

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-513399

(P2011-513399A)

(43) 公表日 平成23年4月28日(2011.4.28)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 39/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 39/00	H	4 C 0 8 5
<b>A 6 1 P 35/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2010-549646 (P2010-549646)	(71) 出願人	510237804
(86) (22) 出願日	平成21年3月3日 (2009.3.3)		ザ ユニバーシティ オブ マイアミ
(85) 翻訳文提出日	平成22年10月26日 (2010.10.26)		THE UNIVERSITY OF M
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/001330		I A M I
(87) 国際公開番号	W02009/114085		アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 1 5 6
(87) 国際公開日	平成21年9月17日 (2009.9.17)		, マイアミ, エヌ. ダブリュー. 1 0 番 ア
(31) 優先権主張番号	61/033, 425		ベニュー 1 6 0 0
(32) 優先日	平成20年3月3日 (2008.3.3)	(74) 代理人	100096024
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 柏原 三枝子
		(74) 代理人	100125520
			弁理士 高橋 剛一
		(74) 代理人	100155310
			弁理士 柴田 雅仁

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 同種癌細胞による免疫療法

## (57) 【要約】

細胞による免疫療法（例えば、免疫処置又はワクチン接種）は、修飾された熱ショックタンパク質（例えば、g p 9 6）を分泌する同種癌細胞のヒト対象への頻回投与か、あるいは対象中のB細胞の枯渇か、あるいはその双方によって改善できる。抗原（例えば、同種又は同系癌細胞の新生抗原又は腫瘍抗原から得られるエピトープ）は、対象中で特異的な免疫応答を誘発できる。例えば、分泌型の熱ショックタンパク質を有する免疫原性複合体に結合するエピトープが、分泌型のg p 9 6及び抗原の双方を同時発現する同種癌細胞から、あるいは抗原のみを発現する、対象の同系癌細胞から取得できる。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

ヒト対象を免疫処置する方法であって、当該方法が、

(a) 修飾された g p 9 6 熱ショックタンパク質を分泌する同種癌細胞の免疫原性組成物を前記ヒト対象に投与するステップであって、前記修飾が小胞体 ( E R ) 用の保留シグナルを含む、天然型 g p 9 6 のドメインを少なくとも除去するステップと、

(b) 修飾された g p 9 6 熱ショックタンパク質を分泌する同種癌細胞の別の免疫原性組成物を前記ヒト対象に投与するステップであって、前記修飾が小胞体用の保留シグナルを含む、天然型 g p 9 6 のドメインを少なくとも除去するステップと、

を具え、前記免疫原性組成物を投与するステップと、前記別の免疫原性組成物を投与するステップとの間が 2 週間未満であることを特徴とする方法。

10

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の方法において、前記免疫原性組成物を投与するステップと、前記別の免疫原性組成物を投与するステップとの間が 1 週間以下であることを特徴とする方法。

**【請求項 3】**

請求項 1 に記載の方法において、各々が前記修飾された g p 9 6 熱ショックタンパク質を分泌する同種癌細胞からなる少なくとも 9 の免疫原性組成物が、前記ヒト対象に少なくとも毎週投与されることを特徴とする方法。

**【請求項 4】**

請求項 1 ないし 3 のうちのいずれか 1 項に記載の方法において、E R 保留シグナルを含むドメインを I g G 1 又は I g G 2 の 1 以上の重鎖定常領域で少なくとも置換することによって、前記天然型 g p 9 6 が修飾されることを特徴とする方法。

20

**【請求項 5】**

請求項 1 ないし 3 のうちのいずれか 1 項に記載の方法において、E R 保留シグナルを含むドメインを I g G 1 又は I g G 2 の F c ドメインで少なくとも置換することによって、前記天然型 g p 9 6 が修飾されることを特徴とする方法。

**【請求項 6】**

請求項 1 ないし 5 のうちのいずれか 1 項に記載の方法において、前記癌細胞が H L A - A 1 又は H L A - A 2 を発現することを特徴とする方法。

**【請求項 7】**

請求項 1 ないし 6 のうちのいずれか 1 項に記載の方法において、少なくとも、前記修飾された g p 9 6 熱ショックタンパク質がウシパピローマウイルスからの 1 以上の制御シグナルからなるベクターによってコード化されることを特徴とする方法。

30

**【請求項 8】**

請求項 1 ないし 7 のうちのいずれか 1 項に記載の方法において、前記癌細胞が細胞腫に由来することを特徴とする方法。

**【請求項 9】**

請求項 1 ないし 7 のうちのいずれか 1 項に記載の方法において、前記癌細胞が肺癌に由来することを特徴とする方法。

**【請求項 10】**

請求項 1 ないし 3 のうちのいずれか 1 項に記載の方法において、A D 1 0 0 が、E R 保留シグナルを含むドメインを I g G 1 又は I g G 2 の F c ドメインで少なくとも置換することによって修飾される天然型 g p 9 6 ( g p 9 6 - I g ) と、

40

H L A - A 1 又は H L A - A 2 と、

をコード化し、かつ、ウシパピローマウイルスからの 1 以上の制御シグナルからなる 1 又は 2 の発現ベクタを形質移入することを特徴とする方法。

**【請求項 11】**

請求項 1 ないし 10 のうちのいずれか 1 項に記載の方法が、前記免疫原性組成物の初回投与前及び / 又は投与中に、対象の B 細胞を枯渇させるステップを更に具えることを特徴とする方法。

50

**【請求項 1 2】**

請求項 1 ないし 1 0 のうちのいずれか 1 項に記載の方法が、前記免疫原性組成物の少なくとも 1 の投与前及び / 又は投与中に、対象の B 細胞を枯渇させるステップを更に具えることを特徴とする方法。

**【請求項 1 3】**

修飾された g p 9 6 熱ショックタンパク質を分泌する同種癌細胞を用いてヒト対象の免疫処置又はワクチン接種を改良する方法であって、天然型 g p 9 6 の修飾が小胞体 ( E R ) 用の保留シグナルを含むドメインを少なくとも除去し、前記改良が、

前記同種癌細胞を頻回投与するステップであって、同種癌細胞が 2 週間未満の時間を置いて対象に投与されるステップか、

前記同種癌細胞の少なくとも 1 の投与前及び又は投与中に前記対象中の B 細胞を枯渇させるステップか、あるいは、

前記同種癌細胞を頻回投与するステップ、及び前記対象中の B 細胞を枯渇させるステップの双方、  
を具えることを特徴とする方法。

**【請求項 1 4】**

修飾された g p 9 6 熱ショックタンパク質を分泌する同種癌細胞を含む免疫原性組成物の使用であって、天然型 g p 9 6 の修飾がヒト対象の免疫療法のために、小胞体 ( E R ) 用の保留シグナルを含むドメインを少なくとも除去し、少なくとも 2 の免疫原性組成物は同種癌細胞が 2 週間未満の時間を置いて対象に投与されるか、前記同種癌細胞の少なくとも 1 の投与前及び又は投与中に前記対象中の B 細胞を枯渇させるか、あるいはその双方であることを特徴とする使用。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0 0 0 1】****[ 関連出願の相互参照 ]**

