその組成物を投与することが望ましくあり得；これは、例えば、注射、カテーテル、または移植片による手術の間の局所注入によって達成され得、その移植片は、多孔性、非多孔性またはゼラチン状の物質であり、これらとしては、シラスチック膜または繊維のような、膜が挙げられる。そのような適切な膜は、Guilford sciencesにより提供されるGliadel(登録商標)である。

【0218】

抗BDCA-2モノクローナル抗体(AC144)とのBDCA-2の連結が細胞内Ca²⁺移動を誘導するという事実は、プラズマ細胞様DC(およびBDCA-2を発現する他のすべての細胞)は、BDCA-2シグナル伝達の誘発またはBDCA-2シグナル伝達の誘発の阻害によって、機能的に調節され得ることを示す。DCの機能的調節に関して、以下の局面が、特許請求の範囲によって包含される：

A) CD4⁺およびCD8⁺T細胞応答の誘導およびダウンレギュレーション。

B) 寛容または免疫への免疫応答の分極(polarization)。

C) Th1細胞発達(development)、Th2細胞発達またはTh3/T調節性-1 CD4⁺T細胞発達への、CD4⁺T細胞応答の分極(polarization)。後者は、おそらくTGF- β および/またはIL-10の分泌を介して、免疫応答をダウンレギュレートする。

【0219】

D) DCは、通常、T細胞についての抗原提示細胞と考えられる。しかし、いくつかの実験室からの最近の研究は、これらがB細胞活性化および抗体合成の調節において、重要な役割を有すると示された。従って、B細胞応答は、DC上のBDCA-2を介して調節され得る。同じことが、NK細胞応答についても真であり得る。

【0220】

I型インターフェロンはヒトにおいてTh1型免疫応答を誘導し得るので(Parronchiら(1996) *Eur. J. Immunol.* 26: 697~703)、BDCA-2の誘発は、Th2細胞発達(development)にCD4⁺T細胞応答を分極する(polarize)が、BDCA-2シグナル伝達の阻害は、Th1細胞発達にCD4⁺T細胞応答を分極する。従って、本発明は、それぞれBDCA-2シグナル伝達の誘発またはBDCA-2シグナル伝達の誘発の阻害による、Th2細胞発達またはTh1細胞発達へのCD4⁺T細胞応答の分極を包含する。

【0221】

本明細書中に引用されるすべての刊行物は、本明細書中においてその全体が参考として援用される。以下の実施例は、本発明を例示するために提供されるが、本発明を限定はしない。

【0222】

(実施例1)

(DC特異的モノクローナル抗体(mAb)の生成)

6~8週齢の5匹の雌性Balb/cマウス(Simonsen Laboratories, Gilroy, CA)に、麻酔下で、右足蹠に約 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ の精製HLA-DR⁺lin⁻血液DCを0日目、4日目、7日目、11日目および14日目に、そして左足蹠に約 1×10^6 のHLA-A2⁺Bristol-8 Bリンパ芽球腫を、-3日目、0日目、4日目、7日目、11日目、および14日目に接種した。両方の細胞型を、室温で10分間1:100PHA(Gibco/BRL, Gaithersburg, M

10

20

30

40

50

D)とともにインキュベートし、そして注射前にPBSで洗浄した。この処置は、非特異的アジュバント効果を提供し、そしてフロイントアジュバントのようなアジュバントについての必要性を除去する。

【0223】

15日目、HLA-DR⁺lin⁻DCの5回目の注射の1日後、マウス右脚の膝窩リンパ節を除去した。リンパ球懸濁物を調製し、そして細胞を、KohlerおよびMilstein(1975)Nature 256:495により記載される方法の改変形を使用して、SP2/0 Ag14黒色腫細胞に融合した。融合細胞を、20% FCS(Hyclone、Logan、UT)、2mmol/L Lグルタミン、15mmol/L Hepes、10⁻⁴mmol/Lヒポキサンチン(Gibco/BRL)を補充したDMEM中で96ウェルプレート上にプレートし、そして9% CO₂を含む37℃インキュベーター中に配置した。

10

【0224】

目に見えるハイブリドーマコロニーが明らかな場合、これらのウェルからの上清を、抗体分泌およびPBMCに対する非反応性(<1%ポジティブ細胞)についてフローサイトメトリーによってスクリーニングした。簡単には、ラット抗マウス mAb結合体化ポリスチレンビーズ(直径2.5µm、Interfacial Dynamics Corp.、Portland、OR)とPBMCの混合物を、室温で20分間50µlハイブリドーマ上清とともにインキュベートした。次いで、ビーズ/細胞混合物を、5mmol/L EDTAおよび0.5% BSAを含むPBS(pH7.4)(PBS/EDTA/BSA)で2回洗浄し、そしてビーズおよび試験細胞へのこの上清由来のマウスIgM、IgG1、IgG2aおよびIgG2bの結合を、PE結合体化ラット抗マウスIgM mAb(クローンX54、BD Biosciences、San Jose、CA)、PE結合体化ラット抗マウスIgG1 mAb(クローンX56、BD Biosciences)およびPE結合体化ラット抗マウスIgG2 mAb(クローンX57、BD Biosciences)で染色することによって、検出した。PBMCおよびポリスチレンビーズを、スキャッターシグナルによりフローサイトメトリー分析において容易に区別し得る。

20

【0225】

次いで、第1回のスクリーニング基準を満たした培養上清を、有意な比率の血液DCに対する反応性についてのフローサイトメトリー分析によってスクリーニングした。手短かには、ラット抗マウスmAb結合体化ポリスチレンビーズおよび富化した血液DC(B細胞、T細胞および単球を除去した、PBMC)の混合物を、室温で20分間、50µlハイブリドーマ上清とともにインキュベートした。次いで、この混合物を2回、PBS/EDTA/BSAで洗浄し、そしてPE結合体化ラット抗マウスIgM mAb、PE結合体化ラット抗マウスIgG1 mAbおよびPE結合体化ラット抗マウスIgG2 mAbで染色して、ビーズおよび富化した血液DCへのこの上清由来のマウスIgM、IgG1、IgG2aおよびIgG2bの結合を検出した。フローサイトメトリー分析におけるHLA-DR⁻細胞からのHLA-DR⁺DC細胞の識別のために、ビーズ/細胞混合物を1回洗浄し、PE結合体化ラット抗マウスIgG2 mAbの遊離結合部位およびビーズ結合体化ラット抗マウス mAbの遊離結合部位(free binding site)を、室温で5分間、100µg/mlのマウスIgG2aとのインキュベーションによって飽和させ、そしてこの混合物を、抗HLA-DR-FITC(クローンAC122、IgG2a)により対比染色した。

30

40

【0226】

選択したハイブリドーマ細胞を培養中で増殖して、ストックを液体窒素中で凍結し、サブクローンを、限界希釈によって確立し、そして一連のポジティブサブクローンもまた液体窒素中で凍結した。mAbのアイソタイプを、ISOTYPE Ab-STAT Kit(SangStat Medical Corp.、Palo Alto、CA)により決定した。

50

【0227】

mAb生成のために、ハイブリドーマ細胞を、mAbリッチな腹水のコレクションを用いてBalb/cマウスにおける腹水腫瘍としてか、またはmAbリッチな培養上清のコレクションを用いて細胞培養（ローラー培養または中空線維培養）中でのいずれかで、増殖させた。純粋なIgG mAbを、Protein Aアフィニティークロマトグラフィーにより、いくつかの場合ではその後に疎水性相互作用クロマトグラフィーにより、腹水または細胞培養上清から調製し、そして5 mmol/L EDTAおよび0.05%アジ化ナトリウムを含むPBS中に4℃で貯蔵した。精製mAbを、標準的技術に従って、FITC (Sigma, St. Louis, MO)、PE (Cyanotech Corp., Kailua Kona, HI)、Cy5 (Amersham Life Science Inc., Arlington Heights, IL)、APC (Europa Bioproducts Ltd., Cambridge, UK)、ビオチン (Pierce, Rockford, IL) およびコロイド状超常磁性ビーズ (直径約50 nm、Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) に結合体化した。Hermanson (1996) Bioconjugate Techniques. Academic Press Inc., San Diego, 785頁; Aslamら (1998) Bioconjugation: protein coupling techniques for the biomedical sciences., Macmillan Reference Ltd., London, 833頁、; ならびにKantorら (1997) Magnetic cell sorting with colloidal superparamagnetic particles., Cell Separation Methods and Applications, Recktenwaldsら編、Marcel Dekker Inc., New York, 153~173頁。

10

20

【0228】

(細胞調製物)

正常な健全なボランティアからのパフィコートを、the Institute for Transfusionmedicine, Hospital Merheim, Cologne, Germanyから得た。PBMCを、標準的Ficoll-Paque (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 密度勾配遠心分離によりパフィコートから調製した。

30

【0229】

末梢血白血球を、等張性塩化アンモニウム緩衝液 (155 mmol/L NH₄Cl、10 mmol/L KHCO₃ および0.1 mM EDTA) 中での赤血球の溶解によって、パフィコートから調製した。Hanselら (1991) J. Immunol. Met. 145: 105~110。CD4⁺lin⁻血液DCを、本明細書の他の場所に詳細に記載されるような2工程免疫磁気細胞ソーティング (MACS) により、PBMCから単離した。Robertら (1999); およびMiltenyiら (1999) High gradient magnetic cell sorting, Flow cytometry and cell sorting, Radbruch編、Springer-Verlag, Berlin, 218~247頁。簡単には、単球、T細胞およびNK細胞を、CD3 (クローンBW264/56)、CD11b (クローンM1/70.15.11.5)、CD16 (クローンVEP-13) に対するmAbを使用し、いくつかの実験においては、B細胞および単球上で発現する不十分にしか規定されていない抗原 (クローンL179) に対するmAbを使用して、除去した。除去した細胞画分から、その後、血液DCを、CD4 (M-T321) に対する抗体を使用して、高純度に濃縮した。ハイブリドーマ培養上清 (上記を参照のこと) をスクリーニングするために、血液DCを、CD3およびL179抗原発現に基づくT細胞、B細胞および単球の免疫磁気除去によって、部分的にのみ濃縮した。

40

【0230】

50

CD1c 発現細胞、BDCA-2 発現細胞、およびBDCA-3 発現細胞を、一次試薬としてPE 結合体化mAbもしくはFITC 結合体化mAb(それぞれ、AD5-8E7、AC144およびAD6-5E8)を用い、そして二次試薬として抗PEmAb 結合体化マイクロビーズもしくは抗FITCmAb 結合体化マイクロビーズ(Miltenyi Biotec GmbH)を用いる間接的磁気標識、ならびにMACSによる標識細胞の濃縮によって、PBMCまたは扁桃から単離した。いくつかの実験において、BDCA-3+細胞を、抗BDCA-3 mAb(AD5-5E8) 結合体化マイクロビーズを用いる直接的磁気標識に基づいて単離した。CD1c+B細胞を含まない高度に純粋なCD1c+血液DC細胞を、CD19 mAb 結合体化マイクロビーズ(Miltenyi Biotec GmbH)を使用するCD18+B細胞の免疫磁気除去、続いてのCD1c+細胞の免疫磁気濃縮によって得た。好塩基細胞を、磁気標識キット(Miltenyi Biotec)を用いる、CD3 発現細胞、CD7 発現細胞、CD14 発現細胞、CD15 発現細胞、CD36 発現細胞、CD45RA 発現細胞、およびHLA-DR 発現細胞の間接的磁気標識に基づく、非好塩基細胞の免疫磁気除去によって、PBMCから精製した。CD14+単球、CD34+造血前駆細胞およびCD3+T細胞を、それぞれCD14 mAb 結合体化マイクロビーズ、CD34 mAb 結合体化マイクロビーズおよびCD3 mAb 結合体化マイクロビーズ(Miltenyi Biotec GmbH)を用いる直接磁気標識に基づいて、免疫磁気精製した。

【0231】

(細胞培養)

