

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-509122

(P2021-509122A)

(43) 公表日 令和3年3月18日(2021.3.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00	Z 4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 K 39/39 (2006.01)	A 6 1 K 39/39	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁)

(21) 出願番号 特願2020-555746 (P2020-555746)
(86) (22) 出願日 平成31年1月1日 (2019.1.1)
(85) 翻訳文提出日 令和2年8月31日 (2020.8.31)
(86) 国際出願番号 PCT/US2019/012003
(87) 国際公開番号 WO2019/136038
(87) 国際公開日 令和1年7月11日 (2019.7.11)
(31) 優先権主張番号 62/612, 826
(32) 優先日 平成30年1月2日 (2018.1.2)
(33) 優先権主張国・地域又は機関
米国 (US)

(71) 出願人 520239872
クロリス・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド
K h l o r i s B i o s c i e n c e s
, I n c .
アメリカ合衆国95070カリフォルニア州サラトガ、アレンデイル・アベニュー19630番、ナンバー3167

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌のための予防および治療処置としてのIPSCベースのワクチン

(57) 【要約】

1つの態様において、本願は、患者における癌の処置のための方法であって、方法はワクチンでの患者のワクチン接種を含み、ワクチンは胚源から得られるまたは患者からの体細胞の再プログラム化によって得られる哺乳動物の多能性幹細胞の有効量を含み、ワクチン接種は必要とする患者に哺乳動物の多能性幹細胞を投与する工程を含む、方法；および癌の処置における使用のためのワクチン製剤を記載している。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者における癌の処置のための方法であって、方法はワクチンでの患者のワクチン接種を含み、ワクチンは患者からの体細胞の再プログラム化によって得られる哺乳動物の多能性幹細胞の有効量を含み、ワクチン接種は必要とする患者に哺乳動物の多能性幹細胞を投与する工程を含む、方法。

【請求項 2】

多能性幹細胞が人工多能性幹細胞 (iPSC) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

哺乳動物の多能性幹細胞が未分化多能性幹細胞である、請求項 1 または 2 に記載の方法

10

【請求項 4】

多能性幹細胞が、shRNA p53 の起こりうる付加と共に、Oct 4、c-My c、KLF - 4 および Sox 2 を含む 4 つの再プログラム化因子を含むミニイントロン(mini-intronic) プラスミドを使用して産生される、請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法

【請求項 5】

幹細胞が、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞、末梢血細胞および腎上皮細胞からなる群から選択される、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

アジュバントが、ワクチンに対する免疫応答を増強するための免疫学的薬剤である、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 7】

ワクチンが、以下の方法： a) 独立型のワクチン接種として； b) 腫瘍切除前のアジュバント療法として； c) 腫瘍切除後のアジュバント療法として、 d) 転移状況において； e) 腫瘍または癌の非存在下で予防状況として； および f) 化学療法、免疫療法、標的療法と組み合わせて、生物学的薬剤を使用して、小分子剤を使用して、生物学的または小分子剤を含むナノ粒子と共に、またはそれらの組合せ、の少なくとも 1 つにしたがって投与される、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

癌が、乳癌、黒色腫および中皮腫からなる群から選択される、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 9】

癌が、白血病、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、リンパ腫、骨髄増殖性疾患、扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経内分泌癌腫、膀胱癌、皮膚癌、脳および脊髄癌、頭頸部癌、甲状腺、骨癌、乳癌、子宮頸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、消化器癌、(下) 喉頭癌、食道癌、肝臓癌、肺癌、膵臓癌、前立腺癌、眼癌、腎細胞癌、腎臓、肝臓、卵巣癌、胃癌、精巣癌、甲状腺および胸腺癌からなる群から選択される、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

多能性幹細胞癌ワクチンでの哺乳動物のワクチン接種のための方法であって、方法は、レシピエントからの体細胞の再プログラム化によって哺乳動物の多能性幹細胞を導入すること； および多能性幹細胞をレシピエントに提供することを含む、方法。

40

【請求項 11】

哺乳動物細胞が、未分化多能性細胞である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

多能性幹細胞が、Oct 4、c-My c、KLF - 4 および Sox 2 を含む 4 つの再プログラム化因子を含むミニイントロンプラスミドを使用して産生される、請求項 11 に記

50

載の方法。

【請求項 13】

多能性幹細胞が、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞、末梢血細胞および腎上皮細胞からなる群から選択される、請求項 10 から 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

ワクチンが、ワクチン接種の前に注がれる、請求項 10 から 13 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

ワクチンが、ワクチンに対する免疫応答を増強するための免疫学的薬剤であるアジュバントをさらに含む、請求項 10 から 14 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 16】

哺乳動物からの体細胞の再プログラム化によって得られる哺乳動物の多能性幹細胞の有効量、およびワクチンに対する免疫応答を増強するためのアジュバントまたは免疫学的薬剤を含む熱的に安定なワクチン組成物。

【請求項 17】

多能性幹細胞が人工多能性幹細胞 (iPSC) である、請求項 16 に記載のワクチン組成物。

【請求項 18】

哺乳動物の多能性幹細胞が未分化多能性幹細胞である、請求項 16 または 17 に記載のワクチン組成物。

20

【請求項 19】

幹細胞が、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞、末梢血細胞および腎上皮細胞からなる群から選択される、請求項 16 から 18 のいずれかに記載のワクチン組成物。

【請求項 20】

アジュバントが、CpG、QS21、ポリ(ジ(カルボキシラートフェノキシ)ホスファゼン (poly(di(carboxylatophenoxy)phosphazene)；リボ多糖類の誘導体、例えば、モノホスホリルリピドA、ムラミルジペプチド(MDP；Ribit)、スレオニル-ムラミルジペプチド(t-MDP；Ribit)；OM-174；コレラ毒素(CT)、およびリーシュマニア伸長因子からなる群から選択される、請求項 16 から 19 のいずれかに記載のワクチン組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本願は、2018年1月2日に提出された仮出願番号62/612,826の35 USC 119(e)に基づく優先権を主張し、その開示は参照により本願に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の背景：

40

1世紀近く前に、研究者たちは、胚性物質による免疫化が移植された腫瘍の拒絶につながることを観察した。最近では、共有トランスクリプトームプロファイルおよび抗原がさまざまな腫瘍細胞および胚細胞で同定された。これは、胚性幹細胞(ESC)が抗腫瘍免疫を促進するための免疫化剤として使用することができるという仮説を導いた。

【0003】

不活化された生物体またはタンパク質産物からなる従来のワクチンに対する全細胞ワクチン接種の成功の鍵の1つは、未知の抗原を含む幅広い抗原をT細胞に提示できることである。しかし、抗腫瘍免疫を誘導するワクチンとしての胎児および胚の材料の使用は、主としてこれらの治療法を取り巻く倫理的課題のために、動物モデルを超えてまだ進んでいない。

50

【0004】

人工多能性幹細胞 (iPSC) の発見により、ESC とほぼ同一の遺伝子発現および表面マーカープロファイルを共有する患者自身の組織からの多能性細胞を作成することを可能にし、主要な倫理的障害を回避する。

【0005】

癌ワクチン接種の潜在的な有効性を示唆している、自己移植による iPSC の腫瘍形成性 (Kooreman and Wu, 2010; Okita et al., 2007) および免疫原性 (de Almeida et al., 2014; Zhao et al., 2011) 特性のため、iPSC は癌ワクチン接種の魅力的な候補である。重要なことには、自己 iPSC は、同種異系の ESC よりも正確なおよび典型的な患者の腫瘍抗原のパネルを提供することができる。

10

【発明の概要】

【0006】

発明の概要：

1つの態様において、本出願は、予防的にまたは治療的にのいずれかで複数のタイプの癌を標的とする癌ワクチンの産生のための組成物および方法を提供する。1つの局面において、ワクチンによって産生される癌細胞に対する免疫は、アジュバントおよび iPSC またはミニイントロプラスミド産生 iPSC (MIP-iPSC)、例えばアジュバント CpG および iPSC、またはアジュバント CpG および MIP-iPSC を組み合わせる。MIP-iPSC は、免疫細胞の大きなレパートリーを活性化するためのミニイントロプラスミドを使用して産生され、iPSC および癌細胞間で共有される癌関連または癌に関連するエピトープを標的とし、癌の発生および/または進行に対する長期免疫を提供する。

20

【0007】

別の局面において、興味ある癌型は潜在的に無制限であり、初期のパイロット試験は乳癌、黒色腫、膵臓癌および中皮腫において有効性を示す。iPSC および癌細胞間の癌エピトープにおける大きな重複に基づいて、免疫は、固形腫瘍 (例えば、乳房、肺、皮膚、グリア芽腫、頭頸部、甲状腺、膵臓、肝臓、結腸直腸、腎臓、胃、肉腫、卵巣、膀胱、前立腺、食道、子宮内膜、子宮頸) ならびに血液学的癌 (例えば、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、骨髄増殖性疾患、白血病) に対して発生する可能性がある。

30

【0008】

1つの態様において、自己癌ワクチン産生およびワクチン接種レジメンのための方法であって、方法が、iPSC ベースのワクチンのインビトロでの産生および連続する週を含む数週間、例えば、4週間連続でレシピエントへのワクチン接種、例えば皮下にワクチン接種を含む方法が提供される。1つの変形において、ワクチン接種は、少なくとも2週間連続、3週間連続、4週間連続、5週間連続、または少なくとも6週間連続にわたって毎週行われる。別の変形において、ワクチンは、アジュバント CpG または同等の特性を有する任意の他のアジュバントと一緒に iPSC の使用であって、アジュバントは、ワクチンに対する免疫応答を増強または強化するための免疫学的薬剤、例えば抗体、ペプチドまたは小分子である、使用を含む。

40

【0009】

1つの態様において、多能性幹細胞は、炎症誘発性 (pro-inflammatory) タンパク質を過剰発現する (例えば、GM-CSF、INF、DNMT インヒビターを使用することによって)、または前免疫原性 (pro-immunogenic) タンパク質を過剰発現する (例えば、MHC クラス I、 β 2m、Tapasin、または c-My c / Oct 4) ように遺伝的に操作されていない。1つの変形において、多能性幹細胞は、炎症誘発性タンパク質を過剰発現する (例えば、GM-CSF、INF、DNMT インヒビターを使用することによって)、または前免疫原性タンパク質を過剰発現する (例えば、MHC クラス I、 β 2m、Tapasin、または c-My c / Oct 4) ように遺伝的に操作されている。ワクチンに対する免疫応答を上方調節する前免疫原性抗原を遺伝的に過剰発現す

50

るための方法は、Yaddanapudi, K. et al. (2012). Vaccination with embryonic stem cells protects against lung cancer: is a broad-spectrum prophylactic vaccine against cancer possible? PLoS ONE 7, e42289に記載されている。

【0010】

別の態様において、多能性幹細胞は、1つ以上の癌抗原（例えば、CEA、MAGE-1、survivin、p53、HER2-neu、AFP、ras）、炎症誘発性タンパク質および/または前免疫原性タンパク質を過剰発現するように遺伝的に操作されている。別の態様において、ワクチンは、iPSCを使用して患者自身の組織（例えば、皮膚、筋肉、脂肪、骨髄、器官、毛髪、血液および尿、または組織の組合せ）から産生され、それにより患者特異的ワクチンを作ることができる。

10

【0011】

1つの態様において、患者における癌の処置のための方法であって、方法はワクチンでの患者のワクチン接種を含み、ワクチンは胚源から得られるまたは患者または別の患者またはヒトからの体細胞の再プログラム化によって得られる、またはiPSCの同種異系の供給源から得られる哺乳動物の多能性幹細胞の有効量を含み、ワクチン接種は必要とする患者に哺乳動物の多能性幹細胞を投与する工程を含む、方法が提供される。本願明細書において使用されるとき、方法は、癌の処置のための患者と呼ばれることができる任意の哺乳動物に等しく適用できる。

【0012】

方法の1つの変形において、哺乳動物の多能性幹細胞は、特定化されていない体細胞に由来する。体細胞の再プログラム化のための方法および胚性幹細胞の使用なしで任意の細胞系統の患者特異的幹細胞を再生するための方法のサマリーについてRajasingh, J. Prog. Mol. Biol. Transl. Sci., 2012, 111:51-82参照。1つの変形において、iPSCは、ウイルスおよび非統合非ウイルス方法を使用してゲノム再プログラム化することによって産生される。別の変形において、多能性幹細胞は、アジュバントと製剤化される、例えば、多能性幹細胞は、アジュバントと組み合わせられるか、または乳化される。

20

【0013】

上記方法の1つの局面において、多能性幹細胞は人工多能性幹細胞(iPSC)である。方法の別の局面において、哺乳動物の多能性幹細胞は未分化多能性幹細胞である。方法の別の局面において、多能性幹細胞は、shRNA p53の起こりうる付加と共に、Oct4、c-Myc、KLF-4およびSox2を含む4つの再プログラム化因子を含むミニイントロプラスミドを使用して産生される。方法の1つの変形において、多能性幹細胞は、例えばGM-CSFを使用することによって、免疫原性タンパク質を過剰発現するように遺伝的に操作されていない。方法の別の変形において、多能性幹細胞は、癌抗原、炎症誘発性タンパク質、および/または前免疫原性タンパク質を過剰発現するように遺伝的に操作されている。1つの態様において、多能性幹細胞は、炎症誘発性タンパク質を過剰発現する（例えば、GM-CSF、INFg、DNMTインヒビターを使用することによって）、または前免疫原性タンパク質を過剰発現する（例えば、MHCクラスI、2m, Tapasin、またはc-Myc/Oct4）、または1つ以上の癌抗原を過剰発現する（例えば、CEA、MAGE-1、survivin、p53、HER2-neu、AFP、ras）、または炎症誘発性タンパク質および/または前免疫原性タンパク質を過剰発現するように遺伝的に操作されている。別の態様において、ワクチンは、iPSCを使用して患者自身の組織（例えば、皮膚、筋肉、脂肪、骨髄、臓器、毛髪、血液および尿、または組織の組合せ）から産生され、それにより患者特異的ワクチンを作ることができる。方法の別の局面において、多能性幹細胞は、部分的に分化した胚様体を含む。