本出願は 2 0 0 8 年 3 月 3 日出願の米国特許出願第 6 1 / 0 3 3 , 4 2 5 号の利益を主張し、引用によって組み込まれる。

**【0 0 0 2】****[ 米国支援の研究又は開発 ]**

米国政府は、米国保健社会福祉省からの N I H のコントラクト C A 0 3 9 2 0 1 で提供されるように、本発明において特定の権利を有している。

**【背景技術】****【0 0 0 3】**

本発明は、修飾された熱ショックタンパク質を分泌する同種癌細胞のヒト対象への投与からなる癌細胞による免疫療法 ( 例えば、免疫処置又はワクチン接種 ) を改良することに関する。それは同種癌細胞の対象への頻回投与か、同種癌細胞の初回投与又は少なくとも 1 の投与前及び / 又は投与中の対象内の B 細胞の枯渇か、あるいはその双方によって改良される。

**【0 0 0 4】**

国際公開第 9 9 / 4 2 1 2 1 号は細胞型のワクチンを開示し、形質移入された発現コンストラクトによってコード化される修飾された熱ショックタンパク質が分泌される。そのワクチンは癌又は感染症を治療又は予防するのに有効になりうる。組換え型癌細胞の 1 回の注入、及び 2 週間の間隔を開けた、組換え型癌細胞の 2 回の注入が記載された。自己癌細胞が好適であった。対照的に、本発明は同種癌細胞を用いる。

**【0 0 0 5】**

国際公開第 2 0 0 5 / 0 3 0 1 3 6 号は、遺伝子学的に修飾された肺癌細胞を投与して C D 8 0 及び H L A を発現することによって、腫瘍を抑制することを開示した。その癌細胞は修飾された熱ショックタンパク質を分泌しない。

## 【 0 0 0 6 】

癌は一般的には、癌細胞を死滅させるために腫瘍の外科的切除、放射線、又は薬剤、あるいはその組合せによって治療される。免疫系は癌細胞の増殖及び拡がりを抑制できる。しかしながらそれらは、非免疫原性となり（例えば、非小細胞肺癌）、それが免疫応答の初回抗原刺激を遮断して、有効な応答を生成することによって、あるいは免疫原性となる（例えば、黒色腫）が、免疫応答のエフェクター相を遮断することによって、免疫監視を免れうる。代替的には、初回抗原刺激の遮断は、免疫抑制メディエータを分泌するか若しくはケモカインを寛容化する腫瘍、及び／又は、制御性細胞、寛容原性の抗原提示細胞、若しくは骨髄性サプレッサー細胞の刺激が原因である。同種癌細胞を投与することによる能動的な免疫療法は、遮断を回避し、生得性及び／又は適応性の免疫応答を初回刺激できる。腫瘍特異性のCD8陽性T細胞の応答の誘発及び増幅は特に、癌細胞の細胞崩解、又は癌細胞によって刺激されるインターフェロンガンマの分泌によって評価される場合に所望される。

10

## 【 0 0 0 7 】

Raezら(J. Clin. Oncol. 22:2800-2807, 2004)は、進行型転移性疾患を伴う、患者の非小細胞肺癌に対する、同種癌細胞によるワクチンの第I相試験について述べた。腺癌細胞株AD100は形質移入されて、CD80及びHLA-A1又はA2を発現した。患者は2週ごとに1回、 $5 \times 10^7$ の細胞で、皮内で免疫処置された。3の免疫処置は1の治療経過を提示した。患者が初回の免疫処置に対し無応答でない限り、合計で9の免疫処置のために最大で3の治療経過が施された。この細胞型のワクチンを用いて取得される有望な結果は、免疫処置の頻度を増加させ、少なくとも1の免疫処置前及び／又は処置中にB細胞を枯渇させることによって改良できるであろう。

20

## 【 0 0 0 8 】

従って、免疫療法（例えば、免疫処置又はワクチン接種）の改良を提供することが本発明の目的であり、頻回投与による、修飾された熱ショックタンパク質を分泌する同種癌細胞をヒト対象に投与するステップか、初回又は少なくとも1の投与前及び／又は投与中のB細胞の枯渇か、あるいはその双方を具える。他の利点及び改良は以下に記載されているか、本明細書中の開示から明らかになるであろう。

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 9 】

本発明は免疫処置及びワクチン接種用の同種癌細胞による免疫療法の改良を提供する。「治療(treatment)」は治療的、予防的、あるいは単に対症的であってもよい。

30

## 【 0 0 1 0 】

ヒト対象は修飾された熱ショックタンパク質（例えば、gp96）を分泌する同種癌細胞を投与することによって治療される。本明細書中で「同種(allogeneic)」は、投与される細胞及び治療される対象が1以上の主要組織適合抗原複合体(MHC)分子ごとに異なることを意味する。熱ショックタンパク質は小胞体用の保留シグナルを含むドメインを除去することによって修飾してもよい。選択的に、ドメインはヒト又はマウスの免疫グロブリンIgG1又はIgG2の1以上の重鎖定常領域（例えば、Fcドメイン）で置換してもよい。修飾された熱ショックタンパク質は、発現ベクターによって形質移入されるか、ウイルスベクターによって感染した癌細胞内部の核酸から発現される。ベクターはウシパピローマウイルス(BPV)由来の1以上の制御シグナル（例えば、転写開始及び停止、ドナー及び受容体のスライス、ポリアデニル化、複製の開始点）に基づいてもよい。ベクターは好適には、BPVのE5、E6、及びE7遺伝子を含まない。従って、癌細胞は、それを産生するのに用いられる技術によって「組換え型(recombinant)」であると見なされうる。

40

## 【 0 0 1 1 】

抗原（例えば、新生抗原又は腫瘍抗原から得られる、同種又は同系癌細胞のエピトープ）は、対象内で生得性あるいは適応性の免疫応答を誘発しうる。特に、CD8陽性T細胞

50

の応答の誘発及び増幅が所望される。CD8陽性細胞は癌細胞を死滅させるか、あるいは特異的にインターフェロンガンマを分泌しうる。

【0012】

選択的に、癌細胞は、少なくとも1のMHC分子を発現することによって、対象で発現せずに、発現ベクターによって形質移入されるか、ウイルスベクターによって感染した癌細胞内部の核酸から、同種に産生してもよい。修飾された熱ショックタンパク質及びHLA分子は、同一のベクター又は異なるベクターによって少なくとも部分的にコード化してもよい。

【0013】

ヒト対象は同種癌細胞で数倍に免疫化できる。細胞による免疫原性組成物の2の連続的投与の間隔は、2週間未満である。別の改良は、細胞による免疫原性組成物の少なくとも1の投与前及び/又は投与中の対象のB細胞の枯渇であってもよい。

