

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6393186号  
(P6393186)

(45) 発行日 平成30年9月19日(2018.9.19)

(24) 登録日 平成30年8月31日(2018.8.31)

(51) Int.Cl.

F 1

A 6 1 K	35/14	(2015.01)	A 6 1 K	35/14	Z
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	A
A 6 1 K	38/20	(2006.01)	A 6 1 K	38/20	
A 6 1 K	38/21	(2006.01)	A 6 1 K	38/21	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	U

請求項の数 5 (全 14 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-509386 (P2014-509386)
(86) (22) 出願日	平成24年5月2日(2012.5.2)
(65) 公表番号	特表2014-513126 (P2014-513126A)
(43) 公表日	平成26年5月29日(2014.5.29)
(86) 國際出願番号	PCT/US2012/036123
(87) 國際公開番号	W02012/151279
(87) 國際公開日	平成24年11月8日(2012.11.8)
審査請求日	平成27年4月30日(2015.4.30)
審判番号	不服2017-5238 (P2017-5238/J1)
審判請求日	平成29年4月12日(2017.4.12)
(31) 優先権主張番号	61/482,009
(32) 優先日	平成23年5月3日(2011.5.3)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/528,484
(32) 優先日	平成23年8月29日(2011.8.29)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	513276477 イミュノバティブ セラピーズ、リミテッド イスラエル国 96951 エルサレム
(74) 代理人	マルカ テクノロジー パーク ビルディング ナンバー 1 ファースト フロア 110000578 名古屋国際特許業務法人
(72) 発明者	ハーノイ マイケル イスラエル国 96431 エルサレム ホーリーランド ジデオン ハウスナー 54

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】免疫療法を用いたIL-12の誘導

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

患者自身の免疫系によって患者内で合成される内因性IL-12の発現増加用組成物であって、

該組成物は、

外来抗原として活性化同種異系Th1細胞

Th1サイトカインとして前記活性化同種異系Th1細胞から自然に提供されるインターフェロン-ガンマ、

DC成熟分子として前記活性化同種異系Th1細胞の表面上に発現しているCD40Lを含み、

前記組成物を癌患者に投与後3~4週間後に、IL-12が検出可能になり、当該患者の血漿中の前記内因性IL-12の濃度が8000 pg/ml~200,000 pg/mlになるように、前記内因性IL-12の産生を促進する組成物。

## 【請求項 2】

請求項1に記載の組成物であって、

前記活性化同種異系Th1細胞は、CD3とCD28とが架橋結合されることによって活性化される、組成物。

## 【請求項 3】

請求項1に記載の組成物であって、

前記活性化同種異系Th1細胞は、注入器または可撓性容器に詰められる、組成物。

10

20

**【請求項 4】**

請求項 3 に記載の組成物であって、

前記細胞は、 $1 \times 10^7$  個 / m l 以上の濃度である、組成物。

**【請求項 5】**

請求項 4 に記載の組成物であって、

前記細胞は、非栄養培地に懸濁される、組成物。

**【発明の詳細な説明】****【発明の詳細な説明】****【0001】****[分野]**

本発明は、免疫細胞を用いた治療法に関する。より具体的には、本発明は、患者における IL - 12 の産生を促進する免疫細胞療法に関する。

10

**[背景]**

既知の最も的確、かつ強力で安全な疾病の予防および治療のメカニズムは、先天性免疫および適応免疫の双方の要素を組み合わせて、医学的な介入を行わずに多種多様な外来病原体を除去する、自然「滅菌」免疫応答である。免疫系は、再感染時に迅速に免疫応答を開始するために、除去された外来抗原を「記憶する」ように構築されている。免疫系は、癌患者の免疫系でさえも、ウイルスやバクテリアでみられるような外来抗原を認識することができ、また、該外来抗原を完全に破壊して身体から除去するのに十分な、外来抗原に対する応答を開始することができる。この滅菌免疫応答の強烈性および特異性を確認することができるのは、不全に陥り低下した免疫系によって、自己組織は影響されないながらも、例えは腎臓、肝臓、または心臓などの大きな移植臓器が完全に破壊され得ることにおいて、確認することができる。外来抗原に対するこのような免疫の破壊効果は、患者の免疫応答が低下しているが故に逃避した腫瘍および／または他の抗原に転換し得ると、有益となるだろう。

20

**【0002】**

免疫療法は、癌を含む様々な感染性および非感染性の疾患に対する免疫応答を、利用し、誘導し、および制御する方法を開発するために専ら向けられたものである。治療用ワクチンは、免疫系を教育するために構築された免疫療法の一種である。癌が存在する患者において、該ワクチンは、その患者の免疫系が腫瘍細胞を外来のものとして認識するよう設計されている。免疫系が腫瘍を外来病原体として認識すると、理論的には免疫応答が誘発され、それによって、免疫細胞に大きな腫瘍を破壊させ、転移性腫瘍細胞が体内のどこに存在しようともその転移性腫瘍細胞を探し出して破壊させることができる。免疫治療が成功した後は、除去された外来細胞を「記憶する」免疫系の能力によって、免疫系が日和見性感染症の罹患を防ぐのと同じように、免疫系は、追加的な治療を施すことなくいかなる再発性癌細胞をも除去することができるだろう。