30

40

【0014】

上記方法の別の局面において、幹細胞は、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞、末梢血細胞および腎上皮細胞からなる群から選択される。方法の1つの変形において、多能性幹細胞は、多能性と関連する細胞フラグメントまたはエピトープを含む。別の変形において、ワ

50

クチンはワクチン接種の前に照射される。別の変形において、ワクチンは皮下注射によって投与され、および4週間以下で投与される。方法の1つの変形において、ワクチン接種は毎週行われる。別の変形において、ワクチンは、毎日、週に数回、例えば、週に2回または3回、または2週間ごとに投与されてよく、持続期間は、2、3、4、5、6、7、または8週間であってよい。

【0015】

上記方法の別の局面において、アジュバントは、ワクチンに対する免疫応答を増強するための免疫学的薬剤である。ワクチンの治療有効用量は、本願のワクチンの投与の非存在下での効果と比較して、インピボでの免疫応答を少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約50%、少なくとも約75%、少なくとも約90%またはそれ以上増強または強化させることができる。T細胞応答を測定するために使用されるアッセイは、限定はしないが、遅延型過敏症テスト、ペプチド主要組織適合遺伝子複合体テトラマーを使用するフローサイトメトリー、リンパ球増殖アッセイ、酵素免疫吸着法(ELISA)、酵素結合免疫スポットアッセイ(ELISpot)、サイトカインフローサイトメトリー、細胞傷害性Tリンパ球(CTL)アッセイ、CTL前駆体頻度アッセイ、T細胞増殖アッセイ、カルボキシフルオレセイン二酢酸スクシニイミジルエステルアッセイ、多機能T細胞アッセイ、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)によるサイトカインmRNAの測定、および限界希釈分析を含む。免疫応答を評価するための他のアッセイは、限定はしないが、遺伝子発現プロファイリング、一度に複数の抗原に対する抗体応答を評価するタンパク質マイクロアレイ、ルシフェラーゼ免疫沈降、リンパ球免疫モニタリングのための単一細胞レベルで免疫系において複数の細胞内シグナル伝達分子を測定するためのphosphoflow、および血清中の抗体免疫をモニタリングする表面プラズモン共鳴バイオセンサーを含む。方法の1つの変形において、アジュバントは、CpG、QS21、ポリ(ジ(カルボキシラートフェノキシ)ホスファゼン(poly(di(carboxylatophenoxy)phosphazene));リポ多糖類の誘導体、例えばモノホスホリルリピドA、ムラミルジペプチド(MDP;Ribit)、スレオニル-ムラミルジペプチド(t-MDP;Ribit);OM-174;コレラ毒素(CT)、およびリーシュマニア伸長因子;またはそれらの混合物からなる群から選択される。

【0016】

方法の別の局面において、ワクチンは、腫瘍切除後のアジュバント療法として投与される。方法の1つの変形において、ワクチンは、化学療法、他の免疫療法、例えば抗体、およびこれらの薬剤または分子を含むナノ粒子を含む小分子と共に投与される。別の変形において、ワクチンは、ネオアジュバント(手術前)、アジュバント(手術後)、または転移状況においてまたは予防状況で癌が発生する前に与えることができる。方法の別の局面において、ワクチンは、腫瘍切除前のネオアジュバント療法として投与される。方法の別の局面において、ワクチンは、転移状況において治療として投与される。方法の別の局面において、ワクチンは、単一または複数の化学療法剤、免疫療法、例えば抗-PDL1、抗-PD1、または抗-CTLA4抗体、他の生物製剤、およびこれらの薬剤を含むナノ粒子を含む小分子、例えばジプロボシムと組み合わせて投与される。方法の別の局面において、癌は、乳癌、黒色腫および中皮腫からなる群から選択される。方法のさらなる別の局面において、癌は、白血病、多発性骨髄腫、リンパ腫、骨髄増殖性疾患、扁平上皮癌、腺癌、肉腫、神経内分泌癌腫、膀胱癌、皮膚癌、脳および脊髄癌、頭頸部癌、骨癌、乳癌、子宮頸癌、大腸癌、経直腸癌、子宮内膜癌、消化器癌、(下)喉頭癌、食道癌、胚細胞癌、移行性細胞癌、肝臓癌、肺癌、膵臓癌、胆管癌腫、分化の乏しい癌腫、前立腺癌、眼癌、腎細胞癌、卵巣癌、胃癌、精巣癌、甲状腺および胸腺癌からなる群から選択される。

【0017】

別の態様において、多能性幹細胞癌ワクチンでの哺乳動物のワクチン接種のための方法であって、方法は、1)胚源からの、または2)レシピエントからの体細胞の再プログラム化によって哺乳動物の多能性幹細胞を導入すること;および多能性幹細胞をレシピエントに提供することを含む、方法が提供される。方法の別の側面において、哺乳動物細胞は

未分化多能性細胞である。

【0018】

方法の1つの局面において、多能性幹細胞は、Oct 4、c-My c、K L F - 4 および Sox 2 を含む4つの再プログラム化因子を含むミニイントロプラスミドを使用して産生される。方法の1つの変形において、多能性幹細胞は、免疫原性タンパク質を過剰発現するように、例えばGM - C S F を使用することによって、遺伝的に操作されていない。方法の1つの変形において、多能性幹細胞は、免疫原性タンパク質を過剰発現するように、例えばGM - C S F を使用することによって、遺伝的に操作または改変されている。

【0019】

方法の別の局面において、多能性幹細胞は、癌抗原および/または免疫原性タンパク質を過剰発現するように遺伝的に操作されている。方法の別の局面において、多能性幹細胞は、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞、末梢血細胞および腎上皮細胞からなる群から選択される。方法の1つの変形において、多能性幹細胞は、多能性と関連する細胞フラグメントまたはエピトープを含む。

10

【0020】

上記方法の別の局面において、ワクチンは、ワクチン接種の前に照射される。方法の1つの変形において、ワクチンは、4週間以下、例えば3週間、2週間または約1週間の期間にわたって皮下注射される。別の変形において、ワクチン接種は毎週行われる。別の変形において、ワクチン接種は毎日、週に数回、例えば週に2回または3回、または2週間ごとに行われてよく、および期間は2、3、4、5、6、7、または8週間またはそれ以上であってよい。

20

【0021】

上記方法の別の局面において、ワクチンは、ワクチンに対する免疫応答を増強するための免疫学的薬剤であるアジュバントをさらに含む。上記方法の1つの変形において、腫瘍切除後のアジュバントワクチン接種は、きれいな切除領域(RA)および癌細胞を標的とする免疫系の再活性化をもたらす。上記方法のそれぞれの別の変形において、方法は、腫瘍特異的応答、有効な抗原提示、陽性Tヘルパー免疫応答の少なくとも1つを提供し、細胞傷害性T細胞活性をもたらす。

【0022】

方法の1つの変形において、処置の方法は、ワクチンによる自己免疫応答の兆候をもたらさない；または処置の方法は、ワクチンによる自己免疫性応答の検出可能な兆候を実質的にもたらさない。方法の別の変形において、ワクチンは腫瘍切除後のアジュバント療法として使用される。1つの変形において、方法は、癌、例えば黒色腫または乳癌、または本明細書に記載されている癌の目に見える再発がなく、患者に少なくとも1つのアジュバントラウンド；または少なくとも2つのアジュバントラウンドの(C + I)ワクチンを提供する。別の変形において、方法は、成熟抗原提示細胞(APC)の上方制御およびヘルパーT細胞の上方制御をもたらす。

30

【0023】

別の変形において、ワクチンは、I L - 4 発現B細胞、T N F - アルファ発現C D 1 1 b + G R 1 h i 骨髄細胞の全身性上方調節および腫瘍促進T h 1 7 細胞の低下の少なくとも1つによって、残存癌細胞、例えば黒色腫細胞を拒絶することにおいて免疫系を再活性化する。別の変形において、方法は、腫瘍注射部位およびワクチン接種部位の近くの分解を含む、腫瘍の分解を引き起こす。1つの変形において、方法は、処置後の、腫瘍サイズの少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、75%、85%、90%または95%以上の低下をもたらす。別の変形において、方法は、免疫系の刺激(priming)および免疫系の再活性化をもたらす、癌細胞を特異的に標的とする。上記方法のそれぞれの別の変形において、方法は、複数の癌型に対するアジュバント免疫療法として使用されてよく、診断後1週間、2週間、3週間、4週間または約5週間以内に有効であり得る。別の変形において、方法は、複数の癌型に対して効果的なおよび特異的な応答をもたらす予防的免疫を提供する。別の変形において、効果的なおよび特異的な応答は、リンパ節にお

40

50

ける成熟 A P C の上方調節と、それに続く局所的にヘルパー T 細胞および細胞障害性 T 細胞の増加；および期間後、系統的にヘルパー T 細胞および細胞障害性 T 細胞の増加にも起因する。別の変形において、I L - 2、I L - 4、および I L - 5 を発現する B 細胞および T 細胞は、ワクチン接種における腫瘍退縮を予測する可能性がある。

【 0 0 2 4 】

方法の別の変形において、ワクチン接種は、複数の癌型に対して広範な腫瘍免疫を作り、免疫系に大量の（数十から数百または数千までを含んでよい）腫瘍抗原を提示する。方法の別の変形において、ワクチン接種は、治療関連副作用（例えば、自己免疫性応答、体重減少、サイトカイン放出症候群およびそれらの組合せ）なしで確立された癌を標的とすることにおいて免疫系を再活性化し、方法は、診断後数週間以内に作ることができる。したがって、方法は、慣用の癌の一次処置直後に、個別化されたアジュバント免疫療法のための実行可能な選択肢を提示する。方法の別の変形において、ワクチンは、筋肉内、皮内、皮下、静脈内、動脈内、脾臓内、結節内 (intranodal)、腫瘍内または鼻腔内方法によって投与される。

10

【 0 0 2 5 】

別の態様において、胚源から得られるまたは哺乳動物からの体細胞の再プログラム化によって得られる哺乳動物の多能性幹細胞の有効量、および所望により、ワクチンに対する免疫応答を増強するためのアジュバントまたは免疫学的薬剤を含む熱的に安定なワクチン組成物が提供される。1つの変形において、熱的に安定なワクチンまたは熱安定なワクチンは、コールドチェーン保存を必要としない保存を可能にし、コールドチェーン保存能力がないかまたは限定された領域でのワクチンの容易な導入を可能にする。1つの変形において、ワクチンは、グリコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール 300 およびグリセリン、またそれらの混合物の有効量（例えば、0.01% から 1% w t / w t、0.05% から 0.5% w t / w t、0.05% から 1% w t / w t、または 0.01% から 0.5% w t / w t のおよその範囲）をさらに含む。別の変形において、ワクチンは、標準の液体製剤または噴霧乾燥製剤のいずれかとして、約 35 で最大 6 か月、最大 12 か月、最大 24 か月、または最大 36 か月間安定である。

20

【 0 0 2 6 】

ワクチンの乾燥方法の1つの局面は、噴霧乾燥方法を含む。噴霧乾燥方法は、例えば、高圧ノズルから噴霧する方法、または当分野で知られている噴霧器などの遠心力を使用することによる方法を含んでよい。噴霧乾燥のために使用することができるガスまたは空気は、所望の含水量を有するワクチン粉末を乾燥させるのに十分な温度での加熱空気または熱風を含む。1つの局面において、ガスは、窒素または窒素富化空気などの不活性ガスである。

30

【 0 0 2 7 】

1つの局面において、高温ガス温度は、約 30 から 50 、 30 から 60 、 30 から 70 、または約 30 から 100 であってよい。高圧ノズルで使用されるプロセス中のスプレーのために使用することができる高圧は、約 10 から 1,000 p s i、100 から 800 p s i または 200 から 500 p s i を含んでよい。噴霧乾燥は、乾燥ワクチンの残留水または残留水分含有量が約 1% から約 6%、1% から 5%、2% から 6%、3% から 6% または約 3% から 5% に制御されることができるとような条件下で実施されてよい。

40

【 0 0 2 8 】

1つの局面において、エマルジョンは、次に、商業的供給者、例えば B u c h i、N i r o、Y a m a t o C h e m i c a l C o.、O k a w a r a K a k o k i C o. からの慣用の噴霧乾燥装置、および同様の市販のスプレードライヤーにおいてスプレー乾燥されてよい。噴霧乾燥プロセス、例えば回転噴霧、圧力噴霧および二流体噴霧もまた使用されてよい。これらのプロセスで使用されるデバイスの例は、P a r u b i s u M i n i - S p r a y G A - 3 2 および P a r u b i s u S p r a y D r i e r D L - 4 1 (Yamato Chemical Co.) または S p r a y D r i e r C L - 8、S p r a

50

y Drier L - 8、Spray Drier FL - 12、Spray Drier FL - 16またはSpray Drier FL - 20、(Okawara Kakoki Co.)を含み、ロータリーディスク噴霧器を使用する噴霧乾燥方法のために使用されてよい。本願の粉末を生成する噴霧器のノズルは、例えば、ノズルタイプ1A、1、2A、2、3(Yamato Chemical Co.)または同様の市販のノズルを含んでよく、上記スプレードライヤーのために使用されてよい。加えて、ディスク型MC - 50、MC - 65またはMC - 85(Okawara Kakoki Co.)が、スプレードライヤー噴霧器の回転ディスクとして使用されてよい。

【0029】

別の局面において、乾燥プロセスから得られるワクチン粉末は、約5から1,000ミクロン、約10から500ミクロン、10から350ミクロン、20から250ミクロン、40から200ミクロン、または約50から150ミクロンの範囲の平均粒子サイズを有する粒子の1重量%、5重量%、7重量%、10重量%、20重量%、30重量%、40重量%、50重量%またはそれ以上を含んでよい。1つの局面において、乾燥プロセスから得られる粉末は、50から150ミクロンの平均粒径を有する粒子の約1%から10重量%を含む。

10

【0030】

ワクチン組成物の別の局面において、多能性幹細胞は人工多能性幹細胞(iPSC)である。ワクチン組成物の別の局面において、哺乳動物の多能性幹細胞は未分化多能性幹細胞である。ワクチン組成物の別の局面において、幹細胞は、繊維芽細胞、ケラチン生成細胞、末梢血細胞および腎上皮細胞からなる群から選択される。

