

(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2011-521967

(P2011-521967A)

(43) 公表日 平成23年7月28日(2011.7.28)

(51) Int.Cl.

**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61P 37/04** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 31/04** (2006.01)  
**A61P 17/02** (2006.01)

F 1

A 61 K 39/00  
A 61 P 37/04  
A 61 P 35/00  
A 61 P 31/04  
A 61 P 17/02

H

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 36 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-511835 (P2011-511835)  
(86) (22) 出願日 平成21年5月29日 (2009.5.29)  
(85) 翻訳文提出日 平成23年1月11日 (2011.1.11)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2009/045550  
(87) 國際公開番号 WO2009/146392  
(87) 國際公開日 平成21年12月3日 (2009.12.3)  
(31) 優先権主張番号 61/056,925  
(32) 優先日 平成20年5月29日 (2008.5.29)  
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 505401687  
アイ アール エックス セーラピューティクス、 インコーポレイテッド  
アメリカ合衆国 ニューヨーク 10019, ニューヨーク、 ウエスト 57ティーエイチ ストリート 140, スイート 9シー  
(74) 代理人 100106448  
弁理士 中嶋 伸介  
(72) 発明者 ジョン・ダブリュー・ヘデン  
米国、 ニューヨーク 11724、 コールドスプリングハーバー、 ハーバーロード 428  
F ターム(参考) 4C085 AA03 BB17 CC03 EE01 GG01  
GG03 GG04 GG05 GG06  
最終頁に続く

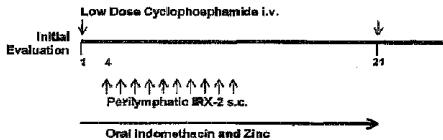
(54) 【発明の名称】初代細胞由来生物製剤の作用機序

## (57) 【要約】

免疫系を抑制している免疫標的を処置し、免疫系を回復する方法であって、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、血液中のB及びT細胞の数を修正し、リンパ節を局所的に活性化し、免疫標的に隣接する領域にヘルパー-T及びB細胞を浸潤させ、免疫標的にキラー-T細胞及びマクロファージを浸潤させ、免疫標的に処置し、免疫系を回復させる、ステップを有する方法。患者に免疫を誘発させる方法。腫瘍を破壊する方法。癌治療に有利な治療結果を予測する方法。免疫予防の方法。免疫回復の方法。腫瘍を処置する方法。腫瘍エスケープを防止する方法。

【選択図】図1

Figure 1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

免疫系を抑制している免疫標的を処置し、免疫系を回復する方法であって、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、血液中のB及びT細胞の数を修正し、リンパ節を局所的に活性化し、免疫標的に隣接する領域にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、免疫標的にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させ、免疫標的を処置して、免疫系を回復させる、ステップを有する方法。

**【請求項 2】**

10

前記修正するステップが、血液中のB及びT細胞の数を上方制御又は下方制御することとして更に定義される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記修正するステップが、ナイーブT細胞及び早期メモリーT細胞の数を修正することとして更に定義される、請求項2に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記修正するステップが、CD3+、CD45RA+及びCCR7+ナイーブT細胞の数を修正することとして更に定義される、請求項3に記載の方法。

**【請求項 5】**

20

前記修正するステップが、ナイーブT細胞をメモリー及びエフェクターT細胞に分化させることとして更に定義される、請求項4に記載の方法。

**【請求項 6】**

セントラルメモリーT細胞を血流から流出させ、排液性リンパ節に移動させるステップを更に有する、請求項5に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記修正するステップが、B細胞をリンパ節に補充し、B細胞を抗原に暴露し、B細胞を免疫標的に移動させ、免疫標的を攻撃することとして更に定義される、請求項3に記載の方法。

**【請求項 8】**

30

前記攻撃するステップが、免疫標的を攻撃する抗体の作製及び抗体依存細胞性細胞毒性の支持からなる群から選択される作用として更に定義される、請求項7に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記活性化するステップが、リンパ節を局所的に肥大させ、リンパ球を補充し、洞組織球増殖症を回復に向けさせることとして更に定義される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 10】**

前記免疫標的に隣接する領域に浸潤させるステップが、免疫標的に隣接する領域にCD45RA+、CD3+及びCD4+Tリンパ球及びCD20+Bリンパ球を浸潤させることとして更に定義される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

40

前記免疫標的に浸潤させるステップが、免疫標的にCD45RO+、CD3+及びCD8+Tリンパ球及びCD68+マクロファージを浸潤させることとして更に定義される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記免疫標的に隣接する領域に浸潤させるステップ及び前記免疫標的に浸潤させるステップが、体液性及び細胞性免疫である、請求項1に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記初代細胞由来生物製剤が、IRX-2として更に定義される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 14】**

50

前記投与ステップが、更にIRX-2の投与前に低用量のシクロホスファミドを投与す

ることを有し、更にレギュラトリーT細胞リンパ球により抑制を回復に向かわせるステップを有する、請求項13に記載の方法。

**【請求項15】**

前記投与ステップが、更にインドメタシン及び亜鉛を毎日投与することを有することを特徴とする、請求項14に記載の方法。

**【請求項16】**

前記投与ステップが、更にIRX-2を毎日又は断続的に週に3日、7日の内5日、5~20日間皮下に投与することとして更に定義される、請求項14に記載の方法。

**【請求項17】**

前記投与ステップが、更に1日当たり30~700ユニットのIRX-2を投与することとして更に定義される、請求項16に記載の方法。

**【請求項18】**

外因性抗原を投与するステップを更に有する、請求項1に記載の方法。

**【請求項19】**

外科手術、放射線療法、化学療法又はそれらの組み合わせを行うステップを更に有する、請求項1に記載の方法。

**【請求項20】**

前記免疫標的が、遺伝子異常、癌、感染、栄養不良、火傷、AIDS、HIV、化学療法及び放射線療法からなる群に起因する生物学的状態である、請求項1に記載の方法。

**【請求項21】**

患者に免疫を誘発させることを有する方法であって、  
初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、  
T及びB細胞の変化を検出し、  
患者に免疫を誘発させる、ステップを有する方法。

**【請求項22】**

腫瘍を破壊する方法であって、  
初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、  
未成熟樹状細胞を成熟させ、  
ナイーブT細胞を活性化させ、  
得られた成熟樹状細胞がナイーブT細胞を刺激し、  
ナイーブT細胞をキラーT細胞に分化させ、  
キラーT細胞を腫瘍に移動させ、  
腫瘍を破壊する、ステップを有する方法。

**【請求項23】**

初代細胞由来生物製剤がIRX-2として更に定義される、請求項22に記載の方法。

**【請求項24】**

癌治療に有利な治療結果を予測する方法であって、  
初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、  
腫瘍周囲におけるヘルパーT及びB細胞及び腫瘍内におけるキラーT細胞及びマクロファージの増加を検出し、  
癌治療に有利な治療結果を予測する、ステップを有する方法。

**【請求項25】**

前記検出するステップが、腫瘍周辺のCD45RA+、CD3+及びCD4+Tリンパ球及びCD20+Bリンパ球の増加、及び腫瘍内のCD45RO+、CD3+及びCD8+Tリンパ球及びCD68+マクロファージの増加を検出することとして更に定義される、請求項24に記載の方法。

**【請求項26】**

初代細胞由来生物製剤が、IRX-2として更に定義される、請求項24に記載の方法。

**【請求項27】**

10

20

30

40

50

免疫予防の方法であって、  
初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、  
免疫抑制を防止する、ステップを有する方法。

【請求項 28】

前記防止するステップが、未成熟樹状細胞を成熟させ、ナイーブT細胞を活性化させ、得られた成熟樹状細胞がナイーブT細胞を活性化させ、活性化されたナイーブT細胞をアポトーシスから保護し、ナイーブT細胞をメモリー及びエフェクターT細胞に分化させ、免疫系が抑制されないようにリンパ節を局所的に活性化させることとして更に定義される、請求項27に記載の方法。

【請求項 29】

初代細胞由来生物製剤が、IRX-2として更に定義される、請求項28に記載の方法。  
。

【請求項 30】

免疫回復の方法であって、  
初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、  
患者の免疫系を回復させる、ステップを有する方法。

【請求項 31】

前記回復させるステップが、未成熟樹状細胞を成熟させ、ナイーブT細胞を活性化させ、得られた成熟樹状細胞がナイーブT細胞を活性化させ、活性化されたナイーブT細胞をアポトーシスから保護し、血液中のB及びT細胞の数を修正し、リンパ節を局所的に活性化し、免疫標的に隣接する領域にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、免疫標的内にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させることとして更に定義される、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

初代細胞由来生物製剤が、IRX-2として更に定義される、請求項31に記載の方法。  
。

【請求項 33】

免疫標的が腫瘍である、請求項32に記載の方法。

【請求項 34】

腫瘍を治療する方法であって、  
初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、  
血液中のB及びT細胞の数を修正し、  
リンパ節を局所的に活性化し、  
腫瘍周囲にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、  
腫瘍内にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させ、  
腫瘍を処置する、ステップを有する方法。

【請求項 35】

初代細胞由来生物製剤が、IRX-2として更に定義される、請求項34に記載の方法。  
。

【請求項 36】

前記処置するステップが、腫瘍の軟化、腫瘍に起因する痛みの緩和、腫瘍の縮小、腫瘍の断片化、腫瘍の壊死及び腫瘍の線維化からなる群から選択される少なくとも1つの結果を提供する、請求項34に記載の方法。

【請求項 37】

腫瘍エスケープを防止する方法であって、  
初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、  
血液中のB及びT細胞の数を修正することによって腫瘍の免疫退化を形成し、  
リンパ節を局所的に活性化し、  
腫瘍周囲にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、  
腫瘍内にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させ、

10

20

30

40

50

腫瘍エスケープを防止する、ステップを有する方法。

【請求項 3 8】

初代細胞由来生物製剤が、IRX-2として更に定義される、請求項37に記載の方法

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫系の治療に関する。特に、本発明は、初代細胞由来生物製剤（primary cell derived biological）の免疫系に対する作用機序に関する。

10

【背景技術】

【0002】

二十世紀初頭に、ウィリアム・コーリーが毒素によるヒト癌の腫瘍退縮を行ったため、癌治療者は、臨床反応が比較的まれであるにもかかわらず、何百もの異なる免疫治療を行った。これらの失敗の原因について洞察することがほとんど又は全くなかったため、一貫した作用機序は明らかにされなかった。明確な作用機序を確立するためには、常に反応を引き起こし、分析可能な治療を構築する必要があった。

【0003】

頭頸部扁平上皮癌（head and neck squamous cell cancer : H&NSCC）がその患者に見られる免疫不全についてよく知られているので、よいモデルとなる。数例を挙げれば、（1）腫瘍並びにプロスタグラジン、レギュラトリート細胞、骨髄サプレッサー細胞、抗原抗体複合体、IL-10などのサイトカイン等を含む宿主経由機序により誘導されたTリンパ球アネルギー及び喪失（Whiteside, 2001；Hadden, 1995）、（2）サプレッサー及び炎症性変化の兆候を有する単球／マクロファージの機能異常（Mantovani, 2002）及び（3）洞組織球増殖症（sinus histiocytosis : SH）により特徴付けされる樹状細胞（dendritic cell : DC）の異常（Dunn, 2005）などがある。