30

**【0003】**

疾病または病原生物に対する個人の免疫系反応は、Th1 応答にも Th2 応答にもなり得る。Th1 応答では、CD4+T 細胞は Th1 細胞へと分化 (polarized) するが、それに対して、Th2 応答では、CD4+T 細胞は Th2 細胞へと分化する。この一層広く使用されている分類方法は、Th1 / Th2 バランスと呼ばれる。Th1 細胞が細胞媒介性免疫を促進する一方、Th2 細胞は液性免疫を誘発する。細胞性免疫 (Th1) は、ナチュラルキラー細胞 (NK)、T 細胞、およびマクロファージに対して、感染部位にて異常細胞および微生物を攻撃するように誘導する。液性免疫 (Th2) は、侵入した異物を中和するために用いられる抗体の産生をもたらす。一般的に、CD4+T 細胞の Th2 への分化が、多くのヒトおよび動物の癌研究において癌の進行との関連が示されてきている一方で、Th1 への分化は、腫瘍縮小および抗腫瘍免疫と相関がある。

40

**【0004】**

個人の免疫応答、すなわち Th1 / Th2 バランスは、当該個人におけるサイトカインのバランスによって評価され得る。サイトカインは、小さな細胞内シグナル伝達タンパク

50

質分子である。サイトカインという用語は、通常、ナノモルからピコモルまでの濃度で調節因子として働く様々な可溶性タンパク質群および様々なペプチド群の総称として使用される。サイトカインは、健常な状態または病的な状態のいずれにおいても、個々の細胞および組織の機能活性を調節する。また、これらのタンパク質は、細胞間の相互作用を直接調節し、細胞外環境で行われる作用を調節する。インターロイキンは、免疫調節に関与する一群のサイトカインであって、免疫系の様々な細胞によって合成されることが可能である。インターロイキンは、例えばIL-2、IL-4、IL-10、およびIL-12などの複数のインターロイキンがあり、これらインターロイキンの各々は、免疫系内で特異的な役割を有する。

## 【0005】

10

Th1細胞は、炎症反応に関する1型サイトカインを産生する。1型サイトカインには、例えば、IL-2、IL-12、IL-15、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、TNF-ベータ、GM-CSF、およびC-Cケモカインが含まれる。Th2細胞は、体液性免疫応答に関する2型サイトカインを産生する。2型サイトカインには、例えば、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、およびTGF-ベータが含まれる。Th1免疫応答およびTh2免疫応答は、1型応答が増加することで2型応答がダウンリギュレートされ、2型応答が増加することで1型応答がダウンリギュレートされるように、互いに対抗調節し合う。

## 【0006】

20

IL-12は、p35およびp40のサブユニットで構成されるヘテロ二量体である。IL-12は、一次的には抗原提示細胞(APC)によって産生される。また、IL-12は、単球およびマクロファージ、樹状細胞、ならびにB細胞によって産生され得る。IL-12は、T細胞およびナチュラルキラー細胞に対して免疫調整作用をもたらす。内因性IL-12は、最適なTh1応答を生ずることに関与することが知られており、細胞内病原体に対する細胞媒介性免疫において重要な役割を果たすことができる。

## 【0007】

30

IL-12は、免疫系の重要な要素を調節すること、また、研究室での研究や動物実験において劇的な抗腫瘍効果を有することが実証されてきたことから、熱心な研究対象とされてきた。IL-12は、例えば、ヒト肺線癌および急性骨髓性白血病の成長の阻害に関与してきた。しかしながら、人体に高い毒性をもたらすがゆえに、治療計画において外因性IL-12を用いることが制限されてきた。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0008】

【図1】1年より長きにわたる患者の血漿中のIL-12レベルを図示するグラフである。同種異系活性化Th1細胞は、様々な投与手段を用いて様々な時間で患者に投与された。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0009】

## [例示的な実施形態の詳細な説明]

本発明は、患者の血漿中のIL-12を検出可能なレベルに導く組成物および方法に関する。本発明は、患者に投与された場合に、重篤な毒性を生じることなく、患者の血漿中の内因性IL-12を検出可能なレベルで産生し得るように導く組成物を含む。内因性IL-12は、驚くことに、癌患者において検出され得る。該組成物は、好ましくは、同種異系活性化T細胞を含む。T細胞は、IL-12を産生することができないため、患者に投与されたT細胞組成物は、患者自身のAPCによるIL-12の産生を引き起こす。

## 【0010】

40

また、本発明は、患者自身の免疫系によって、該患者の内因性IL-12の産生を誘発する方法を含む。該方法は、同種異系物質の、好ましくは同種異系活性化T細胞の、組成物を投与することを含む。該組成物は、単回投与または複数回投与にて投与され得る。好ましくは、同種異系活性化T細胞は、低用量で頻繁に投与される。同種異系細胞は、皮内