「未成熟」単球由来DC(Mo-DC)の生成のために、精製CD14+単球を、培地[2mmol/L L-グルタミン、10% FCS(Sigma)、100mmol/Lピルビン酸ナトリウム(Gibco/BRL)、100 U/mlペニシリン(Gibco/BRL)および100μg/mlストレプトマイシン(Gibco/BRL)を補充した、RPMI 1640(Gibco/BRL)]中で $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlの細胞密度で、500~1000U/ml rIL-4(PeproTech, Rocky Hill, NJ)および100ng/ml rGM-CSF(PeproTech)の存在下で、加湿5%CO₂含有雰囲気下で37℃で7日間培養した。「成熟」Mo-DCの生成のために、「未成熟」Mo-DCを1回洗浄し、そして20ng/ml TNF-α(PeproTech)の存在下でさらに3日間培地中で培養した。CD34+造血前駆細胞由来DC(CD34-DC)の生成のために、精製CD34+細胞を、100ng/ml rFlt3-Ligand(PeproTech)、0.5ng/ml rTGF-β1(PeproTech)、10ng/ml rTNF-α、20ng/ml rSCF(PeproTech)および100ng/ml rGM-CSFの存在下で、培地中で11日間、細胞密度 5×10^4 細胞/mlで培養した。新鮮に単離したCD4+lin⁻血液DCを、10ng/ml rIL-3(PeproTech)の存在下で48時間まで、培地中で細胞密度 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlで培養した。単離したCD1c 発現DC、BDCA-2 発現DC、およびBDCA-3 発現DCを、いかなるサイトカインも含まないか、または10ng/ml rIL-3、20ng/ml IL-4(PeproTech)および100ng/ml GM-CSFの存在下で、培地中で48時間まで、細胞密度 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlで培養した。

【0232】

(実施例2)

(血液DCのフローサイトメトリー分析)

FACScalibur(BD Biosciences)を、1色フローサイトメトリー、2色フローサイトメトリー、3色フローサイトメトリーまたは4色フローサイトメトリーのために使用した。 $5 \times 10^3 \sim 2 \times 10^5$ 細胞/サンプルのデータを、リスト様式で得、そしてCellQuestソフトウェア(BD Biosciences)を使用して分析した。

【0233】

以下のmAb(クローン名)を、フローサイトメトリーについてのこの研究において使用した: Pharmingen, San Diego, CAからのCD1a(HI149)、CD10(HI10a)、CD11a(G43-25B)、CD11c(B-ly6)、CD25(M-A261)、CD27(M-T271)、CD32(FL18.26)、CD38(HIT2)、CD40(5C3)、CD43(IG10)、CD54(HA58)、CD62L(Dreg56)、CD64(10.1)、CD69(FN50)、CD98(UM7F8)、抗HLA-DQ(TU169)、および抗TCR T10B9.1A-31; BD BiosciencesからのCD2(S5.2)、CD8(SK1)、CD13(L138)、CD14(MFP9)、CD19(SJ25-CL)、CD33(P67.6)、CD34(8G12)、CD45RO(UCHL-1)、CD56(NCAM16.2)、CD71(L01.1)、CD123(9F5)、抗IgD(TA4.1)、抗マウスIgG1(X56)、抗マウスIgG2(X57)、および抗マウスIgM(X54); CLB, Amsterdam, NetherlandsからのCD5(CLB-T11/11、6G4)、CD7(CLB-T-3A1/1、7F3)、CD16(CLB-FcR gran/1、5D2)、CD45RA(F8-11-13)、CD80(CLB-DALI); CD18(7E4)、CD23(9P25); Coulter Immunotech, Marseilles, FranceからのCD58(AICD58)、CD77(38.13)、CD83(HB15A)、CD86(HA5.2B7)、CD116(SC06); Miltenyi Biotec GmbHからのCD4(M-T321)、CD11b(M1/70.15.11.5)、CD14(TUK4)、CD15(VIMC6)、抗HLA-DR(910/D7)、抗AC133(AC133/1)、および抗TCR(BW242/412); Amcell, Sunnyvale, CAからのCD36(AC106)、CD123(AC145)、抗HLA-DR(AC122およびAC123)および抗GPA(AC107); An cell, Bayport, MNからのCD1c(M241); Southern Biotechnology Associates, Birmingham, Alabamaからのポリクローナル抗IgG、抗IgM(SA-DA4)、ポリクローナル抗、およびポリクローナル抗; W. Knapp, Institute of Immunology, University of Vienna, Vienna, AustriaからのCD61(VIPL2); J. Moll, Forschungszentrum Karlsruhe, Karlsruhe, GermanyからのCD44(IM7); Caltag Laboratories, Burlingame, CAからのCD20(H147); E. Butcher, Department of Pathology, Stanford University, Stanford, CAからの抗CLA(HECA-452); J. P. Kinet, Molecular Allergy and Immunology Section, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, Marylandからの抗FcRI(15-1); M. R. Parwaresch, Department of Pathology, Christian Albrechts University, Kiel, GermanyからのCD11c(Ki-M1); D. N. Hart, Mater Medical Research Institute, Mater Misericordiae Hospitals, South Brisbane, Queensland, AustraliaからのCMRF-44およびCMRF-56; ならびにSigmaからの抗HLA-A、抗HLA-B、抗HLA-C(W6/32)。

【0234】

全ての抗体を、FITC、PE、ビオチンまたはCy5と結合体化したmAbとして使用した。ビオチン化mAbでの間接的な免疫蛍光染色のために、ストレプトアビジン-APC(BD Biosciences)を使用した。フローサイトメトリー分析において死

10

20

30

40

50

細胞を排除するために、細胞をプロピジウムヨードで染色した。Fcレセプター媒介mAb結合を最小にするために、細胞を、大部分の実験において、ヒトIgGを含むFcR遮断薬(Miltenyi Biotec GmbH)の存在下で染色した。

【0235】

(顕微鏡分析)

細胞を、細胞遠心機(Cytospin 3, Shandon, Pittsburgh, PA)において、スライド上にスピンドウンさせた。蛍光顕微鏡検査のために、細胞遠心分離の後に、スライドを一晩風乾し、そしてFluoromount G(Southern Biotechnology Associates)で封入した。メイ-グリュンヴァルト/ギームザ染色のために、スライドを、細胞遠心分離の後に少なくとも2時間 10
に間にわたって風乾し、メイ-グリュンヴァルト/ギームザ溶液(Merck, Darmstadt, Germany)中で2分間、室温で染色し、蒸留水中で徹底的にリンスし、ギームザ溶液(Merck)中で15分間、室温で染色し、蒸留水中で繰り返し洗浄し、そして少なくとも2時間風乾した。Zeiss Axioscop(顕微鏡)(Zeiss, Oberkochen, Germany)を、分析のために使用した。デジタル写真を、Xillix Microlmager M11400-12X(Xillix, Vancouver, Canada)を使用して作成した。

【0236】

(実施例3)

(交差阻害、同時キャッピングおよび同時インターナリゼーションの分析) 20

2つの異なるmAbクローンが同じ(かまたは密接に関連する)抗原エピトープを認識するか否かを分析するために、交差阻害結合アッセイを実施した。 1×10^6 と 2×10^6 との間の細胞を、これら2つのmAbクローンのうちの一方とともに、約 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で10分間、4 で予備インキュベートし、次いで、他方のmAbクローンのPE結合体で、その最適な力価でさらに5分間、4 で染色した。PBMCを使用して、BDCA-2、BDCA-3、およびBDCA-4に特異的なmAbクローンの交差阻害を分析し、そしてMOLT-4細胞を使用して、CD1c特異的なmAbクローンの交差阻害を分析した。細胞染色を、フローサイトメトリーによって分析した。

【0237】

AD5-5E8およびAD5-14H12が同じ抗原(または同じ抗原複合体)を認識するか否かを確認するために、同時キャッピングアッセイを実施した。簡単に言えば、BDCA-3発現細胞を、PE結合体化AD5-14HI2 mAbおよび抗PE mAb結合体化マイクロビーズを用いて間接的に磁気により標識することによって、PBMCから単離し、そして単離した細胞を、30分間37 でインキュベートして、mAb-抗原複合体のキャッピングを誘導した。その後、細胞を、0.1%アジ化ナトリウムを補充した氷冷PBS/EDTA/BSA(PBS/EDTA/BSA/アジド)で洗浄し、そしてPBS/EDTA/BSA/アジド中のFITC結合体化AD5-5E8 mAbで10分間4 で染色した。細胞染色を、蛍光顕微鏡検査によって分析した。 30

【0238】

同時インターナリゼーションアッセイを使用して、AC144およびAD5-17F6が同じ抗原(または同じ抗原複合体)を認識するか否かを調査した。簡単に言えば、 1×10^6 のPBMCを、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ のAC144 mAbとともに、15分間室温で、PBS/BSA中でインキュベートし、PBS/BSA中で2回洗浄し、次いで細胞培養培地中で、37 で30分間インキュベートした。AC144 mAbが培養の際にインターナリゼーションされるか否かを分析するために、細胞のアリコート、培養期間の前後に、ラット抗マウスIgG1-PEで染色した。全てのAC144 mAb結合部位が非結合体化AC144 mAbで培養前に飽和されたか否か、およびいずれかの遊離の結合部位が培養後に再出現したか否かを決定するために、細胞のアリコート、培養期間の前後に、AC144-PEで染色した。AD5-17F6抗原が同時インターナリゼーションされたか否かを分析するために、アリコートを、培養期間の前後に、AD5-17F6 40

- P Eで染色した。全ての細胞を、フローサイトメトリー分析においてC D 1 2 3^{bright} H L A - D R⁺プラスマ細胞様 (p l a s m a c y t o i d) D Cをゲートオンし得るように、C D 1 2 3 - F I T CおよびH L A - D R - C y 5で対比染色した。

【 0 2 3 9 】

(実施例 4)

(エンドサイトーシスアッセイ)

血液D Cサブセットのエンドサイトーシスを評価するために、精製したC D 1 c⁺、B D C A - 2⁺およびB D C A - 3⁺血液D C、ならびに(コントロールとして)精製したC D 3⁺T細胞を、37 °Cで、1 m g / m l L u c i f e r イエロー(L Y)を含む培地中で、0 分間、1 5 分間、4 5 分間、および7 5 分間インキュベートした。その後、細胞を氷冷P B S / E D T A / B S A中で3回洗浄し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。

10

【 0 2 4 0 】

(実施例 5)

(単離された血液D Cの非培養血液細胞との反応性)

表 1 に列挙するm A bの血液細胞との反応性によって、これらを以下の4つの群に分割し得る：(1) A C 1 4 4、A D 5 - 1 3 A 1 1およびA D B - 4 B 8；(2) A D 5 - 1 7 F 6；(3) A D 5 - 5 E 8およびA D 5 - 1 4 H 1 2；ならびに(4) A D 5 - 8 E 7。

【 0 2 4 1 】

20

第1群のm A b (A C 1 4 4、A D 5 - 1 3 A 1 1およびA D B - 4 B 8) は、全てのP B M Cの約0 . 4 1 ± 0 . 1 7 % (n = 1 0) を染色する(図 1 A)。前方向散乱シグナルと側方向散乱シグナルとのドットプロットにおいて、これらの希少な細胞は、小さな休止リンパ球と単球との間に位置する均一な細胞集団を構成する(図 1 B)。従って、これらの希少な細胞は、T細胞レセプター(T C R)、C D 1 4、C D 1 9およびC D 5 6 (それぞれT細胞、単球、B細胞およびNK細胞において発現される系列マーカー)を発現しない(図 1 A)。高度に精製された血液D C (9 5 %より多いH L A - D R⁺、T C R⁺、C D 1 4⁺、C D 1 9⁺およびC D 5 6⁺) の染色は、第1群のm A bが、C D 1 1 c⁺ C D 1 2 3^{bright}血液D Cと反応性である(図 2) がC D 1 1 c⁺血液D Cとは反応性ではないことを明らかにする。これらの全てが単一の抗原と反応するか否かを分析するために、本発明者らは、二色染色および交差阻害研究を実施した。その結果は、この群の全てのm A bが、同じ抗原の単一のエピトープを認識することを示す。この抗原を、B D C A - 2と命名した。

30

【 0 2 4 2 】

図 3 に示すように、第2群のm A b (A D 5 - 1 7 F 6) は、A C 1 4 4 (第1群のB D C A - 2 特異的m A bの1つ) と同じP B M Cの間で細胞を認識する。それにもかかわらず、A D 5 - 1 7 F 6は、B D C A - 2とは異なる抗原を染色する。このことは、A D 5 - 1 7 F 6がB D C A - 2の抗B D C A - 2 m A b媒介インターナリゼーションの前後で等強度の表面染色を示した同時インターナリゼーション実験によって、ならびにA C 1 4 4 m A bおよびA D 5 - 1 7 F 6 m A bが全体的に異なる染色パターンを示した培養後のD Cの染色によって、明らかに実証された(図 4)。A D 5 - 1 7 F 6によって認識される抗原を、B D C A - 4と命名した。これは、ニューロピリン - 1 (n e u r o p i l i n - 1) と同一である。Heら(1 9 9 7)。