20

【0031】

ワクチン組成物のさらなる別の局面において、アジュバントは、CpG、QS21、ポリ(ジ(カルボキシラートフェノキシ)ホスファゼン；リポ多糖類の誘導体、例えばモノホスホリルリピドA、ムラミルジペプチド(MDP；Rib i)、スレオニル-ムラミルジペプチド(t-MDP；Rib i)；OM-174；コレラ毒素(CT)、およびリーシュマニア伸長因子からなる群から選択される。

【0032】

1つの変形において、本願は、ワクチンでの患者のワクチン接種を含む、患者において癌の処置における使用のための製剤であって、ワクチンは、胚源から得られるまたは患者からの体細胞の再プログラム化によって得られる哺乳動物の多能性幹細胞の有効量を含み、ワクチン接種は、必要とする患者に哺乳動物の多能性幹細胞を投与する工程を含む、製剤を記載している。

30

【0033】

本明細書に記載の方法のそれぞれの1つの変形において、患者において癌を処置することにおける使用のためのワクチン接種であって、ワクチンは、胚源から得られるまたは患者からの体細胞の再プログラム化によって得られる哺乳動物の多能性幹細胞の有効量を含み、ワクチン接種は、必要とする患者に哺乳動物の多能性幹細胞を投与する工程を含む、ワクチン接種が提供される。別の変形において、ワクチンは、胚源から得られるまたは哺乳動物からの体細胞の再プログラム化によって得られる哺乳動物の多能性幹細胞の有効量、およびワクチンに対する免疫応答を増強するためのアジュバントまたは免疫学的薬剤を含む熱的に安定なワクチン組成物である。

40

【図面の簡単な説明】

【0034】

【図1】図1は、最大のB細胞応答を測定することによる最適なワクチン接種スケジュールの評価を示す表示である。

【0035】

【図2】図2は、マウスにおける乳癌および黒色腫の予防処置のインビボ有効性を示す表示である。

【0036】

50

【図3】図3は、予防ワクチン接種が、d L Nにおける抗原提示の増加および後のd L Nおよび脾臓におけるエフェクター/メモリーT細胞応答をもたらすことを示す表示である。

【0037】

【図4】図4は、インビトロならびに乳癌の同所性腫瘍モデルにおけるインビボでのC + Iワクチンの腫瘍特異的特性を示す表示である。

【0038】

【図5】図5は、T I Lが、B細胞およびC D 4 + T細胞抗腫瘍応答を有する炎症誘発性表現型を示すことを示す表示である。

【0039】

【図6】図6は、C + Iワクチン接種が、ワクチン特異的T細胞クローンの上方調節および腫瘍拒絶のポジティブコントロールグループと同様に全身性免疫プロフィールをもたらすことを示す表示である。

【0040】

【図7】図7は、腫瘍切除後のアジュバントワクチン接種が、きれいなR Aおよび癌細胞を標的とする免疫系の再活性化をもたらすことを示す表示である。

【0041】

【図8】図8は、A) P B S、C p Gおよびi P S CプラスC p Gワクチンとしての組織の相対的効果；B) i P S C + C p GワクチンがP B M CにおけるI L - 2 + C D 4 5 + 細胞を増加させた、およびi P S C + C p Gワクチンが脾臓におけるエフェクターメモリーC D 8 + T細胞を増加させた；C) 脾臓癌細胞刺激の72時間後のi P S Cワクチンの刺激を受けた(primed) P B M C増殖の結果を示すグラフ的および説明的表示を含む。

【発明を実施するための形態】

【0042】

発明の詳細な説明：

図1．最大のB細胞応答を測定することにより最適なワクチン接種スケジュールを評価すること。(a) 非特異的M E F結合における有意な増加なしで、D B 7へのI g G結合%により評価されるように、最適なワクチン接種は、C + Iワクチン接種の毎週で4週間に設定された(n = 3 コントロール動物、n = 4 i P S Cの刺激を受けた動物、n = 4 C + Iの刺激を受けた2週、およびn = 4 C + Iの刺激を受けた4週動物、平均 ± s . e . m .、T u k e yの多重比較試験を伴うA N O V A)。(b) 胚性繊維芽細胞、i P S CおよびD B 7癌細胞へのP B S 4週、i P S C 4週、C + I 2週、またはC + I 4週のワクチン接種したマウスの血清I g G結合の典型的なF A C Sプロット。分化した細胞に対するコントロールサンプルとして、部分的に分化した細胞培養を分析に含めた。このことは、I g G陽性および陰性細胞により示され、I g G結合が分析された細胞の未分化部分に特異的であることを示した。C + I 4週のワクチン接種したマウスは、D B 7乳癌細胞への最も良いI g G結合を示した。(c) ワクチン製造が多能性についてマウスi P S Cを選別すること、照射、アジュバント溶液の再懸濁、および脇腹、部位1から4における皮下注射からなることを示す概要。

【0043】

図2．マウスにおける乳癌および黒色腫の予防処置のインビボ有効性。(a) C + IワクチンでのF V Bマウスのワクチン接種は、4週間までに10匹のマウスのうち7匹において癌細胞の完全な拒絶およびD B 7腫瘍サイズにおいて全体的な低下をもたらした(n = グループあたり10)。(b, c) Aに示されているデータの定量化。C + IワクチンでのC 5 7 B L / 6マウスのワクチン接種は、2週までに侵襲性B 1 6 F 0黒色腫細胞系によって開始された黒色腫サイズの有意な低下をもたらした(n = 8 P B S、n = 9 i P S Cで刺激を受けた、n = 10 C p Gで刺激を受けた、およびn = 9 C + Iで刺激を受けた)。(d) パネルCに示されている腫瘍サイズデータの定量化。平均 ± s . e . m .として示されるbおよびdにおけるデータ、T u k e yの多重比較試験を伴うA N O V A、* p < 0 . 0 5、* * p < 0 . 0 0 1、* * * p < 0 . 0 0 1、* * * * p < 0 .

10

20

30

40

50

0001)。

【0044】

図3．予防ワクチン接種は、dLNにおける抗原提示の増加および後のdLNおよび脾臓におけるエフェクター/メモリーT細胞応答をもたらす。(a) B16F0導入の2週間後、iPSCおよびC+Iワクチン接種したマウスは、C+Iのワクチン接種したマウスの末梢血において制御性T細胞(CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺)のパーセンテージの有意な低下およびエフェクター/メモリーヘルパーT細胞(CD4⁺CD44⁺)における増加を示した。この時点で、エフェクター/メモリー細胞傷害性T細胞(CD8⁺CD44⁺)の限定された上方調節のみが見られた。(b) C+IグループにおけるdLNは、エフェクター/メモリーヘルパーT細胞の有意により高いパーセンテージおよび(c) 10 成熟抗原提示細胞(APC)、例えばマクロファージ(CD11b⁺F4/80⁺MHC-II⁺CD86⁺)および樹状細胞(CD11c⁺MHC-II⁺CD86⁺)による抗原提示の増加を有した。(d) C+Iのワクチン接種したFVBマウスは、DB7導入の4週間後に脾臓において活性化細胞傷害性T細胞(CD8⁺グランザイム-B⁺)のパーセンテージの増加を示した。(e) これらのマウスのdLNは、成熟抗原提示マクロファージならびに(f) エフェクター/メモリーヘルパーT細胞および細胞傷害性T細胞の頻度の増加を示した。(n = グループあたり5、平均 ± s.e.m.、Tukeyの多重比較試験を伴うANOVA、* p < 0.05、** p < 0.001、*** p < 0.001、**** p < 0.0001)。

【0045】

図4．インビトロならびに乳癌の同所性腫瘍モデルにおいてインビボでのC+Iワクチンの腫瘍特異的特性。(a) iPSC溶解物およびDB7溶解物への暴露時にCpG単独(ビヒクル; n = 4)グループと比較して、C+Iのワクチン接種したグループ(iPSCのワクチン接種した; n = 6)において脾細胞の免疫細胞活性化のためのデュアルELISPOtアッセイ(赤色: グランザイム-、青色: IFN-) (図S4A、Bも参照)。 20 (b) ビヒクルグループと比較してC+Iのワクチン接種したグループにおいてIFN-スポットの数の有意な増加。(色の違いに基づいてAdobe Photoshopソフトウェアにより計算されたスポット。*** p < 0.001、スチューデントのt検定)。(c) 腫瘍接種後3週間で乳癌の同所性腫瘍モデルにおいてビヒクルマウスと比較してC+Iワクチン接種したマウスにおいて腫瘍容積の典型的なイメージ。(d) 養子移入後3週間で乳癌の同所性腫瘍モデルにおいてビヒクルマウスと比較してC+Iワクチン接種したマウスからの脾細胞の養子移入を受けた後で腫瘍を有するマウスにおいて腫瘍容積の典型的なイメージ。(e) パネルCからの結果の定量化は、3週間の経過にわたって乳癌の同所性腫瘍モデルにおいてビヒクルマウスと比較してC+Iワクチン接種したマウスにおいて腫瘍容積の有意な低下を示す。(f) ビヒクルのワクチン接種したマウスからの脾細胞を受けるマウス(n = 8)と比較してC+Iのワクチン接種したマウス(n = 7)からの脾細胞の養子移入後の3週間の経過にわたってパネルDから腫瘍を有するマウスにおける腫瘍容積の有意な低下(*** p < 0.001、一元配置分散分析)。

【0046】

図5．TILは、B細胞およびCD4⁺T細胞抗腫瘍応答を有する炎症誘発性表現型を示す。(a) 2 × 10⁶ AC29(A)中皮腫細胞がCpG+iPSC(C+I)のワクチン接種したマウス(n = 5)において注射された1週間後、このC+I/AグループにおいてTILは、CyTOFデータのSPADE分析により評価されるように、PBS(P)のワクチン接種したマウス(n = 5; P/Aグループ)と比較して、エフェクター/メモリーCD4⁺およびCD8⁺細胞の頻度の増加およびT-reg数の低下を示した。 40 ポジティブコントロールグループ、C+Iのワクチン接種したおよびCpG+AC29(C+A)のワクチン接種したマウスは、それぞれ、単球およびマクロファージおよび間質細胞の後に強化される存在と共に、iPSC(n = 5; C+I/I)およびAC29細胞(n = 5; C+A/A)を完全に拒絶した。(b) CyTOFデータのCitrus分析は、C+IマウスにおけるB細胞およびヘルパーT細胞クラスターにおいてIL-2、I 50

L - 4、および I L - 5 のより高いレベルが、腫瘍内の免疫応答に關与することが明らかになった。

【 0 0 4 7 】

図 6 . C + I ワクチン接種は、ワクチン特異的 T 細胞クローンの上方調節および腫瘍拒絶のポジティブコントロールグループと同様に全身性免疫プロフィールをもたらす。(a) 腫瘍細胞導入後 1 週間での異なる処置グループからの血清の L u m i n e x 分析は、P B S コントロールマウス (P B S / A C 2 9) と比較して陽性コントロールマウス (C + I / i P S C、C + A / A C 2 9) において全身性サイトカインの有意に低い存在を示す。C + I / A C 2 9 グループは、陽性コントロールサンプルと同様の傾向に従う (C + I / i P S C および C + A / A C 2 9、T u k e y の多重比較試験を伴う A N O V A、* p < 0 . 0 5、** p < 0 . 0 0 1、*** p < 0 . 0 0 1)。 (b) C + I ワクチン接種したマウス (C + I 1 から C + I 5 / A C 2 9) 中、T I L 内でより良いユニークなワクチン関連分散 (variance) があつたが、一方、P B S ワクチン接種したマウス (P B S 1 から 5 / A C 2 9) は、リンパ球器官に一般的に存在する T 細胞中でより高い均一性を証明した (図 S 6 C - D)。

10

【 0 0 4 8 】

図 7 . 腫瘍切除後のアジュバントワクチン接種は、きれいな (clean) R A および癌細胞を標的とする免疫系の再活性化をもたらす。(a) R 1 腫瘍切除を受けた B 1 6 F 0 腫瘍を有するマウスは、異なる処置グループにランダム化され、4 週間 C + I、C p G、または P B S のいずれかで毎週ワクチン接種された。(b) 切除領域 (R A) における皮膚生検 (*) からの D N A は、d d P C R により評価されるように、C + I ワクチンでの 4 回のワクチン接種ラウンド後に腫瘍細胞のパーセントにおいて有意な低下を示した。(c) 腫瘍切除後のワクチン接種は、T h 1 7 細胞 (C D 4 + C D 6 2 L + T C R - b + (I L - 2 / I L - 1 7 A) ; C D 4 + C D 6 2 L + C D 4 4 + T C R - b + (I L - 1 7 A)) の低下および T N F - を発現する骨髓細胞 (C D 1 1 b + C D 4 4 + G R 1 ^{h i} (T N F - a)) および I L - 4 を発現する C D 1 9 + C D 6 2 L + C D 4 4 + B 細胞の存在の増加をもたらした (n = 8 P B S、n = 1 0 C p G、n = 1 0 C + I、平均 ± s . e . m .、T u k e y の多重比較試験を伴う A N O V A、* p < 0 . 0 5)。S Q : 皮下注射。

20

【 0 0 4 9 】

組成物および方法は、多能性ベクター (M I P) の産生、このベクターでの i P S C の産生、癌ワクチンを確立するおよび予防的および治療的に対象をワクチン接種するために提供される。

30

【 0 0 5 0 】

本願明細書において使用される癌ワクチンは、癌細胞を標的とすることに同じ宿主の免疫系を刺激する (prime) ためにアジュバントと組み合わせたの宿主の多能性幹細胞の使用である。

【 0 0 5 1 】

宿主は、一般的に、ヒト、イヌ、ネコ、またはウマを含むがこれらに限定されない哺乳動物である。実験動物、例えば齧歯動物は、癌選択試験、エピトープスクリーニングおよびメカニズム試験のために興味あるものである。より大きな動物試験、例えばブタおよびサルが、安全性試験のために興味があるものである。