50

ルート、静脈内ルート、または病巣内ルートによって投与され得る。その頻度は、3日置きよりも多いことが好ましい。これらの組成物が投与されると、がん患者でさえも、その患者自身の免疫系によって、血漿中の内因性IL-12が検出可能なレベルで産生されるように誘導されることがある。一般的には、腫瘍によってIL-12の発現が抑制されるがゆえに、癌患者においてIL-12がみつけられることはない。驚くことには、本明細書に記載の方法は、この抑制を克服することが可能であり、長期間にわたって、例えば数か月間または1年間までも、血漿中におけるIL-12の発現を誘発するのに十分な環境を創出することが可能である。さらに、血漿中に内因性IL-12が存在することで、薬剤として外因性IL-12を投与するほどの重篤な毒性を患者にもたらすことはない。

## 【0011】

10

内因性IL-12とは、そのIL-12が患者自身の免疫系によって患者内で合成されることを意味する。具体的には、該IL-12は、患者の抗原提示細胞(APC)によって合成されることが可能である。APCは、単球およびマクロファージ、樹状細胞、ならびにB細胞を含み得る。外因性IL-12とは、そのIL-12が患者自身の免疫系によって合成されないことを意味する。外因性IL-12は、別の個人から分離されたIL-12および/または純化されたIL-12、あるいは、IL-12遺伝子を含むDNA構築体(DNA construct)によって発現されるIL-12、を含む。

## 【0012】

20

有利なことは、患者において内因性IL-12が全身で産生されることによって、患者にもたらされるのは最小限の毒性か、あるいは、いかなる毒性ももたらされないことである。患者は、例えば一過性インフルエンザ様症状などのような、一過性の症状を経験する可能性がある。一般的には、外因性IL-12が患者に投与されてきた場合、中毒作用によって治療の場での使用が限定されてきた。本明細書に記載の方法は、毒性を生じることなく血漿中のIL-12を全身に関して検出可能なレベルとし得るようなIL-12の生体内産生を促進するための方法であって、当該方法の能力は驚くものがある。この結果、患者自身の免疫系を利用することで、腫瘍および癌細胞の縮小および/または除去を目的としてIL-12が存在することから生ずる利益を活用することが可能となる。

## 【0013】

30

これらの方法の使用は、Th1環境に対して、具体的にはIL-12に対して、好適な反応をする他の疾患の縮小および/または除去に適用することができる。このような疾患には、癌、例えば、B型肝炎、C型肝炎、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、HPV、ヒト型結核菌、歯周病などの、慢性ウイルス性および細胞内細菌性またはマイコバクテリア性の疾病を含む感染症、および、アトピー性喘息のようなアレルギー性疾患が含まれる。さらに、IL-12の生体内産生を促進する方法には、細胞性免疫を維持することによって抗老化効果が含まれ得る。健常者におけるTh1細胞のTh2細胞に対するバランスは、老化プロセスの一部として減少し、高齢者を感染症および癌にかかりやすくさせてしまう。内因性IL-12の産生を促進することでTh1/Th2比を上昇させることができあり、それによって、疾病に対する脆弱性から守られる。

## 【0014】

40

本発明の組成物は、一般的には、外来抗原、好ましくは同種抗原、を含む。該組成物は、少なくとも1つのTh1サイトカイン、および/または、DCの成熟を誘発してIL-12を産生することが可能な、少なくとも1つのDCエフェクター分子とを含む。治療用組成物は、一般的には、該少なくとも1つのTh1サイトカイン、および/または、同種抗原と相互に結合された該少なくとも1つのDCエフェクター分子とを含む。該組成物は、好ましくは、該組成物の各成分を单一の細胞型にて提供することができる、生きている同種異系活性化T細胞を含む。好適な実施形態では、例えば、インターフェロン-ガンマ、腫瘍壊死因子-アルファ、およびインターロイキン-2などのような、Th1サイトカインを産生するために活性化され、かつ、細胞表面にDC成熟エフェクター分子であるCD40Lを発現する、生きている同種異系Th1細胞が用いられる。あるいは、該組成物の上記3つの成分は、2つ以上の細胞型から供給され得る。例えば、Th1サイトカイン

50

が、1つの組成物中のある1つの細胞型から供給され、同種抗原が別の細胞型から供給され、また、DCエフェクター分子が第3の細胞型から供給されてもよい。あるいは、ある1つの細胞型が上記成分のうちの任意の2つの成分を含み、第2の細胞型が第3の成分を含んでもよい。細胞型は、組成物の必要成分の供給源を提供しさえすれば、生きている必要はない。

#### 【0015】

あるいは、組成物の成分は、天然のタンパク質または生物工学処理されたタンパク質から供給可能である。例えば、組み換えられたもしくは精製されたTh1サイトカイン、DC成熟分子、または同種抗原が、併用されてもよいし、あるいは、生きている細胞成分と組み合わせて用いられてもよい。組成物の成分は、「チップ」または生分解性プラットフォーム上で組み合わされ得る。これらの成分は、患者に対して同時に投与する必要はないが、任意の順で投与され得る。10

#### 【0016】

治療用組成物にある同種抗原は、抗原が貪食され得るように、あるいは、抗原が処理されてT細胞に提供されるために免疫系に供与され得るように、提供されなければならない。抗原は、生きている細胞の天然部分でもよいし、あるいは、分子生物学の技術を用いて変形もしくは生体工学処理されたものでもよい。抗原は、可溶性であるか、または、表面、生体もしくは生きている細胞の無傷部分、または、弱毒化された生体の一部に対して固定化され得る。好適な実施形態では、同種抗原は、同種異系T細胞であり、より好適な実施形態では、同種異系活性化T細胞である。20