40

【 0 2 4 3 】

第3群のm A b (A D 5 - 5 E 8およびA D 5 - 1 4 H 1 2) は、全てのP B M Cの約0 . 0 4 ± 0 . 0 1 % (n = 1 0) を染色する(図 1 A)。散乱シグナル(図 1 B)ならびにT C R⁺、C D 1 4、C D 1 9およびC D 5 6に対するm A bでの対比染色(図 1 A)によれば、これらの細胞は、リンパ球および単球とは異なり、そして第1群の抗体によって認識される細胞よりわずかに大きい。従って、血液D Cの染色は、異なるサブセットが、A D 5 - 5 E 8およびA D 5 - 1 4 H 1 2によって認識されること(すなわち、C D

50

1 1 c^{dim}CD 1 2 3⁻血液DC)を示す(図2)。二色染色、交差ブロッキング研究および同時キャッピング実験によれば、両方のmAbが、同じ抗原の、空間的に関連していない2つのエピトープを認識するようである。本発明者らは、この抗原をBDCA-3と命名した。

【0244】

第4の群(mAb AD5-8E7)は、 $2.39 \pm 0.96\%$ ($n=10$)までの分画されていないPBMCと反応する(図1A)。系列マーカーTCR α 、CD14、およびCD19の光散乱分析(図1B)および対比染色は、mAbが、T細胞および単球とは反応性ではなく、小さな休止CD19⁺B細胞の主要なサブセットと反応性であることを明らかにする。精製したDCの染色は、AD5-8E7が、B細胞に加えて、第1群および第2群のmAbによって認識されるサブセットとは異なる、血液DCの第3のサブセット(すなわち、CD11c^{bright}CD123^{dim}血液DC)を染色することを示す。かなりの割合のCD11c^{bright}CD123^{dim}血液DCが、CD56を発現する(以下を参照のこと)。この理由により、いくらかのAD5-8E7反応性PBMCは、CD56(図1A)を染色する。AD5-8E7は、精製したNK細胞に対して反応性ではない。AD5-8E7によって認識される抗原を、最初は、BDCA-1と命名した。なぜならこれは、新たな抗原であるようであったからである。しかし、AD5-8E7はCD11c⁺mAb M241のMOLT-4細胞に対する結合を完全にブロックすることが、後に明らかとなった(図6)。従って、AD5-8E7によって認識される抗原は、CD11cである。

【0245】

表1に列挙されるmAbのいずれも、顆粒球、血小板、赤血球、精製した好塩基性細胞および精製したCD34⁺造血前駆細胞と反応性ではない。

【0246】

(実施例6)

(培養された血液DC、Mo-DCおよびCD34-DCにおける、BDCA-2、BDCA-3およびBDCA-4の発現)

新たに単離されたプラズマ細胞様CD11c⁻血液DCは、生存および変異に関してIL-3に依存するが、一方でCD11c⁺血液DCの生存および変異は、サイトカイン依存性がはるかに低い。CD11c⁻およびCD11c⁺血液DCにおける、BDCA-2、BDCA-3およびBDCA-4の発現を、rIL-3の存在下での全血液DCの培養の0時間、1時間、3時間、6時間、9時間、12時間、18時間、24時間、36時間、および48時間後に、分析した。この結果を図4に示す。BDCA-2の発現は、CD11c⁻血液DCにおいて、48時間以内に完全にダウンレギュレーションされる。対照的に、BDCA-4は、CD11c⁻血液DCにおいてなおさらにアップレギュレートされ、そしてBDCA-2とは異なり、これはまた、全てでなければ大部分のCD11c⁺DCにおいて、高レベルに発現される。BDCA-3の発現は、CD11c⁻血液DCにおいて迅速に誘導され、24時間後に最も高い発現レベルに達する。その後、BDCA-3発現は、再度ダウンレギュレートされるようである。CD11c⁺血液DCにおけるBDCA-3の発現の分析は、BDCA-3⁻CD11c^{bright}およびBDCA-3⁺CD11c^{dim}サブセットが培養の開始時に存在するという事実によって、複雑になる。BDCA-3の発現は、BDCA-3⁺CD11c^{dim}血液DC集団における培養の少なくとも6時間まで変化しないままであり、そしてBDCA-3⁻CD11c^{bright}血液DCサブセットの少なくともいくらかの細胞において、3時間以内に誘導される。

【0247】

(Mo-DCおよびCD34⁻DCにおける、BDCA-2、BDCA-3およびBDCA-4の発現)

機能的CD11a⁺DCを、エキソピボで、単球およびCD34⁺造血前駆細胞から生成した。Benderら(1996); Picklら(1996); Romaniら(1994); Sallustoら(1994); Cauxら(1992); Mackensenら

10

20

30

40

50

(1995); Szabolcsら(1995); Herbstら(1996); de Wynterら(1998); およびStrunkら(1996)。図7は、Mo-DC (これらは、rGM-CSFの存在下で単球を7日間培養することによって生成した) ならびにIL-4およびCD34-DC (rFlt3リガンド、rTGF- β 1、rTNF- α 、rSCFおよびrGM-CSFの存在下でCD34⁺造血前駆細胞を11日間培養することによって生成した) が、CD1a、CD1cおよびBDCA-4を発現するが、BDCA-2もBDCA-3もいずれも発現しないことを示す。

【0248】

(実施例7)

(抗BDCA-2 mAb媒介架橋の際のBDCA-2のインターナリゼーション) 10
 抗DC A-2 mAb標識BDCA-2⁺細胞の37[°]でのインキュベーションがmAb
 インターナリゼーションを生じる可能性を、FITC結合体化AC144 mAb (IgG1)
 でのPBMCの染色によって、検討した。次いで、37[°]でのインキュベーション
 に続いて、残っている細胞表面関連mAbを、PE結合体化ラット抗マウスIgG1 mAb
 での染色によって検出した。図8に示すように、細胞を37[°]でインキュベートした
 場合に、ラット抗マウスIgG1-PE染色の強度は、バックグラウンドレベルまで非常
 に迅速に低下する。対照的に、AC144-FITC染色の強度は、約50%のレベルま
 で一時的にのみ低下するが、その後、ほぼインキュベーション前のレベルまで戻
 る。このことは、BDCA-2が、レセプター媒介エンドサイトーシスと類似の速度論で、抗BD
 CA-2 mAb架橋の際にインターナリゼーションされることを実証する。AC144 20
 -FITC染色強度の一時的な低下は、恐らく、エンドサイトーシス前のBDCA-2/
 抗BDCA-2 mAb複合体のパッチングおよびキャッピングに起因する。

【0249】

(実施例8)

(単離されたCD1c⁺、BDCA-2⁺およびBDCA-3⁺血液DCの形態)
 CD1c⁺、BDCA-2⁺およびBDCA-3⁺細胞を、PE結合体化一次mAbおよび
 抗PE mAb結合体化マイクロビーズで間接的に磁気によって標識すること、ならびに標
 識した細胞をMACSによって濃縮することによって、PBMCから単離した(図9)。
 細胞遠心分離スライドのメイ-グリュンヴァルト/ギームザ染色(図9)の際に、新たに
 単離されたBDCA-2発現細胞は、血液および扁桃由来のCD11c⁻CD4⁺Lin⁻ 30
 DCの代表的なリンパプラスマ細胞様形態を示す：すなわち、楕円形または湾入した核を
 有する、中程度の大きさの円形細胞。対照的に、新たに単離されたCD1c⁺血液DCと
 新たに単離されたBDCA-3⁺血液DCとの両方が、血液または扁桃由来のCD11c⁺
 CD4⁺Lin⁻DCの代表的な形態学的特性を示す：すなわち、短い細胞プロセスおよび
 さらに過度に小裂片に分かれた核を有する、あまり円形ではない細胞。CD1c⁺BDCA
 に加えて、小さな休止リンパ球の代表的な形態を有するCD1c⁺B細胞は、単離された
 CD1c⁺PBMCの細胞遠心分離スライドにおいて、見られ得る。高度に純粋なCD1
 c⁺BDCAは、CD1c⁺細胞の濃縮の前に、CD19⁺B細胞が磁氣的にPBMCから除
 去された場合に、得られる。

【0250】

(実施例9)

(CD1c⁺、BDCA-2⁺およびBDCA-3⁺血液DCの表面表現型)
 BDCA-2⁺およびBDCA-3⁺血液DCの表現型を、PE結合体化mAbおよびFITC
 結合体化mAbを用いる二色免疫蛍光によって分析した。CD1c⁺血液DCの分析
 のために、B細胞の排除のために、CD19-Cy5を使用して、三色染色を実施した。
 表現型分析の結果を表2に示し、そして以下のように要約し得る：血液DCサブセットの
 いずれも、CD1a、CD8、CD15、CD16、CD19、CD20、CD23、CD
 25、CD27、CD34、CD61、CD69、CD7.1、CD77、CD80、
 CD83、グリコホリンA(GPA)、TCR α 、AC133、IgD、IgMおよび
 CMRF-56抗原を発現しない。全ての血液DCサブセットが、CD43、CD44、 50

CD54およびMHCクラスII分子を、類似のレベルで発現する。BDCA-2⁺血液DCは、これらがCD45RAおよび少量のCD10を除いて、CD13、CD40、CD45RO、CD56を発現しない点、ならびにこれらが、より高レベルのCD4を除いて、より低レベルのCD18、CD38、CD58、CD98、CD116およびCLAを発現する点で、他の2つのサブセットとは異なる。CD1c⁺血液DCは、これらが、より低レベルのCD62Lを除いて、CD2、より高レベルのMHCクラスII分子を発現する点、ならびにこれらが、FcレセプターCD32、CD64およびFcγR1を発現する点で、他の2つのサブセットとは異なる。恐らく、Fcレセプター発現に起因して、CD1c⁺血液DCはまた、IgG、およびI_gMに対してポジティブである。さらに、いくつかのCD1c⁺DCは、CD14およびCD11bに対してポジティブであり、これによって、発現レベルは、CD1c発現とCD2発現との両方のレベルに逆に相関する。BDCA-3⁺血液DCは、これらがCD36をずっと低いレベルで発現する点、およびこれらが低レベルのCD5を発現するようである点で、他の2つのサブセットとは異なる。最後に、CD11cおよびCD123を除いて、少なくとも1つのさらなる抗原(CD33)は、3つ全てのサブセットの識別に有用である：CD33は、BDCA-2⁺DCにおいて低レベルで、BDCA-3⁺DCにおいて中程度のレベルで、そしてCD1c⁺DCにおいて高レベルで、発現される。

【0251】

【表2】

表2

抗原	クローン	BDCA-2 ⁺	BDCA-3 ⁺	CD1c ⁺
CD1a	H1149	-	-	-
CD1c	M241	-	-	+
CD2	S5.2	-/マイナーサブセット+	-	+
CD4	M-T321	++	+	+
CD5	CLB-T1/1.6G4	-	-/+	-
CD7	CLB-T3A1, 7F3	-/マイナーサブセット+	-	+
CD8	SK1	-	-	-
CD10	H110a	-/+	-	-
CD11a	G43-25B	+	++	+
CD11b	M1/70.15.11.5	-	-	-/+
CD11c	Ki-M1	-	+	++
CD13	L138	-	+	+
CD14	TUK4	-	-	-/+
CD15	VIMC6	-	-	-
CD16	CLB-FcR Gran/1	-	-	-
CD18	7E4	+	++	++
CD19	SJ25-C1	-	-	-
CD20	H147	-	-	-
CD23	9P25	-	-	-
CD25	M-A251	-	-	-
CD27	M-T271	-	-	-
CD32	FL18.26 (2003)	-	-	+
CD33	P67.6	-/+	+	++
CD34	8G12	-	-	-

10

20

30

40

抗原	クローン	BDCA-2 ⁺	BDCA-3 ⁺	CD1c ⁺
CD36	AC106	+	-/+	+
CD38	HIT2	+	++	++
CD40	FC3	-	-/+	-/+
CD43	1G10	+	+	+
CD44	IM7	+	+	+
CD45RA	F8-11-13	+	-	-
CD45RO	UCHL-1	-	+	+
CD54	HA58	+	+	+
CD56	NCAM16. 2	-	-/サブセット+	-/サブセット+
CD58	A1CD58	+	++	++
CD61	VIPL2	-	-	-
CD62L	DREG56	-	+	+
CD64	10. 1	++	++	+
CD69	FN50	-	-	-
CD71	L01. 1	-	-	-
CD77	38. 13	-	-	-
CD80	DAL-1	-	-	-
CD83	HB15A	-	-	-
CD86	HA5. 2B7	+	++	+++
CD98	HIM6	++	+++	+++
CD116	SC06	+	++	++
CD123	AC145	++	-	+
HLA-DR	AC122	+	+	++
HLA-DQ	TU169	+	+	++