【0014】

本発明の更なる目的及び利点の態様は、以下の特定の実施形態及び特許請求の範囲の記載、ならびにそれらの一般化で当該技術分野の当業者に明らかとなるであろう。

【発明を実施するための形態】

【0015】

対象は同種癌細胞を含む免疫原性組成物を投与され、それは形質移入された発現ベクター又は感染したウイルスベクターによって少なくとも部分的にコード化された修飾された熱ショックタンパク質（小胞体用の天然型の保留配列を欠く熱ショックタンパク質）を細胞に分泌できる。新生ポリペプチド鎖として、修飾された熱ショックタンパク質は自身又は別のタンパク質のシグナル配列を有して、分泌経路を標的としてもよい。そして、N末端のシグナル配列の逆位に、ヒト免疫グロブリンの重鎖（例えば、IgG1又はIgG2）の1以上の定常領域を含むペプチドタグがあってもよい。選択的に癌細胞は、（例えば、同一又は異なるベクターによって少なくとも部分的にコード化される）同種の主要組織適合抗原複合体（MHC）分子を発現する。癌細胞は、（例えば、同一又は異なるベクターによって少なくとも部分的にコード化される）CD80を発現しても、しなくてもよい。様々な癌細胞株における修飾された熱ショックタンパク質、HLA-A、及びCD80の発現の更なる詳細は、国際公開第99/42121号、及び国際公開第2005/030136号に提供され、引用によって組み込まれている。

【0016】

対象は投薬につき $1 \times 10^7$ ないし $10 \times 10^7$ の範囲の同種癌細胞を投与されうる。全部で1ないし $10 \times 10^8$ の細胞数が対象に投与されうる。同種癌細胞は、少なくとも1日2回、毎日、隔日、週2回、毎週、隔週、あるいは毎月といった、任意の2の連続的投与の間隔で投与してもよい。少なくとも全部で9、18、又は27回の同種癌細胞の投薬が施される。投薬は2週間未満、1週以下、少なくとも週2回、少なくとも隔日、少なくとも毎日、又は少なくとも1日2回施されてもよい。治療は少なくとも6週、10週、15週、18週、22週、又は26週（例えば、1ないし6月）間、連続してもよい。このような治療期間中に、細胞は2週間未満、1週以下、少なくとも週2回、少なくとも隔日、少なくとも毎日、又は少なくとも1日2回の間隔で投与してもよい。細胞は少なくとも皮内、静脈内、腹腔内、又は皮下経路で注入できる。各々の投薬は、単一投薬を含む個別注入用に一定分量に分割してもよい。治療は頻回のワクチン接種、B細胞の枯渇、又はその双方によって改良できる。

【0017】

抗原（例えば、新生抗原又は腫瘍抗原から得られる、同種又は同系癌細胞のエピトープ）は対象中の特異的な免疫応答を誘発できる。例えば、分泌型の熱ショックタンパク質との免疫原性複合体に結合されるエピトープは、分泌型のgp96と抗原との双方を同時発現する同種癌細胞から、あるいは抗原のみを発現する対象の同系癌細胞から取得してもよい。後者は、修飾された熱ショックタンパク質がgp96が合成されたのとは異なる癌細胞に取り込まれ、及び抗原が合成される癌細胞に複合体が形成されることを推定上必要とす

10

20

30

40

50

る。免疫処置は、対象が機能的なCD4陽性T細胞又はリンパ節を有することを要求しなくともよい。従って、ER保留シグナルの除去を含むgp96の総ての修飾後に、修飾されたgp96は更に免疫原性複合体にエピトープを結合しなければならない。任意の修飾はN末端の追加及び欠失、C末端の追加、1ないし3の近接するアミノ酸の点突然変異、あるいは1ないし10のアミノ酸の内的な追加又は欠失を含む。

#### 【0018】

対象はヒト対象にできる。癌細胞はヒト対象から取得してもよい。免疫原又はワクチンは、癌細胞を提供する同一の対象、又は異なる対象に投与してもよい。同種癌細胞は、細胞を受け取る対象と比較して、移植抗原が異なる対象から取得したものでもよい。選択的には、主要組織適合抗原複合体分子（例えば、HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-A27といった1以上のMHCクラスI分子）は、発現ベクターの形質移入、又はウイルスベクターの感染によって癌細胞中に発現させてもよい。修飾又は組織型(histo-type)がそれぞれ、相同組換えによる癌細胞の内在性遺伝子に導入されるため、ベクターの核酸は、修飾された熱ショックタンパク質又は同種のMHC分子を少なくとも部分的にコード化することを必要とする。

#### 【0019】

B細胞は当該技術分野で生体外でのアフェレーシスといった既知の技術によって除去されてもよく、あるいはB細胞受容体に特異的な抗体（例えば、抗CD19、抗CD20、抗CD22、抗BlyS）、B細胞受容体を架橋結合する二量体化されたりガンド（例えば、アプタマーダイマー）、免疫抑制薬（例えば、シクロホスファミド又はプレドニゾン）の投与が用いられてもよい。しかし、リンパ腫又は自己免疫疾患を治療するためのリツキシマブの使用と対照的に、免疫療法に関連するB細胞の枯渇は、本発明に関しては免疫系の他の部分を節約して、癌の細胞による免疫療法を有効にする。例えば、100mg/m<sup>2</sup>ないし500mg/m<sup>2</sup>（あるいは200mg/m<sup>2</sup>ないし300mg/m<sup>2</sup>、あるいは350mg/m<sup>2</sup>ないし400mg/m<sup>2</sup>）の用量でのリツキシマブは、1回以上（例えば、2週ないし2月の間、週に1回）、1時間につき50mgないし1時間につき400mgの割合で患者に投与できる。リツキシマブはシクロホスファミド及びプレドニゾンで補うことができる。B細胞は免疫療法（例えば、免疫処置又はワクチン接種）の前に除去してもよい。B細胞のレベルは免疫療法中、モニタリングしてもよく、枯渇は標準（すなわち、非除去）レベルの1%、5%、又は10%より上である場合に反復してもよい。

#### 【0020】

異常増殖を起こす対象の癌細胞は、新生物又は腫瘍（例えば、細胞腫、肉腫、白血病、リンパ腫）、特に肺癌であってもよい。癌は、胃腸管系（例えば、食道、結腸、腸、回腸、直腸、肛門、肝臓、膵臓、胃）、尿生殖器（例えば、膀胱、腎臓、前立腺）、筋骨格系、肺性（例えば、肺）、あるいは生殖性（例えば、子宮頸部、卵巣、精巣）の器官系で発生するものを含む。例えば、肺癌は非小細胞肺癌（例えば、腺癌、扁平細胞細胞腫、又は大細胞癌）、小細胞肺癌、及びカルチノイドであってもよい。癌細胞は、治療を受ける対象から、あるいは対象以外の別の個体から得てもよい。前者の場合については、同種性(allogenicity)は形質移入された発現ベクター又は感染したウイルスベクターから無関係な主要組織適合抗原複合体のクラスI分子を発現することによって与えられる。癌細胞は、修飾された熱ショックタンパク質を分泌するように操作される限り、非免疫原性であるか、低い免疫原性を有してもよい。癌細胞は細胞腫に由来してもよい。例示的な肺癌細胞はAD100腺癌であり、細胞株が得られる患者と、その患者のMHCハプロタイプを共有するわずかな個体とを除く総ての対象に対し同種である。その誘導体は国際公開第2005/030136号に記載されている。AD100はHLA-A1、HLA-A2、又はCD80を発現しない。膵癌はATCC CRL1420の、gp96-Igを分泌するMIA PaCa-2で治療してもよく、卵巣癌はICLC HTL97004の、gp96-Igを分泌するOVCA-R-3で治療してもよい。