#### 【0017】

例示的な一実施形態では、治療用組成物は、T細胞で発現される同種抗原を含む。T細胞は、好ましくはCD4+T細胞であり、より好ましくはTh1細胞である。Th1細胞は、健常な献血者から得られたナイーブCD4+先駆体細胞から、生体外で分化され、拡張され、活性化され得る。好ましくは、該細胞は、投与のときに活性化された状態である。好ましくは、該細胞は、CD3/CD28表面分子に対してモノクローナル抗体を架橋結合させることによって活性化される。架橋結合は、好ましくは、表面にCD3/CD28モノクローナル抗体を固定化させることによって引き起こされる。好ましくは、該表面は、マイクロビーズ粒子またはナノビーズ粒子である。これらのビーズは、分解性ビーズであってもよい。これらの細胞は、炎症性Th1サイトカインを多量に産生することが可能であり、細胞表面に、例えばCD40Lなどのような、エフェクター分子を発現させることが可能である。該エフェクター分子は、内因性IL-12の産生を引き起こすことによってTh1免疫の発達を促進する働きをする。30

#### 【0018】

好適な実施形態では、治療用組成物は、活性化同種異系Th1細胞を含む。これらの活性化Th1細胞は、強力な炎症性物質となり得る。これらの活性化同種異系Th1細胞およびこれらの製造方法は、例えば、米国特許第7,435,592号、第7,678,572号、第7,402,431号、および第7,592,431号に記載されており、参考によって本明細書に援用される。活性化同種異系Th1細胞は、患者に対して意図的に不適合である。40

#### 【0019】

様々なTh1炎症性サイトカインが治療用組成物に含まれ得る。炎症性Th1サイトカインの例には、IL-1、IL-2、IL-6、IL-12、IL-15、IFN-ガンマ、TNF-アルファ、TNF-ベータ、GM-CSF、およびC-Cケモカインが含まれ、TGF-ベータ、IL-4、またはIL-10は含まれない。サイトカインの成分は、天然のもしくは組み換えサイトカインであってもよいし、あるいは、サイトカインの受容体と相互作用するように構築された、生体工学で処理された分子であってもよい。サイトカインは、治療用組成物に直接含まれてもよい。あるいは、治療用組成物は、サイトカインを産出し、分泌する、生きている細胞または他の成分を含んでもよい。好ましくは、サイトカインは、活性化された細胞源を通して自然に提供される。その理由は、外因性サ50

イトカインは患者にとって非常に有毒となる傾向がある一方で、内因性サイトカインはそうではないからである。いくつかの例示的な実施形態において、治療用組成物は、T細胞を活性状態にて含み、該T細胞は、炎症性T<sub>h</sub>1サイトカインを産出し、分泌するため、治療用組成物中でこれらのサイトカインの発生源としての役割を果たすことが可能である。

#### 【0020】

治療用組成物は、未熟DCの成熟を引き起こす1つまたは複数の因子を含み得る。具体的には、DC1細胞の成熟およびIL-12の産生を促進する成熟因子は、インターフェロン-ガンマの産生およびT<sub>h</sub>1適応免疫をもたらす。DCは、未熟な抗原捕捉細胞から、成熟した抗原提示T細胞-プライミング細胞へと進化することが可能であり、該細胞は、抗原を免疫原に変換し、免疫応答を開始するのに必要なサイトカイン、ケモカイン、および共刺激分子を発現する。誘発された、T細胞に媒介される免疫応答の種類(T<sub>h</sub>1対T<sub>h</sub>2)は、周囲の微小環境から受ける活性シグナルに応じて変化する。例えば抗腫瘍免疫や抗感染症免疫などのような、免疫を調整するDCの能力は、T<sub>h</sub>1免疫を促進するためのDCの成熟度に依存する。ヒトDCは、均一な集団ではない。抗腫瘍免疫を誘発することに加えて、DCは、アネルギーまたは耐性をも誘発することができる。DCは、CD34+造血幹細胞(HSC)に由来する。骨髄樹状細胞(DC1)および形質細胞様DC(DC2)は、ヒトDCの2つの主要な亜集団であり、それらの特徴は、表現型、移動、および機能において大きく変わる。DC1細胞は、効果的なT細胞刺激因子であって、腫瘍特異的免疫応答を誘発する。CD11c+DC1細胞が、主としてT<sub>h</sub>1の分化を誘発する一方で、IL-3(CD123)の受容体を発現するDC2細胞が、主としてT<sub>h</sub>2応答を促進する。これら両DC集団は、健康なドナーに比べて、癌患者では著しく低い。DC1細胞は、成熟するとIL-12を産生し、また、DC2細胞は、IL-10を産生する。

#### 【0021】

例えばIL-10およびIL-12などのようなサイトカインがDCの成熟過程の間に産生されることは、T<sub>h</sub>1あるいはT<sub>h</sub>2免疫応答へとDCが誘導されることに影響を及ぼす。抗原提示分子および共刺激分子を高いレベルで発現することに加え、成熟したDCは、T<sub>h</sub>1免疫応答を刺激するために、多量のIL-12を放出しなければならない。IL-10の放出によって、共刺激分子のアップレギュレーションとIL-12の産出とが妨害されることでDCの成熟過程が阻止され、その後、T<sub>h</sub>1応答を開始するためのDCの能力が制限される。