40

【 0 0 5 2 】

発明の目的のために、多能性細胞は、レシピエントに対して自己、同種異系または異種のものであってよい。

【 0 0 5 3 】

「処置」は、治療的処置および予防的または防止的処置の両方を指す。処置を必要とするものは、障害をすでに有するものならびに障害が予防されるべきであるものを含む。別の態様において、任意の状態または障害の「処置する」または「処置」は、1 つの態様において、予防的にを含む、対象に存在する状態または障害を改善することを指す。別の態

50

様において、「処置する」または「処置」は、対象によって識別不可能であってよい、少なくとも1つの物理的パラメータを改善することを含む。さらに別の態様において、「処置する」または「処置」は、物理的に（例えば、識別可能な症状の安定化）または生理学的に（例えば、物理的パラメータの安定化）のいずれかまたは両方で、状態または障害を調節することを含む。さらに別の態様において、「処置する」または「処置」は、状態または障害の発症を遅延させることを含む。さらに別の態様において、「処置する」または「処置」は、状態（例えば、疼痛）または状態（例えば、癌）の1つ以上の症状（例えば、疼痛）のいずれかの低下または除去、または状態または状態の1つ以上の症状の進行を遅らせること、または状態または状態の1つ以上の症状の重症度を低下させることを含む。さらに別の態様において、「処置する」または「処置」は、予防的に本願明細書に記載されているワクチンを投与することを含む。

10

【0054】

処置の目的のための「哺乳動物」は、ヒト、家畜および農業用動物、および動物園、スポーツ、またはペット動物を含む哺乳動物に分類される任意の動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを指す。1つの局面において、哺乳動物はヒトである。

【0055】

「多能性」および多能性幹細胞によって、このような細胞が成体生物体において細胞の全ての型に分化する能力を有することが意味される。「人工多能性幹細胞」なる用語は、胚性幹細胞（ESC）のように、生物体において細胞の全ての型に分化する能力を維持しながら長期間にわたって培養することができるが、ESC（胚盤胞の内部細胞塊に由来する）とは異なり、分化した体細胞、すなわち、より狭いより定義された可能性を有し、実験的操作の非存在下で、生物体において細胞の全ての型を引き起こすことができなかった細胞に由来する、多能性細胞を含む。「iPSCになる可能性を有する」によって、分化した体細胞が、iPSCになるように誘導されることができる、すなわち、それになるように再プログラム化されることができることが意味される。言い換えれば、体細胞は、多能性細胞の形態学的特性、増殖能および多能性を有する細胞を確立するように再分化するために誘導させることができる。iPSCは、大きな核-細胞質比、明確な境界および顕著な核小体を有する平らなコロニーとして増殖する、ヒトESC様形態を有する。加えて、iPSCは、アルカリホスファターゼ、SSEA3、SSEA4、Sox2、Oct3/4、Nanog、TRA160、TRA181、TDGF1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、Cyp26a1、TERTおよびzfp42を含むが、これらに限定されない、当業者によって知られている1つ以上の重要な多能性マーカーを発現する。加えて、多能性細胞は、奇形腫を形成することができる。加えて、それらは、生体における外胚葉、中胚葉、または内胚葉組織を形成またはに寄与することができる。

20

30

【0056】

体細胞は、3、4、5、6またはそれ以上の因子の組合せで、胚性幹細胞（ESC）から明らかに区別することができない状態に脱分化した/再プログラム化することができる；これらの再プログラム化された細胞は、「人工多能性幹細胞」（iPSC、iPC、iPSC）と称され、種々の組織から生産することができる。

【0057】

ワクチンはまた、アジュバントを含んでよい。ワクチンにおいて有用なアジュバントは、当業者によく知られており、したがって、適当なアジュバントの選択は、本出願のレビュー時に当業者によって日常的に行われることができる。有用なアジュバントの例は、限定はしないが、完全および不完全フロイント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチドおよび油エマルジョンを含む。いくつかの態様において、ワクチンは、無菌で、パイロジェンフリーで、等張に製剤化される、および粒子フリーである注射可能な組成物である。注射可能な組成物に必要な純度の標準は、注射可能な組成物を調製するために使用される生産および精製方法と同様に、よく知られている。ワクチンは、当分野で知られている任意の手段により投与され得る。注射可能な医薬組成物は、非経腸的、すなわち、静脈内、皮

40

50

下および筋肉内に投与され得る。いくつかの態様において、ワクチン医薬組成物は、鼻腔内にまたは舌下または経口内組織への投与などにより口腔の組織に投与され得る。

【0058】

「幹細胞」なる用語は、それ自体を複製または自己複製するおよび種々の細胞型の分化細胞に発達することができる未分化細胞を指す。分裂を受ける幹細胞の産物は、元の細胞と同じ能力を有する少なくとも1つのさらなる細胞である。「幹細胞」なる用語は、胚性幹細胞および成体幹細胞、全能性細胞および多能性細胞、および自己細胞、ならびに異種細胞を包含することが意図される。幹細胞およびその培養物：多能性幹細胞は、あらゆる種類の組織（通常、胎児または前胎児組織などの胚組織）に由来する細胞であり、幹細胞は、適切な条件下で3つの胚葉の全て（内胚葉、中胚葉、および外胚葉）の誘導体である異なる細胞型の子孫を生産することができる特性を有する。これらの細胞型は、確立された細胞系の形態において提供されてよく、またはそれらは、初代胚組織から直接的に得られ、分化のために直ちに使用されてよい。NIHヒト胚性幹細胞レジストリー（NIH Human Embryonic Stem Cell Registry）においてリストされた細胞、例えばhESBG N - 01、hESBG N - 02、hESBG N - 03、hESBG N - 04（BresaGen, Inc.）；HES - 1、HES - 2、HES - 3、HES - 4、HES - 5、HES - 6（ES Cell International）；Miz - hES1（MizMedi Hospital-Seoul National University）；HSF - 1、HSF - 6（University of California at San Francisco）；およびH1、H7、H9、H13、H14（Wisconsin Alumni Research Foundation (WiCell Research Institute)）が含まれる。人工多能性幹細胞は、ウイルスまたは非ウイルスベクターを使用して多能性マーカー（OCT4、SOX2、c-MYC、NANOGおよびKLF4）を外因的に過剰発現し、それによりトランスフェクトされた細胞系に多能性を誘導することによって作成される。

10

20

【0059】

多能性幹細胞は、特定の系統に關与していない場合、未分化と考えられる。ESCは、特定の分化系統に關与していない場合、未分化と考えられる。このような細胞は、胚または成体起源の分化した細胞からそれらを区別する形態学的特性を示す。未分化ESCは、当業者によって容易に認識され、典型的には、高い核/細胞質比および顕著な核小体を有する細胞のコロニーにおける顕微鏡像の2つの次元に現れる。未分化ESCは、未分化細胞の存在を検出するためのマーカーとして使用され得る遺伝子を発現し、このポリペプチド産物は陰性選択のためのマーカーとして使用してよい。

30

【0060】

「処置する」または「処置」なる用語は、疾患または医学的状态、例えば癌を軽減、改善、逆転、緩和、進行の阻害、または予防することを指す。別の局面において、該用語はまた、予防、治療および治癒を含む。「処置」を受けている、または「処置」を受ける対象または患者は、癌に対するかかる処置を必要とする任意の哺乳動物、例えば霊長類、およびヒト、および他の哺乳動物、例えばウマ、ウシ、ブタおよびヒツジ；および家畜化された哺乳動物およびペットである。

【0061】

再プログラム化すること：MIP、またはMIPプラスミドの結果であると予期されるときと同様の癌ワクチン特性を産生する任意のベクターを使用して細胞を再プログラム化すること。

40

【0062】

興味ある体細胞は、限定はしないが、繊維芽細胞、血球、尿の細胞などを含む。

【0063】

アジュバント：アジュバントは、多能性幹細胞を標的とするために、レシピエントの免疫系の免疫学的応答を増強する免疫学的薬剤である。アジュバントは、本出願に記載されているものおよび多能性幹細胞を標的とするためにレシピエントの免疫系の免疫学的応答を増強するための当分野で知られているものを含む。「アジュバント」なる用語は、免疫応答を刺激することができる任意の物質または薬剤を指す。一部のアジュバントは、免疫

50

系の細胞の活性化を引き起こすことができる。例えば、アジュバントは免疫細胞にサイトカインを産生および分泌させることを引き起こすことができる。免疫系の細胞の活性化を引き起こすことができるアジュバントの例は、限定はしないが、本願明細書に記載されているナノエマルジョン製剤、Qサポナリアの木の樹皮から精製されたサポニン、例えばQS21、ポリ(ジ(カルボキシラートフェノキシ)ホスファゼン(PCPPポリマー; Virus Research Institute, USA); リポ多糖類の誘導体、例えばモノホスホリルリピドA(MPL; RibImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.)、ムラミルジペプチド(MDP; Ribi)およびスレオニル-ムラミルジペプチド(t-MDP; Ribi); OM-174(リピドAに関連するグルコサミン二糖類; OM Pharma SA, Meyrin, Switzerland); コレラ毒素(CT)、およびリーシュマニア伸長因子(精製されたリーシュマニアタンパク質; Corixa Corporation, Seattle, Wash.); またはそれらの混合物を含む。当分野で知られている他のアジュバントは、例えば、リン酸または水酸化アルミニウム塩を含んでよい。いくつかの態様において、例えば、本願発明の多能性幹細胞は、1つ以上のアジュバントと共に投与される。いくつかの態様において、使用されるアジュバントは、US2005158329; US2009010964; US2004047882; または米国特許第6,262,029号に記載されている。

【0064】

本願明細書において使用される、「免疫応答を増強(または誘導)するための有効な量」(例えば、免疫応答を誘導または増強するための組成物)なる句は、哺乳動物において免疫応答を刺激、産生および/または誘発するために必要な投与レベルまたは量(例えば、哺乳動物に投与されるとき)を指す。有効量は、本願明細書に記載されているように(例えば、同じか、または異なっている経路を介して)異なる期間にわたって1つ以上の投与において投与することができる。適用または投与は、特定の製剤または投与経路または期間に限定されることを意図していない。

【0065】

本願明細書において使用される、腫瘍関連抗原(TAA)または腫瘍特異的抗原(TSA)は、癌細胞上に存在する既知および未知の抗原/エピトープを指す。

【0066】

癌ワクチンでの最適な免疫応答は、多能性細胞上に存在するこれらのTAAおよびTSAを標的とするように宿主の免疫系を刺激し、TAAおよびTSAを発現する癌型に対する免疫を提供することである。

【0067】

既知のTAAおよびTSAは、限定はしないが、EPCAM、CEACAM、TERT、WNK2、サバイビン(survivin)など(全てOnco; Bushman Lab, University of Pennsylvania)を含む。

【0068】

ワクチン接種の方法:

癌ワクチンのための供給源としての多能性幹細胞は、例えば、ヒト、霊長類、ウマ、ウシ、ブタなどを含む任意の哺乳動物種、特にヒト細胞から得ることができる。

【0069】

多能性幹細胞は、安定な多能性幹細胞集団が形成されるまで、当分野で知られている標準方法を使用して、例えば支持細胞を含まない条件において増殖される。この集団は、磁気抗体選別(MACS)または蛍光抗体選別(FACS)を使用する多能性幹細胞選別により評価されるとき、>90%の純粋な多能性幹細胞パーセンテージを含むべきである。

【0070】

癌ワクチンのために使用される細胞投与量(1×10^6 から 1×10^9 の範囲)は、ワクチンが使用される哺乳動物に対して調整される必要がある。小さな齧歯動物において、ワクチンの有効性は、投与あたり 2×10^6 個の多能性幹細胞に設定された。

【0071】

多能性幹細胞は、注射部位での奇形腫形成を防ぐためにワクチン接種の前に照射される

べきである。この投与量は、細胞周期の阻止に対する多能性幹細胞の感受性または抵抗性にしたがって調整されるべきである。小さな齧歯動物、例えばマウスから産生される i P S C について、この投与量は、6 0 0 0 r a d (1 0 0 0 - 1 0 0 0 0 r a d の範囲) に設定された。

【 0 0 7 2 】

ワクチン接種の部位は、免疫系への適切な抗原提示を可能にするために皮下空間にあるべきである。ワクチンが配置されるべき位置は、対象の形態に基づいて変化される場合があるが、局所的な免疫抑制反応を回避するために、異なる注射部位で実施されるべきである。1つの態様において、方法は、4週間の経過にわたって合計で4週ラウンドのワクチン接種を行われてよい。別の態様において、方法は、毎日、週に数回、または2週間ごと

10

【 0 0 7 3 】

別の態様において、本願発明において多能性細胞はまた、それらの免疫原性特性を強化するために、またはそれらを、T S A および T A A を標的とする宿主の免疫応答を刺激することにおいてより適切にするために、遺伝的に改変させることができる。

【 0 0 7 4 】

小分子薬剤または生物学的化合物は、癌細胞に対する C + I の刺激を受けた免疫細胞の細胞傷害性の可能性を増加させるために C + I ワクチンと共に使用することができる。かかる分子薬剤または生物学的化合物は、例えば、ジプロボシム、P D - 1 または P D L - 1 インヒビターなどを含んでよい。

20

【 0 0 7 5 】

1つの態様において、アジュバントの治療投与量は、癌ワクチンのために使用されるアジュバントに依存するであろう。アジュバント C p G を使用する癌ワクチンの最初の説明において、投与量は、5 μ M の作業濃度に設定された。しかしながら、処置される哺乳動物および癌のタイプに依存して、アジュバントの10倍希釈または濃縮の係数、例えば 0 . 0 5 μ M、0 . 0 3 μ M、0 . 0 1 μ M ; または 1 0 μ M、3 0 μ M、または約 5 0 μ M の濃度を、使用することができる。そのようなガイドラインは、活性剤の分子量について調製され、特定の処置に対するアジュバントの有効性にも基づくことは、当業者に理解されるであろう。投与量はまた、ワクチンを受ける哺乳動物のタイプによって変化させてよい。

30

【 0 0 7 6 】

実験的

以下の実施例は、当業者に本願発明を作成および使用方法の完全な記載および説明を提供するように提示され、本願発明者らが発明と考えるものの範囲を限定することを意図せず、以下の実験が実施された全てまたは唯一の実験であることを表すことも意図していない。使用される数値(例えば、量、温度など)に対して正確性を保証するためように努力が払われたが、いくつかの実験誤差および偏差が考慮されるべきである。他に示されていない限り、部は重量部であり、分子量は重量平均分子量であり、温度は摂氏()であり、圧力は大気圧またはその付近である。

