

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-523067

(P2008-523067A)

(43) 公表日 平成20年7月3日(2008.7.3)

(51) Int.Cl.

A61K 39/39 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

F 1

A61K 39/39
A61P 35/00

テーマコード(参考)

4C085

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

(21) 出願番号 特願2007-545547 (P2007-545547)
 (86) (22) 出願日 平成17年12月6日 (2005.12.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年8月6日 (2007.8.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/043985
 (87) 国際公開番号 WO2006/062917
 (87) 国際公開日 平成18年6月15日 (2006.6.15)
 (31) 優先権主張番号 60/633,175
 (32) 優先日 平成16年12月6日 (2004.12.6)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 593199563
 サイクローン・ファーマシューティカルズ
 ・インコーポレイテッド
 S c i C l o n e P h a r m a c e u t
 i c a l s, I n c.
 アメリカ合衆国、カリフォルニア州、サン
 ・マテオ、マリナーズ・アイランド・ブー
 ルヴアード 901、スイート 205
 901 M a r i n e r s I s l a n d
 B o u l e v a r d, S u i t e 2
 05, S a n M a t e o, C A 9
 4404, U · S · A
 (74) 代理人 100110423
 弁理士 曾我道治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌ワクチンアジュバントとしての α サイモシンペプチド

(57) 【要約】

被検体における癌ワクチンの有効性を高めるための薬剤の組み合わせ及び方法は、被検体における免疫システム応答を誘導することができる免疫応答誘発性の癌ワクチン及びワクチンの有効性を高める量の サイモシンペプチドを利用して、これにより、被検体における免疫システム応答が高められ、当該癌ワクチン及び当該 サイモシンペプチドは、別々に又は同時に投与することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検体において癌を治療するため、及び被検体において癌ワクチンの有効性を高めるための薬剤の組み合わせであって、

a) 前記被検体において免疫システム応答を誘導することができる免疫応答誘発性の癌ワクチンと、

b) 前記被検体において前記システム応答を高める、ワクチンの有効性を高める量のサイモシンペプチドとを含み、

c) 前記癌ワクチン及び前記 サイモシンペプチドを別々に又は同時に投与することができる、前記薬剤の組み合わせ。

10

【請求項 2】

前記被検体がヒトであり、前記癌ワクチンが樹状細胞ワクチンである、請求項 1 に記載の薬剤の組み合わせ。

【請求項 3】

前記癌ワクチンが約 1×10^{-9} g ~ 約 1×10^{-3} g の量であり、前記 サイモシンペプチドが約 0.1 ~ 20 mg の量である、請求項 1 に記載の薬剤の組み合わせ。

【請求項 4】

前記癌ワクチンが約 1×10^{-8} g ~ 約 1×10^{-4} g の量であり、前記 サイモシンペプチドが約 0.5 ~ 10 mg の量である、請求項 1 に記載の薬剤の組み合わせ。

20

【請求項 5】

前記 サイモシンペプチドが TA 1 であり、該 TA 1 の量が約 1.6 ~ 3.2 mg である、請求項 4 に記載の薬剤の組み合わせ。

【請求項 6】

前記癌が乳癌である、請求項 1 に記載の薬剤の組み合わせ。

【請求項 7】

前記癌が、原発性黒色腫、転移性悪性黒色腫、腺癌、扁平上皮細胞癌、腺扁平上皮細胞癌、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌、結腸癌、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、NPC、膀胱癌、子宮頸癌、腎臓癌、脳腫瘍、骨肉腫、子宮癌、胃癌、及び直腸癌から成る群から選択される、請求項 1 に記載の薬剤の組み合わせ。

30

【請求項 8】

被検体において癌を治療する方法であって、該被検体において癌ワクチンの有効性を高めるために、請求項 1 に記載の薬剤の組み合わせを該被検体に投与することを含み、該薬剤の組み合わせが、

a) 前記被検体において免疫システム応答を誘導することができる免疫応答誘発性の癌ワクチンと、

b) 前記被検体において前記免疫システム応答を高める、ワクチンの有効性を高める量の サイモシンペプチドとを含み、

c) 前記癌ワクチン及び前記 サイモシンペプチドを別々に又は同時に投与することができる、

40

該方法が前記 サイモシンペプチドを前記被検体に投与することと共に、前記免疫応答誘発性の癌ワクチンを該被検体に投与することを含み、該癌ワクチン及び前記 サイモシンペプチドが、別々に又は同時に、該被検体に投与される、被検体において癌を治療する方法。

【請求項 9】

前記被検体がヒトであり、前記癌ワクチンが樹状細胞ワクチンである、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記癌ワクチンが約 1×10^{-9} g ~ 約 1×10^{-3} g の量であり、前記 サイモシンペプチドが約 0.1 ~ 20 mg の量で投与される、請求項 8 に記載の被検体において癌を

50

治療する方法。

【請求項 1 1】

前記癌ワクチンが約 1×10^{-8} g ~ 約 1×10^{-4} g の量で投与され、前記 サイモシンペプチドが約 0.5 ~ 1.0 mg の量である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記 サイモシンペプチドが T A 1 であり、該 T A 1 が約 1.6 ~ 3.2 mg の量で投与される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記 T A 1 が、前記癌ワクチンの投与とほぼ同時に投与される、請求項 1 2 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記癌ワクチン及び前記 T A 1 が注射によって投与される、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記組み合わせが、複数回、前記被検体に投与される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記癌ワクチンが、一連の投与の間に 4 ~ 10 回、前記被検体に投与される、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記癌ワクチンが、前記一連の投与の間に 3 週間に 1 回、前記被検体に投与される、請求項 1 6 に記載の方法。

20

【請求項 1 8】

前記 サイモシンペプチドが T A 1 であり、該 T A 1 が前記一連の投与の間に 1 週間に 2 回、投与される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記一連の投与が約 6 ヶ月である、請求項 1 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

[発明の分野]

本発明は、癌の治療の分野に関する。

30

【0 0 0 2】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2004年12月6日に提出された米国仮出願第 60/633,175 号からの利得を主張する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

[発明の背景]

癌は、世界中における死の主な原因である。手術、化学療法、及び放射線療法のような癌の治療に対する非特異的なアプローチが、選択的なグループの患者において成功している。免疫療法は、癌の治療のための新たな領域を構成している。一般的原理としては、腫瘍細胞に対する免疫活性を増大させる能力を治療被検体に与えることである。多くの戦略がここ数年の間に出てきており、現在開発中である。これらの戦略には、同種リンパ球の輸送、腫瘍内への免疫応答性細胞の移植、腫瘍特異的な免疫応答を起こすための全身のワクチン接種等が含まれる。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 4】

当該技術分野において、改良された抗癌治療及び抗癌組成物が依然として必要とされている。

【課題を解決するための手段】

50

【0005】

[発明の概要]

本発明によれば、被検体において癌ワクチンの有効性を高めるための薬剤の組み合わせ及び方法は、被検体において免疫システム応答を誘導することができる免疫応答誘発性の癌ワクチン及び当該被検体において当該免疫システム応答を高める、ワクチンの有効性を高める量のサイモシンペプチドを利用する。当該癌ワクチン及び当該サイモシンペプチドを別々に又は同時に投与することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

[好ましい実施形態の説明]

10

本発明は、被検体、好ましくは哺乳動物の被検体、及び最も好ましくはヒト被検体における、腫瘍及び癌の治療に関する。

【0007】

進行性の癌は、通常の癌治療方法に耐性がある。幾つかの癌ワクチンでは、腫瘍応答に関連する、又は関連しない疾患の進行を低減させるか、又は止めて、且つ生存率を増大させる幾つかの活性が見られる。チマルファシン(サイモシン-1)等のサイモシンペプチドの投与は、癌患者のワクチン治療における正のアジュバント効果(腫瘍の大きさを低減させ、且つ癌ワクチンのみ(例えば、樹状細胞免疫付与)に対して応答性がなかった患者を含む進行性の癌患者における生存率を増大させる)を有する。

20

【0008】

本発明は、癌及び腫瘍の治療に関する。1つの実施形態では、本発明は、腫瘍ワクチンによる治療を受けた癌(乳癌を含むが、これに限定されない)等の腫瘍性疾患の患者の治療における、免疫賦活物質であるチマルファシン等のサイモシンペプチドの免疫刺激活性に関する。これには、癌ワクチン(例えば、樹状細胞ワクチンのようなものだが、この種類の癌ワクチンに限定されない)で治療した患者におけるサイモシンペプチドの投与による、治療応答の改善が含まれる。

30

【0009】

本発明は、乳癌の治療において例示される。しかし、本発明を使用して治療することができる癌としては、原発性黒色腫、転移性悪性黒色腫、腺癌、扁平上皮細胞癌、腺扁平上皮細胞癌、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺癌、肝臓癌、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮癌、前立腺癌、卵巣癌、膵臓癌、結腸癌、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、N P C、膀胱癌、子宮頸癌、腎臓癌、脳腫瘍、骨肉腫、子宮癌、胃癌、直腸癌等が挙げられるが、またこれらにも限定されない。

30

【0010】

サイモシンペプチドには、サイモシン-1(T A 1)ペプチドが含まれ、これには天然に存在するT A 1並びに天然に存在するT A 1のアミノ酸配列、これと実質的に同様のアミノ酸配列、又はこれらの短縮配列形態を有する合成T A 1及び組み換えT A 1、並びに置換配列、欠失配列、伸長配列、置き換え配列(replaced)、又はそうでなければT A 1のものと実質的に同様の生物活性を有する修飾配列を有するこれらの生物学的に活性な類似体(例えば、T A 1と実質的に同じ活性で、実質的に同じ方法において機能するようなT A 1と十分に相同性のあるアミノ酸を有するT A 1由来のペプチド)が挙げられる。