#### 【0022】

以下に記載の因子を含む様々な因子によって、抗原取り込みおよび抗原処理に続く、DC1、IL-12産生細胞となるDCの成熟が誘発され得る：全バクテリアまたはバクテリア由来の抗原(例えば、リポ多糖、LPS)、例えばIFN-ガンマ、TNF-アルファ、IL-1、GM-CSFなどの炎症性サイトカイン、選択的細胞表面受容体(例えば、CD40)のライゲーション、およびウイルス産物(例えば、2本鎖RNA)。未熟DCでのFas結合は、例えば、IL-1ベータおよびIFN-ガンマの成熟および放出の双方を誘発する。CD40のライゲーションは、B7-1/CD80およびB7-2/CD86共刺激分子のアップレギュレーション、IL-12の分泌、および、ケモカイン(例えば、IL-8、MIP-1アルファ、MIP-1ベータ)の放出を促進する。

#### 【0023】

いくつかの好適な実施形態では、CD40Lは、DCが成熟するための因子として含まれる。DCの成熟を引き起こすその他の因子を含むことも、本発明の範囲内である。いくつかの例示的な実施形態においては、治療用組成物は、当該表面上に高密度のCD40Lを発現する、活性化された状態のT細胞を含む。CD40Lは、IL-12を産生するための、DCを成熟させるための強力なエフェクター分子である。

#### 【0024】

ある1つの例示的な実施形態では、治療用組成物は、活性化同種異系T細胞と、少なく

10

20

30

40

50

とも1つのI型サイトカインと、DCの成熟を引き起こす少なくとも1つの因子とを含む。これらの成分を含む組成物は、例えば、2010年12月14日に出願され、参照によつて本明細書に援用される、係属中の米国特許出願番号第12/967,910号に記載されている。

#### 【0025】

微小環境内へ腫瘍関連抗原を放出するために、腫瘍細胞の一部を切除した後に治療用組成物を腫瘍内投与することによって、DCがDC1表現型へと成熟するための強力なアジュバント効果を提供することができる。DC1表現型は、IL-12を産生し、1型抗腫瘍免疫の発達と、腫瘍の免疫回避メカニズムのダウンレギュレーションとを促進する。治療用組成物の投与は、例えば、静脈内投与、皮内投与、髄腔内投与、腹腔内投与、病巣内投与、胸腔内投与などを含む、他の方法によつても達成され得る。皮膚にはラングルハンス細胞と呼ばれる未熟DCが豊富にあることから、好ましくは、組成物は、まず経皮投与される。例えば、インターフェロン-ガンマ、腫瘍壊死因子-アルファ、IL-2、およびGM-CSFなどの炎症性Th1サイトカイン、および、例えばCD40LなどのDC成熟因子の存在下で、ラングルハンスの細胞は、同種抗原を摂取して、DC1、IL-12産生細胞に成熟する。これらの成熟した細胞は、リンパ節へ移動して、Th1免疫の発達を促進する。

#### 【0026】

組成物を皮内注射することで、患者を「プライミング(prime)」して、組成物中の同種抗原に対して免疫を有するようにすることができる。皮内注射が複数回行われることで、患者の循環系において、同種抗原に特異的なTh1記憶細胞の数を増加することができ、それによって、Th1/Th2バランスを変化させることとなる。 $1 \times 10^6$ 個から $1 \times 10^7$ 個の同種異系活性化Th1細胞を注入することは、好適な皮内投与量であり、液体1mlに対して $1 \times 10^7$ 個であることが最も好適である。皮内投与は、Th1記憶細胞の循環数を増加させるために、複数回繰り返されることが好ましい。皮内投与の頻度は、好ましくは7日置きに、より好ましくは3~4日置きに、約3~4回注射することである。

#### 【0027】

好適な実施形態では、皮内投与の後には、in-situワクチンを作り出すために、組成物の腫瘍内投与が行われる。腫瘍内投与は、好ましくは、標的病変にあるいくつかの腫瘍細胞を生体内原位置(in-situ)で切除することに続いて行われる。切除は、好ましくは、超低温(冷凍アブレーション)または熱(放射線療法)を用いて行われるが、アルコールアブレーション、化学療法、および/またはモノクローナル抗体薬を含む様々な方法を用いて行うことも可能である。好適な腫瘍内投与量は、約 $1 \times 10^7$ 個から $1 \times 10^8$ 個の間であり、最も好ましくは約 $3 \times 10^7$ 個である。1回目の腫瘍内投与はアブレーションに続いて速やかに注入され、2回目の腫瘍内投与は、1回目の注入後約7日以内に、好ましくは約3~4日以内に注入されることが好ましい。組成物の腫瘍内注射が後に続くこのアブレーションのプロセスは、必要に応じて繰り返され得る。