40

【 0 0 7 7 】

本願発明は、本発明を実施するための好ましいモードを含むように本発明者によって見出されたまたは提案された特定の態様に関して説明されている。本開示に照らして、本発明の意図された範囲から逸脱することなく、例示された特定の態様において多くの修飾および変更を行うことができることは、当業者に理解されよう。例えば、コドンの重複により、タンパク質配列に影響を与えることなく、基になる D N A 配列に変更を加えることができる。さらに、生物学的機能の同等性の考慮により、種類または量において生物学的作用に影響を与えることなく、タンパク質構造に変更を加えることができる。かかる修飾の全ては特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。

50

【 0 0 7 8 】

本願発明の実施において有用な一般的な技術のさらなる詳細について、実行者は、細胞生物学、組織培養および発生学における標準的な教科書およびレビューを参照することができる。組織培養とESCに関して、読者は奇形癌および胚性幹細胞に言及したいと思う可能性がある：実際のアプローチ (E. J. Robertson, ed., IRL Press Ltd. 1987) ; マウス開発における技術のガイド (P. M. Wasserman et al. eds., Academic Press 1993) ; インビトロでの胚性幹細胞分化 (M. V. Wiles, Meth. Enzymol. 225:900, 1993) ; 胚性幹細胞の特性および用途：ヒト生物学および遺伝子治療への適用の見通し (P. D. Rajhjen et al., Reprod. Fertil. Dev. 10:31, 1998) 。

【 0 0 7 9 】

分子および細胞の生化学における一般的な方法は、標準的なテキストブック、例えばMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001); Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999); Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996); Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999) ; Viral Vectors (Kapliff& Loewy eds., Academic Press 1995); Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997);およびCell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998) において見ることができる。本開示で言及される遺伝子操作のための試薬、クローニングベクター、およびキットは、商業的販売会社、例えばBioRad、Stratagene、Invitrogen、Sigma-AldrichおよびClontechから利用できる。

【 実施例 】

【 0 0 8 0 】

実施例 1 :

iPSCベースの癌ワクチン接種：癌に対する自己幹細胞ワクチン

我々は、自己由来のiPSCの免疫原性および腫瘍形成性特性を癌ワクチンに利用できるということを証明する。複数のマウス系統および複数の癌型を使用して、我々は、腫瘍の確立の完全阻害または腫瘍増殖の有意な低下のいずれかの、癌を標的とすることにおいて宿主の免疫系を刺激するためにiPSCを使用するインビトロおよびインビボ有効性を示す。したがって、本ワクチン接種方法は、腫瘍の確立の完全阻害または腫瘍増殖の有意な低下を提供する。

【 0 0 8 1 】

さらに、我々は、異なる段階での免疫応答に關与する免疫細胞の詳細な分析を提供する。我々はまた、腫瘍切除後のアジュバント免疫療法としてのワクチンの有効性を実証し、癌を標的とすることにおいて免疫系の再活性化をもたらし、切除領域から癌を除去する。

【 0 0 8 2 】

腫瘍確立および進行は、免疫系の監視を回避する高度に増殖性の低免疫原性細胞からなる。したがって、癌処置の分野における新しい手段は、癌を標的とすることにおいて免疫系を再活性化することに向けて追求されている。ある研究者たちは、有望な結果を有するキメラ抗原受容体(CAR)を使用することによってなし遂げようとしている。この治療の背後にあるアイデアは、癌特異的な抗原受容体を作成し、共刺激経路を組み込んでさえいるCARの最新の産生で、癌特異的な抗原受容体をエフェクター細胞、例えばT細胞に結合することである。しかしながら、結果は、恐らく標的化抗原の発現の喪失のために、患者の再発で変化しやすかった。これを回避する方法は、多数の腫瘍抗原は未だ未知であるが、新たな腫瘍特異的抗原を同定することであろう。

【 0 0 8 3 】

多能性幹細胞(PSC)および癌組織は、癌細胞と、既知の、しかしおそらくは未知の、TSAおよびTAAと共有し、したがって、癌を標的とする免疫系を刺激する潜在的な薬剤となる可能性がある。次に、この細胞は、標的化された癌型に似ている代理細胞型と

10

20

30

40

50

して機能するであろう。癌を標的とすることにおいて免疫系の刺激のための胚細胞の使用は、癌の種々のタイプの処置のための有効性および安全性を示すことに失敗しており、倫理的に負担のかかったESCおよびアジュバントとしてGM-CSFを過剰発現する遺伝的に修飾された細胞系の使用に依存している(Yaddanapudi et al., 2012)。これらの最新の構成要素は、これらの処置を臨床解釈に適さなくさせる。

【0084】

腫瘍ワクチン接種に成功することが証明されているFVB株iPSC(図S2A、D)およびアジュバントCpGを使用して(Gilkeson et al., 1998; Goldstein et al., 2011; Mor et al., 1997; Mukherjee et al., 2007)、我々は、CpG-iPSC(C+I)組合せでマウス乳癌(DB7)に対する効果的な免疫応答を観察した。手短に言えば、我々は、まず、CpGの効果および最適なワクチン接種スケジュールを確立した。我々は、2週間または4週間iPSCまたはC+IでFVBマウスを刺激し、C+I 4週間グループにおいてDB7腫瘍溶解物に対して最も強いインビトロT細胞応答を見出した(図S2E、F)。加えて、C+I組合せでの4週間のワクチン接種スケジュールは、DB7に対する最も高いIgG結合をもたらした(80.0 ± 3.4%)、したがって、後のワクチン接種ラウンドのために使用された(図1A、B)。

10

【0085】

ワクチン接種スケジュールを最適化した後、我々は、4つのグループ: 1)PBS、2)CpGのみ、3)iPSCのみ、および4)C+Iに分類して、40匹のFVBマウスのワクチン接種を進めた。週に1回のワクチン接種を4回行った後、 5×10^4 DB7癌細胞を皮下に注射し、腫瘍サイズをキャリパー測定を使用してモニターした。1週間後、全てのマウスが注射部位で同様の病変を示し、C+I処置マウスの10匹のうち7匹で退行し、他のグループにおいてより大きな腫瘍に進行した(図2A、B; 図S3A、B)。腫瘍接種の4週間後、グループあたり5匹のマウスを殺し、血液、脾臓、および流入領域リンパ節(dLN)の免疫プロフィールを分析した。グループあたり他の5匹のマウスは、最長1年間の長期生存試験に使用された。ほとんどが、実験終了後の最初の2週間で 1 cm^3 よりも大きい腫瘍サイズのために、殺した。しかしながら、C+I処置グループにおける2匹のマウスは、1年間生存し、実験の開始と同様にiPSCおよびDB7に対する抗体価を有し、再導入時に 5×10^4 の癌細胞を完全に拒絶することができた(図S3C、D)。iPSC由来の内皮細胞で刺激を受けたこの実験におけるコントロールマウスは、DB7細胞系に対するIgG応答を上昇することができず、それにより、FBS含有培地での培養条件が交差反応性または内因性マウス白血病ウイルス抗原に關与することができるという可能性を排除した。

20

30

【0086】

複数の癌型を標的とすることにおいて我々のワクチンの有効性を証明するために、実験は、C57BL/6マウス系統と同系の、黒色腫細胞系B16F0を使用して行った。C57BL/6 iPSCを産生し(図S2B、D)、40匹のマウスをPBS、CpG、iPSC、およびC+Iグループに再び分類し、4週間毎週処置した。この後に、 5×10^4 のB16F0細胞を腰に皮下注射した。キャリパー測定による腫瘍増殖評価は、C+Iグループにおいて2週目までに腫瘍進行の有意な低下を示した(図2C、D; 図S3E、F)。コントロールグループにおける腫瘍サイズが大きいため、腫瘍注射の2週間後にマウスを殺した。その後、血液、dLN、および脾臓における免疫細胞プロフィールを、フローサイトメトリーを使用して分析した。C+Iグループにおけるサイトメトリー分析は、C57BL/6マウスにおいて腫瘍注射後2週間で血液中の制御性T細胞(Treg)の有意な減少およびdLNにおけるエフェクター/メモリーヘルパーT細胞の増加(図3A、B)、ならびに成熟抗原提示細胞(APC)のパーセンテージの増加(図3C)を示した。

40

【0087】

腫瘍拒絶の後期(4週)で、C+Iのワクチン接種したグループにおいてFVBマウスは、dLNにおける頻度の増加に加えて、脾臓におけるエフェクター/メモリー細胞傷害

50

性T細胞の有意な増加を有した(図3D、F)。これらの細胞傷害性T細胞の腫瘍特異性は、DB7腫瘍溶解物に反応してC+Iワクチン接種したマウスから単離された脾細胞によるIFN- γ の増加した分泌によりさらに確認された(図4A、B、図S4A、B)。C57BL/6マウスと同様に、成熟APCおよびヘルパーT細胞の上方調節もまた、FVBマウスのdLNにおいて見られた(図S4C-F)。

【0088】

C57BL/6およびFVBマウス系統の両方は、試験を通して健常を維持し、ワクチンによる自己免疫性反応の兆候を示さなかった(図S7)。

【0089】

C+Iワクチンの有効性は、乳癌のより臨床的に関連性の高い同所性モデルで評価された。有意な腫瘍サイズの違いは、ビヒクルコントロールと比較してC+Iワクチン接種したマウスにおいて癌細胞の同所性転移の早ければ1週間後に見られ、次に、3週間の経過にわたってさらに腫瘍低下が見られる(図4C、E)。同所性乳癌マウスのさらなるグループを使用して、インビボ腫瘍特異性を、C+Iのワクチン接種したまたはビヒクルのワクチン接種したマウスからの脾細胞をこれらの腫瘍を有するマウスに養子移入することにより、試験した(図4D)。このことは、ビヒクルのワクチン接種したグループと比較してC+Iのワクチン接種したグループにおいて腫瘍サイズの有意な低下をもたらした(図4F)。

10

【0090】

予防処置のためのモデルとして、我々は、CBA/Jマウスと同系の中皮腫細胞系AC29を選択した。CBA/J iPSCを作製し(図S2C、D)、マウスを、PBS(P)、CpGおよびiPSC(C+I)、またはポジティブコントロールとして照射されたAC29癌細胞と共にCpG(C+A)で、毎週4週間ワクチン接種された。その後、 2×10^6 のAC29細胞(A)または 2×10^6 のiPSC(I)を皮下に注射し、1週間後、TILを免疫プロファイルおよびTCRシーケンスについて分析した。免疫プロファイリングを、表現型および細胞内染色キットを使用する飛行時間によるサイトメトリー(CyTOF)分析で行い、これは、P/Aコントロールと比較して(21.1%、14.2%および3.0%、各々)、エフェクター/メモリーCD4⁺(24.0%)およびCD8⁺T細胞(22.4%)の増加した存在と共に、C+I/AグループにおけるT-regの低下(1.9%)を示した(図5A)。Citrus(クラスター同定、特性化および回帰)分析を使用して、IL-2、IL-4、およびIL-5を発現するB細胞およびT細胞は、PBSコントロールグループと比較してC+Iワクチン接種したマウスにおいて腫瘍退縮を予測することが見いだされた(図5B;図S5A-B、D)。全身性サイトカインレベルは、ワクチン接種したグループにおいて有意に低下し、腫瘍拒絶の陽性コントロールマウスと相関することが見られた(C+I/iPSC; C+A/AC29)(図6A;図S6A-B)。

20

30

【0091】

PBSコントロールグループにおけるTCRシーケンシングは、胸腺および脾臓に一般的に存在するT細胞クローンの重複を明らかにした(図S6C)。対照的に、C+IグループにおけるTCRは、異なるマウス間でより様々であった。また、恐らくC+Iワクチンに対するマウス特異的応答に基づいて、胸腺においてクローンの頻度が一般的に低く、脾臓においてより類似した頻度であった(図6B;図S6D)。C+Iグループにおいて5匹のうち4匹のマウスで共有され、他のグループにおいて存在せず、およびナイーブなマウスにおいて極めてまれでもあるTCRクローンが1つあった。

40

【0092】

腫瘍切除後のアジュバント療法としてのワクチンの有効性を評価するために、我々は、次に、C57BL/6マウスの腰に 5×10^4 のB16F0腫瘍細胞を皮下注射し、2週間後に腫瘍をR2またはR1切除した。R2切除マウスは、C+Iワクチンを2回アジュバントラウンドを受けた後に切除領域(RA)に黒色腫の再発は見られなかったが、PBSコントロールをワクチン接種したマウスはRA内に腫瘍が見られた(図S7A)。

50

【0093】

4週間、C + I ワクチン (n = 10)、CpG (n = 10)、およびPBS (n = 8) でワクチン接種されたR1切除マウスにおいて(図7A)、dLNおよびRAを、B16F0黒色腫株を検出および定量するために設計された腫瘍特異的プライマーを使用して分析した(図S7B-G)。dLNにおける腫瘍負荷は、CpGのみおよびC + I ワクチングループの両方で低下し、腫瘍近くの注射で腫瘍の分解を誘導する強力なアジュバントとしてのCpGの効果を示した(図S7H)。ワクチン接種部位からより離れていると、C + I のワクチン接種したグループのみがRAにおいて腫瘍再発を有意に低下させた(図7B)。全身的に、これは、免疫系の再活性化、ならびにコントロールグループと比較してB16黒色腫促進Th17細胞の低下によって説明される(図7C; 図S5C、E)。

10

【0094】

方法の概要:

動物モデル。種々の実験のために(「CpG + iPSCワクチン製造および免疫化」および「癌細胞系および移植」のセクション参照)、若い成体メスFVB、C57BL/6 JおよびCBA/Jマウス(6-8週齢)を使用した。動物を異なる処置グループにランダムに割り当てた。1cm³より大きな腫瘍サイズ、目に見える苦痛、疼痛、または病気を含む健康状態が実験期限前に安楽死を必要としたとき、腫瘍を有するマウスを実験から除外した。全ての実験は、スタンフォード大学実験動物管理パネル(APLAC)によって承認された。