40

サイモシンペプチドの好適な用量は、約0.001~10mg/kg/日の範囲であり得る。

【0011】

「サイモシン-1」及び「T A 1」という用語は、米国特許第4,079,137号明細書に開示されているアミノ酸配列を有するペプチドを示し、この開示は本明細書中に参照によって援用される。

50

【0012】

サイモシンペプチドの有効な量は癌ワクチンを増強させる量であり、約0.1~20mgのT A 1、好ましくは約0.5~10mgのT A 1に対応する範囲内の単位用量であ

50

り得る。さらに好ましくは、この単位用量は約 1 ~ 4 mg の TA 1 を含む。最も好ましくは、この単位用量は約 1 . 6 ~ 3 . 2 mg の TA 1 を含む。

【 0 0 1 3 】

サイモシンフラクション 5 (TF 5) から最初に単離された、サイモシン 1 (TA 1) をシーケンシングして、化学的に合成している。TA 1 は、3108 の分子量を有する 28 個のアミノ酸ペプチドである。

【 0 0 1 4 】

本発明の好ましい実施形態によって使用される癌ワクチンは、樹状細胞ワクチンである。

【 0 0 1 5 】

本発明に従って、任意の問題のある用量で癌ワクチンを被検体に投与することができる。このような用量は、約 1×10^{-9} g ~ 約 1×10^{-3} g の範囲であり得る。他の実施形態では、好適で効果的な癌ワクチン用量は、約 1×10^{-8} g ~ 約 1×10^{-4} g の範囲内であり得る。任意の効果的な投薬数（例えば、1 ~ 20 又はそれ以上の投薬）で癌ワクチンを被検体に投与することができる。好ましくは、複数回の投薬（例えば、約 2 ~ 約 15 回の用量、より好ましくは約 4 ~ 10 回の投薬、及び最も好ましくは約 6 回の投薬）で癌ワクチンを投与する。特に好ましい実施形態では、一連の投与の間に、約 3 週間にごとに 1 回、このワクチンを被検体の健常なリンパ節に投与する。

【 0 0 1 6 】

好ましい実施形態では、サイモシンペプチドを投与すると共に、免疫応答誘発性の癌ワクチンを被検体に投与し、このワクチン及びサイモシンペプチドは、被検体に別々に及び / 又は同時に投与される。1 つの実施形態では、少なくとも 1 回のワクチンの投与の間にワクチンの投与と実質的に同時にサイモシンペプチドを投与する。好ましい実施形態では、ワクチン及びサイモシンペプチドの両方を注射により投与する。好ましくは、複数回、ワクチン及びサイモシンペプチドの両方を被検体に投与する。好ましい実施形態では、一連の投与の間に、1 週間に 2 回、サイモシンペプチドを投与する。一連の投与が約 6 ヶ月継続することが特に好ましい。1 つの実施形態では、本発明は癌ワクチン治療のみに対して非応答性である被検体における、癌の治療に適用可能である。

【 0 0 1 7 】

特に好ましい実施形態では、癌ワクチンの被検体への投与と共に、1 週間に 2 回、皮下注射によって約 1 ~ 4 mg (例えば、約 1 . 6 ~ 3 . 2 mg) の範囲内の薬剤の単位用量で、サイモシンペプチドを投与する。しかし、任意の好適な経路による投与のために、任意の好適な様式で、サイモシンペプチド及び / 又は癌ワクチンを含む薬剤の単位用量を配合することができることを理解すべきである。

【 0 0 1 8 】

本発明のこの実施形態の 1 つの態様によれば、サイモシンペプチドを含む単位用量を被検体に日常的に投与する。例えば、1 日に 1 回以上、1 日に 1 回、1 週間に 1 回、又は 1 ヶ月に 1 回等で、この単位用量を投与することができる。週 2 回基準、すなわち 1 週間に 2 回 (例えば、3 日に 1 回) 、この単位用量を投与してもよい。週 3 回基準、すなわち 1 週間に 3 回、サイモシンペプチドの単位用量を投与することもできる。

【 0 0 1 9 】

注射、注入、又は経口等の任意の好適な手段によって、サイモシンペプチド及びワクチンの投与を行うことができる。特に好ましい実施形態では、投与は注射によって行われる。

【 0 0 2 0 】

ワクチン及びサイモシンペプチドを同時に投与する場合、ワクチン及びサイモシンペプチドを含む単独の組成物として与えることができる。

【 0 0 2 1 】

ワクチン及び / 又はサイモシンペプチドを含む組成物は、1 つ又は複数の医薬的に許容可能な担体及び適宜他の治療成分も含み得る。注射又は注入に適した処方物としては、

10

20

30

40

50

抗酸化剤、緩衝液、静菌剤及びこの処方物を対象の受容者の血液と等張にする溶質を適宜含み得る水溶性滅菌注射溶液及び不溶性滅菌注射溶液、並びに懸濁剤及び増粘剤を含み得る水溶性滅菌懸濁液及び不溶性滅菌懸濁液が挙げられる。この処方物は、単位用量又は複合用量の容器、例えば封入したアンプル及びビレス(viles)で与えることができ、使用の直前に、滅菌液体担体、例えば注射用水の添加のみを必要とする凍結乾燥(凍結乾燥)状態で保存することができる。

【0022】

進行性の癌は、通常の癌の治療法に対して耐性がある。幾つかの癌ワクチンでは、疾患の進行を低減させるか、又は止めて、且つ生存率を増大させる幾つかの活性が見られる。チマルファシン(サイモシン-1)等のサイモシンペプチドの投与は、ワクチン治療における正の効果(腫瘍の大きさを低減させ、且つ癌ワクチンのみ(例えば、樹状細胞免疫付与)に対して応答性がなかった進行性の癌患者等において生存率を増大させる)を有する。

10

【0023】

ヒトの体内の恒常性の維持を担う3つのシステム：免疫システム、内分泌システム、及び神経システムが存在する。免疫システムは、細胞及び組織の修復及び分化に有利に働く(favor)と共に、これらの内部環境及び外部環境を維持することによって、これらの同一性を保存するためのものである。したがって、免疫システムの2つの主な機能は、調節機能及びエフェクター機能である。有機体の必要性に対する動的な応答性における同じ細胞集団によって、これらの両方の機能が行われる。

20

【0024】

免疫システムは癌治療において積極的な役割を果たし、臓器機能不全及び腫瘍の発生を防ぐことができる。

【0025】

治療の観点から、癌における免疫療法は、ワクチン、T細胞感染、又はサイトカイン等の様々な作用物質を介して、免疫システムを本質的に刺激することを意味する。これらの作用物質は、幾つかの作用メカニズムを介して、

30

1) 抗癌応答を刺激することによって、

2) サブレッサーメカニズムを低減することによって、

3) 腫瘍細胞を改変し、これらの免疫原性を増大させて、腫瘍細胞の免疫防御に対する感受性を高くすることによって、

4) 細胞傷害性剤又は放射線療法に対する耐性を改善することによって作用し得る。

30

【0026】

細胞増殖に関わるタンパク質をコードする遺伝子で起こる様々な遺伝子異常によって、癌が引き起こされる。免疫システムの構成成分である抗体及びT細胞は、異常遺伝子を認識する、もしくは欠陥遺伝子に対して応答する効果はないが、癌を引き起こす遺伝子がコードする異常タンパク質を認識し、且つ異常タンパク質に対して応答する。免疫システムは、Bリンパ球及びTリンパ球によって癌を攻撃することができる。

40

【0027】

抗体は、異物に応答してB細胞によって生成されるタンパク質である。それぞれの抗体は特異的な抗原に結合する。抗体の主な防御作用は、約20個の異なるタンパク質の集団である「補体」システムの増幅効果によって起こる。抗体が抗原と結合すると、抗体上の特異的な応答部位が活性化される。この部位は、補体システムの分子と結合し、応答の力スケードを決める。オプソニン作用及び食作用は、より重要な補体効果に共通のものである(among)。これらは、好中球及びマクロファージによる食作用を強く活性化する。この型の抗体介在性の効果は、抗体依存性の細胞媒介性細胞障害(ADCC)として知られている。消化した外部の細胞タンパク質が、ペプチドとして抗原提示細胞(APC)の主要組織適合性複合体(MHC)で与えられるので、ADCCにはT細胞活性を触媒するという利点がある。抗体はまた、特に癌細胞で増殖メカニズムを阻止することにより細胞を死

50

滅させることができている。

【0028】

(CD8+)細胞である細胞傷害性T細胞は、MHCクラスI分子に特異的であり、MHCで示されるタンパク質又はペプチドフラグメントとしてこれらが提示されると、細胞の表面上に発現するペプチド抗原に対して応答する。ペプチド及びMHCは共に、T細胞を活性化させる(activatetract)。このT細胞は、酵素によってその膜を穿孔させること、又はアポトーシス経路若しくは自己破壊的な経路を誘発すると共にこれらの侵入性細胞を破壊することによって、担体細胞を破壊する。