#### 【0021】

治療の有効性は、症状の低減、病気の進行の遅延又は退行、生存の延長によって評価できる。また、癌細胞のCD8陽性T細胞の細胞崩解、あるいはそれによって刺激されるインターフェロンガンマのアッセイは、生体外で測定してもよい。能動的な免疫療法の改良は、外科、放射線療法、及び/又は化学療法の組合せで癌を治療するのに用いてもよい。追加の免疫は、1ないし2年間に少なくとも月1回、免疫原性複合体を投与することによって生じさせてもよい。

#### 【0022】

免疫原性組成物は、同種癌細胞と、薬学的に許容可能な担体及び/又は賦形剤とからなる。例えば、担体はアルギン酸塩、又はPLGAビーズ、又はウイルス粒子であってもよく、賦形剤は注入用の水あるいは緩衝生理食塩溶液であってもよい。組成物を調合する前に、担体又は賦形剤は病原体及び発熱物質がないことを確認されうる。細胞は放射線照射され、0.5%のヒト血清アルブミンを含む緩衝食塩水に懸濁されうる。組成物は注入又は補給による全身又は局所投与が好適である。組成物は投与前に細菌及びウイルス混入なしで試験されることが好ましい。推定される汚染源を避けるように、無血清合成培地の同種癌細胞を培養することが好適である。細胞は凍結保存剤として20%のジメチルスルホキシドを追加した同一の培地中で保存できる。

#### 【実施例】

#### 【0023】

抗腫瘍のワクチン接種は天然型の腫瘍のないマウスに投与する場合に非常に有効であり、後の課題では腫瘍の増殖を防御する。防御は一般的には長く続き、特異的な腫瘍は適応性の免疫応答の関与を示した。この状況はワクチンが既に樹立腫瘍の治療上の処置のために用いられる場合に急激に変化する。防御免疫を有効に樹立できる同一用量のワクチンは一般的には、治療上の利点を提供できない。治療用のワクチン接種のこの効果不足の理由は、腫瘍誘発性のサプレッサー細胞の誘発、制御性細胞の産生、T細胞アネルギー又は耐性の誘発、あるいはその組合せに由来すると考えられる。どのような腫瘍誘発性の免疫抑制の正確なメカニズムでも、癌治療に対するワクチン療法の成功は、これらの腫瘍誘発性の抑制効果を克服あるいは中和することに依存する。

#### 【0024】

熱ショックタンパク質のgp96結合型ペプチドが樹状細胞によってCD8陽性細胞に交差提示されることを示したSrivastava及びRammenseeの研究室による先駆者的研究に基づいて、我々は抗腫瘍療法に好適なワクチン接種系を開発した。gp96-IgG1-Fc融合タンパク質を腫瘍細胞に形質移入することにより、シャペロン化された腫瘍ペプチドと複合体化したgp96-Igの分泌を生じさせる。gp96-Igを分泌する腫瘍の非経口投与は生得性の免疫系の活性と併用して、強い抗原特異性のCD8陽性のCTL増殖を引き起こす。腫瘍分泌型のgp96が、DC細胞及びNK細胞のgp96分泌部位への漸増を生じさせ、CD91ならびにTLR2及びTLR4への結合を介してDC活性を媒介する。gp96及びそのシャペロン化されたペプチドのエンドサイトーシス取り込みは、MHCクラスIを介したペプチド交差提示と、CD4陽性細胞から独立した、同種の強いCD8活性とを引き起こす。このモデル系において、CD8陽性のCTL増殖は、養子移植されたTCR遺伝子導入型の、gfpで標識されたCD8陽性T細胞の使用によって、ワクチン接種の4ないし5日以内に正確に定量化できる。この試験系を用いて、我々のモデル系において腫瘍誘発性の免疫抑制が抗原非特異性であり、頻回免疫処置によって、あるいはB細胞の欠如によって、克服できることをここで示す。

#### 【0025】

[対象、細胞株、及び抗体]

C57BL/6J(B6)マウスはJackson Laboratory社又はCharles River Laboratories社から購入した。B6基礎環境を有するIgのμ鎖欠損マウスはJackson Laboratory社から購入した。

#### 【0026】

Gfp(green fluorescent protein: 緑色蛍光タンパク質

マウスはそれらの産生株から取得された。遺伝子導入型のC57BL/6J OT-Iマウス(M. Bevan博士から取得)はH-2K<sup>b</sup>制限型のトリ卵白アルブミン由来ペプチド257ないし264(SIINFEEKL)に特異的なTCR(V<sub>2</sub>V<sub>5</sub>.1.2)を発現する。GfpマウスはOT-Iマウスと交雑させて、マイアミ大学の動物施設で施設ガイドラインに従って、gfp-OT-Iマウスを産生した。後代マウスはova-TCR遺伝子の発現について、及び蛍光によってgfpについて、スクリーニングした。総てのマウスは6ないし12週齢で用いられた。

#### 【0027】

EG7の細胞株(M. Bevan博士から取得)は、gp96-Igを含むベクターのpCMG-Hisで形質移入された。コントロール細胞はベクターのみで形質移入された。ルイス肺癌(LLC)細胞はアメリカ培養細胞系統保存機関(American Tissue Culture Collection)から取得され、pAC-neo-ova中の卵白アルブミンで、あるいは卵白アルブミンのベクター及びgp96-Igを含むpCMG-Hisの双方で、形質移入された。総ての細胞は10%のウシ胎仔血清(FCS)及びゲンタマイシン(GIBCO社)を有するIMDM培地(GIBCO社)で培養された。形質移入された細胞を維持するために、選択用の抗生物質(G418又はL-ヒスチジノール、ミズーリ州セントルイスのSigma社)が培養物に添加された。

#### 【0028】

以下の抗体が染色用に用いられ; 抗CD16/32(2.4G2)、CyChrome-抗CD3(145-2C11)、-抗CD5(UCHT2)、-抗CD8a(53-6.7)、PE-CD19(4G7)、PE又はFITC-抗NK1.1(PK136)、及びPE又はFITC-抗CD11c(HL3)はBD Pharmingen社から購入した。