20

【0095】

繊維芽細胞からのマウスiPSCの産生。FVB、C57BL/6J、およびCBA/Jマウス(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine)からの繊維芽細胞を、20%ウシ胎児血清(FBS)および1x NEAA (ThermoFisher Scientific)を有するDMEM Glutamax (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA)において培養した。繊維芽細胞を、TrypLE Express (ThermoFisher Scientific)を使用して分離し、1x10⁶の繊維芽細胞をエレクトロポレーションバッファー(Neon system, ThermoFisher Scientific)に再懸濁した。細胞を、4つの再プログラム化因子Oct4、Sox2、c-Myc、およびKLF4を含む新規なコドン最適化ミニイントロンプラスミド(cōMIP)でトランスフェクトした(DDiecke S, Lu J, Lee J, Termglinchan V, Kooreman NG, Burr ridge PW, Ebert AD, Churko JM, Sharma A, Kay MA, Wu JC. Sci Rep. 2015 Jan 28;5:8081. doi: 10.1038/srep08081. PMID: 25628230)。トランスフェクション後、細胞を照射マウス胚フィーダー(MEF)細胞に播種し、15% FBS、1x NEAA、および10ng/ml マウス白血病阻害因子(mLIF; EMD Millipore, MA, USA)を含むDMEMで培養した。iPSCコロニーが現れ始めた後、これらを手動でつつき(picked)、新しいフィーダー層に移した。iPSCコロニーを増殖し、数回の継代後、0.2%ゼラチンコーティングプレートに移し、電磁ビーズ選別(Miltenyi, Germany)を使用してSSEA-1について分類し、純粋な未分化集団を維持した。特性化のために、多能性を評価するために、iPSCをOct4、Nanog、Sox2 (Santa Cruz, CA, USA)、SSEA1、およびc-Myc (EMD Millipore)について染色した。加えて、NOD-SCIDマウス(The Jackson Laboratory)の後肢において1x10⁶のiPSCの移植により、奇形腫アッセイを全てのiPSC系統で行った。全ての細胞系をマイコプラズマ汚染について試験し、陰性であることが見いだされた。

30

40

【0096】

CpG + iPSCワクチン製造および免疫化。マウスあたり、2x10⁶のSSEA-1で分類された同系マウスiPSCに注射前に6,000radを照射した。細胞を100μlの5μM CpG (Invivogen, San Diego, USA)に懸濁し、PBSに溶解し、1/4ccインスリンシリンジ(Terumo)にロードした。スタンフォード大学のAPLACのガイドラインに従って、マウスを誘導チャンパーに入れ、立ち直り反射がなくなるまで21/分の送達速度で100%酸素中2%イソフルラン(Isothesia, Butler Sche

50

in)で麻酔した。免疫化を、毎週注射部位を変更しながら、マウスの脇腹においてワクチンの皮下注射により行った。体重測定および全体的な外観の肉眼検査により、ワクチンに対する自己反応性の初期兆候について、マウスを毎週モニターした。ワクチン製造および投与量は、予防およびアジュバント処置実験について同じであった。

【0097】

癌細胞系および移植。乳癌系統DB7は、Dr. Joe Smith (University of Utah, USA)からの贈り物であった。FVBマウスに由来し、非転移性細胞株であった。B16F0黒色腫細胞系は、ATCC (Manassas, VA, USA)から購入され、C57BL/6マウスと同系である。それは、肺への低いリンパ系転移の可能性を有する。AC29中皮腫癌系は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)から購入された。全ての細胞系をマイコプラズマ汚染について試験し、陰性であることが見いだされた。癌系を、通常の培養条件下で、DMEM、10% FBSで増殖させた。C57BL/6およびFVBマウスについて、 5×10^4 の癌細胞を100 μ l PBSに再懸濁し、マウスの腰に皮下注射した。CBA/Jマウスに 2×10^6 の癌細胞を注入した。腫瘍増殖をキャリパー測定によって毎週評価した。試験の終わりに、腫瘍を外植し、流入領域リンパ節および肺組織の肉眼的検査を転移について実施した。

10

【0098】

IgG結合アッセイ。細胞をPBSで複数回洗浄し、ワクチン接種したマウスからの血清2 μ lを添加したFACSバッファー100 μ lに再懸濁し、4 で30分間インキュベートした。この後、細胞を複数回洗浄し、抗IgG FITC二次抗体 (ThermoFisher Scientific)と4 でさらに20分間インキュベートした。アイソタイプコントロールとして、マウスIgGおよびIgMにあらかじめ吸着されるIgG抗体を含んだ。次に、細胞をLSR-II フローサイトメーターを使用して分析した。

20

【0099】

飛行時間によるサイトメトリー (CyTOF)。上記方法にしたがって、外植した組織から免疫細胞を単離した。細胞を、マウス脾臓/リンパ節表現型検査キット、マウス細胞内サイトカインIパネルキットおよび生存能力色素シスプラチン (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA)で染色した。細胞を標準化ビーズを添加した1mlあたり $1 \times 10^5 - 1 \times 10^8$ の細胞の濃度でMaxPar水に再懸濁し、CyTOF2 (Fluidigm)マシンで実行した。データは、正規化ビーズを使用して正規化された。データを、Cytobankオンラインソフトウェアを使用して、密度正規化イベントのスパンニングツリー進行分析 (SPADE) (Mountain View, CA, USA)を使用して分析した。

30

【0100】

クラスター同定、特性化および回帰 (Citrus)。簡潔には、階層型クラスタリングおよび正規化回帰モデルに基づいて、Citrusは多次元データから層別クラスターおよび行動のリストを生成する。加えて、それは、これらのクラスターの機能 (例えば、細胞内サイトカイン)を説明し、新しく取得したデータまたは検証サンプルについての予測モデルを提供できる。これらのクラスターからの層別特徴は、x軸に中央表現 (median expression)としてプロットされている (図5B、7C; 図S5B)。CyTOFデータは、Cytobankを使用して分析され、生存可能な単一細胞についてゲート (gated)、その後、FCSファイルをCitrus 0.8からGUIにアップロードし、スクリプトをR (バージョン3.0.3)で実行した。B16F0腫瘍溶解物に暴露された脾細胞の分析のために、0.2% (567事象)の最小クラスタリングでの10,000のサンプリング事象でCitrus分析を行った。TILのために、Citrus分析は、500事象最小クラスタリングでの1,000サンプリング事象に基づいた。クラスタリング特徴は、25未満の制約された (constrained) cv.minおよびcv.fdr.で見いだされた。

40

【0101】

CDKN2Aにおける大きなゲノム欠失のPCR検出。プライマーは、B16黒色腫細胞系のCDKN2Aにおける大きな欠失の接合部を検出するように設計された (図S1E

50

)。各 25 μ l PCR 反応溶液は、1.25 ユニットの PrimeSTAR (登録商標) GXL DNA ポリメラーゼ (Clontech) および DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) により抽出された 50 - 100 ng のゲノム DNA を含んだ (図 S7C)。次に、PCR 産物を Sanger シーケンシングにより分析し、NCBI において遺伝子データベースでアラインした (図 S7D)。

【0102】

デジタルドロップレット PCR (ddPCR) による黒色腫の腫瘍負荷の定量化。プライマーおよびプローブを、B16 黒色腫細胞系に特異的である 3 SNP (赤色で着色された) を検出するように設計した。DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を使用して、R1 腫瘍切除の 4 週間後に C57B/6 マウスの腫瘍切除領域および dLN から DNA を抽出した。各 ddPCR 反応溶液を、40 から 50 ng の DNA テンプレートおよび dUTP なしの Probe 用の ddPCR (商標) Supermix (BioRad) を使用して 20 μ L の最終容量に再構成した。それぞれのサンプルを、2つのプローブ: 腫瘍負荷を評価するための MT プローブ、および細胞量を評価するための TaqMan (登録商標) Copy Number TFRC プローブ (Mm00000692_cn, ThermoFisher) を使用することによって定量化された (図 S7E、F)。最終的なプライマーおよびプローブ濃度は、それぞれ 900 nM および 250 nM であった。液滴形成は、20 μ L の PCR 反応溶液を有する QX100 液滴発生器を使用して行われた。ゴム製ガスをカートリッジ上に置き、液滴発生器に装填した。次に、エマルジョン (容量 ~ 35 μ l) を、マルチチャンネルピペットを使用して、96-Well twin.tec (商標) PCR Plates (Eppendorf) にゆっくりと移した。次に、プレートホイルでヒートシールし、エマルジョンを、62.5 のアニーリング温度で製造業者のプロトコールにしたがってエンドポイントまで循環させた。次に、サンプルを BioRad QX100 リーダーを使用して読み取った。標準曲線を 0%、1%、5%、10%、25%、50%、75%、90%、95%、99%、および 100% を含む腫瘍負荷の異なる量について作成し、一次回帰式を各 DNA サンプルの腫瘍負荷を定量化するために利用した (図 S7G)。以下は、腫瘍負荷を検出するためのプライマーおよびプローブの配列である:

フォワードプライマー、5' ACTAGCCAGAGGATCTTAAAGACT3' ;
 リバースプライマー、5' GCCATCACTGGAAAGAGAGGC3' ;
 変異体プローブ、5' (HEX) CCTGCCACCCACTCCCCCTTTT (Blackhole Quencher) 3' ; (赤色が変異体特異的対立遺伝子を示す)。

【0103】

T 細胞受容体 (TCR) シーケンシング。A29 腫瘍が浸潤している TIL からの DNA を、DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) を使用して単離した。サンプルを、検査レベル TCR シーケンシングのための Adaptive Biotechnologies (Seattle, WA, USA) に提出した。提出されたサンプルからの最小 DNA 含有量は、1.8 から 2.0 の DNA 品質 A260/280 でサンプルあたり 150 ng であった。データ分析ならびにサンプル間の TCR クローン性の評価は、Adaptive Biotechnologies と共同で行われた。それぞれのサンプル内の TCR クローンのリストおよび DNA サンプル内でのそれらの頻度が提供された。T 細胞重複検索のために、2つのサンプルグループにおいて 4 または 5 のサンプルに出現するクローンのアミノ酸配列を比較した。C+I 処置グループおよび PBS コントロールグループからのデータは、同様の平均生産的なユニーク値 (PBS: 3582.2、CI: 3005.4) と同等に判断された。

【0104】

ELISPOT アッセイ。脾細胞 (5×10^5) を前記のように単離し、37 時間 iPS C または DB7 溶解物のいずれか (35 μ g) と共培養し、その後、グランザイム - および IFN- の分泌を製造業者の指示 (cat# ELD5819、R&D Systems、Diaclone) にしたがって Enzyme-Linked Immuno

【 図 1 C 】

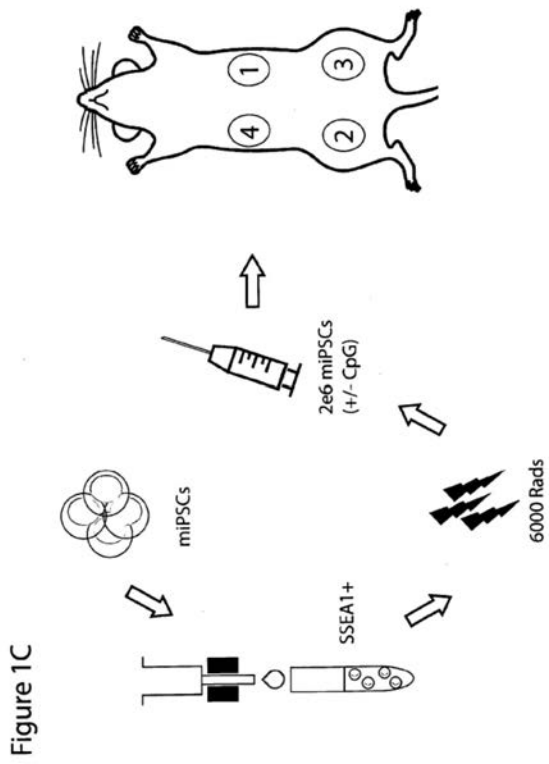
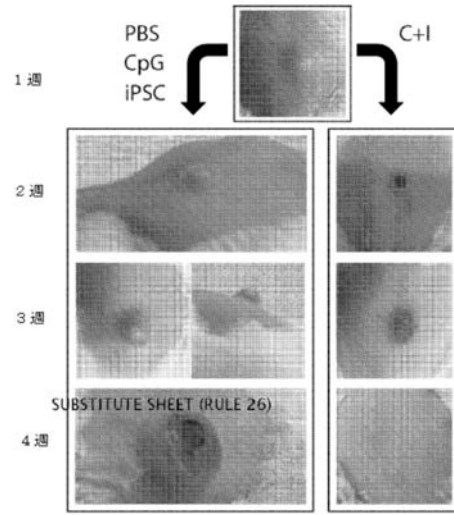