【0029】

ヘルパーT細胞(CD4+)は、免疫システム活性の調節因子である。CD4+のT細胞はまた、MHCクラスIIを認識する。CD4+のT細胞はまた、細胞傷害性T細胞応答(T-ヘルパー1)又は抗原応答(T-ヘルパー2)のいずれかを刺激するサイトカイン(インターロイキン-2(IL2)等)を分泌することにより、免疫応答を増大させる。これらのサイトカインは、B細胞を刺激して抗体を産生するか、又はCD8+のT細胞の産出を高める。CD4+のT細胞は、サイトカインと呼ばれる一連のタンパク質メディエーターを形成し、これは免疫システム全体の応答の作用を高める他の細胞の免疫システムで作用する。

【0030】

癌細胞(膨大細胞)の遺伝子変化が、遺伝子変化のない成熟細胞のものとは異なる分子の発生を引き起こす。腫瘍抗原又は腫瘍関連抗原と呼ばれるこれらの様々な分子は、エフェクター応答の標的である。

【0031】

同時に、膨大細胞はサイトカインを発生し、それによりDNAの自己複製及び自己分化プロセスを誘導し、例えばウイルス感染した細胞によって分泌されたインターフェロンは、隣接細胞におけるウイルス複製を停止させる。

【0032】

IL6及び形質転換増殖因子(TGF)等の他のサイトカインでは、遺伝子損傷の修復(repairaration)を失敗する。これらは細胞の分化を誘導するが、Th1エフェクター免疫システムの作用を阻害する。

【0033】

細胞形質転換プロセスを開始させる毒性効果によって、遺伝子突然変異及び免疫抑制を誘起して免疫防御能力(免疫学的監視)が損なわれるおそれがある。さらに、変更したDNA修復しようとして失敗した新規な膨大細胞は、免疫寛容を誘発するTGF及び/又は関連のサイトカインの産出を増大し、そして遺伝的に変更した細胞は新生物を創出する。

【0034】

近年の研究によって、腫瘍が免疫原性であり、長期間免疫記憶を形成することが可能であることが示されている。別の重要な点は、癌患者の長期間の生存率を変える腫瘍の再発である。幾人かの患者では、化学療法、手術、又は放射線等の通常の治療に対して一次応答することができるが、腫瘍が再発するおそれがある。腎臓移植を受けた患者は、長期追跡調査において、一般的な集団よりも癌の全発生率が約3~5倍高いことが知られており、これは長期間の免疫抑制に部分的に起因している可能性がある。

【0035】

抗原は、免疫システムの細胞による抗原の破壊で認識されている異物である。細胞が癌化すると、新たな普及していない抗原を産出する。免疫システムは、異物としてこれらの抗原を認識し、癌細胞を封じ込めるか、又は破壊することさえできる。ウイルスタンパク質、すなわち肝炎Bウイルス(HBV)、エブスタイン・バーウィルス(EBV)、及びヒト乳頭腫(HPV)は、肝細胞癌、リンパ腫、及び子宮頸癌それぞれの進行に重要である。発癌タンパク質、グリコシル化タンパク質、及び炭水化物は腫瘍抗原である。多くのこれらのタンパク質は、複数の腫瘍型の間で共有され、500を超える腫瘍抗原が定義さ

10

20

30

40

50

れている。

【0036】

体内の免疫応答は、癌患者には十分強くはないと考えられる。癌により発現したタンパク質は免疫応答を誘導することができる。

【0037】

ワクチン接種

免疫応答が不十分であるのには、多くの理由がある。サイトカイン環境では、CD4+のT細胞の増幅は不可能である。腫瘍が増殖すると、免疫受容体分子と結合するウイルスタンパク質等の免疫応答を直接調節すると共に腫瘍がウイルス感染した細胞の表面上に曝されるのを防ぐこと、又は腫瘍自体により、免疫システムの活性化を下方に調節する分泌された因子のいずれかによって、この腫瘍は免疫抑制因子を分泌することができる。

10

【0038】

免疫寛容は、腫瘍が免疫回避を免れる主要なメカニズムである。免疫療法の計画の設計は、癌細胞を根絶させるのに有効であり得る。免疫療法の計画は、免疫システムの活性化因子を使用すること、抗原提示細胞を供給すること、又は幾つかのこれらの腫瘍抗原タンパク質を免疫原性ペプチドに実際に前消化することによって、「腫瘍自体」をより免疫原性にさせることに焦点が当てられている。

20

【0039】

臨床的に有用な腫瘍ワクチンは、悪性の形質転換を伴う重要なタンパク質を標的化する複数のタンパク質に対して免疫付与しなければならない。このように、免疫賦活剤と呼ばれる薬剤又は物質の使用は、ワクチン接種作用の組織学的結果及び臨床学的結果を改善する自然の免疫応答を増大又は改変することができる。免疫療法を成功させるには、癌細胞を破壊し且つその再発を防ぐための免疫システムの制御活性を操作することに焦点を当てなければいけない。

20

【0040】

好ましい実施形態では、本発明は前述の免疫活性の両方に焦点が当てられている。生存自己腫瘍細胞及び変性自己腫瘍細胞を使用して、自己の未感作の(autologous naive)樹状細胞(DC)を増加させる。両方の型の細胞の共培養は特定の組織培養培地で展開され、未感作のDCをエフェクター応答誘導因子DCに分化させる。健常なリンパ節にこれらのDCを注射し、患者の腫瘍細胞に対するT細胞エフェクター応答を開始させる。

30

【0041】

このアプローチは安全であり、患者に対する毒性が最小限であると共に進行型で且つ確立された腫瘍に対する重要で且つ維持された抗腫瘍活性を与える。

【0042】

最初に、以下では、免疫学的監視並びに対応する腫瘍回避形態を伴う腫瘍抗原及び細胞を記載する。

【0043】

次に、現在使用される主要な免疫療法計画を記載する。それから、本発明の治療アプローチ、その原理、考えられる作用メカニズム、及び他のアプローチに対する利点を記載する。

40

【0044】

腫瘍抗原(TA)：関連の腫瘍抗原は、2つの主なカテゴリーに分類することができる。第1のカテゴリーは、腫瘍細胞のみで見出される特異的な腫瘍抗原(STA)を含み、これは免疫攻撃に理想的な標的を表す。第2のカテゴリーは、腫瘍細胞で見出されるが、幾つかの正常細胞でも見出される腫瘍関連抗原(TAA)を含み、このことはTAA分子の量的発現及び質的発現が腫瘍細胞を正常細胞と区別するためのTAAの使用を可能にする。

【0045】

腫瘍の免疫療法の目的は、STA及びTAAに対する免疫応答の制御及び増大によって、効率的に癌を治療することである。悪性黒色腫及び腎細胞癌の幾つかの場合で観察され

50

る自然寛解は、この目的の達成の証拠である。

【0046】

腫瘍特異的抗原 (TSA)：これらの抗原は、膨大細胞でのみ検出することができる。これらの抗原は、実験動物からの腫瘍、並びにウイルス源、突然変異した腫瘍遺伝子、及び悪性の表現型に関連するタンパク質、悪性細胞に特徴的なゲノム不安定性により引き起こされる可能性のある自然突然変異からのヒトタンパク質において同定されている。

【0047】

主要な組織適合性複合体 (MHC) によるT細胞への抗原提示に関する経路の解明によって、遺伝子変化した細胞膜タンパク質を抗原として検出することができるだけでなく、内部タンパク質又は内在化タンパク質が特異的な腫瘍抗原になり得ることが説明される。T細胞は、細胞質タンパク質の細胞分解に由来し、MHC分子のペプチドの裂け目(cleft)に挿入される小ペプチドを認識する。これらのペプチドは、MHC分子と共に細胞表面に後期移送される(later transported)。したがって、任意の異常細胞のタンパク質は潜在的な免疫剤であり、これは膜で検出されるのはこれらのタンパク質だけではない。p 5 3等で突然変異する対立遺伝子によって産出される腫瘍細胞の非機能的なタンパク質は、潜在的には特異的な腫瘍抗原である。

10

【0048】

腫瘍関連抗原 (TAA)：TAAは、特定の分化段階で幾つかの正常細胞により発現することができる腫瘍細胞分子である。他の細胞型、分化マーカー、又は両方の組み合わせに関するこの量的な発現又は組み合わせた発現は、形質転換細胞の同定に有用であり得る。最も良好に特徴付けられたTAAは腫瘍胎児抗原であり、これは胚形成の間に発現するが、正常な成人の組織では存在していないか、又はほとんど検出できない。原型のTAAは癌胎児性抗原 (CEA) である。- フェトタンパク質及びMAGEタンパク質群は、この種の抗原に含まれる。

20

【0049】

免疫学的監視

遺伝的に形質転換した細胞は、正常細胞のタンパク質とは量的又は質的に異なる抗原タンパク質（それぞれ、STA及びTAA）を呈する。一度構築されると、生来の免疫応答及び適応した免疫応答に作用する細胞性成分及び体液性成分は、形質転換細胞及び腫瘍の破壊応答に役割を果たす。

30

【0050】

免疫学的監視プロセスを伴う細胞は、以下のものである。

【0051】

ナチュラルキラー細胞 (NK)：これらは、MHCが欠乏した細胞を認識及び破壊する。標的細胞の細胞膜に孔を形成することによって、これらの細胞が機能する。これらの孔は、細胞質膜におけるペルホリン(perforin)分子の自己組織化によって作り出される。これらの細胞の構造は幾らか補体C9と相同であり、このコロケーションによって、グラニザイム型の細胞溶解酵素が容易に通過することができる孔が発生する。腫瘍細胞表面上の受容体Fas及びTNFの活性化は、第2のメカニズムを構成している。これらの両方の現象によって、アポトーシスが活性化される。MHC分子の欠失によって引き起こされるこれらの細胞溶解活性は、生来の免疫応答に対応する活性である。一方、ナチュラルキラー細胞はまた、腫瘍に対する抗体の活性において共働する。これらの細胞は、Fc受容体によって腫瘍細胞表面に付着し、上記の溶解現象（ペルホリン、Fas活性化、TNF攻撃）を引き起こす。この活性は、腫瘍に対する適合した免疫応答の一部であると考えられる。