#### 【0029】

##### [gfp-OT-I細胞及びCD19陽性B細胞の精製及び養子移植]

脾細胞及びリンパ節(LN)細胞の単一細胞懸濁液はgfp-OT-Iマウスから取得され、貯蔵された。それらは塩化アンモニウム溶解によって赤血球が枯渇された。gfp-OT-I細胞は、抗CD8の磁気マイクロビーズを用いた能動的なカラム選択と、製造者の指示に従ったMACSカラム(Miltenyi Biotec社)とによって、選別された。分離されたOT-I細胞の純度は、フローサイトメトリー分析によって決定される場合、95%より高かった。精製された細胞上のV<sub>2</sub>及びV<sub>5</sub>.1.2の発現は、フローサイトメトリーによって定量化された。B細胞の精製用に、CD19陽性細胞は抗CD19マイクロビーズ(Miltenyi Biotec社)で精製された。BCDMマウス中のB細胞を再構成するために、10<sup>7</sup>の精製された細胞が、腫瘍細胞の移植前に2日間、尾静脈を通して養子移植された。

#### 【0030】

##### [生体内のCD8陽性のCTL増殖の分析]

CD8陽性のCTL増殖を測定するために、マウスは10<sup>6</sup>のgfp-OT-Iで養子移植され、1ないし4×10<sup>6</sup>の非照射EG7-gp96-Ig細胞の腹腔内(i.p.)注入によって2日後に免疫化される。免疫処置に続いて、細胞は定期的な間隔で、腹腔、腸間膜の傍大動脈リンパ節(dLN)、及び末梢血から収集された。赤血球は塩化アンモニウム溶解によってサンプルから除去された。100万の細胞が4で10分間インキュベートされ、PBS中の抗CD16/32 mAbが0.5%のBSA(PBA)を含んで、FcR結合を遮断した。細胞はその後、指示された抗体とともに30分間インキュベートされた。サンプルはFACSscan(Becton Dickinson社)上でCELL Questソフトウェア(BD Bioscience社)を用いて分析された。各組織ごとの指示された免疫細胞の全数は、各組織中の標的細胞及び全細胞数の割合で算出された。

#### 【0031】

##### [腫瘍接種及び治療プロトコル]

10

20

30

40

50



非照射のEG7、LLC、又はLLC-ova細胞は、200 $\mu$ lのPBSでマウスの側腹部に皮下注入された。LLC-ova細胞の接種5日後（日数5）に、0.3mlのPBS量における10<sup>6</sup>の精製されたgfp-OT-Iが尾静脈を通して注入された。2日後、マウスは、グラフに示されたスケジュールによる、0.5mlのPBS量での10<sup>6</sup>の非照射のLLC-ova-gp96-Ig又はEG7-gp96-Ig細胞の腹腔内注入によって免疫化された。コントロールマウスはPBS、EG7、又はLLC-ovaで治療された。側腹部中の腫瘍の寸法は、少なくとも20日の間、週に2回、2次元で測定された。

#### 【0032】

[統計的解析]

有意性はt検定によって評価された。p<0.05の計算値は、統計的有意性を示すと見なされた。

#### 【0033】

[樹立腫瘍がTCR特異性と別個に、gp96を媒介したCD8のCTL増殖を抑制する]

熱ショック融合蛋白質gp96-Igの腫瘍細胞への形質移入によって、gp96でシャペロン化されたペプチドとともにgp96-Igの分泌が生じた。gp96-Igは、gp96の小胞体保留シグナル(KDEL)の、IgG1のFc部分との置換によって産生される、修飾タンパク質である。マウスでのgp96-Igを分泌する腫瘍細胞の注入によって、腫瘍特異性の免疫及び記憶の誘発と、同一であるが形質移入されない腫瘍での後の攻撃の防御とが生じる。分泌型のgp96-Igによって産生される腫瘍免疫は、EL4特異性の抗原といった腫瘍内在性抗原から得られるペプチドを含む、gp96でシャペロン化されたペプチドに対して、及び、EL4(EG7)又はLLC(LLC-ova)に形質移入される卵白アルブミンといった代替抗原に対して特異的である。卵白アルブミンの代替抗原は、卵白アルブミン特異性のOT-I TCR遺伝子導入型CD8陽性細胞の養子移植を介して、生体内でCD8陽性のCTL増殖を正確に決定する方法を提供する。

#### 【0034】

樹立腫瘍はCTL増殖に対し抑制性であることが知られる。樹立腫瘍の有無でのCTL応答を測定するために、卵白アルブミンで形質移入された同系又は同種の腫瘍がgp96-Ig-ovaを分泌するのに、遺伝子導入型CD8陽性のCTLが応答するTCR導入型OT-I系を我々は用いた。移植可能な腫瘍モデルとして、我々は、卵白アルブミンの形質移入によるEL4から得られ、免疫原性及び高い腫瘍原性として分類されるEG7を用いた。加えて、更に低い免疫原性及び高い腫瘍原性であると見なされるルイス肺癌(LLC及びLLC-ova)を我々は用いた。双方の細胞株の分割速度は非常に速く、培養時の8ないし12時間の倍加時間である。

#### 【0035】

100万のEG7-gp96-Ig細胞の単回の腹腔内免疫処置後に、10<sup>6</sup>の細胞につき60ないし80ngのgp96-Igを24時間で分泌し、OT-IはCD8陽性ゲートにおける低い免疫前レベル(~0.2%)から、腫瘍のないマウスにおける高頻度(15ないし40%)まで増殖する。gp96-Igを分泌しない非照射のEG7の投与は有意なOT-Iの増殖を生じさせることができない。しかし、側腹部中の遠位部位にある、皮下に樹立されたEG7腫瘍は、腹腔腔において、かつ脾臓及びリンパ節において全身的に、OT-Iのgp96ワクチン誘発型の増殖を有意に抑制する。EG7腫瘍は卵白アルブミンを分泌し、K<sup>b</sup>-ovaを発現する。従って、腫瘍床又は腫瘍を排出するリンパ節を通して、再循環時に養子移植されたOT-Iは、K<sup>b</sup>-ova特異性のTCRを通してシグナルを受け取る一方で、共刺激のシグナル2を受け取らないために、アネルギー性となることが可能である。この仮説を評価するために、いずれも卵白アルブミンを発現しない同系腫瘍EL4及びLLCは、遠位部位で皮下に樹立された。次いで、OT-Iは静脈内(i.v.)で養子移植され、マウスはEG7-gp96-Igを用いて腹腔内で免

10

20

30

40

50

疫化された。樹立された E L 4 及び L L C は、抑制が腫瘍中の好適な T C R 抗原 K<sup>b</sup> - o v a に依存しないことを示す樹立された E G 7 と同様に、分泌型の g p 9 6 - o v a による O T - I の増殖を抑制する場合に有効であった。O T - I の増殖は、腹膜腔において、かつ全身的に、遠位部位での L L C 及び E L 4 の存在によって抑制されたが、腹腔内の E G 7 - g p 9 6 - I g の免疫処置での腹膜腔中への全細胞の漸増は、腫瘍のないマウスと比較すると事実上増加した。

#### 【 0 0 3 6 】

他で更に報告されるように、樹立腫瘍が抗原非特異性の C T L 増殖の抑制を誘発できることをデータは示す。この抑制の誘発は、腹膜腔中のワクチン部位に対する細胞漸増の増加と相関する。腫瘍を有するマウスから腫瘍のないマウスへのワクチン誘発型腹膜細胞の移植は、レシピエントマウスが制御又はサプレッサー細胞の存在を示す場合に、O T - I の増殖を抑制した。従って、C D 8 陽性 T 細胞は、抗原と別個の腫瘍を有するマウスにおける細胞性の抑制応答のため反応しない。