#### 【0028】

前述の方法は、また、好ましくは、宿主の(先天性および適応性の両方の)免疫細胞の活性化、および、腫瘍の場所を含む炎症部位へのそれらの溢出を引き起こすために、組成物を静脈内へ投与することを含む。同種異系活性化Th1細胞の組成物の静脈内投与には、好ましくは、約 $1 \times 10^7$ 個から $1 \times 10^9$ 個、より好ましくは約 $5 \times 10^7$ 個から $1 \times 10^8$ 個が含まれる。この静脈内注射は、数回、好ましくは月1回、繰り返され得る。

#### 【0029】

組成物の同種異系Th1細胞は、大量の1型サイトカイン、すなわち、IL-2、IFN-、TNF-アルファ、およびGM-CSF、を産出することが好ましい。未熟DCが抗原を貪食し処理している微小環境に炎症性Th1サイトカインが存在することで、DC1、IL-12産生細胞への成熟の促進が助けられ得る。IL-12は、IFN-のレベルを刺激することが可能であり、このIFN-のレベルによって、次は、Th1免疫

10

20

30

40

50

の促進がもたらされ得る。IFN- $\gamma$ は、1型抗腫瘍免疫を促進するために必要な、重要な1型サイトカインである。IFN- $\gamma$ は、腫瘍細胞の成長を直接妨げ、T細胞が媒介する抗腫瘍反応を誘発することで、抗腫瘍効果を仲介することができる。IFN- $\gamma$ の分泌は、独立して、NK細胞の応答に寄与し、そして、IL-12によって活性化されたNK細胞の応答を促進することができる。

#### 【0030】

活性化同種異系Th1細胞を含む好適な薬剤は、健常な選別された献血者から得た、純化された先駆体から得ることができる。該細胞は、皮内注射もしくは腫瘍内注射、または、静脈内注入、のいずれかのために処方された、無菌性の低エンドトキシン投与にて供給されるべきである。また、該細胞は、腹腔内注入、胸膜腔内注入、または硬膜外注入用に処方されてもよい。提供者は、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、HBV、HCV、RPR(梅毒)に対して陰性であることをテストされることが好ましく、該細胞は、マイコプラズマ、EBV、およびCMVに対して陰性であることがテストされることが好ましい。好適な実施形態では、活性化同種異系細胞は、患者に対してHLA不適合である。

10

#### 【0031】

本発明の方法は、一般的には、患者の血漿中において内因性IL-12を検出可能なレベルで産生することに関する。本方法は、患者の血漿中において内因性IL-12を検出可能なレベルで産生するために、患者の免疫系を操作するようにして本発明の組成物を投与することを含む。本明細書に記載された方法によって、癌患者のTh1免疫細胞の循環数を増加させ、Th2環境からTh1環境へとバランスを移すことができる。さらに、本方法は、抗腫瘍特異性Th1免疫を引き出すステップ、および／または、腫瘍の免疫回避をダウンレギュレートするために、先天性および適応性免疫応答の成分を活性化して持続的なTh1サイトカイン環境を発生させるステップを含んでもよい。

20

#### 【0032】

本発明の方法は、外来抗原に対する患者のTh1免疫を促進するために、外来抗原を含む組成物を投与することを含み得る。本方法は、また、少なくとも一部の腫瘍の壊死を生じる腫瘍の全てまたは一部を切除することを含んでもよい。患者の腫瘍を壊死させるために、様々な方法が用いられ得る。また、本方法は、腫瘍壊死部位、すなわち腫瘍病巣部位に近接して炎症性微小環境を形成することを含んでもよい。さらに、本方法は、長期に渡ってTh1環境を維持するために、患者の適応免疫細胞および先天性免疫細胞を活性化することも含み得る。好適な実施形態では、本方法の重要な要素として、上述のように、活性化同種異系T細胞を含む薬剤または組成物を使用することが含まれる。

30

#### 【0033】

ヒト癌患者のほとんどが、一般的には、偏った(polarized)Th2免疫を示すので、この治療方法の目的は、一般的には、癌患者における循環性Th1細胞の数を増加させることである。循環性Th1細胞の数は、上述された、外来抗原を含む治療用組成物のうちの1つを、癌患者に投与することにより該患者内で高められ得る。

#### 【0034】

例示的な実施形態では、患者は、皮内注射される活性化同種異系Th1細胞を投与される。好適な実施形態では、皮内注射は、週1回で約3週間～4週間の週間スケジュールに基づいている。別の好適な実施形態では、皮内注射は、約3日～4日置きに複数回投与されてもよい。皮内注射は、2日置きに、または一年間まで間隔を空けて、投与されてもよい。注射スケジュールは、循環しているTh1記憶細胞のフットプリント(footprint)を向上するように策定されるべきである。外来細胞に発現された同種抗原は、強力な免疫拒絶反応を刺激し得る。さらに、組成物中におけるTh1サイトカインの存在によって、あるいは同種異系細胞によるTh1サイトカインの発現によって、Th1記憶免疫に向けて、同種抗原に対する免疫応答を誘導するために必要な、炎症性のアジュバント環境を提供することが可能である。これによって、同種異系Th1細胞内に含まれる同種抗原に特異的な、患者内で循環しているTh1記憶細胞のプールを増加することが可能と