Figure 1C

【 図 2 A 】

Figure 2A



【 図 2 B 】

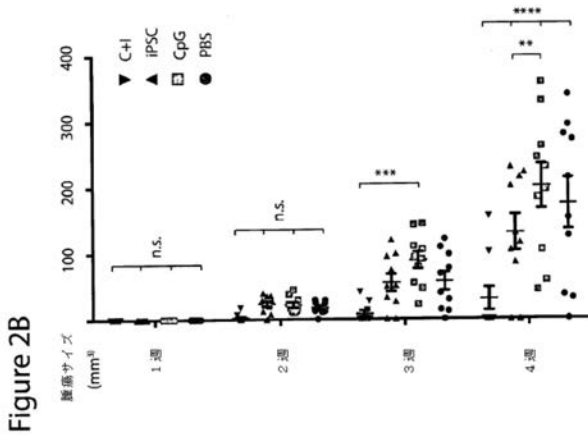


Figure 2B

【 図 2 D 】

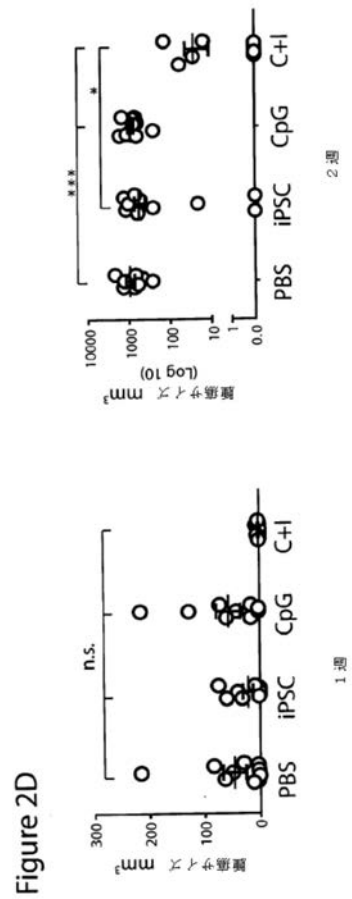


Figure 2D

【 図 2 C 】

Figure 2C

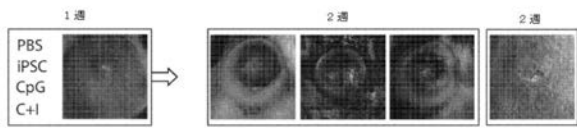
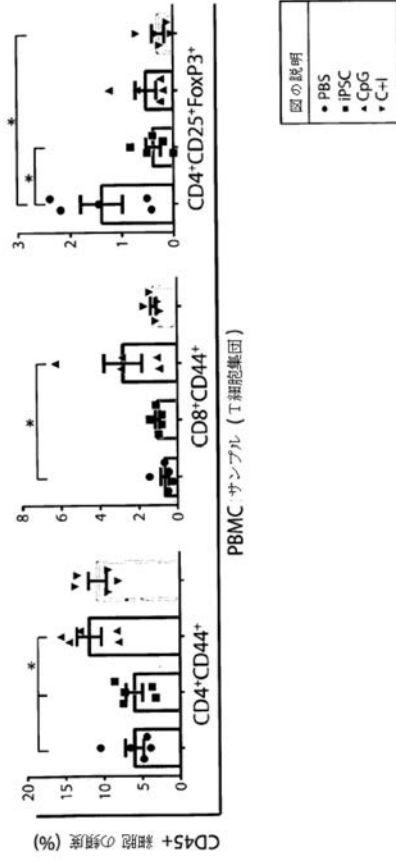