10

#### 【 0 0 3 7 】

抗原非特異性の免疫抑制を克服するために、頻回反復される、ワクチン接種による C D 8 陽性の C T L の抗原特異性の刺激が、腫瘍を有するマウスに見られる抑制活性を相殺できるかどうかを、我々は評価した。

#### 【 0 0 3 8 】

[ 樹立腫瘍の拒絶は頻回の g p 9 6 - I g 免疫処置を要求する ]

多くのワクチン接種の戦略は、分泌型の g p 9 6 - I g を含み、腫瘍及び腫瘍抗原に対しマウス内で防御免疫を樹立できるが、治療用のワクチン接種による既存の樹立腫瘍を拒絶することは更に困難である。C D 8 の増殖の抗原非特異性の抑制を観察するために、我々はワクチン接種の異なるスケジュールがどのように腫瘍の拒絶及び / 又は腫瘍の増殖に影響を与えるかを分析した。

20

#### 【 0 0 3 9 】

我々は最初に、腫瘍の移植と同日にワクチン接種を開始することによって、治療用のワクチン接種の効果を分析した。100万の E G 7 腫瘍細胞が同系マウスの側腹部中に皮下移植された。同日(日数0)に、100万の g p 9 6 - I g 分泌型の E G 7 ワクチン細胞(E G 7 - g p 9 6 - I g、60ないし80ng / 10<sup>6</sup>細胞数×24時間の速度で、g p 9 6 - I g を分泌する)は、ワクチンとして腹腔内に投与され、ワクチン接種は日数3、7、10及び14で反復された。治療を受けないマウスと比較して、腫瘍の増殖は、4の E G 7 - g p 9 6 - I g のワクチン接種が腫瘍の移植と同日に開始することによって減少する。治療上の効果は g p 9 6 及び抗原依存性である。非照射の E G 7 は、g p 9 6 - I g 又は L L C - g p 9 6 - I g を分泌せず、E G 7 抗原を発現せず、E G 7 - g p 9 6 - I g と同一速度で g p 9 6 - I g を分泌するが、E G 7 - g p 9 6 - I g と同一用量及びスケジュールでワクチンとして腹腔内投与される場合に腫瘍を抑制できない。E G 7 - g p 9 6 - I g でのワクチン接種が、E G 7 接種の2日以上後に開始される場合、同一のワクチン接種スケジュールを用いた治療上の効果は実質的に減少する。2日後の樹立腫瘍でさえもワクチン接種によって制御するのは、新しく移植された腫瘍よりも困難であることを、これらのデータは示している。

30

40

#### 【 0 0 4 0 】

我々は次いで、樹立腫瘍がそれ以上の頻回のワクチン接種のスケジュールによって制御できるかどうかを評価した。100万の E G 7 腫瘍細胞は、側腹部に皮下移植され、3ないし7日間樹立できるようにし、少なくとも7以上の腫瘍細胞の倍加を可能にした。この期間中、視覚的に検出可能な腫瘍小結節の血管新生が生じる。マウスは次いで、100万の E G 7 - g p 9 6 - I g 細胞で、又は、特異性のコントロールにおいて L L C - g p 9 6 - I g 細胞もしくは非照射の E G 7 細胞と同一スケジュール及び用量で、腹腔内に毎日ワクチン接種されるか、あるいはワクチン接種されなかった。E G 7 - g p 9 6 - I g での毎日のワクチン接種は、3日間で樹立されていた E G 7 の増殖を有効に制御したが、非照射の E G 7 での、あるいは L L C - g p 9 6 - I g での毎日のワクチン接種は樹立され

50

た E G 7 の増殖に有効ではなかった。更なる研究において、我々は移植された E G 7 腫瘍を、E G 7 - g p 9 6 - I g のワクチン接種を開始する前に 5 及び 7 日間で樹立するのを可能にした。毎日の 2 のワクチン接種は、この腫瘍樹立後の段階で腫瘍の増殖を遅らせるのに必要であった。頻回の免疫処置がマウスで 2 4 日間、腫瘍の増殖を抑制できることをこのデータは示す。更なる研究は、連続した長期間のワクチン接種のスケジュールが腫瘍を完全に根絶するかどうかを決定するのに必要とされる。

#### 【 0 0 4 1 】

免疫原性の E G 7 リンパ腫で取得されたデータを検証するために、実験はわずかな免疫原性の樹立された L L C を用いて反復された。腫瘍の移植 3 日後に開始する、L L C - g p 9 6 - I g の腹腔内免疫処置 ( 日数 3、7、10、14 ) の反復によって、L L C の腫瘍の進行の遅延が生じた。L L C に対する毎日の免疫処置は腫瘍の遅延により有効ではなかった。免疫処置の効果は、E G 7 - g p 9 6 - I g のワクチン接種が L L C の腫瘍の増殖を制御できない場合に腫瘍特異性であった。腫瘍の増殖の制御は更に、非照射の L L C で得られないが、g p 9 6 - I g の分泌に依存した。

10

#### 【 0 0 4 2 】

分泌型の g p 9 6 - I g 及びそのシャペロン化されたペプチドによって抗原交差提示と併用される頻回の D C 及び N K 活性が、樹立腫瘍誘発型で抗原非特異性の免疫抑制を克服することをこれらのデータは示唆する。

#### 【 0 0 4 3 】

[ g p 9 6 媒介型の D C 及び N K の漸増及び C D 8 の C T L 増殖が B 細胞欠損マウスで増加する ]

20

T h 1 抗腫瘍応答が、野生型マウスと比較して B 細胞欠損マウス ( B C D M ) で増加することが、いくつかのグループによって報告されてきた。従って、我々は g p 9 6 媒介型の C T L 増殖及び抗腫瘍免疫における B 細胞の役割を研究した。腹膜腔は C D 5 陰性 C D 1 9 陽性の B 細胞で、及び C D 5 陽性 C D 1 9 陽性の B 1 B 細胞で埋められ、後者は I g M を産生し、活性時にアイソタイプスイッチを受けない。E G 7 - g p 9 6 - I g の腹腔内免疫処置で、C D 5 陰性 C D 1 9 陽性の集団は免疫処置後の日数 4 で約 5 倍に増加するが、C D 5 陽性の B 1 B 細胞は中程度に増加する。g p 9 6 媒介型の O T - I の増殖は免疫処置後の日数 4 及び 5 で最大になる。それは、ワクチン接種部位である腹膜腔での D C 細胞及び N K 細胞の漸増及び活性に先行される。B 細胞欠損マウスにおいては、D C、特に N K 細胞の漸増は 3 の別個の実験で増加し、漸増した細胞は腹膜腔中でより長く残った。その際は有意性に到達しなかったが、再現性があった。野生型 B 細胞の B C D M への養子移植は、D C 細胞及び N K 細胞の漸増の増加を消滅させた。その知見は、B 細胞が生得性の免疫細胞の g p 9 6 誘発型の漸増に影響を与えることを示唆し、B 細胞が更に C D 8 陽性の C T L 増殖を制御又は抑制することに関与しうること示唆する。