40

50

なる。複数回の投与は、追加接種(booster shot)の役割を果たし得るので、同種抗原に特異的な循環性記憶T h 1細胞の数を増加させる。

#### 【0035】

いくつかの実施形態では、同種異系活性化T細胞の投与に続いて、患者の応答を向上させるために追加のステップが行われてもよい。これらのステップには、例えば、追加の同種異系活性化T細胞の腫瘍内投与をするとともに、腫瘍壊死を引き起こす腫瘍を切除することが含まれ得る。同種異系活性化細胞を静脈内に追加で投与してもよい。これらの方針は、参照によって本明細書に組み込まれるHarr-Noyの米国特許第7,972,594号に記載されている。

#### 【0036】

本明細書に記載された方法を用いて治療用組成物または薬剤を投与することで、患者自身の免疫系によって、患者における内因性IL-12の全身での産生が促進され得る。患者における内因性IL-12の濃度は、患者の血漿中においてIL-12が検出できれば、十分である。IL-12の検出可能なレベルは内因性のものであり、治療用組成物に存在し得るIL-12から生じるものではない。その理由は、一般的には、同種異系材の投与によって誘発された拒絶反応において、その組成物の成分は、患者の免疫系によって排除されるからである。好適な実施形態では、組成物は、IL-12を産生することができないT細胞を含む。したがって、患者の血漿中に検出されたいかなるIL-12も、患者自身の免疫系によって産生されたIL-12の結果である。

#### 【0037】

好ましくは、IL-12は、患者の免疫細胞、例えば、患者自身の単球、ナチュラルキラー細胞、および樹状細胞によって産生される。これらの細胞は、本明細書に記載された組成物の投与によって生成された炎症性またはI型サイトカインの影響下で、成熟することとなる。

#### 【0038】

患者の血漿中のIL-12の濃度は変動し得るが、一般的には、少なくとも約8000 pg/mlである。患者の血漿中のIL-12の濃度は、好ましくは、約8000 pg/mlから200,000 pg/mlの間である。本明細書に記載されているように、患者の血漿中において検出されたIL-12の濃度は、毒性に関する問題を生じない。しかしながら、外因性IL-12の投与は、患者に有害であることが知られてきた。血漿中でIL-12の発現に血清転換する患者は、血清中にIL-12を発現しない患者と比べて、生存率が高い。IL-12のレベルは、生存率との相関はないかもしれないが、IL-12の存在だけは極めて重要である。

#### 【0039】

一般的には、組成物の投与後で一定期間が経過すると、IL-12の増加が検出される。好ましくは、治療用組成物を約3~4週間投与した後、血漿中においてIL-12が検出可能となる。最後の組成物を投与した後、IL-12の血清転換において約90日~120日間の遅延が生じ得る。

#### 【0040】

血漿中のIL-12は、様々な方法を用いて検出することができる。IL-12は、p40鎖およびp35鎖と呼ばれる2つのサブユニットを有し、p40に特異的な抗体が検出には好適である。IL-12の存在を検出するには、いくつかの方法が利用可能である。例えば、IL-12の検出には、ELISA法やサイトカインビーズアレイが含まれ得る。

#### 【0041】

本明細書に記載された方法は、ヒトを含む様々な患者に好適となり得る。また、他の哺乳類に対しても本方法を用いてもよい。

本発明は、患者の疾病を治療する方法も含む。その疾病には、病原体によって引き起こされた疾病だけでなく、上述のような癌性腫瘍や血液悪性疾患が含まれ得る。患者におけるT h 1応答の影響を受けやすい他の疾患もまた、本明細書に記載された方法を用いて治

10

20

30

40

50

療することが可能である。患者は、本明細書に記載された方法に従って、同種異系組成物を投与される。そして、患者の血漿は、IL-12が存在するかについて監視される。内因性IL-12の検出は、その疾病に対する患者の免疫応答を示唆するものとなり得る。IL-12のレベルを維持するために治療用組成物を追加で投与し、それによって、当該疾病抗原に対する患者の免疫応答を維持してもよい。

#### [例]

本研究は、同種異系活性化Th1細胞で治療された患者の血漿中におけるIL-12のレベルを監視するために行われた。活性化同種異系Th1細胞およびその調製方法は、米国特許第7,435,592号に記載されている。活性化同種異系Th1細胞は、意図的に患者に不適合であった。皮内注射 - 活性化同種異系Th1細胞が皮内注射によって投与された。該細胞は、1mlに $1 \times 10^7$ 個/mlの密度で懸濁された。

10

#### 【0042】

腫瘍内注射 - 腫瘍内注射は、切除の1時間以内に、切除された腫瘍の壊死中心部に投与された。

冷凍アブレーションは、CryoCare-28経皮的プローブシステム（米国カリフオルニア州のエンドケア）を使用して行われた。このシステムは、ジュール・トムソン効果を使用して、閉鎖系で冷凍器の先端部を冷却した。ガス係数とノズルの寸法とに応じて、異なる気体要素は、当該ノズルに近接する領域にて異なる熱交換現象を生じる。アルゴンガスが冷却（-187）に用いられ、ヘリウムが加熱（67）に用いられた。