10

20

抗原	クローン	BDCA-2 ⁺	BDCA-3 ⁺	CD1c ⁺
HLA-A, B, C	W6/32	+	+	+
GPA	AC107	-	-	-
TCR $\alpha\beta$	T10B9. 1A-31	-	-	-
AC133	AC133	-	-	-
Fc ϵ RI	15-1	-	-	+
IgD	TA4. 1	-	-	-
IgG	ホ ^o リクロナル	-	-	+
IgM	SA-DA4	-	-	-
κ	ホ ^o リクロナル	-	-	+
λ	ホ ^o リクロナル	-	-	+
CLA	HECA-452	++	+++	+++
CMRF44	CMRF44	-	-	-/マイナーサブセット+
CMRF56	CMRF56	-	-	-

30

【 0 2 5 2 】

(実施例 1 0)

(培養後の CD 1 c⁺、BDCA - 2⁺および BDCA - 3⁺血液 DC における、MHC クラス II、CD 8 3、および同時刺激分子の発現)

新たに単離された CD 1 c⁺血液 DC および BDCA - 3⁺血液 DC を、いかなるサイトカインをも補充しない培地中で 1 日間培養し、そして新たに単離された BDCA - 2⁺血液 DC を、IL - 3 および CD 4 0 mAb を補充した培地中で、CD 3 2 トランスフェクトした線維芽細胞上で 2 日間培養した。この培養期間の後に、細胞を、CD 1 a、CD 8 0、CD 8 3、CD 8 6 および HLA - DR の発現に関して分析した。比較のために、いわゆる「未熟」Mo - DC (単球を 7 日間、GM - CSF および IL - 4 の存在下で培養することによって生成した) およびいわゆる「成熟」Mo - DC (「未熟」Mo - DC の

40

50

、3日間のTNF- α の存在下での培養によって生成した)もまた、含めた。Salustoら(1995) J. Exp. Med. 182: 389-400; ならびにSalustoら(1998) J. Immunol. 28: 2760-2769。図10に示すように、「未熟」Mo-DCおよび「成熟」Mo-DCとは対照的に、血液DCサブセットのいずれも、この培養期間の後に、CD1aを発現しない。しかし、同時刺激分子であるCD80およびCD86、DC活性化抗原CD83(Zhouら(1995); Zhouら(1992) J. Immunol. 149: 735-742; およびZhouら(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2588-2592)、ならびにHLA-DR分子は、培養の際に、3つ全ての血液DCサブセットにおいて、成熟Mo-DCと比較して類似のレベルまで、アップレギュレートされる。これらの結果は、3つ全ての血液DCサブセットをIL-3、IL-4およびGM-CSFで補充した培地中で2日間培養した別の実験と有意には異ならなかった。血液および扁桃由来のCD11c⁺CD4⁺Lin⁻DCに関して以前に示されたように、BDCA-2⁺血液DCは、IL-3を含まない培地中で培養される場合に、急速に死滅する。

【0253】

(実施例11)

(新たに単離されたCD1c⁺、BDCA-2⁺およびBDCA-3⁺血液DCのエンドサイトーシス能力)

精製したCD1c⁺、BDCA-2⁺およびBDCA-3⁺血液DC、ならびにコントロールとして、精製したCD3⁺T細胞のエンドサイトーシス能力を、これらの細胞を37°Cで、LYの存在下で培養し、そして種々の時間の後のLYの取込みをフローサイトメトリーによって分析することによって、試験した。図11に示すように、精製したCD3⁺T細胞とは異なり、精製したCD1c⁺血液DC、BDCA-3⁺血液DC、およびいくらかの程度まではBDCA-2⁺血液DCもまた、LYをエンドサイトーシスする能力を有する。類似の結果が、FITC-デキストランを使用して得られた。全ての血液DC集団のエンドサイトーシス能力は、Mo-DCと比較した場合に、ずっと低い。

【0254】

BDCA-4のアミノ酸配列を、この抗原をAD5-17F6 mAb(AD5-17F6アフィニティーカラム)で精製し、そしてこの精製した抗原をMALDI TOF質量分析によって分析することによって、得た。BDCA-4は、ニューロピリン-1と同一である。Heら(1997)。

【0255】

(実施例12)

(BDCA-2の抗BDCA-2モノクローナル抗体(AC144)との連結は、細胞内Ca²⁺移動を誘導するが、BDCA-4(ニューロピリン-1)の抗BDCA-4との連結は、Ca²⁺移動を誘導しない。)

(材料および方法):

BDCA-2⁺BDCA-4⁺BDCA-2⁺血液DCおよびBDCA-2⁺血液DCでトランスフェクトしたかまたはトランスフェクトしていないU937細胞における、細胞質ゾルカルシウムの測定。BDCA-2⁺BDCA-4⁺血液DCおよびBDCA-2⁺血液DCでトランスフェクトしたかまたはトランスフェクトしていないU937細胞を、Indo-1 AM(Sigma, St. Louis, MO)とともに、Valituttiら(1993) Eur. J. Immunol. 23: 790-795によって記載されるように、装填した。抗BDCA-2(AC144、IgG1)または抗BDCA-4(AD5-17F6、IgG1)mAbを、それぞれ新たに単離されたBDCA-2⁺BDCA-4⁺BDCA-2⁺血液DCおよびBDCA-2⁺血液DCでトランスフェクトされたかまたはトランスフェクトされていないU937細胞に添加し、続いて架橋剤としてラット抗マウスIgG1 mAb(X56)を添加したか、または添加しなかった。細胞を、フローサイトメーターで分析して、Ca²⁺フラックスを検出した。生存細胞(散乱基準に基づく)およびIndo-1で標識した細胞(405nm対525nmの発光スペクトルに基づく)のみを、この分析に含んだ。

10

20

30

40

50

【0256】

図13は、細胞内移動が、抗BDCA-2 mAb単独(A)ならびにまたは抗BDCA-2および架橋している二次mAb(B、D、E)を介して、免疫磁氣的に精製したBDCA-2⁺BDCA-4⁺BDCA(A、B)およびBDCA-2でトランスフェクトしたU937細胞(D)においては誘導されるが、トランスフェクトされていないU937細胞(E)においては誘導されないことを示す。

【0257】

免疫磁氣的に精製したBDCA-2⁺BDCA-4⁺BDCAにおけるBDCA-4の、抗BDCA-4 mAbおよび架橋二次mAbとの連結は、細胞質ゾルCa²⁺移動を誘導しない。時間(X軸、204, 80秒に対応する1024の値)に対するIndo-1蛍光(Y軸)の、Ca²⁺依存性の405nm/525nm比を示す。

10

【0258】

図13に示すように、プラズマ細胞様BDCA(図13AおよびB)およびBDCA-2でトランスフェクトされたU937細胞(図13D)の上の表面BDCA-2の、特定のmAb(AC144、IgG1)との連結、続いて二次架橋mAb(ラット抗マウスIgG1、X56)との連結あり(図13BおよびD)またはなし(図13A)は、細胞質ゾルカルシウム濃度の迅速かつ一時的な上昇を惹起した。対照的に、プラズマ細胞様DCの、抗BDCA-4 mAb(AD5-17F6)とのインキュベーション、続いて、二次架橋mAb(ラット抗マウスIgG1、X56)とのインキュベーション(図14C)、またはトランスフェクトされていないU937細胞の、抗BDCA-2 mAb(AC144、IgG1)とのインキュベーション、続いて、二次架橋mAb(ラット抗マウスIgG1、X56)とのインキュベーション(図13E)は、細胞質ゾルカルシウム濃度の迅速かつ一時的な上昇を誘導しなかった。

20

【0259】

(実施例13)

(ウイルス刺激(インフルエンザウイルス株PR8)に应答しての、精製したBDCA-2⁺BDCA-4⁺BDCAによるI型インターフェロンの生成は、抗BDCA-2 mAbでのBDCA-2の誘発によって阻害される)

CD4⁺CD123^{bright}CD11c⁻プラズマ細胞様DCは、エンベロープされたウイルス、細菌、および腫瘍細胞に应答して、主要なI型インターフェロンプロデューサーであることが示された。Fitzgerald-Bocarslyら(1993)Pharmacol. Ther. 60:39-62; Siegalら(1999)Science 284:1835-1837; Cellaら(1999)Nature Med. 5:919-923。この理由によって、これらはまた、天然I型インターフェロン産生細胞(NIPC)と呼ばれてきた。プラズマ細胞様DCは、BDCA-2およびBDCA-4を発現する。図14に示すように、プラズマ細胞様DCにおける表面BDCA-2の、特定のmAbとの連結、続いて二次架橋mAb(ラット抗マウスIgG1、X56)との連結は、インフルエンザウイルス株PR8(5HAU/ml)での刺激に应答して、血液または扁桃由来の、免疫磁氣的に精製したプラズマ細胞様BDCA-2⁺BDCA-4⁺DCによって、I型インターフェロンの分泌を阻害する。抗BDCA-2、インフルエンザウイルスおよび架橋mAbを含む培養物における、I型インターフェロン産生のレベル(図14、AC144+RamG1+FLU)は、インフルエンザウイルス単独(図14、FLU)またはアイソタイプコントロールmAb(抗サイトケラチンmAb CK3-11D5、IgG1)、インフルエンザウイルスおよび架橋mAb(図14、CK3+RamG1+FLU)を含む培養物よりずっと低い。

30

40

【0260】

対照的に、プラズマ細胞様DCにおける表面BDCA-4の、特定のmAbとの連結、続いて二次架橋mAb(ラット抗マウスIgG1、X56)との連結は、血液または扁桃由来の、免疫磁氣的に精製したプラズマ細胞様BDCA-2⁺BDCA-4⁺DCによって、インフルエンザウイルス株PR8(5HAU/ml)での刺激に应答して、I型インター

50

フェロンの分泌を阻害しない。抗BDCA-4、インフルエンザウイルスおよび架橋mAbを含む培養物における、I型インターフェロン産生のレベル(図14、17F6+RamG1+FLU)は、アイソタイプコントロールmAb(抗サイトケラチンmAb CK3-11D5、IgG1)、インフルエンザウイルスおよび架橋mAb(図14、CK3+RamG1+FLU)を含む培養物におけるレベルと同じである。

【0261】

(材料および方法) :

BDCA-2発現およびBDCA-4発現のプラズマ細胞様(plasmacytoid)DCを、PBMC(図14A)または扁桃細胞(図14B)から、抗BDCA-4(AD5-17F6)結合体化微小ビーズを用いた直接的な磁気標識およびMACSによる標識細胞の富化によって単離した。単離したBDCA-2発現およびBDCA-4発現のプラズマ細胞様DCを、24時間培地中で、a)IL-3単独(図14、コントロール); b)IL-3、抗BDCA-2 mAb(AC144、IgG1)およびラット抗マウスIgG1 mAb(図14、AC144+RamG1); c)IL-3、抗BDCA-2 mAb(AC144、IgG1)、ラット抗マウスIgG1 mAb、およびインフルエンザウイルス菌株PR8(図14、AC144+RamG1+FLU); d)IL-3およびインフルエンザウイルス菌株PR8(図14、FLU); e)IL-3、抗サイトケラチン mAb(CK3-11D5、IgG1)、ラット抗マウスIgG1 mAb、およびインフルエンザウイルス菌株PR8(図14、CK3+RamG1+FLU); およびf)IL-3、抗BDCA-4 mAb(AD5-17F6)、ラット抗マウスIgG1 mAb、およびインフルエンザウイルス菌株PR8(図14、17F6+RamG1+FLU)の存在下で培養した。

【0262】

培地上清中の分泌I型インターフェロンを、標準IFN- γ 曲線を参照して、Daudi細胞増殖の阻害を評価することによって測定した(Nedermanら(1990)Biologicals 18:29-34)。

【0263】

BDCA-2+BDCA-4+プラズマ細胞様DCによるI型インターフェロン産生の阻害に関して、増加したレベルの循環しているI型インターフェロンおよび増加したレベルのI型インターフェロン誘導因子(抗DNA抗体およびDNAの複合体のようなもの)は、SLE患者に見出され、疾患の活性と相関している。さらに、I型インターフェロンで処置された非自己免疫障害を有する患者は、頻りに自己抗体を発生し、そして時々SLEを発生する。Ronnbloomらからのいくつかの論文((1999)Clin. Exp. Immunol. 115:196-202; (1999)J. Immunol. 163:6306-6313; および(2000)J. Immunol. 165:3519-3526)は、患者由来のI型インターフェロン誘導因子が、健康なドナー由来のPBMCにおけるI型インターフェロンの分泌を誘導し、そしてこれらが、選択的に天然のI型インターフェロン産生細胞(NIPC=プラズマ細胞様DC)を活性化することを示した。