20

【0004】

異常を回復するには、効果的な治療努力が必要であった。広範な文献の再調査（Hadden, 1995）及び一連の臨床前試験により、初代細胞由来生物製剤（IRX-2としても知られている）プロトコルが得られた。IRX-2プロトコルは、図1に示すように、静脈内注射による低用量（300mg/m<sup>2</sup>）のシクロホスファミド（CY）を、レギュラトリート細胞リンパ球或いはその他のサプレッサーによる抑制を回復するため、初期投与として使用する。CYに続いて、IRX-2を、癌領域のリンパ節の頸部鎖に供給されるように、頭蓋底に10～20日間毎日投与する。これらのリンパ節部位は、免疫が起こる場所として知られている（Maass, 1995）。

30

【0005】

IRX-2は、Tリンパ球の数と機能を上昇させて作用すると考えられていた。近年、米国特許出願第60/990,759号（Signorelli）に開示されているように、腫瘍誘導性アポトーシスの反転（reversal）が主な機構であることが示された。インドメタシン（indomethacin : INDO）を約21日間、毎日投与し、腫瘍及び公知の癌関連抑制機構である単球/マクロファージによるプロスタグラジン産生を阻止した。亜鉛もまた、方法の免疫回復成分の他の態様として投与された（Hadden, 1995）。

40

【0006】

また、上記プロトコルが開発された時点では、T細胞への腫瘍抗原の提示者として樹状細胞が重要な役割を果たしていることは知られており、SHがDCの異常を反映していることも知られていた。米国特許第6,977,072号及び第7,153,499号に開示されている作用機序に関する出願人の研究により、IRX-2プロトコルがこのDCの

50

異常を回復し、強力な免疫を反映する局所のリンパ節変化を起こすこと (Meneses, 2003) が明らかになった。より具体的には、上記特許は、ナイーブT細胞の産生を誘発し、好ましくはサイトカインIL-1、IL-2、IL-6、IL-8、INF-及びTNF-を含む、IRX-2の投与によるT細胞免疫を回復させる方法を開示している。これは分子的治療を通して成人がナイーブT細胞を産生することができる最初に示したもののが一つであり、また、回復すべき免疫に抗原を提示できるナイーブT細胞の存在を示したものである。

## 【0007】

IRX-2を支持するメカニズム仮説は、抗原投与の必要はないが、治療用癌ワクチンのメカニズムに類似する。頸部に投与されたIRX-2は、DC上で頸部リンパ節鎖に直接作用し、成熟及びそれに続くナイーブT細胞への内因性腫瘍抗原の提示能力を促進するものと考えられている。

10

## 【0008】

IRX-2の作用機序に関する非臨床データは、IRX-2がヒト単球由来DCを効果的に刺激、活性化することを示した (Egan, 2007)。未成熟DCのIRX-2処置は、ナイーブT細胞への抗原提示に重要である分子の分化に加え、CD83及びCCR7(それぞれ、成熟及びリンパ節遊走のマーカーである)の発現を増大させる。また、IRX-2は、ナイーブT細胞の活性化に重要な共刺激レセプターである、CD48、CD54及びCD86を誘導する。IRX-2で処置されたDCにおける機能的な変化には、抗原提示及びT細胞活性の増強が含まれていた。以上をまとめると、未成熟DCのIRX-2処置は、ナイーブT細胞を効果的に刺激できる、成熟かつ活性化されたDCの成長に一致するT-形態学的表現型機能変化を引き起こす。

20

## 【0009】

抗原特異的反応性を測定することが可能な、定義済みの抗原に基づく治療用癌ワクチンとは対照的に、拒絶抗原はH&NSCC内に見出されていないので、IRX-2治療後の抗原特異的反応の測定能が制限される。

30

## 【0010】

IRX-2はTリンパ球の機能を増強し、新たな未成熟T細胞の生成及び一旦生成されたこれらT細胞のアポトーシスを防止することが示されたが、抗原の提示後のT細胞の機能については知られていない。T細胞による腫瘍処置についての正確な機構は、先行技術には明示的にも本質的にも開示されていない。更に、IRX-2は癌治療の間に上述の機構において効果を有することが示されたが、IRX-2が癌以外の免疫抑制の他の例において同様な作用機序を提供できるという証拠はない。個々のサイトカインが免疫系の各部位を完全には回復させることができなかっただけでなく、複数のサイトカインを含む他の治療も同様に免疫系を回復させることはできなかった。例えば、マルチカイン(MULTIKINE: Cel-Sci)は腫瘍自身のみに有効で、腫瘍細胞の細胞周期に影響するが、免疫系に影響を与えるという証拠は示されていない。

40

## 【0011】

本質的に、出願人の初期の研究は、免疫系に影響を与えるいくつかの特定の基準における初代細胞由来生物製剤の作用機序について記載している。ここでは、免疫系に影響する、即ち、リンパ球の生存に影響する初代細胞由来生物製剤の他の基準の証拠を示す。ここでのデータは、初代細胞由来生物製剤は、免疫系の各基準に対して、即ち、免疫系の各部門に対して、補正的な、プラス効果を有することを示している。先行技術の組成は、免疫系の単一の部門に向けられている。

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0012】

従って、免疫系の各部門を効果的な対象として免疫系を回復する、免疫抑制に対する完全な作用機序を提供する組成に対する要望がある。

## 【課題を解決するための手段】

**【 0 0 1 3 】**

本発明は、（ 固形腫瘍、バクテリア感染、HIVなどの感染症等の ）免疫系を抑制している免疫標的を処置し、免疫系を回復する方法を提供する。本発明の方法は、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、血液中のB及びT細胞の数を修正し、リンパ節を局的に活性化し、免疫標的に隣接する領域にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、免疫標的にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させ、免疫標的を処置し、免疫系を回復させる、ステップを有する。

**【 0 0 1 4 】**

本発明はまた、患者に免疫を誘発させる方法であって、上記免疫が、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、T及びB細胞の変化を検出し、患者に免疫を誘発させる、ステップを有する方法を提供する。10

**【 0 0 1 5 】**

本発明はまた、腫瘍を破壊する方法であって、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、未成熟樹状細胞を成熟させ、ナイーブT細胞を活性化させ、得られた成熟樹状細胞がナイーブT細胞を刺激し、ナイーブT細胞をキラーT細胞に分化させ、キラーT細胞を腫瘍に移動させ、腫瘍を破壊する、ステップを有する方法を提供する。

**【 0 0 1 6 】**

本発明は、癌治療に有利な治療結果を予測する方法であって、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、腫瘍周囲におけるヘルパーT及びB細胞及び腫瘍内におけるキラーT細胞及びマクロファージの増加を検出し、癌治療に有利な治療結果を予測する、ステップを有する方法を提供する。20

**【 0 0 1 7 】**

本発明は、免疫予防の方法であって、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、免疫抑制を防止する、ステップを有する方法を提供する。

**【 0 0 1 8 】**

本発明は更に、免疫回復の方法であって、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、患者の免疫系を回復させる、ステップを有する方法を提供する。

**【 0 0 1 9 】**

本発明は、腫瘍を治療する方法であって、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、血液中のB及びT細胞の数を修正し、リンパ節を局的に活性化し、腫瘍周囲にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、腫瘍内にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させ、腫瘍を処置する、ステップを有する方法を提供する。30

**【 0 0 2 0 】**

本発明はまた、腫瘍エスケープを防止する方法であって、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、血液中のB及びT細胞の数を修正することによって腫瘍の免疫退化を形成し、リンパ節を局的に活性化し、腫瘍周囲にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、腫瘍内にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させ、腫瘍エスケープを防止する、ステップを有する方法を提供する。

**【 0 0 2 1 】**

本発明の他の利点は、添付の図面に関連して考慮される以下の詳細な説明を参照することにより一層良好に理解されるにつれて、容易に評価されるであろう。40

**【 図面の簡単な説明 】****【 0 0 2 2 】**

【図1】IRX-2プロトコルの表示である。

**【 0 0 2 3 】**

【図2】IRX-2の体内(in vivo)投与量に対する反応を示すグラフである。

**【 0 0 2 4 】**

【図3】4つの患者群における生存率を示すグラフである。

**【 0 0 2 5 】**

【図4】4つの患者群におけるリンパ球浸潤の比率の中央値を示すグラフである。50

【0026】

【図5】リンパ球のH&E染色の写真である。

【0027】

【図6】リンパ球浸潤のH&E染色の写真である。

【0028】

【図7】Aは反応者におけるリンパ浸潤濃度(density)を示すグラフ、Bは非反応者におけるリンパ浸潤濃度を示すグラフである。

【0029】

【図8】腫瘍内/腫瘍周囲リンパ球浸潤の部位を示すグラフである。

【0030】

10

【図9】CD45RO+メモリーT細胞のIHC染色を示す写真である。

【0031】

【図10】第0日、第21日における融合FDG-PET/CTスキャン画像である。

【発明を実施するための形態】

【0032】

全体として、本発明は、腫瘍及び全体的な免疫系の両者に対するIRX-2の作用機序に向けられるものであり、初代細胞由来生物製剤を投与することによる免疫標的の処置方法を提供する。初代細胞由来生物製剤は、以下に更に詳述するように、免疫標的の免疫拒絶を形成する。

【0033】

20

本明細書中では、「免疫標的」とは、免疫系の抑制をもたらす生物学的状態又は免疫抑制をもたらす疾病を意味する。免疫標的は、抑制により免疫系が非反応性である、抗原標的でもある。本発明では、免疫標的は、免疫抑制を転換し、免疫系を正常機能に回復させる初代細胞由来生物製剤の「ターゲット」となる。免疫標的は、免疫系組成の遺伝子異常(内因性又は原発性免疫不全)によって引き起こされる。免疫標的はまた、外因性因子(二次免疫疾患)によっても引き起こされる。例えば、免疫標的は、AIDSやHIVなどの疾病、放射線照射(放射線治療)、化学療法、栄養不良、火傷、感染、特に癌(腫瘍)により引き起こされる。

【0034】

30

本明細書中では、「アポトーシス」とは、細胞死を意味する。アポトーシス(I型細胞死)は、ストレス、感染、損傷など、さまざまな理由で起こる、細胞の一種のプログラムされた死である。リンパ球のアポトーシスは、これらに限定されないが、癌関連治療(化学療法、放射線照射)などのさまざまな現象及びアポトーシス誘導因子を産生する腫瘍自体により誘導される。

【0035】

本明細書中では、「リンパ球」とは、免疫系に存在する白血球を指し、大型顆粒リンパ球(ナチュナルキラー(natural killer(NK)細胞))及び小リンパ球(T及びB細胞)を含む。

【0036】

40

「初代細胞由来生物製剤」は、本明細書中では、複数のサイトカイン、好ましくは天然の非組換えサイトカインを意味し、特に天然サイトカイン混合物(natural cytokine mixture:NCM)として既に知られている。好ましくは、初代細胞由来生物製剤は、以下に記載のIRX-2であり、意図した意味から外れることなく、この出願を通して、2つの用語を交換可能に使用することができる。

【0037】

「IRX-2」は、フィトヘマグルチニン(phytohemagglutinin:PHA)及びシプロフロキサシン(ciprofloxacin:CIPRO)により刺激された精製ヒト白血球細胞(单核細胞)により產生される、白血球由来天然初代細胞由来生物製剤である。主な活性成分は、インターロイキン1(IL-1)、インターロイキン2(IL-2)、インターロイキン6(IL-6)、インターロイキン8(IL-