30

#### 【 0 0 4 4 】

従って、我々は g f p で標識された O T - I の増殖が B C D M で増加したかどうかを評価した。B C D M における g p 9 6 免疫処置後の O T - I の増殖は、日数 4 での野生型マウスに見られる増殖の約 2 倍の強さであった。重要なことに、O T - I は腹膜腔において、及び流入領域リンパ節において、免疫処置後の日数 7 及び 1 2 で有意に高頻回で持続した。免疫処置前の、野生型 B 細胞の B C D M への養子移植は、O T - I の増殖を野生型マウスに見られる増殖のレベル以下に低減した。I L - 1 0 欠損マウスが B C D M に見られるような増殖の増加ではなく、野生型マウスに似た O T - I の増殖を呈するため、B 細胞の存在による O T - I の増殖の抑制は I L - 1 0 の産生によって媒介されない。

40

#### 【 0 0 4 5 】

[ g p 9 6 媒介型の樹立腫瘍の拒絶は B 細胞の不存在で増加する ]

上に示したように、野生型マウスにおいて樹立された E G 7 の増殖制御は最小限で毎日の g p 9 6 免疫処置を要求する。同様に、L L C の進行は頻回の免疫処置で遅延できる。E G 7 及び E L 4 細胞は B C D M 中で拒絶され、腫瘍を樹立しないが、しかしながら、L L C 及び L L C - o v a は野生型マウスよりも遅い速度で増殖するものの B C D M に樹立

50

できる。LLC - ova は BCDM で、及び野生型マウスで 7 日間、側腹部に皮下で樹立された。OT - I は静脈内に養子移植され、2 日後に、LLC - ova - gp96 - Ig は単一用量で腹腔内投与され、腫瘍の増殖がモニタリングされた。BCDM においては、単一の免疫処置によって、3 のラットにおける、樹立される 7 日間の LLC - ova 腫瘍の完全な拒絶と、2 のラットにおける有意な腫瘍の縮小とを生じた。無治療においては、LLC - ova は野生型マウスよりも遅い速度であるとはいえ、BCDM で進行的に増殖し続けた。BCDM の B 細胞の再構成は野生型マウスに見られるのと同様のワクチン接種の効果、すなわち進行の遅延を与えた。

#### 【0046】

単一の免疫処置による、BCDM において樹立された LLC の最適な腫瘍制御は、有意に多数の腫瘍特異性の CTL 前駆体 (OT - I)、及び抗原特異性の免疫処置 (LLC - ova - gp96 - Ig) の双方によって支持される。BCDM においては、gp96 免疫処置のない、100 万の養子移植された OT - I の存在によって、大多数のマウスにおける腫瘍の拒絶を生じない。同様に、OT - 1 の移植なしでの単独の gp96 免疫処置はその組合せよりも効果が低い。

#### 【0047】

[ 非小細胞肺癌 (NSCLC) における同種癌ワクチンの臨床試験 ]

同種の肺癌細胞株 AD100 は gp96 - Ig 及び HLA - A1 を形質移入される。細胞のうち少なくとも 70 % が、100 万の細胞から 24 時間ごとに 60 ng より多くの gp96 - Ig を発現する。組換え型癌細胞は非照射され、その後、進行性、再発性、又は転移性の NSCLC (ステージ III B / IV) に罹患する患者に皮内注入された。HLA の適合は要求されない。毒性についての懸念が生じない場合は、患者は 17 週にわたり毎週又は 2 週に 1 回、 $5 \times 10^7$  の同種癌細胞でワクチン接種される。代替的に、全部で  $4.5 \times 10^8$  の同種癌細胞は (a) 18 週にわたる 9 の注入、(b) 18 週にわたる 18 の注入、あるいは (c) 18 週にわたる 36 の注入によって送達してもよい。

#### 【0048】

[ 考察 ]

樹立腫瘍が抗腫瘍免疫を抑制することが十分に理解されよう。腫瘍特異性の T 細胞は樹立腫瘍の存在下でアネルギー性となる。その研究で用いられた B 細胞リンパ腫に対するアネルギーは抗原特異性であり、MHC で限定され、MHC 合致型で骨髄由来の抗原提示細胞の存在に依存した。他の研究においては、抗原非特異性で骨髄性のサプレッサー細胞及び制御性 T 細胞は抗腫瘍免疫の抑制に結びつけられた。生体内での CTL 応答の抑制が抗原と別個の経路を通して樹立腫瘍によって得られうることを、我々の研究は示す。gp96 - ova のワクチン接種に応じた OT - I の増殖は、腫瘍による卵白アルブミンの発現と別個に、樹立腫瘍によって抑制される。この型の抑制は制御性 T 細胞によって、あるいは骨髄性サプレッサー細胞又は M2 マクロファージといった、他のサプレッサー細胞によって得られうる。この仮説によると、抑制活性は gp96 ワクチン接種により腫瘍を有するマウスに誘発された腹膜細胞の移植によって、腫瘍のないマウスに移植可能である。

#### 【0049】

gp96 - ova の免疫処置に対する OT - I 応答は、樹立腫瘍の存在下で強く抑制されるが、完全に遮断されるわけではなく、このことは樹立腫瘍による免疫抑制と、分泌型の gp96 - ova によって刺激された活性化 DC による抗原交差提示を通じた CD8 の CTL 活性との間にバランスがあることを示唆する。天然型腫瘍マウスで、gp96 - ova によって NK 及び DC の漸増及び活性化が生じ、OT - I の増殖がその後生じることを、我々は以前に示した。樹立腫瘍は、LLC - gp96 - Ig のワクチン接種により腹膜腔中への細胞の漸増を実質的に増加させるが、OT - I の増加は抑制され、樹立腫瘍の存在下で漸増した細胞の多くがサプレッサー細胞になりうることを示唆する。gp96 - ova での頻回の免疫処置は、gp96 媒介性の DC 及び NK 刺激の反復、抗原交差提示の増加、及び CTL の初回抗原刺激を通して、抑制から免疫活性の増加へとバランスをシフトすることによって抑制活性を克服できることを、この仮説は予測する。実際に、頻

10

20

30

40

50

回の免疫処置は腫瘍の進行の遅延に有意な効果を有する。樹立されたEG7の場合においては、毎日又は1日2回のワクチン接種は腫瘍の進行を停止するのにより有効であった。LLCについては、免疫処置は隔日又は3日ごとで十分であり、毎日の免疫処置の方が効果が大きくなかった。これらの腫瘍特異性の差異は、サプレッサー細胞が末梢性腫瘍の存在により産生される速度に関連しうる。代替的に、腫瘍がサプレッサー細胞の誘発を媒介するメカニズム、あるいは誘発されたサプレッサー細胞の性質にその差異は依存しうる。これらの問題は現在研究中である。