【0264】

本明細書中に示される、BDCA-2の連結がウイルス刺激によって誘導されるI型インターフェロンの産生を抑制するという知見は、BDCA-2に対する結合が、単にBDCA-2の連結によってだけではなく、NIPC(=BDCA-2+BDCA-4+プラズマ細胞様DC)を枯渇することによってもまた疾患を処置するために、適用され得ることを示す。従って、本発明は、NIPCのインビゴ、インビトロ、およびエキソビゴ枯渇をさらに含む。このような枯渇は、自己免疫疾患の処置または予防における使用に適切である。

【0265】

図14は、BDCA-4ではなくBDCA-2と特定のmAbとの連結、続く、2次架橋mAbとの連結が、インフルエンザウイルス菌株PR8を用いた刺激に应答した血液または扁桃由来のプラズマ細胞様BDCA-2+BDCA-4+DCによる、I型インターフェ

10

20

30

40

50

ロンの分泌を阻害することを示す。血液 (A) または扁桃 (B) 由来のプラズマ細胞様 BDC A - 2⁺BDC A - 4⁺DC を、IL - 3 単独 (コントロール); IL - 3、抗 BDC A - 2 mAb およびラット抗マウス Ig G 1 mAb (AC 144 + Ram G 1); IL - 3、抗 BDC A - 2 mAb、ラット抗マウス Ig G 1 mAb、およびインフルエンザウイルス菌株 PR 8 (AC 144 + Ram G 1 + FLU); IL - 3 およびインフルエンザウイルス菌株 PR 8 (FLU); IL - 3、抗サイトケラチン mAb、ラット抗マウス Ig G 1 mAb、およびインフルエンザウイルス菌株 PR 8 (CK 3 + Ram G 1 + FLU); IL - 3、抗 BDC A - 4 mAb、ラット抗マウス Ig G 1 mAb、およびインフルエンザウイルス菌株 PR 8 (17F6 + Ram G 1 + FLU) の存在下で 24 時間培養した。培養上清中の分泌された I 型インターフェロン (U/ml) を、標準 I 型インターフェロン曲線を参照してバイオアッセイによって測定した。

10

【0266】

(実施例 14)

(BDC A - 2 は、リガンドをエンドサイトーシスし得るだけでなく、リガンドを抗原プロセッシングおよびローディング区画に送達して、リガンドを CD⁴⁺クラス II 制限 T 細胞に対して提示し得る。)

(材料および方法)

BDC A - 2 発現および BDC A - 4 発現のプラズマ細胞様 DC を、PBMC から、抗 BDC A - 4 (AD5 - 17F6) 結合体化微小ビーズを用いた直接的な磁気標識および MACS による標識細胞の富化によって単離した。単離した BDC A - 2 発現および BDC A - 4 発現のプラズマ細胞様 DC を、96 ウェル平底マイクロプレート中 Ig G 1 mAbs (0.2 μg/ml) の存在下で、B13 T 細胞クローンの 4 × 10⁴ 細胞/ウェルと共に共培養した (Lanzavecchia (1988) J. Exp. Med. 167: 345 - 352)。アッセイに使用した mAb は以下であった: AC 144 (抗 BDC A - 2、Ig G 1)、ZM3.8 (抗 ILT3、Ig G 1) および CK3 - 11D5 (抗サイトケラチン、Ig G 1)。48 時間後、培養物を、(³H)チミジン (1 μCi/ウェル) を用いてパルスし、そして取り込まれた放射能を、さらに 16 時間後に測定した。(³H)チミジン取り込み (cpm) を、培養物中の単離 BDC A - 2 発現および BDC A - 4 発現プラズマ細胞様 DC の数に対してプロットした (図 15)。

20

【0267】

図 15 は、単離された BDC A - 2 発現および BDC A - 4 発現プラズマ細胞様 DC による、マウス Ig G 1 に特異的な T 細胞クローンに対する抗 BDC A - 2 mAb (AC 144、Ig G 1) の提示を示す。BDC A - 2⁺BDC A - 4⁺プラズマ細胞様 DC は、抗 ILT - 3 mAb (ZM3.8、Ig G 1、黒三角) および抗サイトケラチン mAb (CK3 - 11D5、Ig G 1、黒丸) よりもはるかに効果的に、T 細胞に対して抗 BDC A - 2 mAb (AC 144、Ig G 1、黒四角) を提示した。

30

【0268】

抗 BDC A - 2 mAb (AC 144、Ig G 1) 標識 BDC A - 2⁺BDC A - 4⁺プラズマ細胞様 DC の 37 °C でのインキュベーションは、細胞表面上で抗 BDC A - 2 mAb / BDC A - 2 複合体の極めて急速なインターナリゼーションを生じた (図 8 を参照のこと)。ここで、抗 BDC A - 2 mAb (AC 144、Ig G 1) は抗原プロセッシングおよびローディング区画にアクセスし、そして抗体由来のペプチドは、マウス Ig G 1 ペプチドエピトープに特異的な CD⁴⁺クラス II 制限 T 細胞クローン (B13) に効果的に提示されることを示す。抗 BDC A - 2 mAb の提示を、Ig G 1 mAb リガンドをプロセッシングおよびペプチドローディング区画に標的化し得ることが公知のレセプター (ILT3) に結合する Ig G 1 mAb の提示、および、BDC A - 2⁺BDC A - 4⁺プラズマ細胞様 DC 上の細胞表面分子に結合しないが、流体相を占め得る Ig G 1 mAb (抗サイトケラチン mAb CK3 - 11D5、Ig G 1) の提示に対して比較した。図 15 に示されるように、BDC A - 2⁺BDC A - 4⁺プラズマ細胞様 DC は、抗 ILT - 3 mAb および抗サイトケラチン mAb よりもはるかに効果的に、T 細胞に対して抗

40

50

B D C A - 2 m A b (A C 1 4 4) を提示した。

【 0 2 6 9 】

(実施例 1 5)

(扁桃細胞において、 B D C A - 2 の発現は、 C D 1 2 3 + T 細胞 - ゾーン関連プラズマ細胞様 D C に対して制限され、一方 B D C A - 4 はまた、数個の他の細胞に対して低いレベルで発現され得る)

図 1 6 は、扁桃プラズマ細胞様 C D 1 2 3 + D C に対する B D C A - 2 および B D C A - 4 の発現を示す。それぞれ、 B D C A - 2 に対する F I T C 結合体化 m A b (A C 1 4 4) ならびに C D 1 2 3 および B D C A - 4 に対する P E 結合体化 m A b (A D 5 - 1 7 F 6) を用いた扁桃細胞の 2 色染色を示す。 B D C A - 2 の発現が C D 1 2 3 b r i g h t プラズマ細胞様 D C に対して制限され、一方、 B D C A - 4 がまた数個の他の細胞に対して低いレベルで発現されることに注意する。

10

【 0 2 7 0 】

(実施例 1 6)

(B D C A - 4 m A b (A D 5 - 1 7 F 6) は、ニューロピリン 1 を認識する)
ニューロピリン 1 は、神経細胞ガイダンスを媒介するコラプシン / セマホリン (s e m a p h o r i n) ファミリーに対するレセプターである。ニューロピリン 1 はまた、血管内皮増殖因子に対するアイソフォーム特異的レセプターとして内皮細胞および腫瘍細胞によって発現される。しかし、以前は、ニューロピリン 1 が血液および扁桃のプラズマ細胞様 D C に対して発現されること、およびニューロピリン 1 が少なくとも新鮮な非培養血液

20

【 0 2 7 1 】

(材料および方法)

ニューロピリン 1 を、抗 B D C A - 4 m A b A D 5 - 1 7 F 6 (抗 N R P - 1 (M L)) を用いて、トランスフェクトされていない P A E 細胞 (P) およびニューロピリン 1 をトランスフェクトした P E A 細胞 (N P) の細胞溶解物から免疫沈降した (S o k e r ら (1 9 9 8) C e l l 9 2 : 7 3 5 - 7 4 5) 。沈降したタンパク質を、 S D S - P A G E および B D C A - 4 特異的 m A b A D 5 - 1 7 F 6 (M L) またはニューロピリン 1 特異的 m A b (S h a y S o k e r , C h i l d r e n ' s H o s p i t a l , B o s t o n , M A (S) より) を用いるウエスタンブロットにより分析した。

30

【 0 2 7 2 】

図 1 7 は、ニューロピリン 1 を、ニューロピリン 1 をトランスフェクトした P A E 細胞 (N P) の細胞溶解物から、抗 B D C A - 4 m A b A D 5 - 1 7 F 6 (抗 N R P - 1 (M L)) を用いて免疫沈降したが、トランスフェクトされていない P A E 細胞 (P) では免疫沈降されなかったことを示す。沈降したタンパク質を、 S D S - P A G E および B D C A - 4 特異的 m A b A D 5 - 1 7 F 6 (M L) またはニューロピリン 1 特異的 m A b (S h a y S o k e r , C h i l d r e n ' s H o s p i t a l , B o s t o n , M A (S) より) を用いるウエスタンブロットにより分析した。

40

【 0 2 7 3 】

B D C A - 4 特異的 m A b A D 5 - 1 7 F 6 が、ニューロピリン 1 トランスフェクトした P E A 細胞 (N P) からは約 1 3 0 ~ 1 4 0 k D a の特異的バンドを免疫沈降するが、トランスフェクトしていない P A E 細胞 (P) からはそうでないことに注意する。このバンドは、ニューロピリン 1 特異的 m A b (S h a y S o k e r (S) より) で検出し得るが、抗 B D C A - 4 m A b A D 5 - 1 7 F 6 (M L) では検出し得なかった。従って、本発明者らの抗 B D C A - 4 m A b A D 5 - 1 7 F 6 は、標準的な免疫沈降実験においてネイティブ形態のニューロピリン 1 を認識するが、 S D S - P A G E / ウエスタンブロット実験に使用される場合、ニューロピリン 1 の変性形態を検出できない。

【 0 2 7 4 】

興味深いことに、ニューロピリン 1 はまた、血管内皮増殖因子 (V E G F) に対するアイ

50

ソフォーム特異的レセプターとして内皮細胞および腫瘍細胞によって発現される。より興味深いことには、いくつかの論文 (Gabrilovichら (1996) Nature Med. 2: 1267; Nature Med. 2: 1096-103; Gabrilovichら (1999) Clin. Cancer Res. 5: 2963-70; Ohmら (1999) J. Immunol. 163: 3260-8; Oyamaら (1998) J. Immunol. 160: 1224-32; Gabrilovichら (1998) Blood 92: 4150-66; Ishidaら (1998) J. Immunol. 161: 4842-51) は、大きなパーセンテージの腫瘍によって産生される VEGF が、インビボにおいて DC 生成および機能を減少したことを示す。これらの DC に対する効果がニューロピリン 1 (BDCA-4) によって媒介されるか否かは明らかではないが、本発明はニューロピリン 1 に媒介される DC の機能調節を含む。

10

【0275】

(実施例 17)

(ポリ I : C での刺激に应答した精製 BDCA-2⁺BDCA-4⁺DC による I 型インターフェロン (IFN-) の産生は、抗 BDCA-2 mAb を用いて BDCA-2 を誘発することによって阻害される)

CD4⁺CD123^{bright}CD11c⁻ プラズマ細胞様 DC は、エンベロープウイルス、細菌および腫瘍細胞に应答した主要な I 型インターフェロンインデューサーであることが示された。Fitzgerald-Bocarslyら (1993) Pharmacol. Ther. 60: 39-62; Siegalら (1999) Science 284: 1835-1837; Cellara (1999) Nature Med. 5: 919-923。こういうわけで、これらはまた、天然 I 型インターフェロン産生細胞 (NIPC) と呼ばれる。プラズマ細胞様 DC は、BDCA-2 および BDCA-4 を発現する。図 19 に示されるように、プラズマ細胞様 DC 上での表面 BDCA-2 と特異的 mAb との連結、続く 2 次架橋 mAb (ヤギ抗マウス IgG) との連結は、ポリ I : C での刺激に应答した血液または扁桃から免疫磁氣的に精製されたプラズマ細胞様 BDCA-2⁺BDCA-4⁺DC による IFN- の分泌を阻害する。抗 BDCA-2、ポリ I : C および架橋 mAb を用いた培養物中の IFN- の産生レベル (図 18、AC144 + ヤギ抗マウス IgG + ポリ I : C) は、マウス IgG1、ポリ I : C および架橋 mAb を用いた培養物 (図 18、マウス IgG1 + ヤギ抗マウス IgG + ポリ I : C) と同様に低かった。

20

30

【0276】

(材料および方法)