40

【0052】

これらの機能により、ナチュラルキラー細胞は、これらの発現におけるウイルス誘導性の腫瘍細胞及び小さな腫瘍の破壊の主な原因になり、これらはインターフェロン及びインターロイキン2の作用によって活性化される。これらのロイキンは、NK細胞の溶解活性を促進する。NK細胞は活性化されると考えられている（LAK、ロイキン活性化キラー

50

)。

【0053】

ごくわずかなMHC1膜タンパク質の存在によってでさえ、生来のNK応答としての膨大細胞の破壊が抑制される。しかし、このことが腫瘍に作用する抗体の溶解活性に由来する場合、この存在によってNK応答は抑制されない。

【0054】

食細胞：食作用活性を有する細胞は、治療目的に使用することができる特異的な抗腫瘍作用のメカニズムを有する。Tリンパ球により活性化する場合、これらの細胞が腫瘍細胞になる可能性がある。リゾチーム、スーパーオキシドラジカル、一酸化窒素、及びTNF、これらは異なるメカニズムによって腫瘍細胞を破壊する。しかし、これらの最も重要な抗腫瘍活性は、これらの抗原提示能、主にCD4リンパ球提示能によって発揮される。腫瘍がその表面上にMHC2分子を有していないので、これらはヘルパー細胞に対する特徴的な腫瘍抗原を示すことができないことが知られている。活性化マクロファージは、この抗原提示を行い、調節CD4+リンパ球及びエフェクターCD4+リンパ球の両方の活性化を誘導することができる。これらはまた、CD8+及びB細胞に対する抗原を提示する。

【0055】

これらの食細胞及び特徴を表す細胞に関して、免疫システムの最も巧みな(skillful)細胞は、樹状細胞である。固有の樹状細胞は、1000個以下の未感作のCD4リンパ球と接触することができ、このことにより、樹状細胞は有機体において最も強力であると考えられる。このため、これらは治療目的で使用されている。人工的に制御した培地におけるこれらの刺激によって、腫瘍に対する任意の免疫システムの刺激が誘導されるので、近年ではこれらが最も良好なアジュバントであると考えられている。これらの細胞は、腫瘍細胞の抑制分泌の標的でもある。腫瘍のプロスタグランジン、TGF、及びIL10分泌は、拒絶の抑制(及び調節)リンパ集合の特徴の発生を誘導することによる、マクロファージ上の負の効果を有する。

【0056】

リンパ球：CD4エフェクター群及びCD8エフェクター群のTリンパ球によって、最も強力な抗腫瘍の役割を果たす。残念なことに、これらのサブレッサーT細胞集合の出現及び発達によって、体内全体にわたって広がる腫瘍増殖及びその転位が起こる危険性がある。細胞膜でCD25ポジティブマーカーを有するCD4リンパ球の亜母集団として、これらのサブレッサーリンパ球を特徴付けている。T細胞のエフェクター応答は腫瘍細胞を直接的に死滅させ、残りの免疫システムの成分を活性化させる。CD4集団及びCD8集団に対して作用する抗腫瘍免疫力は、抗原に特異的である。これらのリンパ球は、患者の末梢血だけでなく、腫瘍浸潤細胞においても検出されている。これまでに記載されているように、量的及び質的な抗腫瘍応答に関して、CD4細胞の活性は最も重要である。しかし、腫瘍がMHCII分子を発現しないので、この作用は対応する特異性細胞によって行われる抗原提示によって変化する。これに対して、細胞傷害性のT細胞は、MHCIIにおける細胞抗原を認識することができる。しかし、標準の状態で及び共刺激する分子の欠失により、腫瘍細胞が腫瘍に対して特異的なCD8細胞のアネルギーを誘導する。反対に、活性化したCD8リンパ球は腫瘍溶解にこれらの共刺激信号を必要としない。これらが利用する溶解メカニズムは、NK細胞によって利用されるものと同様のものである：細胞質膜におけるアポトーシス及び孔形成。

【0057】

B細胞：患者の血清における応答性のある抗腫瘍抗体の偶発的な検出によって提案するのに使用されている、腫瘍の免疫力に対する受容体の応答の潜在的な機能。基本となる作用メカニズムは、抗体(ADC)による細胞溶解である。補体によって支持される抗腫瘍メカニズムは、抗腫瘍作用(fight)により小さい役割を果たすと思われる。最終的に、幾つかの実験は、腫瘍における特異的な抗体の攻撃が免疫応答を促進する抗原の消失につながり、これによりこの溶解メカニズムに対して耐性のある集団を(消極的な選択によ

10

20

30

40

50

り)発生させるという理論を支持している。しかし、抗体が細胞膜におけるMHC I複合体を消失させる場合、細胞がNK細胞によるこれらの破壊に敏感であることは明らかである。腫瘍遺伝子HER2-NEUタンパク質に対するハーセプチン等の幾つかのモノクローナル抗体がこの治療利用及び商業的販売のために開発されている。この分子は、卵巣転位及び乳房転位の細胞の25%で発現し、FDAは、この状態を患う患者の治療のための治療利用において認可されている。これらの第2の抗体はリツキシマブであり、これはCD20細胞決定因子に対して作用する。これは、リツキシマブがBリンパ腫の治療に使用することができるという理由のためである。他の抗体は現在、臨床開発中である。

【0058】

腫瘍細胞免疫学：腫瘍細胞は、炎症抗腫瘍応答の標的になり得る幾つかの分子を提供する。しかし、これらの抗原を認識することができるリンパ球は、腫瘍に隣接する血液で単離されているが、これらは腫瘍に対して有効なエフェクター機能をもたらすことはできない。腫瘍細胞の細胞学的特徴はこの現象を説明するか、又はこの現象を説明しようと試みている。腫瘍細胞は表面上にMHC I I複合体を有さず、このことは腫瘍細胞がCD4リンパ球にATPを提供することができず、わずかなMHC I複合体の発現を有する理由である。

【0059】

これらの特性によって、NK細胞活性の阻害、及びCD8細胞におけるわずかな活性化応答が起こる。ほとんどの腫瘍細胞が表面上で共刺激する分子を提供しないことによって、この最後の現象が悪化する。共刺激する分子に対するこの受容体の欠失によって、アネルギーCD8リンパ球の進行が引き起こされる。

【0060】

腫瘍細胞は抗炎症物質を強く分泌する。これらの物質の幾つかは、未だに同定されていない。マクロファージの活性化を阻害することにより、プロスタグランジンの産出が作用する。インドメタシン又はCOX2阻害剤の同時投与によって、この物質を阻害することができる。腫瘍細胞は、大量のTGF 及びIL10を産出することもできる。これらのサイトカインは、細胞分化を制御する分子である。腫瘍細胞は適切な細胞分化を失っているので、この物質の合成産出を制御するための負の調節信号も欠失している。膵臓癌、乳癌、神経膠腫、SCLC等の転移の可能性とこれらのサイトカインの合成との比較を示す研究がある。これらの最も重要な作用は抗原提示細胞を調整することであり、これによりこれらは、腫瘍抗原に対して特異的なサブレッサーリンパ球の発生を誘導する。

【0061】

免疫システムと腫瘍との間の動的関係：腫瘍と腫瘍細胞との混合培養に関する技法が、黒色腫ペプチドに対して応答する細胞傷害性T細胞の抗原組成物の詳細な研究を可能にしている。これらはクローニングされ、アミノ酸配列によって特異的な腫瘍抗原を特徴付けるのに使用されている。これらの研究において、3つの重要な発見があった。第1の発見：黒色腫は細胞傷害性T細胞として認識することができる少なくとも5つの異なる抗原を有する。第2の発見は、黒色腫抗原に対して応答する細胞傷害性のTリンパ球がin vivoで拡大しないという事実であった。このことにより、in vivoの場合、上記の抗原は免疫原性がないことが示唆される。第3の発見は、特異的な細胞傷害性T細胞の存在のため、これらの抗原の発見のin vitro及びおそらくはまたin vivoでの陰性選択の可能性であった。これらの発見は、腫瘍免疫療法に希望を与える。同時に、この発見は、これらの抗原は自然の形態では高い免疫原性がなく、細胞傷害性T細胞によって認識及び除去することができない腫瘍細胞をin vivoで選択する可能性について警告していることを示す。

【0062】

腫瘍は、増殖するためには一連の動的回避メカニズムを生成しなければいけない。任意の抗腫瘍計画の問題に直面した場合、この腫瘍は新たな回避形態の開発による腫瘍自体の適合によって応答する。