50

8)、腫瘍壊死因子 (TNF-) 及び - インターフェロン (IFN-) である。好ましくは、本発明に使用される IRX-2 は、これら 6 種の重要なサイトカインを含有する。IRX-2 はまた、先に「NCM」、即ち天然サイトカインとして言及しされており、米国特許第 6,977,072 号及び第 7,153,499 号に定義、説明されている。

#### 【0038】

簡潔には、IRX-2 は、4-アミノキノロン抗生剤を常在于において、好ましい実施形態では PHA であるマイトジエンを、連続的又はパルス状により供給することにより調製される。しかし、その他のマイトジエンを使用することもできる。患者に投与する IRX-2 は、IL-1 を 60 ~ 6000 pg/mL、より好ましくは 150 ~ 1800 pg/mL の濃度範囲で、IL-2 を 600 ~ 60000 pg/mL、より好ましくは 3000 ~ 12000 pg/mL の濃度範囲で、TNF- を 200 ~ 20000 pg/mL、より好ましくは 1000 ~ 4000 pg/mL の濃度範囲で含有する。  
10

#### 【0039】

IRX-2 はまた、IL-6 を 60 ~ 6000 pg/mL、より好ましくは 300 ~ 2000 pg/mL の濃度範囲で、IL-8 を 6000 ~ 60000 pg/mL、より好ましくは 20000 ~ 18000 pg/mL の濃度範囲で、TNF- を 200 ~ 20000 pg/mL、より好ましくは 1000 ~ 4000 pg/mL の濃度範囲で含有することができる。組換え、天然又はペグ化されたサイトカインを使用することができ、又は IRX-2 が組換え、天然又はペグ化されたサイトカインを含有することができる。本発明の IRX-2 は更に、(100 ~ 10000 pg/mL、より好ましくは 500 ~ 2000 pg/mL の濃度範囲で) IL-7、IL-12、IL-15、GM-CSF 並びに G-CSF などの他の組換え、天然又はペグ化サイトカインを含有することができる。IRX-2 を作製する方法は、上記特許並びに米国特許仮出願第 61/044,674 号に記載されている。  
20

#### 【0040】

化学的阻害剤、非ステロイド性抗炎症薬 (non-steroidal anti-inflammatory drug: NSAIDS)、これらの組み合わせなど、その他の化合物も IRX-2 とともに投与することができる。化学的阻害剤としては、免疫抑制性ではなく (好ましくは低用量での使用)、かつ、例えば、体内の免疫抑制又は抑制機構を制御することにより、免疫及び/又は免疫応答を増強するような免疫調節効果を有する化学療法剤を使用することができる。好ましい実施形態によれば、化学的阻害剤は、これらに限定されるわけではないが、例えば、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質などの抗新生物薬である。化学的阻害剤はまた、サリドマイドなどの免疫調節剤であってよい。化学的阻害剤はまた、塩又は他の複合体であってよい。好ましくは、化学的阻害剤は、アルキル化剤であるシクロホスファミド (cyclophosphamide: CY) である。NSAID は好ましくは、CoxI 及び CoxII 両者の阻害剤である、インドメタシン (indomethacin: INDO) である。NSAID はまた、イブプロフェン又はセレコキシブやロフェコキシブなどの CoxII 阻害剤、又はそれらの組み合わせであってよい。また、内因性抗原 (即ち、既に体内に存在する抗原) 及び外因性抗原を IRX-2 と共に投与することもできる。  
30

#### 【0041】

本明細書中では、「有効量」とは、本発明の所望の結果を達成するために必要とされる IRX-2 の量、即ち、免疫標的の処置、更に後述される機能を遂行する IRX-2 の量を意味する。当業者であれば、上述のように、さまざまな濃度の成分とともに、特定の患者に投与されるべき IRX-2 の有効量を決定することができる。

#### 【0042】

本発明は、免疫系を抑制している免疫標的を処置し、免疫系を回復させる方法を対象としている。本方法は、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、血液中の B 及び T 細胞の数を修正し、リンパ節を局所的に活性化し、免疫標的隣接する領域にヘルパーT 及び B

10

20

30

40

50

細胞を浸潤させ、免疫標的にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させ、免疫標的を処置し、免疫系を回復させる、ステップを有する。これらのステップはともに、免疫標的の免疫拒絶の証拠を作製する。言い換れば、これらのステップのそれぞれが、免疫標的は破壊されているはずであることを免疫系が認識したことの証拠であるとともに、免疫系が正常に機能するように回復した（又は、疾病又は免疫抑制された状態での機能レベルよりも高くなっている）ことの証拠でもある。

#### 【0043】

初代細胞由来生物製剤、即ちIRX-2を上述のように投与することが好ましい。化学的阻害剤である低用量シクロホスファミドは、IRX-2の投与によりレギュラトリーT細胞リンパ球による抑制が転換される前に投与することが好ましい。NSAID（好ましくは、インドメタシン）及び亜鉛は、IRX-2投薬の間、毎日投与することもできる。IRX-2の投与量は、更に後述する。

10

#### 【0044】

B及びT細胞の数は、IRX-2の投与により、上方制御又は下方制御することができる。変更される血液中のB及びT細胞の数は、より具体的には、ナイーブT細胞及び早期メモリーT細胞の数である。数が変更されるナイーブT細胞は、CD3+、CD45RA+及びCCR7+である。これは、時間依存性の工程である、ナイーブT細胞のメモリー及びエフェクターT細胞への分化により達成される。セントラルメモリーT細胞も、血流から抜け、排液性リンパ節に移動する。言い換れば、ナイーブT細胞の修飾レベルは、ナイーブT細胞が免疫標的を効果的に攻撃できるT細胞のより進展した形へと分化した結果である。血液中のB細胞の数も、B細胞がリンパ節に補充されることにより変化し、抗原に暴露され、免疫標的へ移動し、免疫標的を攻撃する。より具体的には、B細胞は、抗体の作製及び／又は抗体依存性細胞性細胞障害の支援により免疫標的を攻撃する。

20

#### 【0045】

リンパ節は、局所的なリンパ節を増大させることによって局所的に活性化され、リンパ球を補充し、洞組織球増殖症を回復に向けさせる。免疫標的への抗原の免疫付与が局所的リンパ節に起こる。

#### 【0046】

免疫標的に隣接する領域へのCD45RA+、CD3+及びCD4+Tリンパ球並びにCD20+Bリンパ球の浸潤が起こる。免疫標的に隣接する領域は、免疫標的自身の表面から、その表面から離れた部位まで広がることができる。免疫標的自身への浸潤、即ち、免疫標的内への直接の浸潤は、CD45RO+、CD3+及びCD8+リンパ球（即ち、キラーT細胞）及びCD68+マクロファージで起こる。これら浸潤工程のそれぞれは、（細胞により媒介される）細胞性免疫と同様、（抗体により媒介される）体液性免疫の形成に貢献する。

30

#### 【0047】

本発明の方法のそれぞれにおいて、これらに限定されるわけではないが、例えば、外科手術、放射線療法、化学療法又はそれらの組み合わせなどの治療を更に向上させるために、IRX-2の投与と組み合わせて、その他のさまざまな方法を行うことができる。例えば、放射線療法又は化学療法（細胞破壊的工程）の前にIRX-2を投与することにより、IRX-2はアポトーシスからTリンパ球を保護し、細胞保護剤として作用するので、これらの工程の結果が改善される。

40

#### 【0048】

より具体的には、T細胞がアポトーシスから保護される方法はいくつか存在する。抗アポトーシスシグナル分子（即ち、JAK-3及び蛍光体-Akt）の発現が上方制御され、アポトーシス促進性分子（即ち、SOCS-2）の発現が下方制御される。全体として、CD8+及びCD4+Tリンパ球におけるカスパーゼ活性化が低減し、cFLIP発現が増加する。PI3K/Akt生存経路の抑制に対して、IRX-2が対抗する。T細胞は、外因性アポトーシス（MV-誘導性及びCH-11Ab-誘導性アポトーシス）及び内因性ミトコンドリアアポトーシスの両者により保護されている。これらの保護ステップ

50

のそれについては、更に米国特許仮出願第60/990,759号(Signorelliら)に記載されている。

#### 【0049】

本発明はまた、患者に免疫を誘導する方法を提供する。本方法は、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、T及びB細胞の変化を検出し、患者に免疫を誘発させる、ステップを有する。初代細胞由来生物製剤の投与については上述したが、更に後述する。T及びB細胞の変化については上述されているように、T及びB細胞の分化又は他所への移動により、血液中のT細胞及びB細胞の濃度が変化する。このT及びB細胞の移動は、免疫が患者に誘導されたことの証拠である。

#### 【0050】

初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、未成熟樹状細胞を成熟させ、ナイーブT細胞を活性化させ、得られた成熟樹状細胞がナイーブT細胞を刺激し、ナイーブT細胞をキラーT細胞に分化させ、キラーT細胞を腫瘍に移動させ、腫瘍を破壊する、ステップを有する、腫瘍を破壊する方法が提供される。初代細胞由来生物製剤は、米国特許第6,977,072号及び7,153,499号に記載のナイーブT細胞の産生を誘導するとともに、樹状細胞の熟成を引き起こす。成熟樹状細胞は、次いでナイーブT細胞が活性化されるように、ナイーブT細胞に抗原を提示する。本明細書において証明されているように、ナイーブT細胞は、直ちにキラーT細胞に分化でき、腫瘍に向かって移動し、腫瘍を破壊する。

#### 【0051】

本発明はまた、癌治療に有利な治療結果を予測する方法を提供する。本方法は、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、腫瘍周囲におけるヘルパーT及びB細胞及び腫瘍内におけるキラーT細胞及びマクロファージの増加を検出し、癌治療に有利な治療結果を予測する、ステップを有する。更に具体的には、上述した、CD45RA+、CD3+及びCD4+Tリンパ球及びCD20+Bリンパ球の腫瘍周囲における増加、又はCD45RO+、CD3+及びCD8+リンパ球及びCD68+マクロファージの腫瘍内における増加を検出する。言い換えれば、これらの種類の細胞が増加している場合、初代細胞由来生物製剤での治療が効果的であることを示すバイオマーカーとなる。この方法は、初代細胞由来生物製剤での治療が有効でなく、他の治療方法を探す必要のある患者のスクリーニングに使用することができる。この方法は、これらに限定されないが、例えば、さまざまなアッセイやイムノアッセイ(エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ)、ハイスクループット法などの自動化手段による治療結果の予測に使用することができる。

#### 【0052】

本発明は、免疫予防の方法を提供する。本方法は、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、免疫抑制を防止する、ステップを有する。免疫予防とは、免疫系が抑制されることを防止することである。具体的には、未成熟樹状細胞を成熟させ、ナイーブT細胞を活性化させ、得られた成熟樹状細胞がナイーブT細胞を活性化し、活性化されたナイーブT細胞をアポトーシス(特に、化学療法又は放射線照射の前に投与された場合)から保護し、ナイーブT細胞をメモリー及びエフェクターT細胞に分化させ、リンパ節を局的に活性化させ、免疫系が抑制されないようにすることにより、初代細胞由来生物製剤は、免疫系の全ての部位を活発に作動させる。これらのステップのそれぞれは上述の通りである。患者が生物学的因素により免疫抑制される傾向にある場合、この患者に予防的にIRX-2を投与し、その免疫系の低下を防止する。例えば、患者が癌を生じやすい遺伝因子を有する場合、癌などの免疫標的が生じないようにIRX-2を投与し、免疫系に免疫標的を攻撃する準備をさせることができる。