CD11c⁻CD123^{bright} プラズマ細胞様 DC を、BDCA-4 微小ピーズを用いてヒト末梢血単核球から分離した。CD11c⁻CD123^{bright} プラズマ細胞様 DC (1 × 10⁶ 細胞/ml) を、10 μg/ml の AC144 mAb またはマウス IgG1 mAb (CF6B、抗 TPO) を用いて、RPMI、10% FCS、10 mM HEPES、50 μM 2-ME、20 μg/ml ジェネティシン中、37 °C で 30 分間インキュベートした。20 μg/ml のヤギ抗マウス IgG (Chemicon International) を添加し、そして細胞を、再び 37 °C で 30 分間インキュベートした。これらの細胞を、20 μg のポリ I : C (Sigma) の有りまたは無しで、37 °C で 24 時間培養した。細胞上清を収集し、そして IFN- 濃度を、ELISA (Endogen) によって決定した。アッセイの感度は、3 pg/ml である。

40

【0277】

図 18 は、BDCA-4 ではなく BDCA-2 と特定の mAb との連結、続く、2 次架橋 mAb との連結が、ポリ I : C を用いた刺激に应答した血液または扁桃由来のプラズマ細胞様 BDCA-2⁺BDCA-4⁺DC による、IFN- の分泌を阻害することを示す。血液由来のプラズマ細胞様 BDCA-2⁺BDCA-4⁺DC を、10 μg/ml の AC144 mAb (2 および 4) またはマウス IgG1 mAb (CF6B、抗 TPO、1 および 3) を用いて 37 °C で 30 分間培養した。20 μg のヤギ抗マウス IgG を添加し、そしてこの細胞をさらに 37 °C で 30 分間インキュベートした。これらの細胞を、20

50

μgのポリI : Cの有り(3および4)または無し(1および2)で、37 で24時間培養した。培養上清を収集し、そしてIFN- 濃度を、ELISAによって決定した。

(実施例18)

(種々の組織および精製血球集団におけるRT-PCRによるBDCA-2 mRNAの発現分析)

(核酸配列およびアミノ酸配列)

BDCA-2をコードするcDNAを、COS細胞における発現クローニングによって得た。図5は、BDCA-2のアミノ酸配列(発現される6個のエキソンを有するアイソフォーム)を示す。BDCA-2は、C型レクチンII型膜タンパク質である。このようなレクチンは、例えば、Batesら(1999) J. Immunol. 163:1973-1983に記載される。既知のC型レクチンに対するBDCA-2の比較を、実施例20に示す。

10

【0278】

図19は、BDCA-2 cDNAの存在に関する、Clontechからのヒトの複数組織のcDNAパネルの分析(レーン1:心臓;レーン2:脳;レーン3:胎盤;レーン4:肺;レーン5:肝臓;レーン6:骨格筋;レーン7:腎臓;レーン8:膵臓;レーン9:脾臓;レーン10:胸腺;レーン11:精巣;レーン12:卵巣;レーン13:小腸;レーン14:リンパ節;レーン15:骨髄;レーン16:胎児肝臓;レーン17:扁桃)、および異なる集団の白血球から調製されたcDNAの分析(レーン18:T細胞;レーン19:B細胞;レーン20:NK細胞;レーン21:単球;レーン22:CD11c^{bright}CD123^{low}DC;レーン23:CD11c-CD123^{bright}プラズマ細胞様BDC)を示す。

20

【0279】

全てのcDNAをいくつかの異なるハウスキーピング遺伝子(グリセルアルデヒド-3リン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホリパーゼA2、 α -チューブリン、および β -アクチン)のmRNA発現レベルに対して標準化した。標準化は、組織特異性および相対的な標的mRNAの量の正確な評価を確実にする。同じ量のcDNA(約50pg)を、各RT-PCR反応に使用した。RT-PCR反応を、BDCA-2に特異的なプライマー(順方向:5'-TTGAAAGAACCAACACCCCGAAAGT(配列番号7)および逆方向:5'-TAGCTTCTACAACGGTGGATGCC(配列番号8))ならび

30

【0280】

サイクル条件を以下のようにした:94 で30秒および68 で2分。34サイクルをBDCA-2に関して使用し、そして38サイクルをグリセルアルデヒド-3リン酸デヒドロゲナーゼ(G3PDH)に関して使用した。BDCA-2 mRNAシグナルを、CD11c⁻CD123^{bright}プラズマ細胞様DCのみに検出することに注意する。さらに4回のPCRサイクルをBDCA-2 cDNAの増幅に対して使用した場合(34サイクルの代わりに38サイクル)、弱いシグナルをまた、膵臓、精巣、卵巣、骨髄および扁桃に検出した。精巣由来のcDNAを用いて(38PCRサイクル)、より短い転写物(スプライス改変体)のシグナルが、CD11c⁻CD123^{bright}プラズマ細胞様DC由来のシグナルに対して比較した場合より顕著であり、そして全長転写物由来のシグナルは、実際には、さらにより多くのPCRサイクルでのみ検出可能であった。

40

【0281】

(実施例19)

(BDCA-2およびBDCA-2スプライス改変体のエキソン/イントロン構造)

BDCA-2スプライス改変体に関する情報を、開始コドンの前のmRNA配列に相補的なプライマー(順方向プライマー:5'-TTGAAAGAACCAACACCCCGAAAGT(配列番号7))および終止コドンの後ろのmRNA配列に相補的なプライマー(

50

逆方向：5' - TAGCTTTCTACAACGGTGGATGCC (配列番号 8)) を用いたプラスマ細胞様 DC 由来の RT - PCR 増幅、生じるフラグメントのプラスミドへのクローニング、および挿入物の配列決定によって得た。結果を図 20 に示す。比較に関して、マウス樹状細胞関連 C 型レクチン 2 (デクチン - 2 (Dectin - 2)) のスプライス改変体を、図 21 に示す。

【0282】

図 22 は、示される推定イントロンの位置と共に、BDCA - 2 とマウスデクチン - 2 との mRNA 配列のアラインメントを示す。表 3 は、エキソンのパラメーターを示す。

【0283】

【表 3】

表 3

エクソン	mRNA	コードされる アミノ酸残基	コードされる アミノ酸残基数
0	0-361		0
1	362-522	1-10	10
2	523-615	11-41	31
3	616-726	42-78	37
4	727-872	78-127	49
5	873-988	128-166	39
6	989-1283	167-213	47

【0284】

イントロンの位置は、Homo sapiens Chromosome 12 Clone RP11 - 277J24, Working Draft Sequence, 21 unordered pieces (GenBank 登録番号 AC006517) および転写物のスプライシングに関する規則に基づく。BDCA - 2 のイントロン / エクソン構造は、デクチンのイントロン / エクソン構造に類似する。

【0285】

少なくとも 4 個の BDCA - 2 スプライス改変体が生成される。6 個のエクソン全てを有するタンパク質をコードする mRNA ; エクソン 1、3、4、5、および 6 を含むタンパク質をコードする mRNA ; エクソン 1、2、4、5、および 6 を含むタンパク質をコードする mRNA、ならびにエクソン 1、2、3、5、および 6 を含むタンパク質をコードする mRNA が存在する。

【0286】

(実施例 20)

(BDCA - 2 相同性およびタンパク質ドメイン)

ヒト BDCA - 2、ヒト DCIR (樹状細胞免疫レセプター)、およびマウスデクチン - 2 (樹状細胞関連 C 型レクチン 2) のアミノ酸配列のアラインメントを、図 23 に示す。

【0287】

ヒト DCIR (GenBank 登録番号 AJ133532) は、約 51% の aa が 191 aa のストレッチにわたって同一である、ヒト分子間で BDCA - 2 に対する最も高い相同性を有する分子である (Bates ら (1999) J. Immunol. 163 : 1973 を参照のこと)。

【0288】

マウスデクチン - 2 (GenBank 登録番号 AF240357) は、約 51% の aa が 211 aa のストレッチにわたって同一である、おそらくヒト BDCA - 2 のホモログである (Ariizumi ら (2000) J. Biol. Chem. 16 : 11957 ; WO 98 / 28332 ; PCT / US97 / 23761 ; および米国特許第 6,046,158 号を参照のこと)。

【0289】

BDCA - 2 (213 aa)、DCIR (237 aa) および Dectin - 2 (209

10

20

30

40

50

aa) は全て、カルシウム依存 (C型) レクチンファミリーの I I 型膜糖タンパク質である。各分子は、推定細胞質ドメイン (BDCA-2: aa1-21; DCIR: aa1-44; デクチン-2: aa1-17)、推定膜貫通ドメイン (BDCA-2: aa22-41; DCIR: 44-69; デクチン-2: 18-40)、および推定細胞外ドメイン (BDCA-2: aa42-213; DCIR: 70-237; デクチン-2: 40-209) を含む。推定細胞外ドメイン内において、各分子は、COOH-末端に単一炭水化物認識ドメイン (CRD) を含む (BDCA-2: aa83-206; DCIR: 106-230; デクチン-2: 79-202)。図23は、ヒトBDCA-2、ヒトDCIRおよびマウスデクチン-2のアラインメントを示す。

【0290】

PROSITEデータベースを用いて見いだされる推定タンパク質ドメイン/モチーフを、表4に示す。

【0291】

【表4】

表4

ドメイン	BDCA-2	デクチン-2	DCIR
ASNグリコシル化	110-113 NCSV 137-140 NSSY 164-167 NVTF	131-134 NESL	185-188 NESS
cAMP-およびcGMP- 依存プロテインキナーゼ リン酸化部位	53-56 KRLS 135-138 SQK		78-81 KKTT
プロテインキナーゼC リン酸化部位	51-53 TVK 107-109 SQK	15-17 TLR 49-51 SRR 72-74 SEK 94-96 STK	80-82 TTK 130-132 SEK 211-213 SPK
カゼインキナーゼII リン酸化部位	123-126 TREE 187-190 SSEE	94-97 SYKE 101-104 STSE 119-122 TEAE 200-203 SICE	1-9 TYAE 80-83 TTKE 87-90 TTLE 126-129 SWQD 130-133 SEKO 146-149 TQEE 168-171 SDPE 228-231 SVCE
チロシンキナーゼ リン酸化部位	57-64 KIREYQQY	50-58 RRLYELHTY	
アミド化部位	148-151 GGRR		
N-ミリスチル化部位		11-16 GVCWTL 68-73 GTMVSE 77-82 GCCPNH	20-25 GINTAS
C-型レクチンドメイン サイン	180-206	11-17 176-202	203-230

【0292】

BDCA-2は、3つの推定N-グリコシル化部位を含み (aa110-113 NCSV; aa137-140 NSSY; aa164-167 NVTF)、一方、デクチン-2 (aa131-134 NESL) およびDCIR (aa185-188 NESS) は、1つの推定N-グリコシル化部位のみを含む。BDCA-2およびデクチン-2の全ての推定リン酸化部位は、推定細胞外ドメインに位置する。従って、これらは細胞内キナーゼによってリン酸化されるようにはあまりならないようである。ナチュラルキラー遺伝子複合体にコードされる多くのC型レクチン (例えば、CD94、Ly-49、およびNKG2) と同様に、DCIRは、コンセンサス免疫レセプターチロシンベースの阻害モチーフ (ITIMモチーフ; (I/V)XYXX(L/V)) を細胞質ドメイン (aa5-10 ITYAEV) に含む。興味深いことに、このITIMモチーフは、BDCA-

10

20

30

40

50

2 およびデクチン - 2 の相対的に短い細胞質テイル (B D C A - 2 : 2 1 a a ; デクチン - 2 : 1 7 a a) には見出されない。

【 0 2 9 3 】

(実施例 2 1)

(B D C A - 3 タンパク質分析)