【0063】

10

20

30

40

50

異常な分子の検出によって、特異的な抗体の発生による一次ヒト免疫応答が発生され、その後、A D C Cにより破壊が行われる。N K細胞及び多核白血球は、この現象に積極的に作用する。このことは、低いか、又は存在さえしない適切な表面抗原を有するこれらの細胞集団における選択を誘導する。同時に、破壊された細胞の食作用は、M H CクラスI分子で与えられる可能性があるこれらの細胞内の抗原に対する細胞免疫応答の延長を誘導する。異なる抗原を有する細胞及び/又は共刺激する分子を有さない細胞の新たな選択が行われる。最終的には、より高い未分化レベルを有する細胞の選択は、腫瘍によって産出されるインターロイキン10及びT G F 等の抑制因子の増大に直接関係している。これらの物質が特異的なサブレッサー細胞のプロモーターになるように、樹状細胞を誘導する。この現象によって、腫瘍に対する耐性の発展が可能になり、これには絶対的な自由を育み(growing)、拡げる可能性がある。特定の技法の使用による作用の単独方法によって、上記で選択した現象及びそれに続く結果における長期間の失敗が引き起こされるので、細胞集団のこれらの動態を無視する免疫システムの操作に基づく、これらの治療的アプローチは失敗するであろう。免疫療法アプローチのみの作用に応答性のある腫瘍の割合は、このアプローチの有効性及びエネルギーにも関わらず、20%未満である。したがって、適切な時間で所望の効果を誘導するために、記載の動態を検討する技法の組み合わせを使用しなければいけない。

10

20

30

40

【0064】

免疫療法

宿主の免疫システムが腫瘍の増殖を制御することが不適切であることはよくあるが、腫瘍の根絶に有利に働く免疫システムの可能な操作及び改善の幾つかの指標が存在する。これらの幾つかは、ほとんどの腫瘍細胞における同定可能な腫瘍抗原の存在、及び効果がないが検出可能な宿主応答の同定であり、また腫瘍細胞が免疫応答を拒絶するメカニズムのより良好な理解である。近年の技法の進歩は、腫瘍抗原免疫療法に関する新たな可能性を生み出している。これらの中で、本発明者等はリンパ球の亜集団の単離、腫瘍抗原の同定及び精製、抗原選択性のT細胞の開発、サイトカインによる免疫応答の増大、及び腫瘍抗原の表面を標的化する抗体の産出に関する技法を見出している。

【0065】

排他的に使用されるか、又は毒素と結合する腫瘍抗原に対するモノクローナル抗体(M A B)は腫瘍増殖を制御することができる。

【0066】

モノクローナル抗体の発生によって、腫瘍を標識化及び破壊する可能性が示唆された。正しいアイソタイプの特定の腫瘍抗体がN K細胞による腫瘍細胞溶解に作用し、これらのF c受容体によって、N K細胞を活性化させることができる。これを行うために、細胞膜分子である特定の腫瘍抗原を見出すべきである。この後、マウスを選択した抗原で免疫付与する。それから、マウスの脾臓を除去し、この組織を分離させ、リンパ球細胞懸濁液を得る。次に、リンパ球をI g Gを産出する骨髄腫由来の細胞と融合させる。得られたハイブリッド細胞懸濁液は、ハイブリドーマと呼ばれる。96ウェル培養プレート上でこれを希釈することにより培養させる。この融合した細胞をそれぞれの区画に幾つか存在させるような方法で積層化させる。その後、細胞を培養させたまま、どの細胞のクローニングが抗体を産出したかを判断するために、それぞれの区画の上清を分析する。また、I g Gを分泌するクローニングを拡大させ、産出した抗体を分析し、同じ細胞型であるが、異なる患者由来の様々な腫瘍を認識する特異性及び有効性を測定する。この後に、選択されたクローニングを拡大させる。使用する抗体は、これらのクローニングの上清から抽出される。分子工学の利用により、抗体のF c部分がヒト由来の類似のものに置き換えられる場合、この分子の抗原性は低減するであろう。これらは、「ヒト化」抗体と呼ばれる。

【0067】

近年F D Aは、乳癌の治療のためのヘルセプチンとして知られている、ヒト化モノクローナル抗体の使用を承認している。この抗体は、成長因子H E R - 2 / n e uの受容体と応答する。この受容体は、乳癌を患う患者の約4分の1で過剰発現する。H E R - 2 / n

50

e u はより悪い予後に関係しているが、この過剰発現は T 細胞による H E R - 2 / n e u 誘導性の抗腫瘍応答に関する。ヘルセプチンは、受容体とこのように受容体の発現レベルを低減させるその天然リガンドとの相互作用を阻害することにより作用すると考えられている。従来の化学療法と組み合わせた場合、この抗体の効果を増大させることができる。

【 0 0 6 8 】

C D 2 0 の認識によって作用するリツキシマブとして知られている 2 番目に F D A から承認された抗体が存在する。これは、B 細胞の非ホジキンリンパ腫の治療に使用される。C D 2 0 の融合及び集団化によって、リンパ球のアポトーシスを誘導する信号が発せられる。

10

【 0 0 6 9 】

発生した放射性同位体と結合するモノクローナル抗体を使用し、腫瘍の拡大をモニタリングし、且つ診断を与えるために、腫瘍を視覚化する。

【 0 0 7 0 】

モノクローナル抗体による最初に知られた成功した腫瘍治療では、抗イディオタイプ抗体を使用して、免疫グロブリンが対応するイディオタイプを発現したこれらの B 細胞を標識化した。一般的に最初の部分の治療によって寛解がもたらされるが、最初の治療に使用した抗体と結合しない変異型で腫瘍が再発する。この場合は、遺伝的不安定性の明確な例として示され、これにより腫瘍によって治療が回避されてしまう。

20

【 0 0 7 1 】

腫瘍に特異的なモノクローナル抗体又は腫瘍選択性のモノクローナル抗体の治療使用で提示される他の問題は、モノクローナル抗体融合後の細胞の非効率的な致死及び腫瘍における抗体の非効率的な侵入である。第 1 の問題は、しばしば毒素を抗体と結合させることにより回避することができる。この治療は、抗毒素と呼ばれる試薬を産出する。この治療で指定される好ましい 2 つの毒素は、リシン鎖 A 及びシードモナス毒素である。細胞内分画の抗体分子からの毒素分子の分離を可能にするように、これらのアプローチの両方は抗体の内在化を要求し、このようにして毒素鎖の侵入及びその後の細胞の致死を可能にする。

【 0 0 7 2 】

結合したモノクローナル抗体を使用する 2 つの他のアッセイは、抗体分子とアドリアマイシン等の化学療法剤との融合又はこの分子と放射性同位体との融合を示している。

30

【 0 0 7 3 】

前者の場合、腫瘍細胞表面由来の抗原によるモノクローナル抗体の特異性は、その位置で薬剤を濃縮させる。内在化の後に、エンドソームで薬剤を放出し、その細胞増殖抑制効果又は細胞傷害性効果を発揮する。放射性同位体と結合するモノクローナル抗体は腫瘍位置に焦点を当てた放射活性を濃縮させる。これらのアプローチの両方は、薬剤又は放射性放出物が放出されると、抗体と結合したものと隣接する細胞に影響を及ぼす可能性があり、隣接した腫瘍細胞を死滅させるので好都合である。

【 0 0 7 4 】

癌胎児性抗原 (C E A) は、モノクローナル抗体の腫瘍抗原標的の例である。 C E A に對して放射活性物質で標識化したモノクローナル抗体によって、再発した結腸直腸癌を検出することができる。この治療は現在、この新生物の診断及び治療における試験的段階にある。

40

【 0 0 7 5 】

樹状細胞

D C は、外部抗原を処理し、且つ移動させるのに自然状態で機能する「母なる自然の (M other Nature's)」抗原提示細胞、並びに T 細胞に対する提示及び防御免疫応答の発生のためのリンパ節への「危険」信号であると考えられている。 D C が活性化し、「成熟する」と、D C は T 細胞刺激のプロセスにおいてより強くなると考えられる。 D C は通常、皮膚及び他の粘膜組織に存在し、そこで病原体及び他の抗原と接触する；抗原でブーストさ

50

れた後の皮内注射によって、早期の試験における黒色腫及び結腸直腸癌の抑制が誘導されることが示されている。

【0076】

DCは骨髄由来である。IL3、SCF、Filt3L、TNF、及びGMCSFはその早期の分化に影響を及ぼしている。この直近のサイトカインによって、前分化状態の増殖が促進され、これらの細胞の血流への放出に有利に働く。それにもかかわらず、DCは未感作のT細胞からの免疫応答の発生において既知である最も強力な媒介物であり、癌抗原特異的なワクチンの処理及び移動に使用される。

【0077】

DCが免疫力において中心的な役割を果たすので、腫瘍抗原で充填した樹状細胞(DC)に基づく治療用の癌ワクチンは特に興味深い。DCは体内全体、特に感染組織への侵入路になり得る領域で見られる。動物モデルの多くの研究によって、腫瘍抗原で充填したDCは腫瘍攻撃に対して防御することができ、DCに基づく免疫付与がこれまでに移植した腫瘍の進行を遅くすることができる示されている。例えば、B16黒色腫細胞型由来の抗原で充填した樹状細胞によって免疫付与されたマウスは、移植した腫瘍の進行を防ぐことができる。

【0078】

DCの局所リンパ節への生理的移動を模倣するために、異なる投与経路、すなわち静脈内(IV)、皮下(SC)、経皮、節内、リンパ管内、及び腫瘍内でDCを使用した。DCと共にサイトカインを投与することによって、免疫付与によって誘導した免疫応答が増大し得る。本発明では、免疫賦活剤として使用したチマルファシンは、非応答性の患者におけるDCワクチン接種に対する臨床応答を改善させた。