#### 【0053】

本発明はまた、免疫回復の方法を提供する。本方法は、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、患者の免疫系を回復させる、ステップを有する。免疫系が抑制されている患者は、IRX-2治療により利益を受け、免疫系が正常又はそれ以上の機能を有するように回復される。更に具体的には、未成熟の樹状細胞を成熟させ、ナイーブT細胞を活性化さ

10

20

30

40

50

せ、得られた成熟樹状細胞がナイーブT細胞を活性化し、活性化されたナイーブT細胞をアポトーシスから保護し、血液中のB及びT細胞の数を修正し、リンパ節を局所的に活性化させ、免疫標的に隣接する領域にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、免疫標的にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させることにより、免疫系が回復される。これらのステップのそれぞれは上述の通りである。免疫系の複数の部門がIRX-2の投与により作動されることにより、免疫系は免疫標的に対応できるようになる。例えば、腫瘍やその他の免疫標的は、免疫標的を攻撃するのに必要なさまざまな免疫成分を下方制御する傾向にある。免疫標的は、自分自身が免疫系により攻撃されないようにする保護作用を有する。更に、免疫抑制状態の患者の樹状細胞は、免疫標的存在に対して耐性となる。しかし、これらの免疫標的は、一旦免疫系の抑制が回復されると、攻撃に対して感受性となる。IRX-2は、免疫標的にに対する樹状細胞の耐性を破壊し、免疫標的の保護作用の全てを克服するために、上述の免疫系の各部門を活性化する。初代細胞由来生物製剤の樹状細胞に対する作用は、米国特許第6,977,072号及び7,153,499号に記載されている。

10

#### 【0054】

本発明はまた、腫瘍を処置する方法を提供する。本方法は、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、血液中のB及びT細胞の数を修正し、リンパ節を局所的に活性化させ、腫瘍周囲にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、腫瘍内にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させて、腫瘍を処置するステップを有する。これらのステップのそれぞれは上述の通りである。IRX-2は、下記の実施例に示されるように、腫瘍の軟化、腫瘍に起因する痛みの緩和、腫瘍の縮小、腫瘍の断片化、腫瘍の壊死、腫瘍の線維化により証明されるように、癌のさまざまな段階における腫瘍を処置することが示されている。本質的に、IRX-2は、免疫系の各部門を抑制することなく、腫瘍は効果的に処置され、癌が患者から除去される。

20

#### 【0055】

本発明は更に、腫瘍エスケープを防止する方法を提供する。本方法は、初代細胞由来生物製剤の有効量を投与し、血液中のB及びT細胞の数を修正することによって腫瘍の免疫退化を形成し、リンパ節を局所的に活性化し、腫瘍周囲にヘルパーT及びB細胞を浸潤させ、腫瘍内にキラーT細胞及びマクロファージを浸潤させ、腫瘍エスケープを防止する、ステップを有する。これらのステップのそれぞれは上述の通りである。多くの腫瘍は、免疫系に対して攻撃的であり、免疫系を抑制するシグナルを送り出す。免疫系はIRX-2により完全に抑制から回復されるので、腫瘍は免疫系から逃れることなく、転移することができない。重要なことは、下記の実施例において、IRX-2治療後に腫瘍を再発した患者がないことである。従って、IRX-2は効果的に腫瘍エスケープを防止する。

30

#### 【0056】

全体的に、IRX-2は、免疫系のそれぞれの部門を抑制することなく、さまざまな免疫標的を攻撃する。免疫不全疾病状態（癌、AIDS、その他の前述の疾病）は、IRX-2を介してその免疫系の抑制状態を転換する。免疫系の複数部分でのIRX-2と特定のサイトカインの組み合わせにおけるIRX-2の効果は、単独の「楽器」というよりはむしろ「シンフォニー」として機能する。これは、各成分の組み合わせではあるが、免疫系の単一の部門にのみ作用する、従来の治療法に対立するものである。免疫系の各部分が、IRX-2投与により得られる1つの効果のゲートキーパーとなる。免疫系のこれらの部分のそれぞれが、免疫標的を攻撃するために必要となる。言い換えれば、図17に示されるように、未成熟樹状細胞は、ナイーブT細胞を活性化するために成熟する必要がある。ナイーブT細胞の作製は、成熟樹状細胞により抗原が提示されることによっても誘導される。樹状細胞がナイーブT細胞に抗原を提示するためには、ナイーブT細胞と樹状細胞の両者が、局所的なリンパ節に移動する必要がある。一旦活性化されると、ナイーブT細胞は、キラーT細胞に分化し、免疫標的を攻撃できるように、アポトーシスから保護される必要がある。B細胞も、免疫標的を攻撃するために、マクロファージになる必要がある。IRX-2を投与することにより、これらの機能のそれぞれが遂行され、あらゆる免疫

40

50

標的をいつでも攻撃できる、健康に機能する免疫系が提供される。

【0057】

体内への初代細胞由来生物製剤の投与方法は、IRX-2に関連する上記特許に開示されている、ワクチンとIRX-2による免疫療法又はIRX-2単独による免疫療法と同じである。1回当たり115ユニット(Unit)のIRX-2を、10日間、リンパ節周辺に注射することが好ましいが、更に後述されるように他の方法により注射することもできる。あるいは、タンクを使用し、IRX-2を断続的に投与することもできる。例えば、1週間に3日間又は1週間の7日の内5日、投与することができる。後述されるように、IRX-2は、1:1から1:10の濃度範囲で希釈されたIRX-2液(即ち、IRX-2を成長させた培地中のIRX-2を希釈)でアポトーシスを防止した。

10

【0058】

好ましくは、IRX-2は、処置されている腫瘍やその他の持続性病変などの病変の領域に局所的なリンパ節に流出するリンパ管の周りに注射される。癌などの病変の近くの、局所的なリンパ節に流出するリンパ管内へ投与される、リンパ管の周辺に投与することが重要である。腫瘍周囲への注入は、ほとんど応答も進行も得られないで、そのような注入は行わない。10日間の注入計画が最適であり、20日間の注入プロトコルは、臨床的には効果的であるが、TH1応答が低下する傾向があり、癌へのリンパ球浸潤により測定した限りでは、望ましくないTH2応答に移るようである。両側注入が効果的である。根治的頸部郭清術の部位では、反対側への注入が効果的である。

20

【0059】

本発明の(IRX-2を含む)化合物は、アポトーシスから保護するだけでなく、外因性又は内因性抗原への最適な免疫を促進するように、個々の患者の臨床状態、投与の部位及び方法、投与スケジュール、患者の年齢、性別及び体重を考慮して、投与及び投薬される。本明細書において、目的にとって医薬的に「有効な量」は、当業界において公知である検討事項に基づいて決定される。投与量は、T細胞をアポトーシスから保護するのに有効であることが好ましい。投与量はまた、免疫を促進して、例えば、腫瘍の縮小、腫瘍切除及び白血球浸潤、再発の遅延又は生存率の改善、症状の緩和又は除去に有効であることが好ましい。

30

【0060】

本発明の方法では、本発明の化合物をさまざまな経路で投与することができるが、外リンパ注射が好ましい。上記化合物は、化合物自身として投与することも医薬的に許容される誘導体として投与することもでき、単独で投与しても、医薬的に許容される担体、希釈剤、アジュバント、賦形剤と組み合わせて有効成分として投与してもよい。上記化合物はまた、皮内又は皮下、リンパ外又はリンパ内、節内、脾臓内、筋肉内、腹腔内又は胸腔内投与することができる。化合物の移植も有用である。治療される患者は、温血動物であり、特にヒトを含む哺乳動物である。示されたデータは、ヒト又はヒト由来細胞に対するIRX-2の活性を示しており、本明細書におけるデータは全てヒトに直接関連、適用される。医薬的に許容される担体、希釈剤、アジュバント及び賦形剤、更に移植担体は、一般に、本発明の有効成分と反応しない、不活性、非毒性固体又は液体增量剤、希釈剤又は封入剤をいう。

40

【0061】

投与は、単回投与でも数日間の複数回投与でもよいが、10日間の注入法が好ましい。本発明の化合物を投与する場合、通常、単位注入量形態(例えば、溶液、懸濁液、乳液)に製剤される。注入に好適な医薬製剤としては、滅菌溶液又は分散液、及び滅菌注入用液又は分散液に再構成される滅菌粉末が挙げられる。担体は、水、エタノール、多価アルコール(例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレンギリコール液など)、好適なそれらの混合物、植物油などの溶媒又は分散媒である。

【0062】

適切な流動性は、例えば、レシチンなどの被膜を使用し、分散液の場合には所要の粒子サイズを維持し、界面活性剤を使用することにより保持できる。非水性賦形剤、例えば、

50

綿実油、ゴマ油、オリーブ油、大豆油、コーン油、ヒマワリ油、ラッカセイ油及びミリスチン酸イソプロピルなどのエステルを、化合物組成物の溶媒系として使用することもできる。更に、抗菌防腐剤、抗酸化剤、キレート剤、緩衝剤を含む、組成物の安定性、滅菌性、等張性を高めるさまざまな添加剤を加えることができる。微生物の作用は、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などのさまざまな抗菌・抗真菌剤により確実に防止することができる。多くの場合、砂糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を含有することが望ましい。注入可能な医薬品形態の持続性吸収は、吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチンなどの使用により達成することができる。しかし、本発明では、使用される賦形剤、希釈剤又は添加剤は上記化合物と混合可能である必要がある。

10

#### 【0063】

注入可能な滅菌溶液は、本発明を実施する際に使用される化合物を、必要とされるいくつかの他の成分とともに、必要量の好適な溶媒に組み入れることにより調製できる。

#### 【0064】

本発明の薬理学的製剤は、さまざまな賦形剤、添加剤、希釈剤などの相溶性の担体を含有する、注入可能な製剤として患者に投与することができる。あるいは、本発明に使用される化合物は、徐放性皮下移植の形で、又はモノクローナル抗体、ベクター性伝達、イオン泳動、ポリマーマトリックス、リボソーム及びミクロスフェアなどの標的送達システムにより、非経口的に患者に投与することができる。本発明に有用な送達システムとしては、例えば、米国特許第5,225,182号、5,169,383号、5,167,616号、4,959,217号、4,925,678号、4,487,603号、4,486,194号、4,447,233号、4,447,224号、4,439,196号及び4,475,196号に記載されているものを挙げることができる。その他の多くの移植、送達システム及びモジュールは当業者に周知である。

20

#### 【0065】

本発明を、以下の実験的実施例により更に詳細に記載する。これらの実施例は、説明の目的のみに例示されるものであって、他に明記されない限り、本発明を制限するものではない。従って、本発明が以下の実施例に制限されると解釈されることは全くなく、むしろ、本明細書に提供された開示の結果として明らかになつたいかなる変更も包含すると解釈される。

30

#### 【実施例】

#### 【0066】

#### 原料及び方法

細胞培養に関連する全てのステップは滅菌状態で行われる。本明細書に記載されていない細胞免疫の一般的な方法は、M i s h e l l 及び S h i i g i ( S e l e c t e d M e t h o d s i n C e l l u l a r I m m u n o l o g y, 1 9 8 1 )などの細胞免疫技術に関する一般的な参考図書に記載され、当業者に周知の方法に従って行われる。