#### 【0050】

腫瘍分泌型のgp96-ovaでの腹腔内免疫処置に対するOT-I応答を研究することによって、大多数のB細胞が腹腔腔内に漸増することを我々は認めた。B細胞はgp96媒介性のOT-Iの増殖におけるそれらの役割に関する問題を促す抗腫瘍免疫に対し、抑制性であると報告された。B細胞欠損マウスを用いると、gp96-ovaの免疫処置に続くNK及びDCの漸増と、OT-Iの増殖との双方を抑制することが、即時に明確になった。B細胞を再構成したBCDMは、gp96-ova媒介性のOT-Iの増殖に対し野生型マウスのように応答し、B細胞の欠損は、B細胞の欠如と関連しない方法で、BCDMのgp96-ova免疫処置に対する応答性を修飾する可能性を除外した。B細胞の欠損によって、単一のgp96-Igの免疫処置のみの後でさえも、OT-Iの増殖の増加、及び7日間で樹立されたLLC-ovaの腫瘍の腫瘍拒絶の強い増加が生じた。サプレッサー細胞の腫瘍媒介性の誘発がB細胞の不存在下で大きく減少するか、あるいはB細胞自体がサプレッサー細胞として作用することをこのデータは示唆する。B細胞はサプレッサー細胞の誘発に関与するか否か、あるいはB細胞自体がCTL応答に対し免疫抑制性であるか否かは、更なる研究を必要とするが、しかしながら、IL-10は腫瘍免疫のB細胞媒介性の抑制に関与するとは思われない。現行の研究において、OX40-L欠損型のB細胞が抗腫瘍免疫応答を抑制する機能の低減を示すことを我々は見出した。B細胞上に発現したOX40-Lが、どのようにgp96による抗腫瘍免疫及びCTL増殖の抑制を媒介するかを決定することは残されたままである。

#### 【0051】

我々の研究は、抗原とは別個の免疫抑制が研究、更には規定できるモデルを提供する。特にこのプロセスにおけるB細胞の役割は非常に興味深い。加えて、我々の研究は抗腫瘍ワクチンがより有効にできる方法を示唆する。抗体でのB細胞の枯渇、及び、例えば腫瘍分泌型のgp96ワクチンでの、その後の頻回のワクチン接種によって、従来のワクチン接種方法で見られるものよりも、更に有効な腫瘍の増殖の制御が生じうる

#### 【0052】

特許、特許出願、書籍及び本明細書中に引用される他の刊行物は、全体として引用によって組み込まれる。特に、本明細書に記載の改良は米国特許出願第11/878,460号の癌細胞ワクチンの投与に応用でき、引用によって組み込まれている。

#### 【0053】

数値範囲を述べる場合に、範囲内の総ての値が更に記載されていると理解すべきである（例えば、1ないし10は1ないし10の間の各整数値、ならびに2ないし10、1ないし5及び3ないし8といった総ての中間範囲を含む）。用語「約（about）」は、当該技術分野の当業者が発明の運用あるいはその特許性に影響しないと理解する、測定値に関する統計的不確実性と、数量における変動性のことである。

#### 【0054】

特許請求の範囲の趣旨及びその法的な等価物の範囲内にある総ての修飾及び置換は、それらの範囲内に包含すべきである。「具える、含む（comprise）」を記述する請求項は、請求項の範囲内にある他の要素を含むことを許容し、「具える、含む」の用語を記述する代わりに、接続語「～から実質的になる（consisting essentially of）」（すなわち、本発明の運用に実質的に影響しない場合に請求項の範囲内にある他の要素の含有を許容する）又は「～からなる（consisting of）」（すなわち、本発明に通常関連する、不純物又は重要でない活性以外の請求項に列挙

された要素のみを許容する)を記述するこのような特許請求の範囲によっても、本発明は記載される。これらの3の接続語のいずれも本発明を主張するのに用いられうる。

【0055】

本明細書中に記載の要素は特許請求の範囲に明確に記述されない限りにおいては、請求項の発明を限定すると解釈すべきではないと理解すべきである。従って、認可された請求項は、特許請求の範囲に読み込まれる明細書によって限定するのではなく、法的保護の範囲を決定する土台である。比較対照すると、従来技術は、本発明、ないし請求項の発明に先行しかつ新規性を消失させる特定の実施形態の範囲を明確に除外する。

【0056】

更に、請求項の複数の限定間の特定の関係は、このような関係が請求項に明確に記述されない限り意図されていない(例えば、物に関する請求項における構成の配置又は方法に関する請求項におけるステップの順序はそうであることが明確に述べられない限りにおいては、請求項の限定ではない)。本明細書中に開示の別個の要素の総ての可能な組合せ及び並べ換えは、本発明の態様であると見なされる。同様に、本発明の記載の一般化は本発明の一部であると見なされる。



10

【0057】

前述のことから、本発明がその精神又は本質的な特徴から離れることなく、他の特異的な形態で具体化されうることは、当該技術分野の当業者に明らかである。本発明で提供される法的保護の範囲は、この明細書によってではなく、添付の特許請求の範囲によって示されるため、記載の実施形態は例示としてのみ考慮すべきであり、限定として考慮すべきではない。

20

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US2009/001330</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>A61K 35/42(2006.01)i, A61K 35/12(2006.01)i, A61P 37/00(2006.01)i</i>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC A61K 35/42		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models since 1975 Japanese utility models and applications for utility models since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) KOMPASS(KIPO internal), Google scholar		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ZHENG, H., et al., 'Cell Surface Targeting of Heat Shock Protein gp96 Induces Dendritic Cell Maturation and Antitumor Immunity', The Journal of Immunology, 2001, pages 6731~5. See Abstract and page 6733, left column	14
Y	INOUE, S., et al., 'Inhibitory Effects of B Cells on Antitumor Immunity', Cancer Research, 2006, Vol.66, No.15, pages 7741~7. See Abstract	14
Y	MULTHOFF, G., et al., 'Heat Shock Protein 72 on Tumor Cell', The Journal of Immunology, 1997, pages 4341~50. See Abstract	14
Y	DAI, J., et al., 'Cell Surface expression of heat shock protein gp96 enhances cross-presentation of cellular antigens and the generation of tumor-specific T cell memory', Cancer Immunity, 2003, Vol.3, pages 1~11 See Abstract	14
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 13 OCTOBER 2009 (13.10.2009)		Date of mailing of the international search report <b>14 OCTOBER 2009 (14.10.2009)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, Hee Jin Telephone No. 82-42-481-8162 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2009/001330

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1~13  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 1~13 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Search Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 6~9, 11, 12  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



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

(72)発明者 ボダック, エックハルト, アール.

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 1 3 3, ココナッツグローブ, エスパノーラドライブ 1 7 2 0

(72)発明者 ローゼンブラット, ジョセフ, ディー.

アメリカ合衆国 フロリダ州 3 3 3 1 2, ハリウッド, オークヒルストリート 3 3 2 5

(72)発明者 山崎 浩一

日本国北海道札幌市中央区伏見 1 - 2 - 2 7 - 1 0 1

Fターム(参考) 4C085 AA03 CC03 EE01