【0079】

概して、ほとんどのDCワクチンに基づく研究は、この考えに従って行われている。DCを産出するために、患者に白血球搬出法を行う。通常、これらのDC分画を最初の免疫付与に新たに使用する一方で、残りを後の使用のために低温保存する。幾つかの研究では、解凍後にDCワクチンを容易に使用できるように、低温保存前に充填が行われるが、DCを免疫付与前に対象の抗原及び充填計画(strategy)で充填する。免疫付与の理想の間隔又は期間は知られていないが、一般的に1~3週間ごとに与えられる。免疫付与のための正の制御及び負の制御として、不適切な抗原で充填したDCが含まれる。したがって、末梢血を採血し、免疫応答の誘導をモニタリングするが、最終産物における広範囲の免疫分析を行うために、繰り返し白血球搬出法を行うことができる。現在、様々なアッセイが臨床段階で使用されている。in vivoでの活性の測定に加えて、免疫付与する抗原に対するT細胞のサイトカイン産出、拡散、又は細胞溶解活性を測定することにより、in vitroでのT細胞応答性を特徴付けることが可能である。

【0080】

継続中の試験は一般的なものであるので、DCワクチンは、より小さい毒性に十分耐性がある。他の強力な腫瘍ワクチン(細胞ワクチン、黒色腫ワクチン、alignix細胞ワクチン単独又はBCGとの組み合わせ、腫瘍崩壊産物、細胞無含有上清ワクチン、遺伝的ワクチン接種、ウイルスベクターワクチン)による継続中の試験が存在する。

【0081】

腫瘍ワクチン接種の免疫原性を増大させるのに、多くの試みが為されており、これには、キーホールリンペットとして知られているカルフォルニア及びメキシコの沿岸で発見された殻で覆われた海の生き物によって構成されるタンパク質である、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)が含まれる。KLHは、免疫応答の原因になり、癌細胞抗原の担体として作用する巨大タンパク質である。癌抗原は、免疫システムでは見えない可能性がある比較的小さなタンパク質であることがよくある。KLHは、Tヘルパー細胞として知られている免疫細胞にさらなる認識部位を与え、細胞傷害性のTリンパ球(CTL)として知られている他の免疫細胞の活性を増大させることができる。

【0082】

10

20

30

40

50

バシリス・カルメット・ゲラン (B C G) は、数十年間、 T B に対するワクチン接種のために日常的に使用されている不活性形態の結核菌である。 B C G がワクチン抗原に対する免疫応答を高めるという目的で、幾つかの癌ワクチンに B C G を添加する。 B C G が免疫応答を誘導するのに特に効果的であり得る理由は、十分には理解されていない。しかし、 B C G は結核用のワクチンを含む他のワクチンと共に長年使用されている。

【 0 0 8 3 】

インターロイキン - 2 (I L - 2) は、ナチュラルキラー細胞と呼ばれる或る特徴化した免疫システム細胞の癌致死能力を高めることができる体内の免疫システムによって産出されるタンパク質である。 I L - 2 は、免疫システムを活性化することができるが、多くの研究者等は、 I L - 2 のみでは癌の再発を防ぐのには十分ではないと考えている。特定の癌抗原に対する免疫応答を高めるのに、幾つかの癌ワクチンには I L - 2 が使われる。

10

【 0 0 8 4 】

顆粒球単球 - コロニー刺激因子 (G M - C S F) は、抗原提示細胞の拡散を刺激するタンパク質である。

【 0 0 8 5 】

Q S 2 1 は、幾つかのワクチンに添加する場合、免疫応答を改善することができる植物抽出物である。

【 0 0 8 6 】

これらは、癌ワクチンに対する生物学的応答を高めることが意図される。今までに誰も、癌ワクチンと組み合わせた免疫賦活剤としての広範囲の免疫賦活剤であるサイモシン 1 (チマルファシン) の使用について記載していない。本発明者等は、この薬剤が樹状ワクチン接種 (腫瘍ワクチン) に対する生物学的な応答性を改変又は増大させることを示している。本発明者等は、非常に良好な応答性を有する樹状細胞ワクチンに対するこれまでの応答を妨げない乳癌患者におけるこの免疫賦活剤を使用する。

20

【 0 0 8 7 】

チマルファシン 1 すなわち T 1 は、この免疫調節作用並びに慢性 B 型肝炎及び慢性 C 型肝炎、後天性免疫不全症候群 (A I D S) 、原発性免疫不全症、ワクチン接種に対する応答の低減、及び癌を含む幾つかの疾病における関連の治療可能性のために使用されているペプチドである。これらの状態における T 1 の有効性の根拠は、主に免疫応答性の調節によるものである。この薬剤によって、多くの免疫システムパラメーターにおいて有益な効果を有し、 T 細胞分化及び T 細胞成熟が増大することが示されている。

30

【 0 0 8 8 】

胸腺組織由来の天然物質として、チマルファシン 1 を初めに単離した。これは、 28 個のアミノ酸の高純度の合成アミノ末端アシル化ペプチドである (分子量 3108) 。現在、固相ペプチド合成によって T A 1 が生成されている。

【 0 0 8 9 】

免疫学的アッセイによって健常な成人において測定されるレベルが、 0.1 ~ 1 n g / m g である場合、内在性チマルファシンを血清中で検出することができる。循環チマルファシンの放出及び調節の源ならびにメカニズムは知られていない。チマルファシンは有機溶媒中で構造化したヘリックス状に折りこむことができ、したがって単独で膜を横切ることができるので、チマルファシンは、細胞内に受容体を有することが可能である。

40

【 0 0 9 0 】

チマルファシンは、より多くの数の成熟した T 細胞を生成するために、幹細胞を刺激する。培地中のヒト C D 3 4 幹細胞へのチマルファシンの添加によって胸腺リンパ球形成が増大し、これにより、全 C D 3 T 細胞の数の増加及びインターロイキン - 7 (I L - 7) の合成、胸腺細胞の成熟に必須なサイトカインの合成が引き起こされる。増大した有力な亜集団は、ヘルパー T 細胞 (C D 4) であった。

【 0 0 9 1 】

C D 3 、 C D 4 、及び C D 8 細胞の産出が、慢性の B 2 4 型肝炎及び癌の患者で高まる。 N K 細胞の活性は、複数の動物モデル、正常なヒト被検体、及び H I V 感染した患者で

50

増大する。

【0092】

チマルファシンは、マイトジエン又は抗原による活性化の後のIFN、IL-2、IL-3の産出及びIL-2受容体の発現を増大させることができる。このパターンの高められたサイトカイン産出、すなわちIFN及びIL-2によって、チマルファシンがTh1型の免疫応答を促進し、IL-2の産出の有意な増大並びにTh2サイトカインであるIL-4及びIL-10の低減を誘導することが実証される。

【0093】

チマルファシンは、用量依存的な方法でin vitroでの胸腺細胞におけるデキサメタゾン誘導性のアポトーシスに拮抗する。CD4 CD8二重陽性の未熟なT細胞において効果が最も明白であった。担腫瘍マウス由来の血清により刺激される胸腺細胞のアポトーシスはまた、サイモシンによる治療によって低減された。

10

【0094】

チマルファシンは、ワクチン強化剤としての感染症（B型肝炎、C型肝炎、先天性免疫不全症候群）の治療に対してヒトにおいて研究されており、また幾つかの癌に対してもヒトにおいて研究されているが、誰も癌ワクチンを有する免疫調節剤として、チマルファシンを使用してはいない。

【0095】

この薬剤は、幾つかの動物癌モデルで有効性を示し、免疫機能の改善が見られている。多くの癌患者は細胞性免疫を低減し、幾つかの癌の進行は、免疫システムによって腫瘍の抑制が損なわれることに関係していると考えられる。

20

【0096】

どのようにチマルファシンが癌ワクチンに対する臨床応答を改善し得るかを説明することができる正確な作用メカニズムは、完全には理解されていない。この作用は、この薬剤を示した多くのメカニズム及び/又は今日まで知られていない他のメカニズムに関係し得る。これは、観察されたTh1及びC1応答に対するサイトカインの分極に関係することがあり、このことは順々に環境を発展させ、DCを誘導し、サプレッサーよりむしろエフェクターの免疫の活性化を開始させる。

【0097】

チマルファシンは安全な薬剤であり、その潜在的な副作用は非常に低い。

30

【0098】

本明細書中に記載のように、DC-TBHは、活性化した自己B細胞（TBH）と融合した自己腫瘍細胞で共培養した自己樹状細胞（DC）を有する患者の定期的な免疫付与を伴う活性のある免疫療法の治療である。

【0099】

腫瘍抗原源としてTBHを使用し、抗原提示細胞としてDCを使用する。

【0100】

好みの実施形態では、本発明は、進行性の腫瘍(neoplastic)疾病を患う患者において、良好な治療結果を得るのに都合のよい幾つかの特徴を与える。

40

【0101】

外科的部位(surgical piece)を処理する場合、非常に多くの細胞を得ることが望ましいが、細針生検によって得られた腫瘍細胞の数はTBHの同化に十分である。このように、患者が任意の不必要的外科的危険性を被ることを防ぐ。一方で、以下で記述するように、転位抗原性は、様々な組織ごとに異なると考えられる。したがって、非侵襲的な方法を利用して、実質的に患者の転位部位ごとから腫瘍細胞を得ることが好み。

【0102】

Bリンパ球は、活性化すると、その効率性により免疫システムにおける第2の最も強力な型の抗原提示細胞になる細胞である。一方で、B細胞培地をIL6で刺激する場合、少なくとも6ヶ月間、培養を継続することができる。細胞融合後、このIL6感受性はTBH集団に伝達される。