#### 初代細胞由来生物製剤(IXR-X-2)の調製

#### 【0067】

初代細胞由来生物製剤を製造する方法は、米国特許出願第61/044,674号に主に記載されている。単核細胞(mono nucle ar cell: MNC)は、リンパ球分離媒体(lymphocyte separation medium: LSM)に白血球を供給し、溶媒を自動細胞処理及び洗浄システムで遠心分離して精製MNCを得ることにより夾雑細胞を除去して精製する。MNCを、FEPリンパ球保存バッグ内に一晩保存する。MNCの誘導混合物を、使い捨て細胞培養装置内で、マイトジエン、好みしくはフィトヘマグルチニン(PHA)とシプロフロキサシンで刺激し、MNCから初代細胞由来生物製剤を作製する。誘導混合物から、マイトジエンを濾過及び接線流濾過法により除去し、誘導混合物を培養する。誘導混合物を濾過により浄化し、初代細胞由来生物製剤上清を得る。最後に、初代細胞由来生物製剤上清を陰イオン交換クロマトグラフィ

40

50

一、15ナノメーター濾過、更に、必要に応じて、紫外線-C(UVC)による非活性化を行い、DNA及び外因性薬剤を除去する。更に、最終生成物を薬瓶に入れ、患者に投与するまで保存することができる。

#### 実施例1

##### 【0068】

実験に使用されるIRX-2の投与計画のための用量及びスケジュールの選択は、IRX Therapeuticsにより行われた研究に基づいて行った。IRX Therapeuticsによる研究は、前立腺特異膜抗原(prostate specific membrane antigen:PSMA)ペプチド・コンジュゲートで免疫したマウスを用いて行い、足蹠の腫脹の増大を評価した。図2は、これらのデータ及び特徴的な「釣鐘状」曲線を示す。

##### 【0069】

研究は、4群の患者について、下記表1に示したように行った。図3及び4は、これらの群の生存及び腫瘍リンパ球浸潤のグラフである。

##### 【表1】

表1

投与計画	N	IRX-2注入 (ユニット)	注入／日	日数	累積IRX-2量 (ユニット)
1	4	~38U	1	10	380U
2	15	~115U	1	10	1,150U
3	10	~115U	2	20	4,600U
4	6	~660U	2	20	26,400U

##### 【0070】

本研究では、115ユニットのIL-2当量／日で10日間治療した患者に、最大リンパ球浸潤が得られた。生存率は、最低量(投与計画1)の投与を受けた4患者において好ましくなかった。同様に、最大量を投与された6患者においても、生存率は好ましくなかった。投与計画2及び3の生存率は同程度であったが、投与計画2の患者は、リンパ球浸潤により測定された組織学的応答において最も顕著な効果を示した。

##### 【0071】

続いて、調査した中で最も活性な2つの投与量(投与計画2及び3)の中間値は、腫瘍及びリンパ節の重要な組織学的变化を達成するのに明らかに好適であり、研究を更に進めるためのIRX-2の投与量として選択した。10日間の治療に比較して20日間の治療は不便であること、及びIRX-2を高用量で投与された患者でリンパ球浸潤が低かったことに基づいて、両側注入による10日間の注入プロトコル(IRX-2の全量：約2300ユニット)を、後述の研究に選択した。

#### 実施例2

##### 【0072】

外科手術及び／又は放射線療法及び／又は化学放射線療法を行う前のH&NSCC患者について、図1に記載したようなIRX-2プロトコルの検討を行った。一部位当たり15ユニットのIRX-2を両側投与した。27人の患者を処置した。患者の属性を表2

10

20

30

40

50

にまとめた。

【表2】

表2

処置患者数	32	
年齢中央値(範囲)	66(34~86)	
男性:女性比	25:7	
KPS範囲	70~100	
患者属性		10
口腔	15	
喉頭	13	
その他	4	
診断ステージ		
I	1	
II	5	
III	10	20
IV	15	
NA	1	
原発腫瘍のステージ	症例数(%)	
T1	1(4)	
T2	15(56)	
T3	6(22)	
T4	5(19)	30
TX	0	
節ステージ	症例数(%)	
N0	5(19)	
N1	8(30)	
N2	14(52)	
N3	0	
NX	0	40

【0073】

開始時、外科手術前に放射線検査(CT又はMRI)により主に(centrally)検討を行った(Perceptive、Waltham、MA)。血液は、さまざまな白血球の数(表3及び4)について開始時、外科手術前に主に(centrally)測定した(ImmunoSite、Pittsburgh、PA)。外科検体を中央標準研究所(Central reference laboratory、Phenopat、Seattle、WA)に送付し、さまざまな白血球マーカーについて、組織学的変

化及び免疫組織学的性能を評価した（表5）。適切な実験室及び臨床測定を行い、完治及び全生存を通してモニターを続け、毒性及び症状の改善を評価した。

#### 臨床結果：

##### 【0074】

3患者が目的の腫瘍反応を示した（2PR；1MR）。4患者が放射線に反応を示した（>12.5%縮小）。節部位では腫瘍陽性と判断され、外科標本では陰性が主流であった5患者（N2C, N2C、N1、N1、N1）では、進行度が低下した。4腫瘍が和らぎ（陽性兆候）、14患者で、症状改善／痛み・圧痛の緩和、嚥下作用の改善、出血の減少が見られた。治療に関連する副作用は、吐気、嘔吐、口渴、便秘、注射部位の痛み、頭痛、筋肉痛、貧血、挫傷を含み、一般に軽度（グレードI又はII）かつ稀であった。一例だけ、グレードIIIの消化障害が認められた。完治及び全生存を追跡調査した。ほぼ患者全員が1年以上生存し、生存曲線は、以前に本出願人がメキシコ国立癌研究所（The National Cancer Institute of Mexico）で行った研究結果と非常に類似しているが、症状が同等であった米国及びメキシコのコントロールよりも優れているようである。10

#### 実施例3

##### 【0075】

ヘパリン化された血液を集め、免疫表現型を検査し、B細胞、T細胞、NK細胞、ナイーブT細胞、メモリーT細胞及びエフェクターT細胞を含む免疫細胞サブセットの数を決定した。細胞表面マーカーに対する蛍光標識モノクローナル抗体（又は、対応する同位体コントロール）を用いて新鮮、非分画全血を染色した。20

染色、固定して得られた検体を、ベックマン・コールターFC500フローサイトメーター及びCXP-TM分析ソフトウェアを使用して、多重パラメーターフローサイトメトリーにより分析した。フローカウントTMビーズを使用し、単一のプラットホーム（フローサイトメトリーのみ）でTリンパ球サブセットの絶対数を数える方法は、2種（血液測定器及びフローサイトメトリー）のプラットホーム手法（Reimannら、2000）より正確であることが証明されている。下記の表3は、イムノサイト（ImmunoSite）により測定された免疫マーカーのリストとそれらの免疫における役割を示す。30

## 【表3】

表3. 分析された免疫マーカーと免疫反応における役割

細胞	マーカー	役割
T細胞	CD3	細胞性免疫の媒介
B細胞	CD3-, DC19+, CD14-	体液性免疫の媒介
ヘルパーT細胞	CD3+, CD4	サイトカインの作製、B細胞の補助
細胞毒性T細胞	CD3+, CD8	殺腫瘍細胞
ナイーブT細胞( $T_N$ )	CD3+, CD45RA+, CCR7+	ナイーブ又は非常に早い段階での一次刺激後の抗原;リンパ節ホーミング能
セントラルメモリーT細胞( $T_{CM}$ )	CD3+, CD45RA-, CCR7+	長命メモリー細胞、低エフェクター機能;リンパ節へのホーミング
エフェクターメモリーT細胞( $T_{EM}$ )	CD3+, CD45RA-, CCR7-	エフェクター機能の仲介;生体内短半減期;リンパ節上への組織／腫瘍の播種
エフェクターT細胞( $T_{EMRA}$ )	CD3+, CD45RA+, CCR7-	最上のエフェクター機能(例えば、細胞溶解);組織／腫瘍に最適な局在

## 【0076】

本発明の目的として、免疫が起ったか否かの仮定の評価に直接関連する細胞集団のみを、ここでは検討する。

## 【0077】

Tリンパ球、特にCD8+T細胞の発生経路は効果的な抗腫瘍免疫と非常に関連が深いので、この10年、CD8+T細胞に特に注目した研究が盛んに行われてきた。CD4+ヘルパーT細胞とCD8+細胞毒性T細胞はともに、相互交換可能な下位個体群CD45RA+及びCD45RO+に細分される。CD45RA+細胞は、以前は、ナイーブT細胞と命名されていたが、最近、血液中のこれらのT細胞は、ナイーブT細胞のほかに、より完全に分化した、 $T_{EMRA}$ と呼ばれるエフェクターを有することが指摘されている(Lanzavecchia, 2005; Kaech, 2002)。CD45RO+(CD45RA-)メモリーT細胞は更に、セントラルメモリーT細胞( $T_{central memory}: T_{CM}$ )とエフェクターメモリーT細胞( $T_{effector memory}: T_{EM}$ )に細分される。これらの細分類は、CCR7を含む付加的なマーカーが表面に発現していること基づく(Sallusto, 1999; Tomiyama, 2004)。これらさまざまなT細胞サブセットの発生経路及びそれらの分化系列関係は複雑である。有意差のあるデータ及び試験を下記の表4に示す。

10

20

30

40

## 【表4】

表4. 有意性の免疫評価及び試験の概要

細胞集団	N	平均細胞数／mL <sup>3</sup>	標準偏差	基準値からの21日目の差	標準偏差	自由度	T値	P値
基準値								
リンパ球ゲート	25	1177.5	442.4	-69.6	260.7	24	-1.33	0.1946
B細胞	18	275.4	132.2	-74.3	74.8	17	-4.22	0.0006
ヘルパーT細胞	25	817.0	330.7	-65.4	184.0	24	-1.78	0.0884
細胞毒性T細胞	25	351.9	193.3	-4.4	87.9	24	-0.25	0.8061
ナイーブT細胞	25	55.6	89.8	-38.2	76.9	24	-2.49	0.0203
セントラルメモリーT細胞	25	56.9	84.5	-22.8	48.6	24	-2.34	0.0280
エフェクターメモリーティー細胞	25	689.0	354.7	41.2	223.4	24	0.92	0.3651
エフェクターメモリーラ T細胞	25	395.0	250.2	-35.2	132.7	24	-1.33	0.1968

## 【0078】

I RX - 2 が T 細胞と DC の両者に作用して活性化、成熟を促進し、ナイーブ T 細胞に存在する内因性腫瘍抗原を強化するという仮説と一致して、21日目の T 細胞数 (CD3+、CD45RA+、CCR7+) は基準に比較して低下していることが認められた。ナイーブ T 細胞はまず、適切な主要組織適合複合体 (major histocompatibility complex : MCH) 上に存在する抗原を DC が認識することによって活性化される。メモリー T 細胞と完全エフェクター機能を生成する次のステップは完全には明らかにされていないが、いくつかのマーカー、即ち、CD45RA/R0 及び CCR7 により定義される T 細胞の異なる亜集団は、独特の機能特性を有する。例えば、CCR7 発現は、リンパ節に T 細胞が帰巣できるようにし、最も効果的な抗腫瘍プライミングが起こる。