B D C A - 3 発現 H D - M Y - Z 細胞を、 B D C A - 3 発現をアップレギュレートするために 1 0 n g / m l P M A (S i g m a) および 0 . 5 m g / m l イオノマイシンを用いて 2 4 時間刺激した。 3×10^7 個の P M A / イオノマイシン刺激 H D - M Y - Z 細胞を、 1 m g / m l S u l f o - N H S - L C - ピオチン (P i e r c e) を用いた 1 5 分間 4 でのインキュベーションによって表面ピオチン化し、そして 2 回洗浄した。細胞を、 1 0 % スクロースおよびプロテイナーゼインヒビター (フェニルメチルスルホニルフルオリド、ペプスタチン A、ロイペプチン、アプロチニン (S e r v a より)) を補充した 5 0 m M T r i s - H C l p H 8 . 0 中に再懸濁し、そして 0 で超音波処理した (5×4 秒、 7 0 % アウトプット)。超音波処理した細胞を、 $900 \times g$ 、 4 で 1 0 分間遠心分離して、核およびインタクトな細胞を除去した。この上清を、 $30,000 \times g$ 、 4 で 2 時間遠心分離して、精製細胞膜を得た。膜を、プロテイナーゼインヒビターおよび 1 % N P - 4 0 を補充した 5 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 0)、 1 5 0 m M N a C l 中で 1 時間 0 でインキュベートすることによって溶解した。不溶性膜フラグメントを、 $30,000 \times g$ 、 4 で遠心分離することによって除去した。上清に対して、 $MnCl_2$ および $CaCl_2$ を、各々 1 m M の終濃度で添加した。溶解物を、 C o n A S e p h a r o s e カラム (1 m l) 上で吸着させ、そして結合タンパク質を、 1 0 m l の溶出緩衝液 (0 . 5 M D (+) マンノース、 2 0 m M T r i s - H C I (p H 7 . 4)、 0 . 5 M N a C l、 1 % N P - 4 0) を用いて溶出し、そして C e t r i p r e p - 1 0 遠心分離濃縮器 (A m i c o n) を用いて 1 m l の容積に濃縮した。

10

20

【 0 2 9 4 】

タンパク質を、 1 5 0 μ l の抗 N I P m A b 結合体化 M i c r o B e a d s (M i l t e n y i B i o t e c) を用いた 3 0 分間、 4 でのインキュベート、および μ M A C S カラム分離によって、予備切断した。 B D C A - 3 の特異的な免疫沈降に関して、タンパク質を、 2 μ g の N I P 結合体化 B D C A - 3 特異的 m A b A D 5 - 1 4 H 1 2 (I g G 1)、または特異性のコントロールのために一次試薬として 2 μ g の N I P 結合体化 C D 1 9 特異的 m A b S J 2 5 - C 1 (I g G 1) を用いるかのいずれかで 1 4 時間 4 でインキュベートし、そして二次試薬として抗 N I P m A b 結合体化 M i c r o B e a d s を用いて 3 時間 4 でインキュベートした。沈降したタンパク質を、 μ M A C S カラム分離によって単離した。保持されたタンパク質を、 D T T を含む 7 0 μ l の S D S - P A G E 緩衝液を用いて溶出した。沈降されたタンパク質を、 S D S - P A G E (4 ~ 1 2 %) およびストレプトアビジン - ペルオキシダーゼを用いたウエスタンブローディングによって分析した。

30

【 0 2 9 5 】

図 2 4 の結果は、 B D C A - 3 特異的 m A b A D 5 - 1 4 H 1 2 が、 H D - M Y - Z 細胞から約 1 0 0 k D の細胞表面タンパク質を特異的に免疫沈降することを示す。従って、 B D C A - 3 は、見かけ上 1 0 0 k D の分子量を有する。

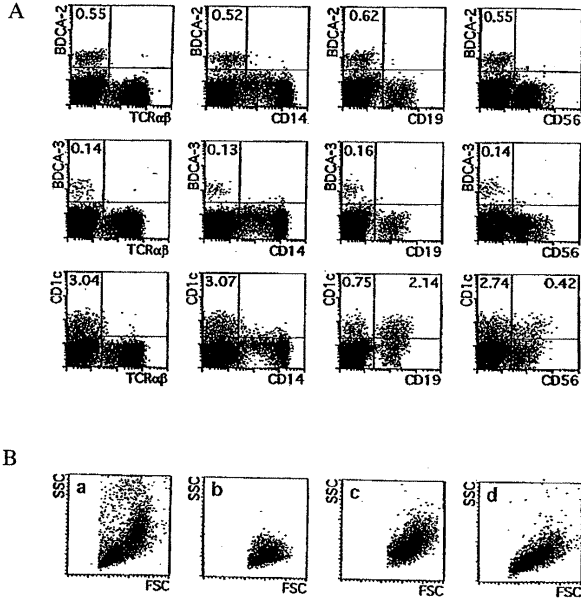
40

【 産業上の利用可能性 】

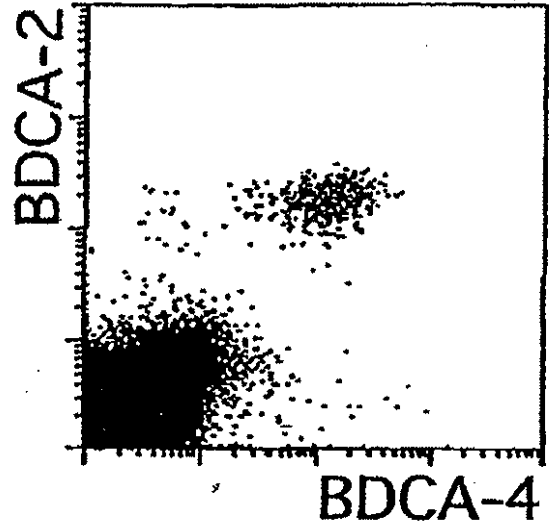
【 0 2 9 6 】

上述の本発明は、明確さおよび理解のために例示および実施例によっていくらか詳細に記載されているが、特定の変化および改変が実施され得ることは当業者に明らかである。従って、説明および実施例は、本発明の範囲の制限として解釈されるべきではなく、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって線引きされる。

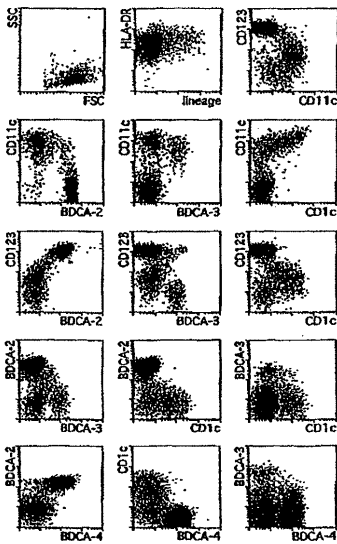
【 1 】



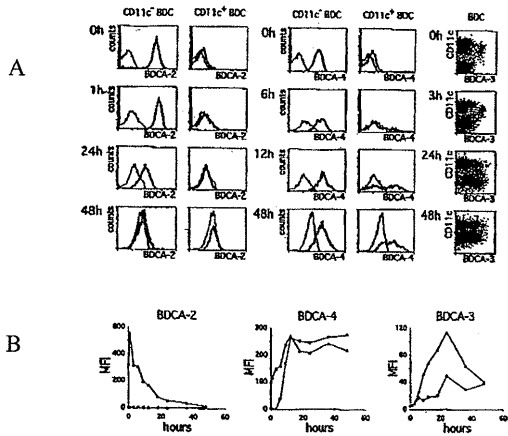
【 2 】



【 3 】



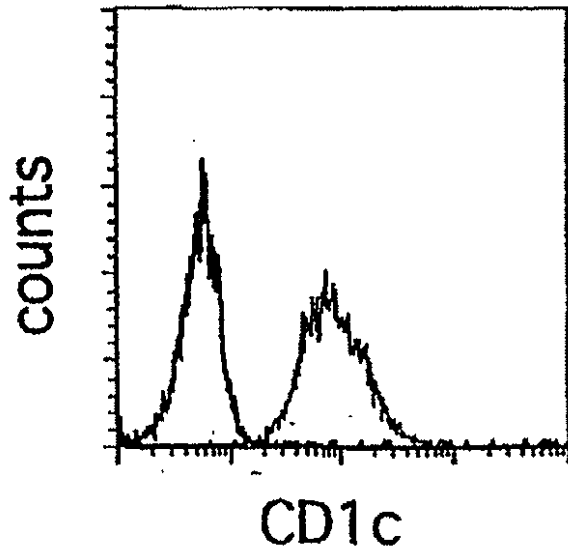
【 4 】



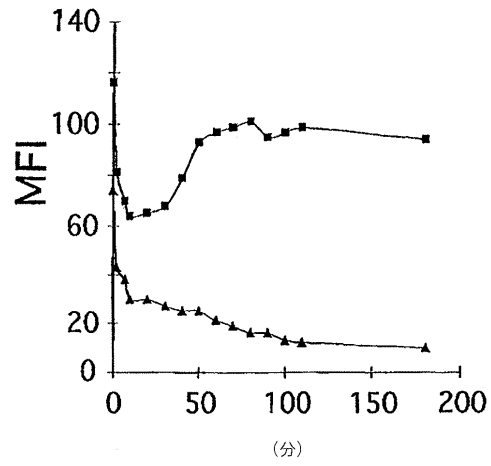
【 5 】

MVPEEPPQDREKGLWWFQLKVWSMAVVSILLLSVCFTVSSVVPNFM
 YSKTVKRLSKLREYQYHPSLTCVMEGKDIEDWSCCPTPWTFSQSSCYF
 ISTGMQSWTKSQKNCSVMGADLVVINTREEQDFIQNLKRNSYFLGLS
 DPGGRRHWQWVDQTPYNENVTFWHSGEPPNLLDERCAHNFSSSEEWG
 WNDIHCHVPQKSICKMKKIYI (配列番号：2)