50

【0103】

したがって、T B Hを幾つかの腫瘍細胞から生成し、数ヶ月間、その潜在性及び抗原的多様性を失うことなく *in vitro* で維持、及び拡大させることができる。

【0104】

DCをこのハイブリッドに曝すと、DCは自然状態の様々な腫瘍細胞集団に存在する実質的に全ての可能性のある腫瘍抗原を捕捉する。この抗原は、活性化したB細胞に特徴的な共刺激分子及び接着性分子の群と共に、T B H表面上に提示され、これは低濃度レベルであっても、DCによるこれらの最大限効果的な捕捉及び同化を可能にする。

【0105】

治療を伴うDCの治療作用の有効性は、これらの細胞を得た発生源に直接関係すると考えられる。 10

【0106】

編集書誌によれば、骨髓由来の若い形態と成熟形態との可動化によって得られたDCで治療した約68%の患者で、50%を超える腫瘍集団の低減が与えられたのに対し、CD34+の分化又は環状血液中の単球によって、*in vitro*で発生したDCで治療した患者の場合、20%未満の低減が与えられた。

【0107】

例示的なプロトコルを記載した本明細書中で使用したDCは、5日間、低用量で、GM-CSFで刺激した患者の軟膜から得られた。これは、成熟形態及び未成熟形態並びに低流量のCD34+の回収を可能にした。一方で、わずか3日間、IL4非存在下のGM-CSF及びTNFによる*in vitro*での培養は、エフェクターDCの分化を可能にし、CD34+、CD14+、又は単球等の他の存在する可能性のある細胞形態の分化を防ぐ。 20

【0108】

沈降によって、又はCD34+及びCD14+を除外する抗体カクテルを使用した陰性選択によって免疫付与に使用したDCが得られた場合、免疫応答と患者の生存率との間に、何ら有意な統計学的な差は見られなかった。

【0109】

実験プロトコル

DCは骨髓由来であり、IL3、SCF、Flt3L、TNF、及びGM-CSFはその早期分化に影響を与える。この直近のサイトカインは、前分化形態の増殖を促進し、血流へのこれらの細胞の放出に有利に働く。 30

【0110】

GM-CSFの皮下投与は、血液へのDCの重要な経路を誘導する。

【0111】

その後、この目的のために、DC用のStem Step(商標)キット(Stem Cell Technology製, Vancouver, Canada)を使用したアフェレーシス及び事後陰性選択(posterior negative selection)によって得られた血液サンプルで治療的に有用な数にそれらを単離することが可能である。本発明者等が使用しているGM-CSFは、大腸菌(Cassara Laboratory, Argentina)のヒト組み換え型である。本発明者等が選択している用量は、連続5日間、夜間(午後7時頃)に毎日、150μg投与することである。この用量及び投与スケジュールでは、その効果は得られたDCの数に比べて高く、顆粒球の増加が低く、副作用が現れる。この時、血流を通る骨髓を源とするDCは、 40

(1)毛細血管壁を通る能力を有する。DCはまた、可動性が低い。

(2)食作用能力が高いが、抗原提示能は低い。

(3)DCは、エフェクター又は耐性応答を誘導するか否かを明らかしない。

【0112】

DCは、警告し(*in alert*)、微環境のサイトカイン作用によって、食作用のために留まる組織へ移動して、DCは他の特徴を得る成熟形態に分化する:

(1)この膜受容体が突然変異し、DCは組織からリンパ節の毛細血管に移動する能力 50

を得て、これらを通る。DCは大きい可動性を得るが、毛細血管壁を通る能力を失う。

(2) DCは食作用能力を失うが、抗原提示能力を増大させる。

(3) DCは、調節因子又はエフェクター免疫応答の誘導因子として、DC自身を定義する。

【0113】

治療の記載

患者の様々な転位(metastases)からサンプルを得た。アフェレーシス及び研究所で行われた隠された(ulterior)精製プロセスによって、患者のB細胞を精製し、IL4及びIL6を加えることによって、48時間、in vitroで活性化した。最終的に、活性化したB細胞ハイブリッド自体、又は患者の樹状細胞で共培養したB細胞ハイブリッドで患者を免疫付与した。3週間ごとに1回、健常なリンパ節にこの免疫付与を行った。同時に、患者は、免疫付与の間3日ごとの夜間(午後7:00~午後9:00)に皮下的にチマルファシン1.6mgを受け、続く6ヶ月後にワクチン接種のプロトコルを完了させた。このワクチン接種の計画は、例えば4~10回の用量を含み得るが、これらの数に限定されない。

【0114】

アフェレーシス療法によって患者の末梢血の軟膜からB細胞を得る。それから、アフェレーシス由来の産物をFicoll-Hypaque勾配上で播種する。上中間期(superior interphase)で得られた単核細胞環はB細胞起源であり、これはStem Cell Technology(Vancouver, Canada)製の商業用キットを使用した陰性選択によって単離される。IL4及びIL6が豊富な血清無含有培地でB細胞を培養する。

【0115】

外科生検又は針生検によって、腫瘍サンプルを得る。いずれの場合にも同時に、抽出材料を細胞学的に確認した。腫瘍サンプルを機械的に分離する。ヒトアルブミン、インスリン、及び上皮成長因子が豊富な血清無含有培地で、得られた単細胞懸濁液を培養する。

【0116】

それから、ポリエチレングリコール溶液を使用することによって、活性化したリンパ球及び単離した腫瘍細胞を融合する。B細胞マーカーとしての抗CD20及び腫瘍細胞源に従った抗シトケラチン又は抗ビメンチンによる免疫二重染色によって、TBH細胞の形成を制御する。次に、インスリン、上皮成長因子、及びIL6が豊富な血清無含有培地でのハイブリッドを培養する。

【0117】

骨髄から移動させた後、アフェレーシス療法によって自己DCを得る。5日間、GMC-SFで患者を刺激することによって、移動を行う。6日目にアフェレーシスによって、2つの血液量のプロセスに対応する軟膜を回収する。

【0118】

患者の軟膜から未熟で、分化したDCの混合集団を濃縮させる。様々な付着技法又は陰性選択のいずれかによって、この濃縮工程及び精製工程を行うことができる。前者では、組織培養フラスコ上に単核細胞を積層させ、4時間後に上清を徐々に廃棄する。それから、以下の適切な組織培養培地で、付着細胞を培養する。陰性選択方法では、CD3、CD14、CD16、CD19、CD34、CD56、CD66b及びグリコホリンAに対する8つのモノクローナル抗体(MAB)の混合物で単核細胞を培養する。免疫電磁ビーズで、それぞれのモノクローナル抗体を接合させる。磁場を通過することによって、マークした細胞懸濁液を精製する。マークした細胞が保持され、マークしていない細胞を滅菌チューブに回収する。得られたマークしていない細胞懸濁液は、50%(40~60%)の未熟及び成熟DC懸濁液で構成されている。

【0119】

ヒトアルブミンであるGMC-SFrh、及びTNFrhが豊富な血清無含有培地において、3日間、自己TBHで自己富化(enriched)DC懸濁液を共培養する。

【0120】

10

20

30

40

50

72時間培養した後に、DCを洗浄し、濃縮して、患者の健常なリンパ節の1つに注射し、その後対応する安全性、純度、及び力価試験を行う。

【0121】

この治療は、進行性の腫瘍疾患を患う患者において良好な治療結果を得る可能性について有益な幾つかの特徴を示す。

【0122】

外科的部位を処理する場合、非常に多くの細胞を得るのには都合がよいが、細針生検によって得られた腫瘍細胞の数はT BHの同化には十分である。転位抗原性は、様々な組織ごとに異なると考えられる。したがって、非侵襲的な方法で測定し、患者の各転位部位から腫瘍細胞を得ることが非常に重要である。

10

【0123】

Bリンパ球は、活性化すると、免疫システムにおいて第2の最も強力な型の抗原提示細胞になる細胞である。一方で、B細胞培地をIL6で刺激する場合、少なくとも6ヶ月間、培養を継続することができる。細胞融合後、このIL6感受性はT BH集団に伝達される。

【0124】

したがって、その潜在性及び抗原的多様性を失うことなく、幾つかの腫瘍細胞からT BHを生成し、数ヶ月間、in vitroで維持及び拡大させることができる。

【0125】

DCをこのハイブリッドに曝すと、DCは自然段階の様々な腫瘍細胞集団に存在する実質的に全ての可能性のある腫瘍抗原を捕捉する。この抗原は、活性化したB細胞に特徴的な共刺激分子及び接着性分子の群と共に、T BH表面上に提示され、これは低濃度レベルであっても、DCによる最大限効果的な捕捉及び同化を可能にする。

20

【0126】

in vitroでの成熟プロセス及び活性化プロセスの開始から、T BHはDCに存在しているので、DCがこのプロセスを行うことができる短期間での腫瘍抗原の取り込みが可能になる。腫瘍抗原を飲作用した(endocytated)すぐ後に、DCは抗原を処理及び提示するその能力において最大レベルの有効性に達する。これらはまた、血管から組織への移動能力を発現する。

30

【0127】

このように、リンパ節内への注射は、DCワクチンの輸血よりも有効であると考えられる。

【0128】

しかし、骨髄からの可動性によって得られたDCによって、単独処理において得られた少数の細胞がもたらされる。外科的部位から溶解した腫瘍等の全腫瘍を示す抗原の使用によって、又は腫瘍細胞及びDCからのハイブリッドによって、これらのDCを刺激する場合、サンプルは、経時的な有効性を達成するために、異なる部分で単離することができる。