## 【0079】

ナイーブ T 細胞数 (CD3+、CD45RA+、CCR7+) の著しい低下、55.6 細胞 / mL<sup>3</sup> の基準細胞レベルが 21 日目では 17.4 細胞 / mL<sup>3</sup> (p = 0.02) に低下していることが認められた。ナイーブ T 細胞の欠如は、細胞が、それぞれの類似抗原を見出し、それによって刺激され、メモリー又は完全エフェクター集団のいずれかである、別の機能性集団に分化することにより起こる。

## 【0080】

更に、CCR7+ を有するセントラルメモリー T 細胞集団 (CD3+、CD45RA-、CCR7+) は、リンパ節へ帰巣する傾向を与えられ、56.9 細胞 / mL<sup>3</sup> の基準細胞レベルが 21 日目では 34.1 細胞 / mL<sup>3</sup> (p = 0.028) に低下する。これはまた、腫瘍への免疫が I RX - 2 処置の応答として起こっていることを示している。研究により、T 細胞の TCM 集団が、再刺激により、優先的にリンパ節に帰巣し、エフェクター、例えば、細胞溶解性機能を更に獲得する、早期の「幹様」性の高いメモリー集団を代表することが示されている。この集団に見られる著しい低下は、これらの TCM 細胞が血流から抜け出し、排液性リンパ節に移動し、そこで更に活性化されることと一致している。

## 【0081】

免疫後、抗原運搬犯への攻撃に協力する他の免疫細胞が期待される。免疫仮説に対する

10

20

30

40

50

支持は更に、B細胞の著しい低下( $p < 0.01$ )が観察されたことに認められた。B細胞は、リンパ節に補充され、そこで抗原に暴露された後、腫瘍へ向かって分泌され、腫瘍を直接攻撃できる抗体又は抗体依存性細胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity: ADCC)を支えることができる抗体を作製すると推定される。

#### 【0082】

ここで観察された統計的に有意性を有する変化及び傾向は、ナイーブT細胞の免疫はIRX-2の投与により起こっていることを強く示している。これらの患者には、その他の一次介入は観察されなかったので、これらの変化は無作為に起こったわけではないと思われる。

10

#### 【0083】

IRX-2処置が、自己腫瘍抗原への免疫を引き起こすという仮定は、非無作為化正常及びH&NSCCコントロール患者と比較した、IRX-2処置後のH&NSCCリンパ節応答についての出願人の公開情報(Meneses, 2003)によても支持される。IRX-2処置に関連する目立ったリンパ節応答の特徴は、節補充、リンパ球、特に非処置H&NSCC患者のリンパ節で激減されることが示された、Tリンパ球の膨潤である(Verastegui, 2002)。IRX-2によると推定される免疫中に起こる節の拡張は、洞組織球増殖症からの回復、明らかな樹状細胞機能異常と関連することも観察されている。これらの変化は、免疫と一致している。以前の研究は、腫瘍抗原への免疫が、腫瘍自身ではなく、局所的なリンパ節で起こることを確認している(Maass, 1995)。

20

### 組織学

#### 【0084】

免疫がリンパ節に起こる場合、新しいメモリーキラーT細胞が発達し、その後血管を通ってリンパ節を出て、組織内に流れ込み、抗原標的(即ち、免疫標的)を巡回すると考えられる。抗原標的を確認すると、メモリーキラーT細胞は、組織に浸潤し、標的を殺す。細胞性免疫応答が始まると、その他の免疫細胞も借り出され、標的を殺し、浄化する工程に参加する。

30

#### 【0085】

Tリンパ球の腫瘍への浸潤、特に、CD45RO+CD8+T細胞の浸潤は、腫瘍抗原への免疫の証拠であり、そのような浸潤が、H&NSCC、メラノーマ、大腸及び卵巣癌を含む、さまざまな癌の生存率の改善に関与していることの証拠である(Wolff, 1986; Pages, 2005; Galon, 2006)。

#### 【0086】

ここでは、リンパ節に免疫を引き起こしたIRX-2は、腫瘍へのリンパ球の浸潤及び腫瘍崩壊をもたらし、腫瘍内の特定の免疫細胞の存在は、抗腫瘍免疫応答の証拠を提供するという仮説が立てられた。また、腫瘍への免疫応答は、腫瘍の周辺領域から腫瘍内領域に広がる、拡散リンパ球の浸潤により証明されるという仮説が立てられた。

#### 【0087】

原発性腫瘍生検及び切除標本からのホルマリン固定パラフィン包埋ブロック又は非染色スライドを、ヘマトキシリン及びエオシン(hematoxylin及びeosin:「H&E」)及び免疫組織化学染色(immunohistochemistry staining:「IHC」)のために、臨床現場からPhenopath Laboratories(Seattle, WA)に提出した。26のIRX-2研究被験者のペア検体を提出し、その内、25の被験者が評価可能であり、1被験者は外科手術を受け、腫瘍の組織学的証拠は有していなかった。外科手術被験者に限定した2つの比較群として、無作為に選択された非処置H&NSCC外科手術標本から、H&E比較用にMD Andersonから25外科手術標本、Stony Brook Health Sciences Centerから10外科手術標本を、研究の最後に集めた。

40

50

## 【0088】

免疫組織化学染色は、IRX-2処置検体のみを行い、腫瘍中の免疫マーカーの存在を決定した。そのマーカーを表5に列記する。

## 【表5】

表5. IHCにより分析された免疫マーカー

細胞	マーカー	免疫応答における役割
T細胞	CD3	細胞性免疫の媒介
B細胞	CD20	抗体の作製
ヘルペーT細胞	CD4	サイトカインの作製、B細胞の補助
細胞毒性T細胞	CD8	殺腫瘍
プラズマ細胞	CD138	抗体の作製
マクロファージ	CD68	T細胞の援助及び殺腫瘍
ナイーブ／エフェクタ ーT細胞	CD45RA+	ナイーブ／エフェクターT細胞
メモリーT細胞	CD45RO(RA-)	抗原関与T細胞

## 【0089】

IHC染色マーカーの存在は、低出力で段階的に予め定義された0～100mm視覚的アナログ尺度(visual analog scale: VAS)を使用して評価した。0は、マーカーに対して陽性染色細胞が0%、100は100%の存在を意味する。マーカーを強調するために使用されたパーオキシダーゼ反応は、H&E染色に比較して、リンパ球浸潤の領域及び濃度を過大評価するので、IHCに基づく強度決定の信頼性を下げことになるが、細胞種間の相対関係を解明するにはIHCはなお有用である。

H & S 研究：方法及び分析

## 【0090】

3つの分析方法により、H&E染色スライドを比較した。分析方法の2つは、MD AndersonからのIRX-2処置25標本及び非処置外科手術25標本を、ブランド特徴抽出するもので、腫瘍特徴及び免疫応答特徴について分析した。第3の分析は、Stony BrookからのH&E染色された10スライドからの、同一、非混合免疫応答特徴抽出である。それぞれにおいて、特徴は、症例報告形式で、VASを用いて抽出、定量した。

## 【0091】

免疫応答特徴のそれぞれについて、2つの評価がなされた。第1の評価は、全外科手術標本に全体的に存在するマーカーの存在についてであり、第2の評価は、腫瘍の周辺又は腫瘍内への浸潤の程度についてである。

## 【0092】

全体の評価は、リンパ球浸潤、その濃度、腫瘍と浸潤とのバランス及び腫瘍の形態印象

10

20

30

40

50

を含むその他の特徴を考慮して行った。その他の下位特徴には、線維化及び壊死の広がり、腫瘍はもはや存在しないが腫瘍が存在したことの示唆、及び分化扁平上皮癌において、腫瘍破壊の他の印である、最小量の又は腫瘍を囲んでいないケラチン真珠の濃度が挙げられる。「活性免疫応答」には、免疫系により作り出された損傷の証拠であるリンパ球浸潤、及び腫瘍がもはや生存できず崩壊する程度、即ち、宿主が腫瘍と闘う範囲及び過程が含まれる。「活性免疫応答」のリンパ球浸潤下位特徴の一例を、図5及び6に示す。

#### 【0093】

活性免疫応答変化の主要な下位特徴の1つが、IRX-2処置患者に見られる、リンパ球浸潤(lymphocyte infiltration: LI)の位置と強さである。IRX-2処置患者及び本目的に限定される比較群の両者でこの反応を実証する外科手術標本は、LI全体の濃度、腫瘍周辺LI及び腫瘍内LIの顕著な増加を示した。10

#### 【0094】

下記表6に示すように、VASの50mm以上の事前特定臨界点に基づいた分析の結果、外科手術標本の3つの群の間で活性免疫応答率が異なっていた。

#### 【表6】

表6

群	AIRの患者	全患者	活性免疫応答率
1. IRX-2処置	11	25	44.0%
2. MD Anderson	6	1	24.0%
3. Stony Brook	1	10	10.0%

#### 【0095】

活性免疫応答を示すこれらの患者の頻度は、MD Anderson及びStony Brookに集められた標本の20%から、IRX-2処置群では44%（カイ二乗検定： $p < 0.05$ ）に増加した。2030

#### 腫瘍周辺対腫瘍内LIの決定

#### 【0096】

腫瘍内の免疫細胞の位置も評価した。ここでは、活性抗腫瘍免疫応答は、周辺領域から腫瘍内領域を含むように拡大したリンパ球浸潤を有すると仮定した。

#### 【0097】

IRX-2処置患者における活性免疫応答のVAS分析では、11患者が強い反応（50、反応者と呼ぶ）を示し、14患者は比較的弱い反応（<50、非反応者と呼ぶ）を示した。これら2群の患者のLIの比較を図7A、7Bに示す。40

#### 【0098】

図に示されるように、非反応者に比較して、反応者では、典型的な部位にLIの（領域及び濃度の両者において）顕著な増加が見られた。腫瘍内（INTRA）LIの増加は、腫瘍周辺（PERI）の変化に比べ、比例的にはるかに大きい。

#### 【0099】

さまざまなマーカーの位置の免疫組織化学は、各位置でどの細胞が支配的であるかを明確にすることを助ける。これらの結果を図8に示す。腫瘍周辺の浸潤は、標本におけるLIの約25%を占め、CD45RA+、CD3+、CD4+Tリンパ球及びCD20+Bリンパ球が支配的であった。一方、腫瘍内の浸潤は、標本におけるLIの約75%を占め、CD45RO+、CD3+、CD8+リンパ球（即ち、エフェクター「キラー」T細胞

10

20

30

40

50

表現型) 及び C D 6 8 + マクロファージが支配的であった。図 9 は、 I R X - 2 処置外科手術標本における C D 4 5 R O + メモリー T 細胞を I H C 染色の画像例を示す。

#### 【 0 1 0 0 】

免疫仮説の最も強力な支持は、腫瘍の中及び周囲への浸潤についてのリンパ球浸潤の実験及び壞死、線維化、腫瘍の縮小を示す腫瘍拒絶の実態に由来する。拒絶のパターンは、増加した B リンパ球と活性化マクロファージがそれぞれ体液性及び細胞性免疫の両者にとって特徴的である。

#### 実施例 4

##### 【 0 1 0 1 】

一患者において、図 10 に示すように、融合 F D G P E T / C T スキャンを第 0 日目及び第 21 日目で比較した。全糖分解活性及び容量を測定し、表 7 に示す。