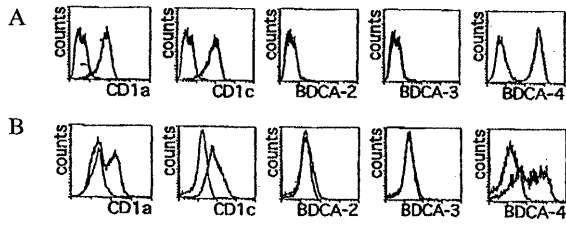
【 6 】



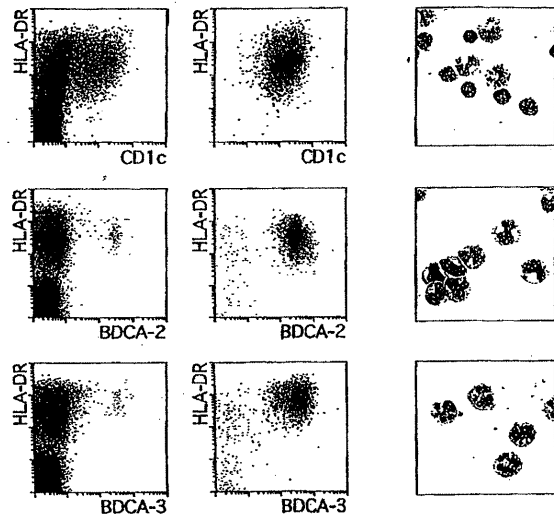
【 8 】



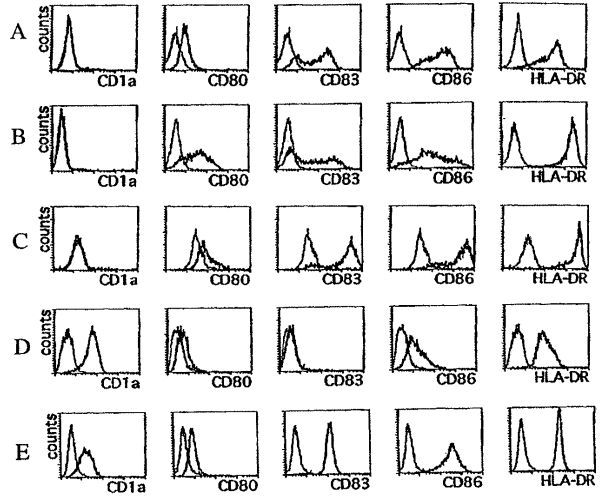
【 7 】



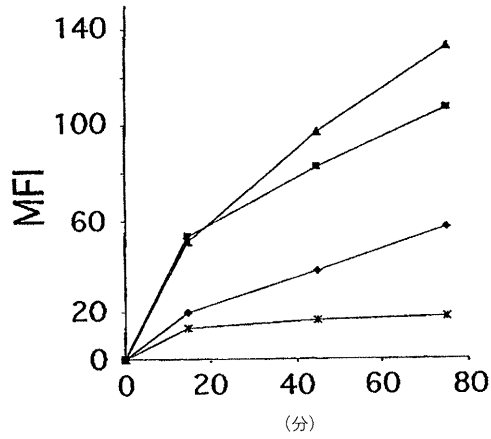
【 9 】



【 10 】



【 図 1 1 】



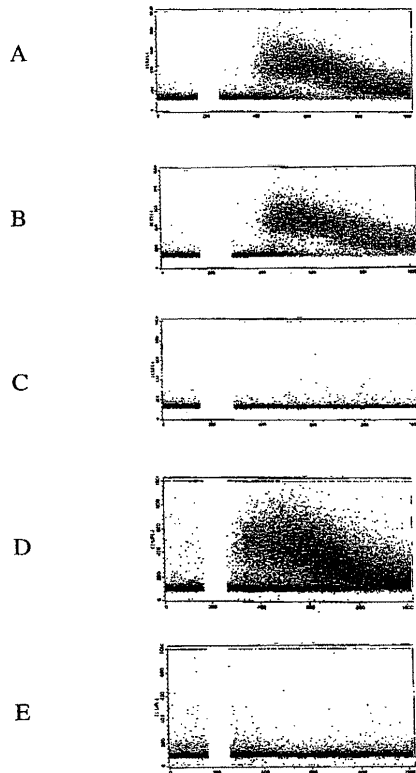
【 図 1 2 】

```

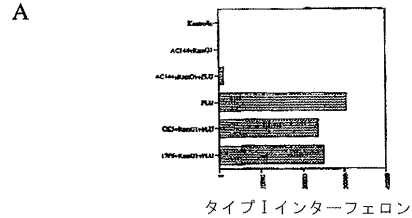
CAGTGATTCTCGTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCCGAAATTACAGACG
TGTGCCACCATGCTGGCTAATTTTGGATTTTTAGTAGAGATGGGG
TTTACTATGTTGGCCAGGCTAGTCTTGAACCTCTGGCCTGAAGCAA
TCCGCCACCTCAGCCTCCCAAAGTGTGAGATTATAGGCACGAGCC
ACTACACCTGGCCACAAAATCTTTAAAGAAGCCAATCCCATCTCC
CTCAAAGGCCAAGGGCCACCTCACCTCTTGTACAGCAGATCTGTG
CCTCCACAGTCACCTGCTCCCAAGTCAACCTCTGTCTGACCTGC
ATGGTGTGCGGTGCCCTCCTGCCTCAGGCCGGAAGAAGGATCTAAG
GGCTTGGCTTGTGAAAGAACCACACCCCGAAAGTAACATCTTTGG
AGAAAGTGATACAAGAGCTTCTGCACCCACCTGATAGAGGAAGTCC
AAAGGTGTGCGCACACACAATGGTGCCTGAAGAAGAGCCTCAAGA
CCGAGAGAAAGGACTCTGGTGGTTCCAGTTGAAGGTCTGGCCATGG
CAGTCGTATCCATCTTGTCTCCTCAGTGTCTGTTCAGTGTGAGTCTG
TGGTGCCTCACAAATTTATGTATAGCAAACTGTCAAGAGGCTGTCC
AAGTTACGAGAGTATCAACAGTATCATCCAAGCCTGACCTGCGTCAT
GGAAGGAAAGGACATAGAAGATTGGAGCTGCTGCCAACCCCTTGG
ACTTCATTTAGTCTAGTTGCTACTTTATTTCTACTGGGATGCAATCT
TGGACTAAGAGTCAAAGAAGTGTCTGTGATGGGGCTGATCTGGT
GGTGATCAACACCAGGGAAGAACAGGATTTTCATCATTGAGAAATCTG
AAAAGAAATTTCTTTATTTTCTGGGGCTGTCAGATCCAGGGGCTCG
GCGACATTGGCAATGGGTTGACCAGACACCATACAATGAAAATGTC
ACATTTGGCACTCAGGTGAACCAATAACCTTGATGAGCGTTGTGC
GATAATAAATTTCCGTTCTCAGAAGAATGGGGCTGGAATGACATTC
ACTGTCAATGACCTCAGAAGTCAATTTGCAAGATGAAGAAGATCTAC
ATATAAATGAAATATTTCCCTGGAAATGTTGTTGGGTTGGCATCCA
CCGTTGTAGAAAGCTAAATTTGATTTTAAATTTATGTGTAAGTTTGT
ACAAGGAATGCCCTAAATGTTTCAGCAGGCTGTCACCTATTACAC
TTATGATAAATCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
  
```

(配列番号: 1)

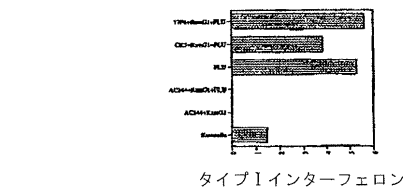
【 図 1 3 】



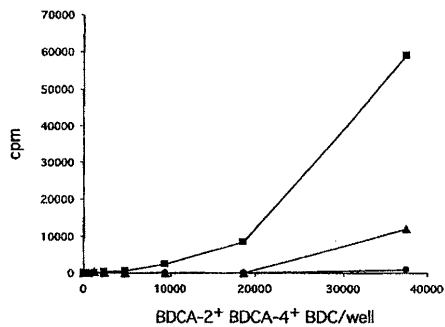
【 図 1 4 】



B



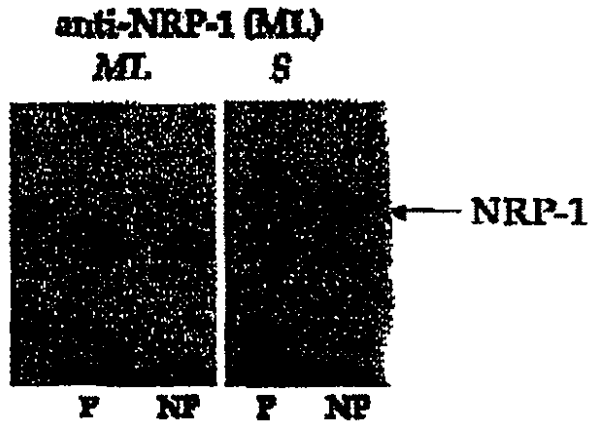
【 図 1 5 】



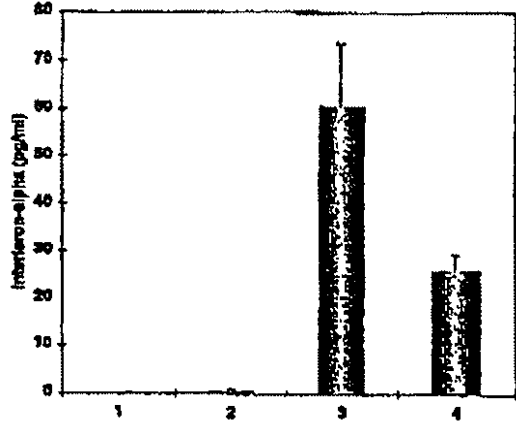
【 16 】



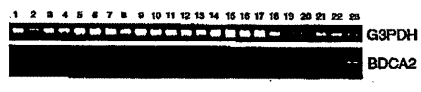
【 17 】



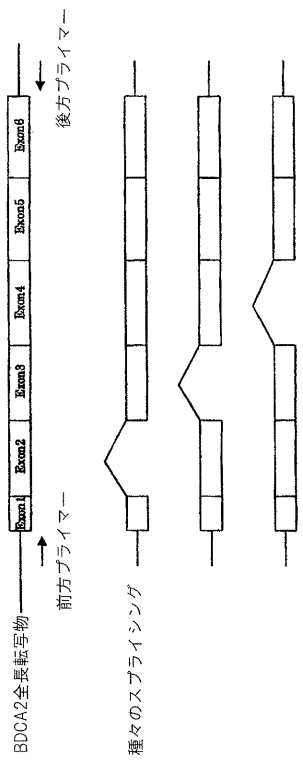
【 18 】



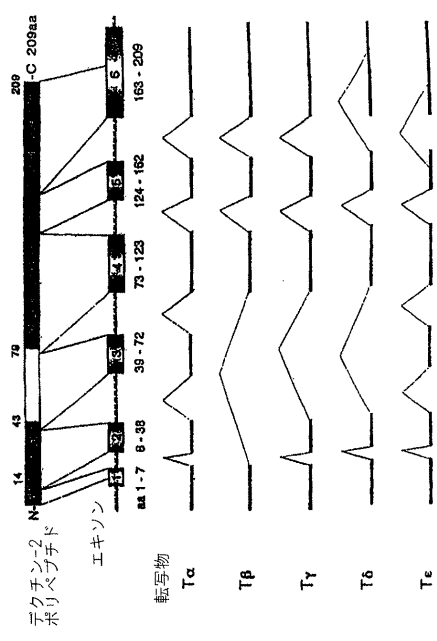
【 19 】



【 20 】



【 21 】



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 60/179,003
(32)優先日 平成12年1月28日(2000.1.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/180,775
(32)優先日 平成12年2月7日(2000.2.7)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/196,824
(32)優先日 平成12年4月11日(2000.4.11)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 60/197,205
(32)優先日 平成12年4月13日(2000.4.13)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (74)代理人 100114465
弁理士 北野 健
- (74)代理人 100156915
弁理士 伊藤 奈月
- (72)発明者 シュミッツ, ユルゲン
ドイツ国 5 0 1 2 6 ベルクハイム, ヨーゼフ - トゥエンナー - シュトラーセ 3 4
- (72)発明者 ドゥジョネック, アンドルゼフ
ドイツ国 5 0 6 7 7 ケルン, ロースリンガーシュトラーセ 1 1 9
- (72)発明者 バック, デイビッド ウィリアム
イギリス国 ティーエヌ2 0 6 ユーエル イースト サセックス, メイフィールド, グレベ
ファーム

審査官 上條 肇

- (56)参考文献 国際公開第99/015559(WO, A1)
国際公開第96/028732(WO, A1)
米国特許第05871728(US, A)
米国特許第05788963(US, A)
Tissue Antigens, 1997年, Vol.50, p.439-448
Am.Rev.Respir.Dis., 1989年, Vol.139, No.5, p.1112-1117
J.Immunol., 1999年 8月, Vol.163, No.3, p.1409-1419

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/10
MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	对树突细胞特异的抗原结合片段，其组合物和使用方法，由此识别的抗原和由此获得的细胞		
公开(公告)号	JP5599834B2	公开(公告)日	2014-10-01
申请号	JP2012045127	申请日	2012-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	美天旋生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	Mirutenii生物GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Mirutenii生物GESELLSCHAFT手套Beshurenkuteru有限公司		
[标]发明人	シュミッツユルゲン ドウジョネックアンドルゼフ バックデイビッドウィリアム		
发明人	シュミッツ,ユルゲン ドウジョネック,アンドルゼフ バック,デイビッド ウィリアム		
IPC分类号	C12N5/0784 C12Q1/04 G01N33/53 A01K67/027 A61K35/12 A61K39/00 A61K39/02 A61K39/12 A61K39/395 A61K45/00 A61K47/48 A61K48/00 A61K51/10 A61P1/16 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/ 04 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/14 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/08 C07K7/06 C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/ 19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 G01N33/50		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K47/6813 A61K47/6817 A61K51/1027 A61K2035/122 A61K2039/505 A61K2039/ 5154 A61P1/16 A61P11/06 A61P17/00 A61P17/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/22 A61P33/00 A61P33/14 A61P35/ 00 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/7056 C07K16/28 C07K2317/77 C12N5/0639 C12N5/ 064 C12N2501/998 G01N33/5094		
FI分类号	C12N5/00.202.M C12Q1/04.ZNA G01N33/53.N G01N33/53.Y A01K67/027 A61K39/395.C A61K39/395. G A61K39/395.L A61K39/395.U A61K48/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P25/00 A61P31/04 A61P31/10 A61P31/12 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/705 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/ 19 C12N1/21 C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/12 C12N5/00.101 C12N5/0784 C12N5/10 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BB20 2G045/CA17 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/ CA20 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB09 2G045/CB13 2G045/CB26 2G045/DA36 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC11 2G045/GC15 4B024/AA01 4B024/BA31 4B024/ CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX02 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/ AC14 4B065/BA01 4B065/BB08 4B065/BB12 4B065/BB25 4B065/BB37 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/NA14 4C084/ZA962 4C084/ZB052 4C084/ ZB072 4C084/ZB132 4C084/ZB262 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB372 4C085/AA13 4C085/ AA14 4C085/AA25 4C085/AA26 4C085/AA27 4C085/CC02 4C085/DD32 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/ EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 松任谷裕子 北野 健		
审查员(译)	肇峰		

優先権 60/165555 1999-11-15 US
60/167076 1999-11-23 US
60/179003 2000-01-28 US
60/180775 2000-02-07 US
60/196824 2000-04-11 US
60/197205 2000-04-13 US

其他公开文献 JP2012152215A

外部链接 [Espacenet](#)

摘要(译)

要解决的问题：提供对树突细胞特异的抗原结合片段，并有效地治疗和/或诊断各种疾病。解决方案：分离的抗原结合片段包含特异性结合BDCA-4 (神经毡蛋白-1) 蛋白的多肽结构域。

H	疎水性
A	脂肪族
C	システイン
G	グリシン
E	グルタミン酸
W	トリプトファン
Δ	芳香族アミノ酸
+	炭水化物のカルシウム依存性結合に関与する残基
++	炭水化物の結合特異性を決定する残基