40

【0129】

臨床的展開の観点から、幾人かの患者のみが腫瘍学的ワクチン接種のみによる自発的に良好な展開を有する。化学療法、放射線療法、及びホルモン療法に耐性のある進行性の乳癌患者の生存率が低いことが知られている。

【0130】

患者の予後を改善することができる自己樹状細胞ワクチン(DCV)のプロトコルが開発されている。

【0131】

チマルファシン(ZADAXIN(登録商標))は、Th1応答性を高めることが示されており、これは腫瘍の緩解に関連する。樹状細胞の免疫付与及びチマルファシンがワクチン療法のみに対して応答性がない進行性の乳癌患者の予後に正の効果を有するか否かを評価するために、以下の研究を行った。

50

【0132】

以下の実施例によって本発明が示されるが、これは限定を意図しない。

【実施例】

【0133】

化学療法、放射線療法、及びホルモン療法に耐性のある18人の進行性の乳癌患者を治療した。

【0134】

全ての患者が（転移のある）クラス4の乳癌である女性であった。

【0135】

年齢は39～71歳であった。

10

【0136】

樹状細胞ワクチンで患者を治療した（プロトコル：「Annals of Oncology」（2004），15巻，Supp. 3 Abs: iii40-「Dendritic Cell Vaccine for Metastases Breast Cancer」に従って）。

【0137】

2回目のワクチン接種後、細胞内免疫付与がワクチン接種を継続して20ULPI（リンフォシティック(Linfocitic)増殖指数）以上である場合にこれを測定した。

【0138】

この応答性が20ULPI未満であった場合、（無作為に）5人の患者群及び7人の患者群の2つの群に患者を分けた。5人の患者群は樹状細胞ワクチンに加えて、チマルファシン（6ヶ月間、1.6mg/tw）を受けた。他の7人の患者群は免疫刺激を受けず、プログラムされた樹状ワクチン接種を受けた。

20

【0139】

この免疫療法レジメンの成功のための重要な点は、2回目のDCワクチン接種後に患者が有する早期免疫応答であった。

【0140】

リンパ球増殖アッセイと呼ばれる既知の *in vitro* 試験を使用して、患者の免疫応答を測定した。簡潔には、患者由来の単核細胞を精製し、10:1の比で患者の腫瘍細胞の懸濁液と混合した（3000個のリンパ単球に対して300個の腫瘍細胞）。マルチウェルプレートで混合細胞懸濁液を播種し、37で培養した。96時間後、細胞を回収して、自動血球計(haemocytometer)で計測した。

30

【0141】

計測した単核細胞の数が、20000個より大きかった（リンパ球増殖指数（LPI）が20Uである）場合、患者は効果的な腫瘍応答で良好な予後を有して、延命した。これに対して、この混合細胞培養後に、単核細胞がこの数に達しなかった場合、患者の応答性は乏しく、その生存率は、免疫応答性の患者より有意に低かった。

【0142】

チマルファシン治療は、Th1応答の重要な免疫エンハンサーであり、これは腫瘍拒絶を伴うものである。

【0143】

2回目のDC免疫付与後に、20U未満のLPIを有する、年齢が39～71歳の5人の連続した進行性乳癌患者を4つのさらなる樹状細胞ワクチンと共にチマルファシン（6ヶ月間、1.6mg/1週間に2回）で治療した。チマルファシンはLPIを改善することができ、大部分の治療患者で効果的な腫瘍応答を示した。

40

【0144】

全18人の治療を受けた転移性乳癌患者を基にした臨床応答及び生存率のデータをまとめて、症状の連続した統計分析(case serial statistic analysis)を行うために、本発明者等は3つの異なる群に全集団を分けた。

【0145】

1群（n=7）では、患者は6つの樹状細胞免疫付与を受け（3週ごとに1つ）、2回

50

目のワクチン接種後に、リンパ球増殖指数（LPI）>20U（免疫応答あり）を有していた。

【0146】

2群（n=6）では、患者は6つの樹状細胞免疫付与を受け、2回目のワクチン接種後に、LPI<20U（免疫応答なし）を有していた。

【0147】

3群（n=5）では、患者は6つの樹状細胞免疫付与を受け、2回目のワクチン接種後に、LPI<20U（免疫応答なし）を有し、また、チマルファシン（1.6mg/1週間に2回）を受けた。

【0148】

リンパ球増殖アッセイによって、免疫応答を測定した。結果において、6ヶ月で、1群（応答性）の患者の100%、2群（非応答性）の患者の50%、及び3群（チマルファシンで治療した非応答性）の80%の患者で50%を超える腫瘍低減が観察された。

【0149】

12ヶ月の患者の生存率は、1群で57%、2群で0%、及び3群で80%であった。

【0150】

2回目のワクチン接種後のDCV治療に対する免疫応答（LPI>20U）が腫瘍の大きさの低減及び患者の延命に関係していたことを理解することができる。チマルファシンによる治療は、樹状細胞免疫付与に対する応答性がなかった進行性の乳癌患者において正の効果があった。患者の生存率は、免疫応答性の患者及びチマルファシンを受けなかった非免疫応答性の患者に比べて、チマルファシン治療した群で高かった（表1を参照のこと）。

【0151】

表1は、6ヶ月での臨床的応答性及び12ヶ月での患者の生存率を示す。

【0152】

【表1】

6ヶ月での臨床的応答性及び12ヶ月での患者の生存率			
治療群	n	50%を越えて腫瘍低減した患者	患者の生存率
1群(応答性)	7	100%	57%
2群(非応答性)	6	50%	0%
3群(チマルファシンで治療した非応答性)	5	80%	80%

【0153】

18人の転移性の乳癌患者のレトロスペクティブ観察を行った。1群（n=7）では、患者は6つの樹状細胞免疫付与を受け（3週ごとに1つ）、2回目のワクチン接種後に、リンパ球増殖指数（LPI）>20U（免疫応答あり）を有していた。

【0154】

2群（n=6）では、患者は6つの樹状細胞免疫付与を受け、2回目のワクチン接種後に、LPI<20U（免疫応答なし）を有していた。

【0155】

3群（n=5）では、患者は6つの樹状細胞免疫付与を受け、2回目のワクチン接種後に、LPI<20U（免疫応答なし）を有し、また、チマルファシン（1.6mg/1週間に2回）を受けた。

【0156】

結果：6ヶ月で、50%を超える腫瘍低減が、1群（応答性）の患者の100%、2群（非応答性）の患者の50%、及び3群（チマルファシンで治療した非応答性）の80%の患者で観察された。12ヶ月での患者の生存率は、1群で57%、2群で0%、及び3群で80%であった。

10

20

30

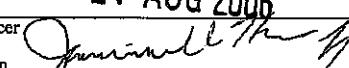
40

50

【 0 1 5 7 】

免疫刺激剤の使用は、樹状細胞ワクチンで治療した乳癌患者に限定されず、その代わりに、これは、他の型の癌患者における樹状細胞ワクチンの展開及び臨床的な結果を改善することができる。チマルファシンはまた、他の種類の免疫ワクチンによって臨床的予後を改善することができる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US05/43985												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 39/00(2006.01)														
USPC: 514/2 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) U.S. : 514/2														
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)														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category *</th> <th style="width: 80%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 10%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 6,537,585 (Durban et al) 25 March 2003, column 6 line 46, column 19 line 37 to 61, column 19 line 65 to column 20 line 4.</td> <td>1, 3-8, 10-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Shrivasta et al, J Biomed Sci 11:623-630, Sept-Oct 2004.</td> <td>2, 9</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Huang et al, Int Immunopharm 4:539-546, April 2004.</td> <td>2, 9</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 6,537,585 (Durban et al) 25 March 2003, column 6 line 46, column 19 line 37 to 61, column 19 line 65 to column 20 line 4.	1, 3-8, 10-19	Y	Shrivasta et al, J Biomed Sci 11:623-630, Sept-Oct 2004.	2, 9	A	Huang et al, Int Immunopharm 4:539-546, April 2004.	2, 9
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	US 6,537,585 (Durban et al) 25 March 2003, column 6 line 46, column 19 line 37 to 61, column 19 line 65 to column 20 line 4.	1, 3-8, 10-19												
Y	Shrivasta et al, J Biomed Sci 11:623-630, Sept-Oct 2004.	2, 9												
A	Huang et al, Int Immunopharm 4:539-546, April 2004.	2, 9												
<input 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 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														
Date of the actual completion of the international search 13 July 2006 (13.07.2006)		Date of mailing of the international search report 17 AUG 2006												
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Mark Halvorson  Telephone No. 571-272-0787												

フロントページの続き

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

(74)代理人 100084010

弁理士 古川 秀利

(74)代理人 100094695

弁理士 鈴木 憲七

(74)代理人 100111648

弁理士 梶並 順

(74)代理人 100122437

弁理士 大宅 一宏

(72)発明者 モヴィグリア、ゲスター・ヴォ・アントニオ

アルゼンチン国、アーベーエヌ・ブエノス・アイレス 1211、パラグアイ 2452-ファースト・フロア

(72)発明者 ルドルフ、アルフレッド・アール

アメリカ合衆国、カリフォルニア州、ロス・アルトス・ヒルズ、リディコート・ドライヴ 141
42

F ターム(参考) 4C085 AA03 BB01 CC03 EE06 FF13 GG04