##### 【 表 7 】

表7

<u>全糖分解活性</u>			
	<u>基準値</u>	<u>21日目</u>	<u>変化%</u>
腫瘍	68. 91	31. 36	-54. 49%
節1	72. 54	4. 97	-93. 15%
節2	14. 35	3. 15	-78. 05%
	155. 80	39. 48	-74. 66%

<u>体積</u>			
	<u>基準値</u>	<u>21日目</u>	<u>変化率</u>
腫瘍	12. 16	7. 33	-39. 72%
節1	9. 46	1. 44	-84. 78%
節2	2. 28	1. 24	-45. 61%
	23. 90	10. 01	-58. 12%

##### 【 0 1 0 2 】

#### 実施例 5

予め、腫瘍標本に対する生検の組織病理学の基準 (M e n e s e s ) は、腫瘍の全体的な縮小、腫瘍の断片化及びリンパ球浸潤 (L I) の増加である。本発明に従って、コントロール腫瘍に対する処置腫瘍についてここで新たな基準、即ち、壞死及び纖維化による腫瘍の破壊、及び腫瘍周辺よりも腫瘍内での L I が増加していることを定める。H & N S C C のサイトカイン処置についてのさまざまな発見を下記表 8 にまとめる。重要なことは、I R X - 2 は免疫系の全ての部門に作用することが示されたことである。これは、他の複数のサイトカイン組成治療ではなされないことである。マルチカイン (M U L T I K I N E : C e l - S c i ) はその製剤に複数のサイトカインを含むが、その作用は腫瘍自体への単一のものであり、免疫系には作用しない。

10

20

30

40

【表8】

表8

	処置対象	コントロール	
De Stefani rIL-2	腫瘍	コントロール腫瘍	↑ LI、↑ 壊死、 ↑ 線維化
Meneses IRX-2	腫瘍	生検	↑ LI、↓ 肿瘍、 ↑ 断片化
Feinmesser マルチカイン	腫瘍	生検	↑ LI、↓ 肿瘍
Timar マルチカイン	腫瘍	コントロール腫瘍	↑ LI、No、 ↓ 肿瘍又は断片化
IRX Therapeutics	腫瘍	生検	↑ LI-小腫瘍、 ↑ 断片化
	腫瘍	コントロール腫瘍	↑ LI、↑ 線維化

10

20

30

40

50

## 結論

### 【0103】

本研究は、扁平上皮頭頸部癌を有する患者に対して、外科手術前に有意な生物学的活性を与えるIRX-2投与計画の能力に関する、出願人の先行する報告を確認、拡げるものである。本研究により、上記処置は、安全で、副作用は投与計画に起因する僅かなものであることを確認している。実際、リンパ球浸潤の病理組織学的变化の証拠を示した患者は、痛み・圧痛の緩和、呼吸・発声の改善、(崩壊の証明としての)腫瘍の軟化などの症状の改善の大部分を有していた。3患者は臨床応答(2PR、1MR)を有すると見なされた。全体的な生存データ及び、未完成ではあるが、再発のない生存者については、出願人の先の研究の程度及び概要に類似しているが、更に助長されている。追跡調査の最初の12ヶ月では再発に死亡は一例もなかったことは、注目に値する。今までに死亡した症例は、1例を除いて、非応答群である。

### 【0104】

最も説得力のあるデータは、作用機序の研究に関連するものである。Bリンパ球及び2つのT細胞サブセットの低下は、最初の免疫及びリンパ節ホーミングに関連することが観察された。メモリー/エフェクター細胞の増加は血液中では観察されないが、これは免疫により誘導されるT細胞の経路パターンに基づいて説明可能である。レギュラトリート細胞の増加は特に認められなかった。

### 【0105】

出願人の先の研究は、IRX-2投与計画に反応する患者には、腫瘍に隣接している非関与リンパ節の増加、劣化したTリンパ球領域の補充及び抗原により起こる活性化の実態を示している。このように、リンパ球は、血液やリンパ管を介して、局所のリンパ節に輸送され、そこで自己腫瘍抗原に免疫されると推定される。ここに示されるように、その後、リンパ球はリンパ節を離れ、血液により腫瘍に運ばれ、そこでリンパ球は腫瘍内及び周辺に浸潤し、腫瘍破壊の証拠(壊死、線維化及び腫瘍の縮小)に関与する。この反応を示す患者では、リンパ球浸潤の増加は、主に腫瘍の周辺のCD3+、CD4+、CD45RA+T細胞群及びCD20+Bリンパ球、及び腫瘍内のCD3+、CD8+、CD45RP+Tリンパ球群及びマクロファージに関与する。腫瘍内の変化は、周辺の変化に比較して大きい。この機構は、概して図17に示される。

**【 0 1 0 6 】**

注目すべきは、非処置患者ではそのような反応は時々起こる（20%）だけであり、IRX-2投与計画によって処置された患者に比べて非常にその頻度が低い（20%に対して44%）ことである。コントロール群での反応の存在は、好ましい結果が予想される新しいバイオマーカーを意味する。

**【 0 1 0 7 】**

実態は、臨床的、放射線学的、病理学的、免疫学的に総合されたものであり、自己腫瘍抗原への免疫の十分な証拠を提供する。IRX-2は、免疫系の全ての部門を活性化し、免疫機能の全体的な回復及び免疫標的を攻撃する能力を提供する。

**【 0 1 0 8 】**

本出願を通して、米国特許を含め、さまざまな刊行物を著者及び発行年により、また特許はその番号により引用した。刊行物の全引用を下記に列挙した。本発明が属する技術分野における技術水準を的確に理解するために、これら刊行物及び特許の開示の全体が、この参照により本出願に包含される。

10

**【 0 1 0 9 】**

本発明を例示的に説明してきたが、使用された用語は制限的なものではなく、説明の単語の本質を意図して使用したことを理解されたい。

**【 0 1 1 0 】**

上述を踏まえると、本発明の多くの変形態様及び変更態様が可能であることは明らかである。従って、添付の特許請求の範囲内で、本発明は具体的な説明とは別の方で実施できることを理解されたい。

20

**参照文献**

- 1 . Dunn G, et al. Dendritic cells and HNSCC: A potential treatment option? (Review).  
Oncology Reports 13:3:3-10, 2005.
- 2 . Egan JE, et al. IRX-2, a novel *in vivo* immunotherapeutic, induces maturation and activation of human dendritic cells *in vitro*. J Immunother 30:624-633, 2007.
- 3 . Galon J, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 313:1960, 2006.
- 4 . Hadden JW, et al. Immunotherapy with natural interleukins and/or thymosin alpha 1, potently augments T-lymphocyte responses of hydrocortisone-treated aged mice.  
Int J Immunopharm 17(10):821-828, 1995.
- 5 . Hadden JW, et al. Sinc induces thymulin secretion from human thymic epithelial cells *in vitro* and augments splenocytes and thymocyte responses *in vivo*. Int J. Immunopharm 17(9):729-733, 1995.
- 6 . Kaech SM, et al. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. Nature Rev Immunol 2:251, 2001.
- 7 . Lanzavecchia A, et al. Understanding the generation and function of memory T cell subsets.  
Curr Opin Immunol 17:326, 2005.
- 8 . Maass G, et al. Priming of tumor-specific T cells in the draining lymph nodes after immunization with interleukin-2-secreting tumor cells: Three consecutive stages may be required for successful tumor vaccination. Proc Natl Acad Sci 92:5540, 1995.

30

40

50

9 . Mantovani A, et al. Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology*, 23 (11) 2002.

10 . Meneses A, et al. Lymph node histology in head and neck cancer: impact of immunotherapy with IRX-2. *Int'l Immunopharm.* 3:1083-1091, 2003.

11 . Pages F, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *NEJM* 353:2654-66, 2005.

12 . Sallusto F, et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708, 1999.

13 . Tomiyama H, et al. Phenotypic classification of human CD8+ T cells reflecting their function: inverse correlation between quantitative expression of CD27 and cytotoxic effector function. *Eur J Immunol* 34:999, 2004.

14 . Verastegui E, et al. Immunological approach in the evaluation of regional lymph nodes of patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Immunol* 102:37, 2002.

15 . Whiteside TL. Immunobiology and immunotherapy of head and neck cancer. *Curr Onc Reports* 3:46-55, 2001.

16 . Wolf GT, et al. Lymphocyte subpopulations infiltration squamous carcinomas of the head and neck: correlations with extent and tumor prognosis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 95:145, 1986.