20

#### 【0043】

計画された標的腫瘍病変は、CTによる画像誘導下で特定され、位置が確認された。滅菌野が生成され、局所麻酔が計画されたプローブ挿入部位に施された。ガイドプローブは、経皮的に挿入され、CTによって当該標的腫瘍病変内にあることが確認された。凍結融解サイクルが1、2回行われた。標的腫瘍の大きさに応じて、2mmまたは5mmの1つのプローブが使用された。凍結時間は、CT上で視認可能な「凍結領域（ice-ball）」の形成に応じて、約5分から20分とした。解凍は、2回目の凍結プロセスが開始される前に、ヘリウムを凍結時間と同等な時間の間注入することによって達成された。この処置には、腫瘍病変のサンプルを切除することが必要であるが、腫瘍がない周辺を含め腫瘍を完全に切除することは必要ない。

#### 【0044】

30

同種異系活性化Th1細胞の注射前に、2回目の凍結サイクルに続き、当該病変を冷却することができた。

表1、2、および3は、記載された日数における、具体的な治療のタイミングと患者の血漿中のIL-12のレベルとを示す。図1は、本研究中の患者の免疫系によるIL-12の発現を図示するグラフである。

#### 【0045】

【表1】

表1

患者#11

BL後の週数	BL後の日数	処置	IL12 pg/ml
0	0	基剤	0
3w+2d	23	Cryo+IT+IV	0
4w+2d	30	post-2nd IV	0
14w+2d	100	post-IV-B	0
16w+1d	113	ID／IVプロトコル中のpre-1st ID	11,317
	136	ID／IVプロトコル中のpost-3rd IV	50,725
21w+1d	148	ID／IVプロトコル中のpre-IV-B	64,117
	149	ID／IVプロトコル中のpost-IV-B	60,301
25w+2d	177	Pre-IV-B 60D IV/ID (T) 14APR10	151,048
	178	Post-IV-B 60D (T) 15APR10	88,362
	179	48h Post-IV-B 60D (T) 16APR10	135,169
	180	72h Post-IV-B 60D (T) 17APR10	79,476
27w+3d	192	F/U	14,840
	197	Pre-IV-B	8,867
	198	Post-IV-B	10,610
37w+3d	262	F/U D240	32,188
42w+3d	297	化学療法前	35,115
46w+3d	325		35,552
49w+3d	346		16,265
50w+3d	353		15,584
52w+1d	365		16,546
52w+6d	370	血漿*	22,626

【0 0 4 6】

10

20

30

【表2】

表2

処置	BL後の日数	IL12 pg/ml
基剤	0	0
Cryo+IT+IV	23	0
post-2nd IV	30	0
post-IV-B	100	0
ID/IVプロトコル中のpre-1st ID	113	11,317
ID/IVプロトコル中のpost-3rd IV	136	50,725
ID/IVプロトコル中のpre-IV-B	148	64,117
ID/IVプロトコル中のpost-IV-B	149	60,301
Pre-IV-B 60D IV/ID (T) 14APR10	177	151,048
Post-IV-B 60D (T) 15APR10	178	88,362
48h Post-IV-B 60D (T) 16APR10	179	135,169
72h Post-IV-B 60D (T) 17APR10	180	79,476
F/U	192	14,840
Pre-IV-B	197	8,867
Post-IV-B	198	10,610
F/U D240	262	32,188
化学療法前	297	35,115
	325	35,552
	346	16,265
	353	15,584
	365	16,546
pre-IV-B	370	22,626
F/U	374	26,405
F/U	388	219,275
F/U	390	155,023
F/U	394	336,141
F/U	401	113,513
F/U	408	92,122
F/U	417	63,357
F/U	423	79,075
F/U	429	48,038
F/U	436	59,471

10

20

30

40

【0047】

【表3】

表3

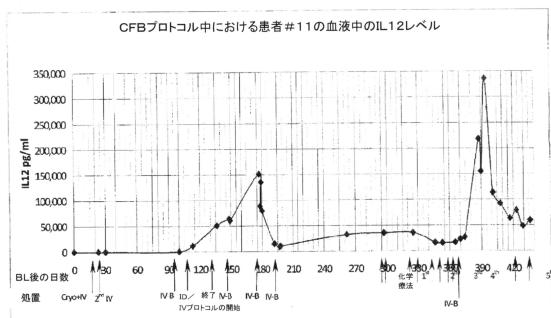
化学療法	BL後の日数	
1回目	296	開始
	301	終了
2回目	324	開始
	331	終了
3回目	345	開始
	352	終了
4回目	359	開始
	364	終了
5回目	408	開始
	415	
	422	終了
6回目	436	開始

10

本発明は、好適な実施形態を参照して説明されてきたが、当業者は、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく形式及び詳細についての変形が可能であることを認識するであろう。

20

【図1】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1

(31)優先権主張番号 61/564,551  
(32)優先日 平成23年11月29日(2011.11.29)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/582,881  
(32)優先日 平成24年1月4日(2012.1.4)  
(33)優先権主張国 米国(US)

合議体

審判長 蔵野 雅昭  
審判官 浅野 美奈  
審判官 前田 佳与子

(56)参考文献 特表2007-500217号公報  
特表2010-509337号公報  
国際公開第2009/135199号

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K35/00-35/768  
P u b M e d