Figure 2C

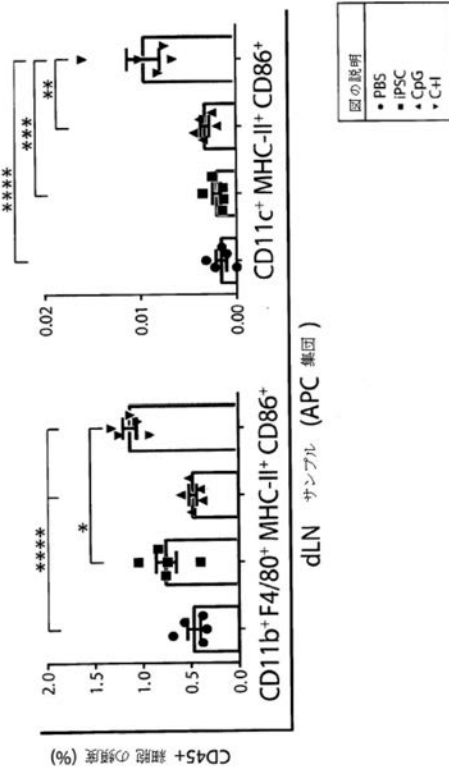
【 図 3 A 】

Figure 3A



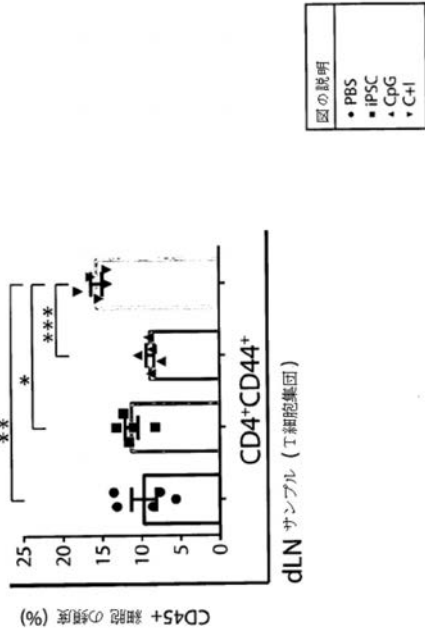
【 図 3 C 】

Figure 3C



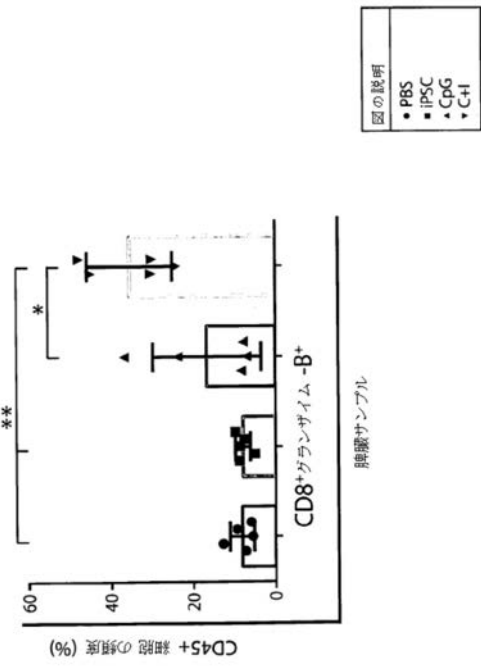
【 図 3 B 】

Figure 3B

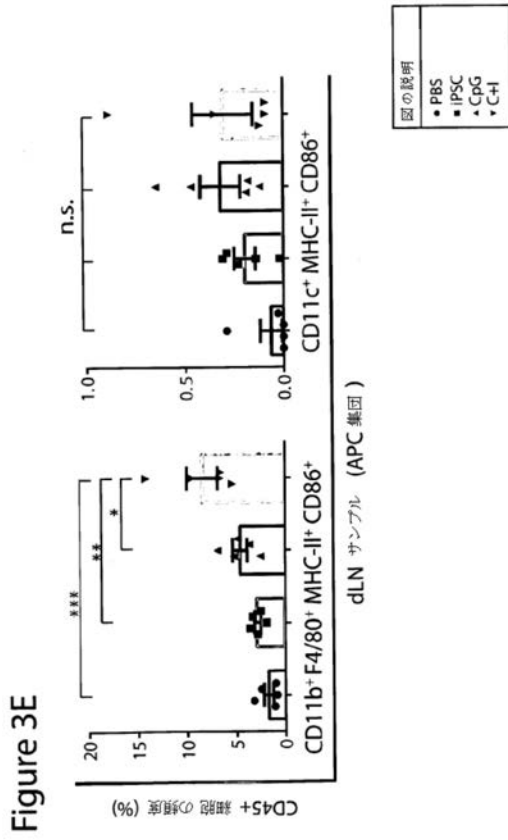


【 図 3 D 】

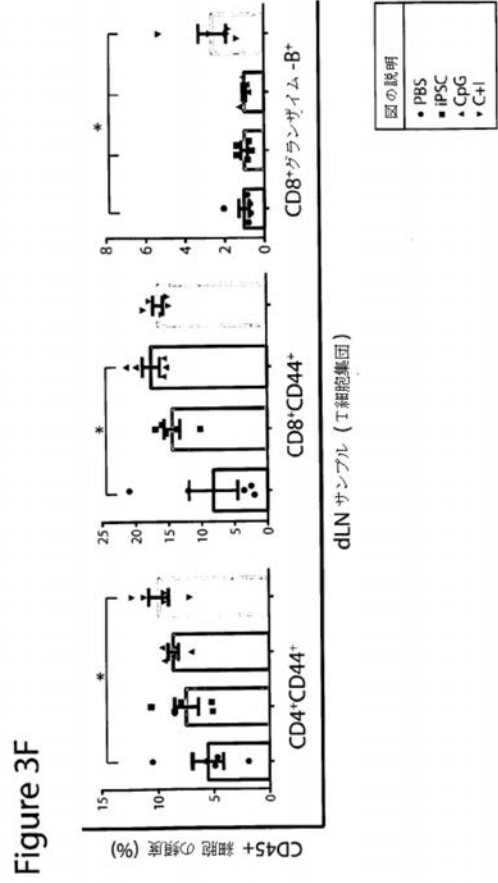
Figure 3D



【 図 3 E 】

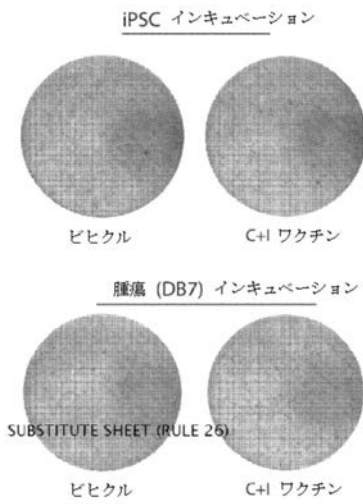


【 図 3 F 】



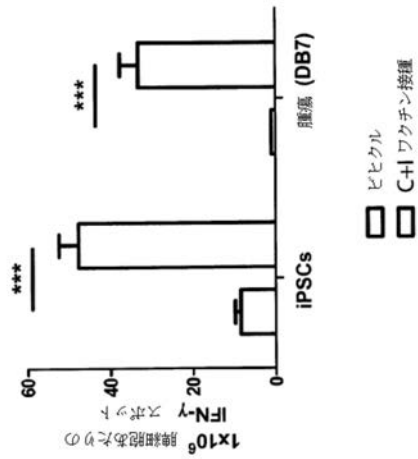
【 図 4 A 】

Figure 4A



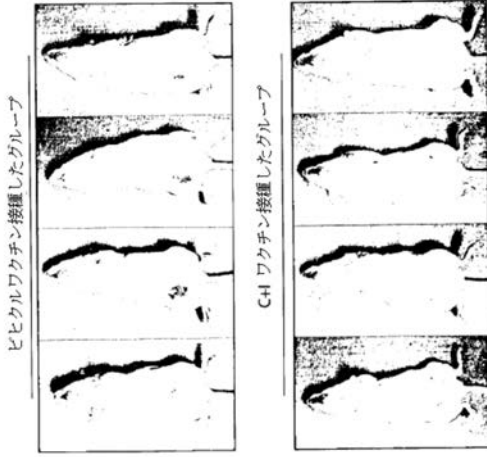
【 図 4 B 】

Figure 4B



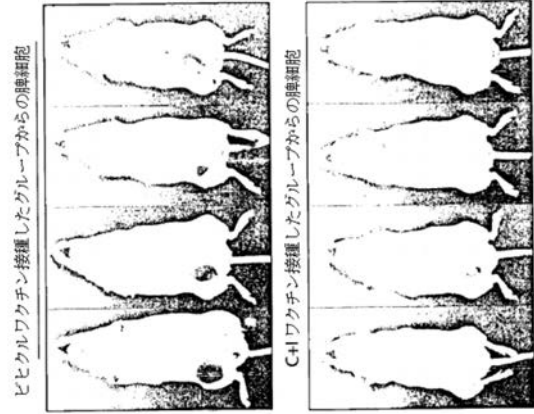
【 図 4 C 】

Figure 3C



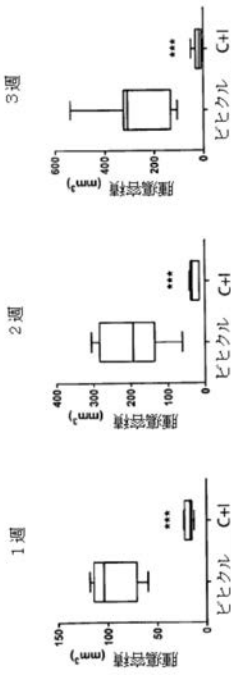
【 図 4 D 】

Figure 4D



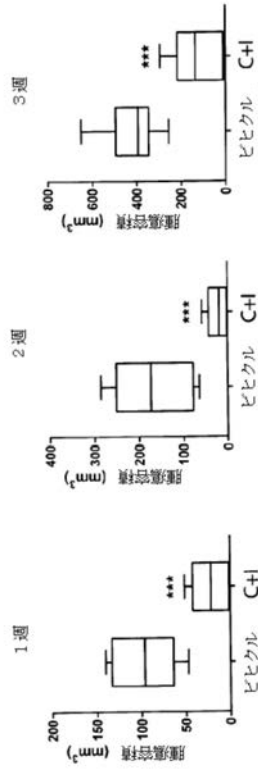
【 図 4 E 】

Figure 4E



【 図 4 F 】

Figure 4F



【 図 5 A 】

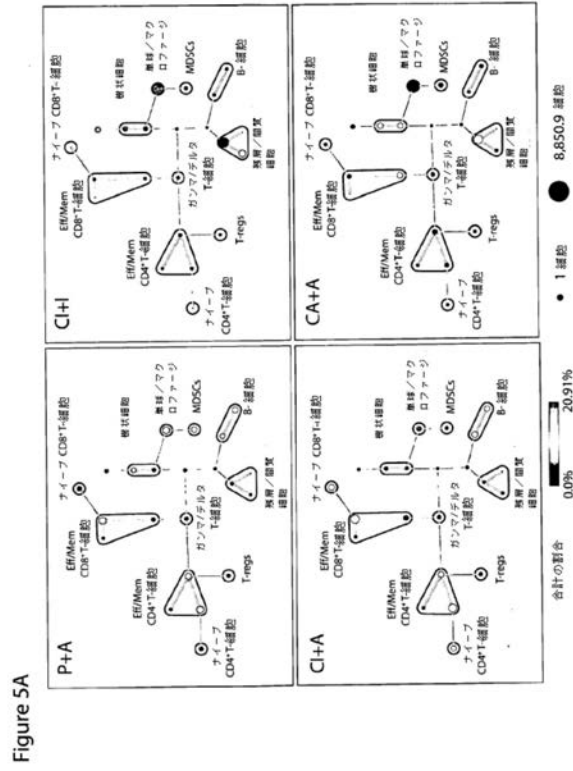


Figure 5A

【 図 5 B 】

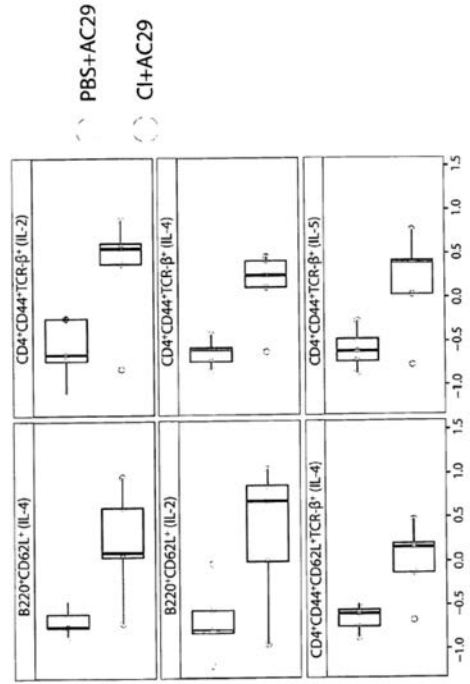


Figure 5B

【 図 6 A 】

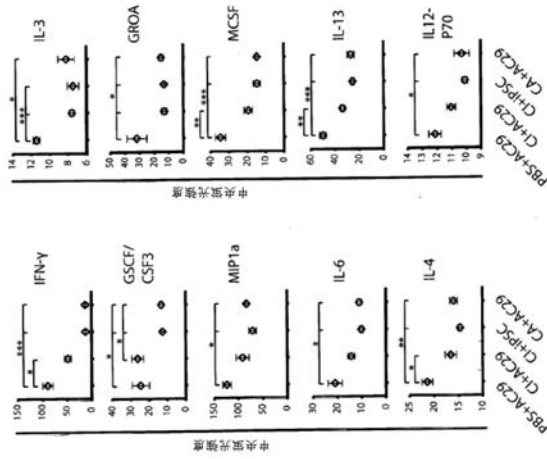


Figure 6A

【 図 6 B 】

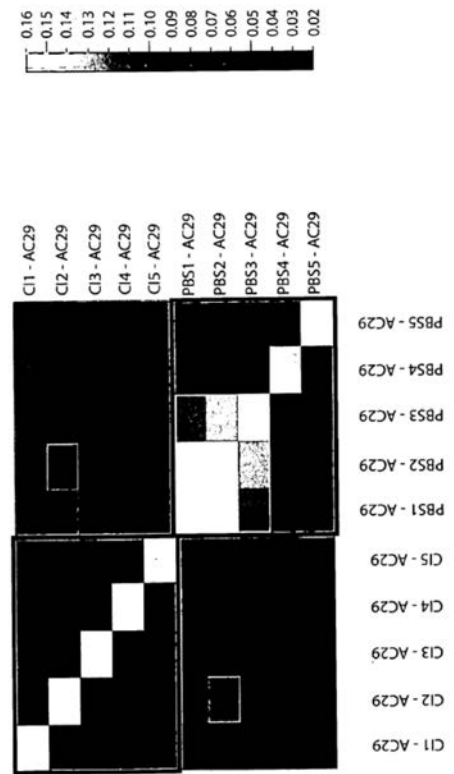


Figure 6B

【 図 7 A 】

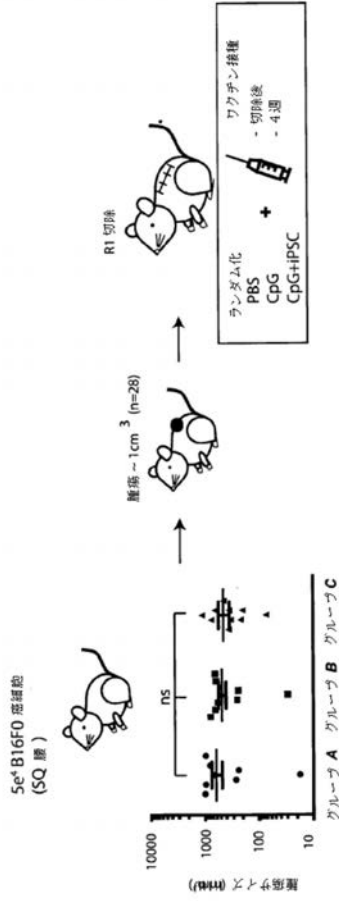


Figure 7A

【 図 7 C 】

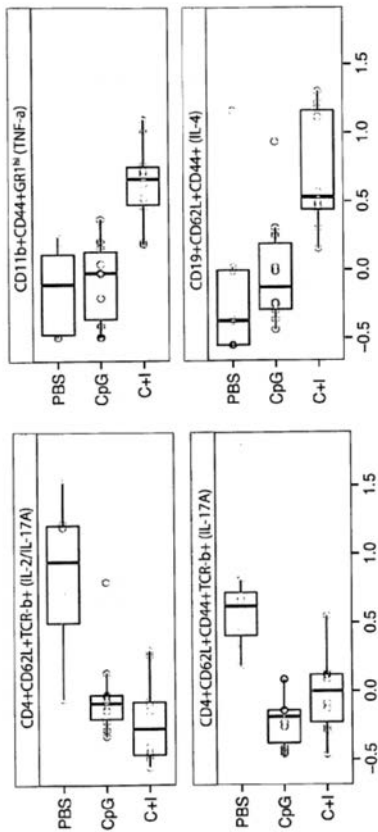


Figure 7C

【 図 7 B 】

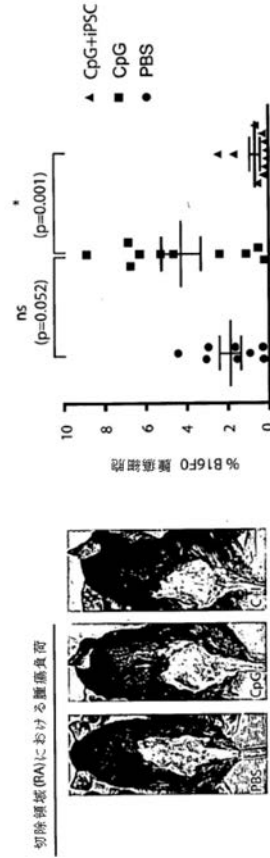


Figure 7B

【 図 8 A 】

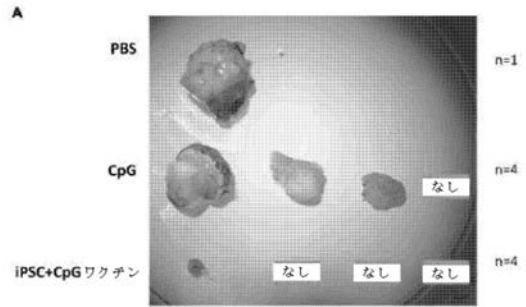


Figure 8

【 図 8 B 】

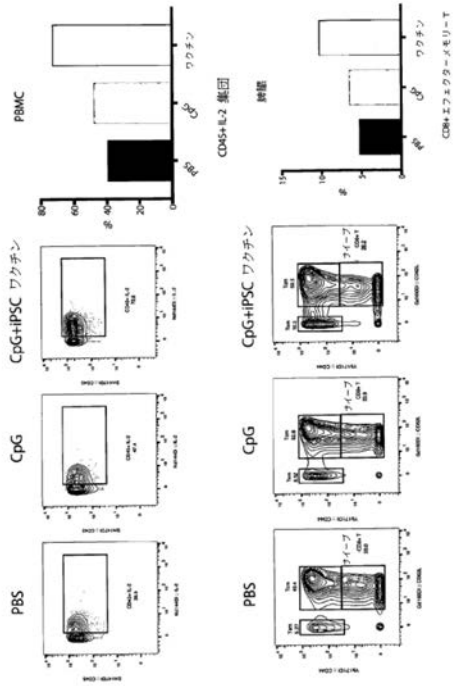


Figure 8B

【 図 8 C 】

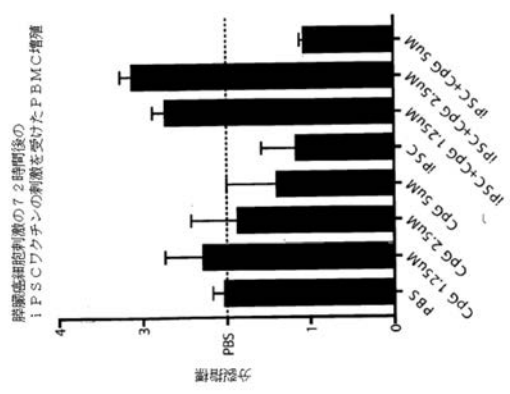


Figure 8C

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2019/012003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K39/00 A61P35/00 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YI LI ET AL: "Vaccination with Human Pluripotent Stem Cells Generates a Broad Spectrum of Immunological and Clinical Response against Colon Cancer", STEM CELLS, vol. 27, no. 12, December 2012 (2012-12), pages 3103-3111, XP055588613, ISSN: 1066-5099, DOI: 10.1002/stem.234 the whole document ----- -/--	1-20
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
16 May 2019		28/05/2019
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Teyssier, Bertrand

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2019/012003

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEI DONG ET AL: "Administration of embryonic stem cells generates effective antitumor immunity in mice with minor and heavy tumor load", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, vol. 59, no. 11, 4 August 2010 (2010-08-04), pages 1697-1705, XP019842241, ISSN: 1432-0851 the whole document -----	1-20
X	MOCAN T & IANCU C: "Effective colon cancer prophylaxis in mice using embryonic stem cells and carbon nanotubes", INTERNATIONAL JOURNAL OF NANOMEDICINE, vol. 6, 12 September 2011 (2011-09-12), pages 1945-1954, XP055588620, ISSN: 1176-9114, DOI: 10.2147/IJN.S24060 the whole document -----	1-20
X	ZHANG ZU-JUAN ET AL: "Human Embryonic Stem Cells - a Potential Vaccine for Ovarian Cancer", ASIAN PACIFIC JOURNAL OF CANCER PREVENTION, vol. 13, no. 9, 30 September 2012 (2012-09-30), pages 4295-4300, XP055588623, ISSN: 1513-7368, DOI: 10.7314/APJCP.2012.13.9.4295 the whole document -----	1-7,9-20
X	YADDANAPUDI K ET AL: "Vaccination with embryonic stem cells protects against lung cancer: is a broad-spectrum prophylactic vaccine against cancer possible?", PLOS ONE, vol. 7, no. 7, E42289, 31 July 2012 (2012-07-31), XP002782850, ISSN: 1932-6203 cited in the application the whole document -----	1-20
X	ZHANG ZUJUAN ET AL: "Vaccination with embryonic stem cells generates effective antitumor immunity against ovarian cancer", INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, vol. 31, no. 1, January 2013 (2013-01), pages 147-153, XP002760168, ISSN: 1107-3756, DOI: 10.3892/IJMM.2012.1195 the whole document -----	1-7,9-20
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2019/012003

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHENG QI ET AL: "A hepatic stem cell vaccine is superior to an embryonic stem cell vaccine in the prophylaxis and treatment of murine hepatocarcinoma", ONCOLOGY REPORTS, vol. 37, no. 3, March 2017 (2017-03), pages 1716-1724, XP002781361, DOI: 10.3892/OR.2017.5381 the whole document	1,3,7, 9-11,16, 18
X,P	----- KOOREMAN N G ET AL: "Autologous iPSC-Based Vaccines Elicit Anti-tumor Responses In Vivo", CELL STEM CELL, vol. 22, no. 4, 5 April 2018 (2018-04-05), pages 501-513, XP085371455, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/J.STEM.2018.01.016 [retrieved on 2018-02-15] the whole document	1-20
A	----- DE ALMEIDA P E ET AL: "Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance", NATURE COMMUNICATIONS, vol. 5, no. 1, 3903, 30 May 2014 (2014-05-30), XP055588636, DOI: 10.1038/ncomms4903 cited in the application	1-20
A	----- KOOREMAN N G & WU J C: "Tumorigenicity of pluripotent stem cells: biological insights from molecular imaging", JOURNAL OF THE ROYAL SOCIETY. INTERFACE, vol. 7, no. Suppl. 6, 6 December 2010 (2010-12-06), pages S753-S763, XP055588639, ISSN: 1742-5689, DOI: 10.1098/rsif.2010.0353.focus cited in the application	1-20
A	----- ZHAO TONGBIO ET AL: "Immunogenicity of induced pluripotent stem cells", NATURE, vol. 474, no. 7350, 9 June 2011 (2011-06-09), pages 212-215, XP055588641, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature10135 cited in the application	1-20
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2019/012003

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DIECKE S ET AL: "Novel codon-optimized mini-intronic plasmid for efficient, inexpensive and xeno-free induction of pluripotency", SCIENTIFIC REPORTS, vol. 5, no. 1, 8081, 28 January 2015 (2015-01-28), XP055588642, DOI: 10.1038/srep08081 -----	4,12

1

フロントページの続き

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. ブルロニック

(71)出願人 503115205

ザ ボード オブ トラスティーズ オブ ザ レランド スタンフォード ジュニア ユニバー
シティー

アメリカ合衆国 9 4 3 0 5 - 2 0 3 8 カリフォルニア州 スタンフォード メイン クワッド
ビルディング 1 7 0 サード フロア ピー . オー . ボックス 2 0 3 8 6 オフィス オブ
ザ ジェネラル カウンセル

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ナイジェル・ジー・クーアマン

アメリカ合衆国 9 5 0 7 0 カリフォルニア州サラトガ、アレンデイル・アベニュー 1 9 6 3 0 番、
ナンバー 3 1 6 7、クロリス・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 ジョセフ・シー・ウー

アメリカ合衆国 9 5 0 7 0 カリフォルニア州サラトガ、アレンデイル・アベニュー 1 9 6 3 0 番、
ナンバー 3 1 6 7、クロリス・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド内

(72)発明者 リン・ブイ

アメリカ合衆国 9 5 0 7 0 カリフォルニア州サラトガ、アレンデイル・アベニュー 1 9 6 3 0 番、
ナンバー 3 1 6 7、クロリス・バイオサイエンシーズ・インコーポレイテッド内

Fターム(参考) 4C085 AA03 AA38 BB50 CC03 EE01 FF12 FF14

4C087 AA01 AA02 BB63 NA05 NA14 ZB05 ZB09 ZB26 ZB27