【 図 1 】

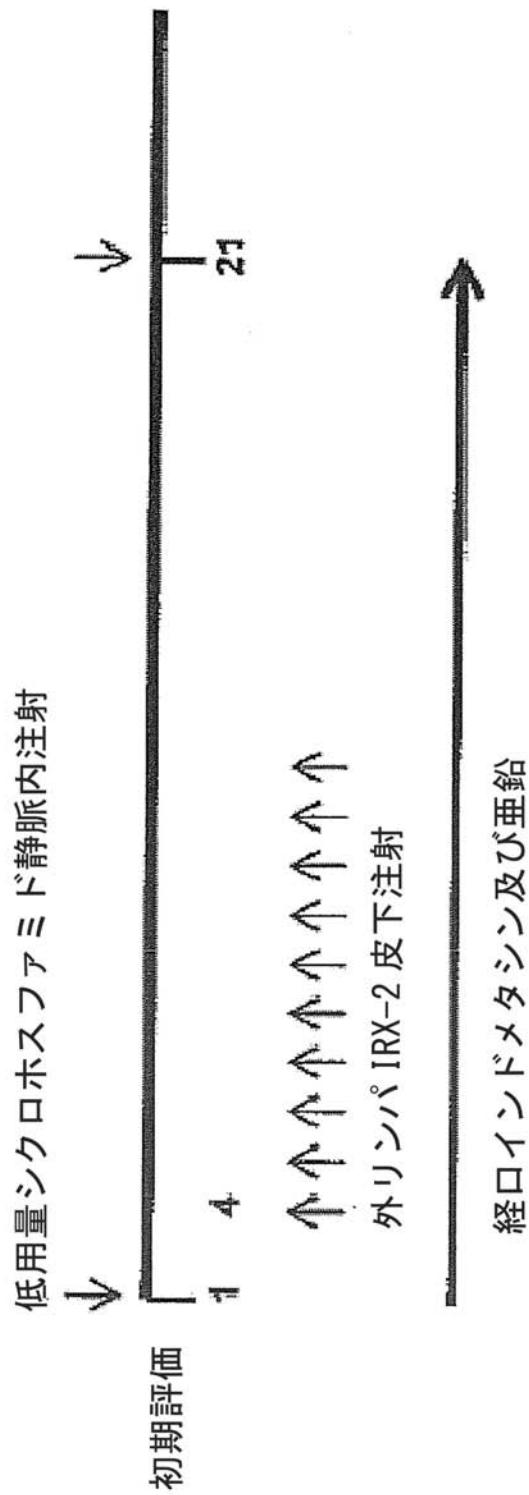
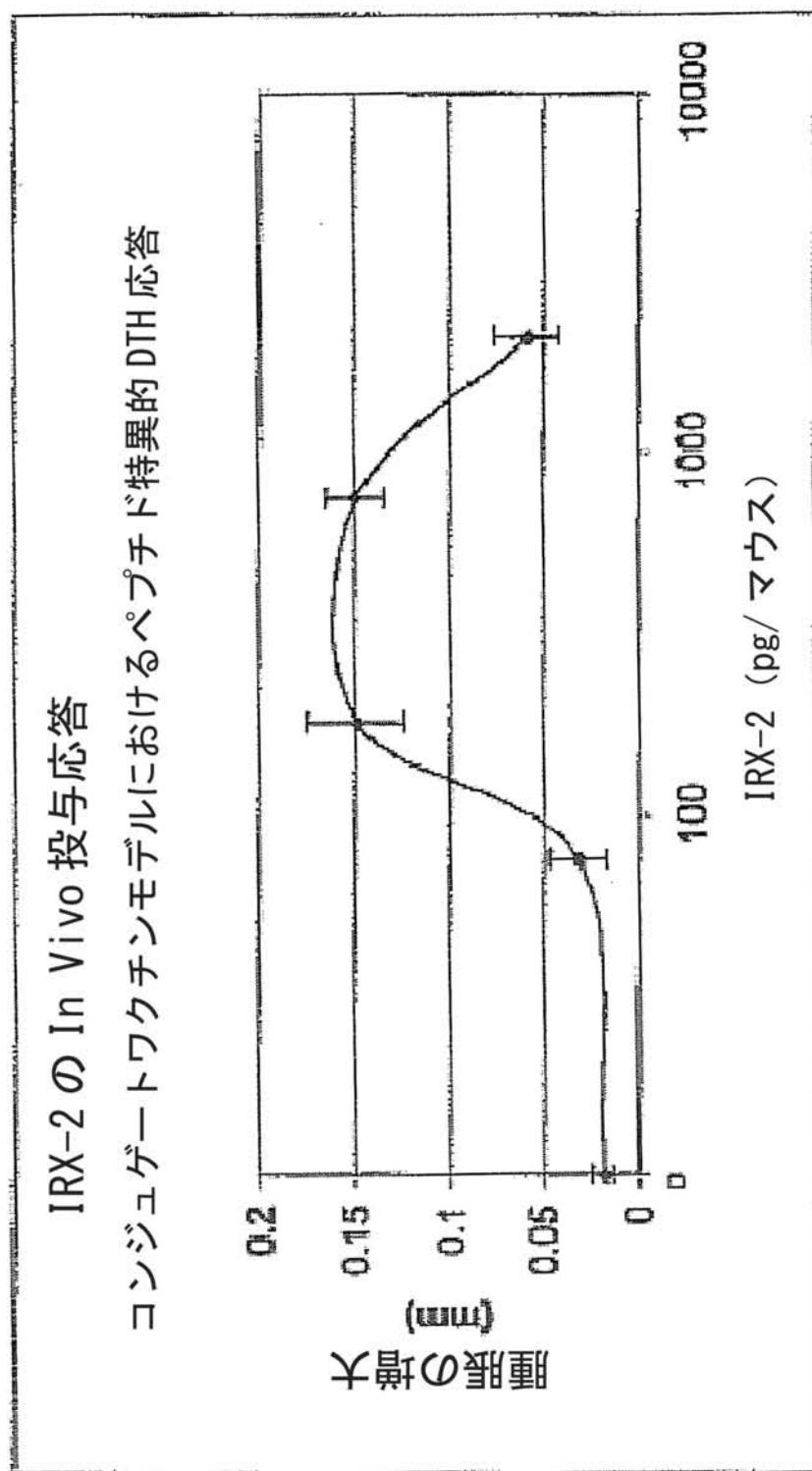


Figure 1

【図 2】

Figure 2 - マウスの IRX-2 投与応答



【図3】

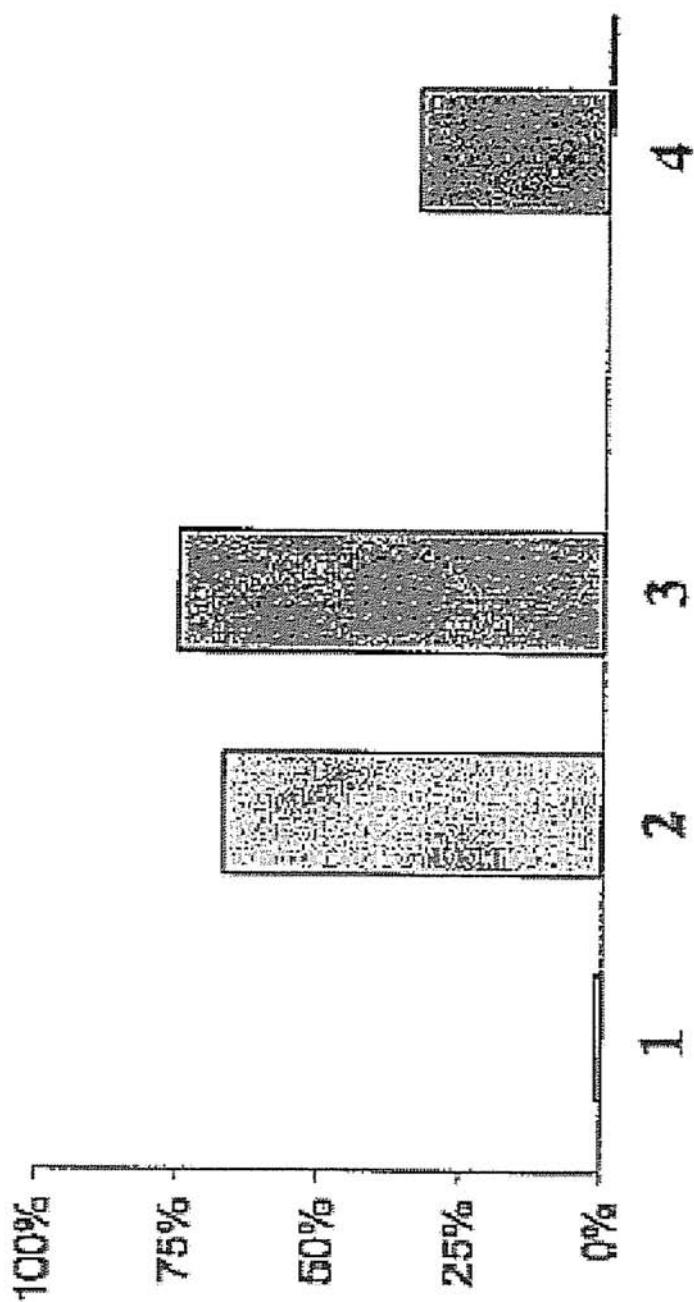
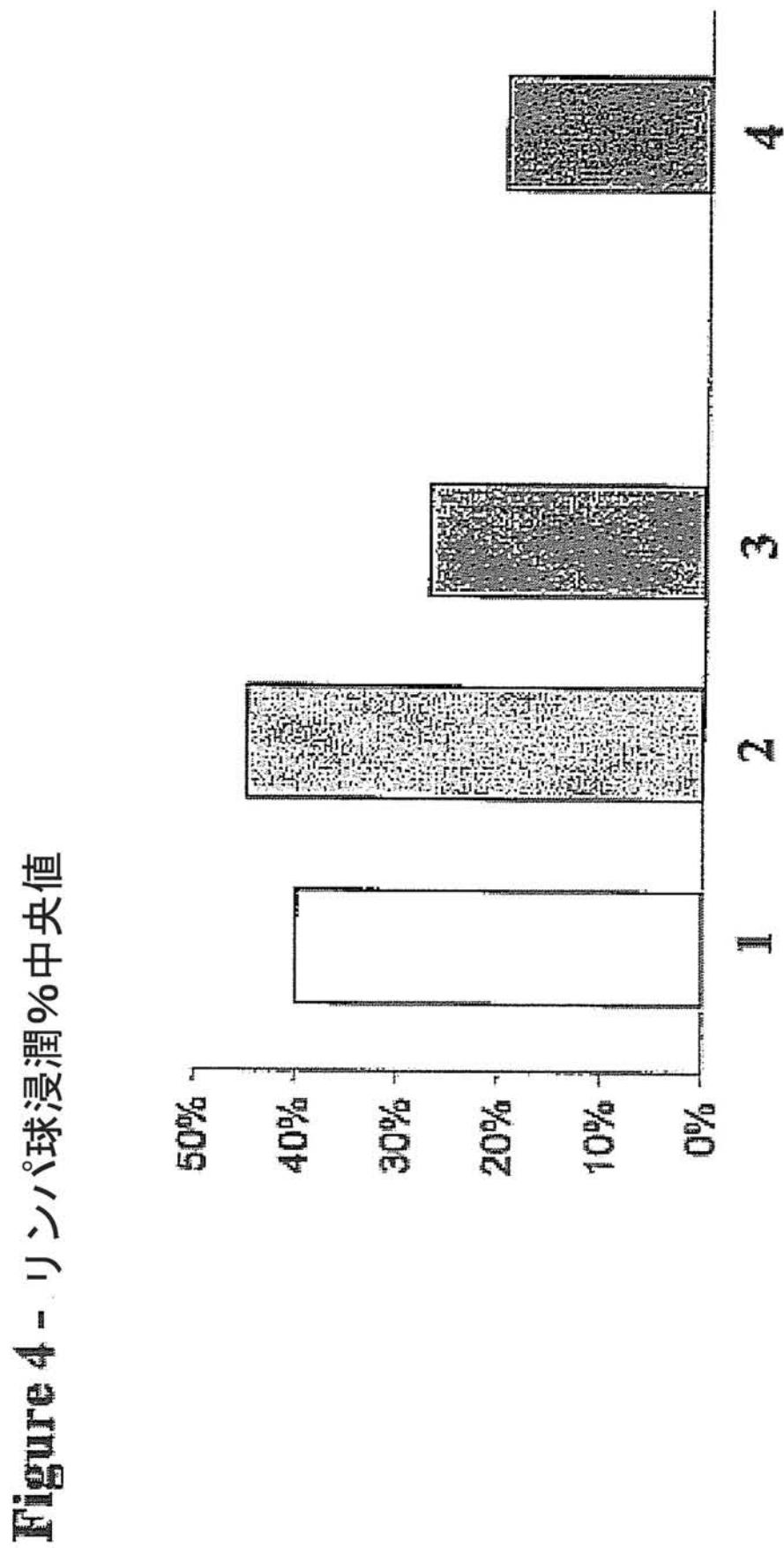


Figure 3 - 生存率

【図4】

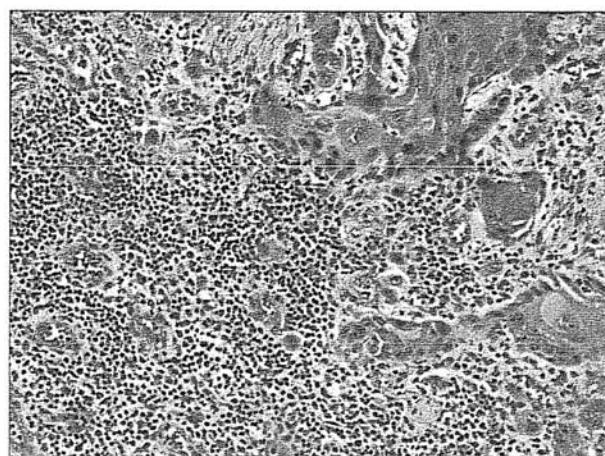


【図5】



**Figure 5**

【図6】



**Figure 6**

【図7】

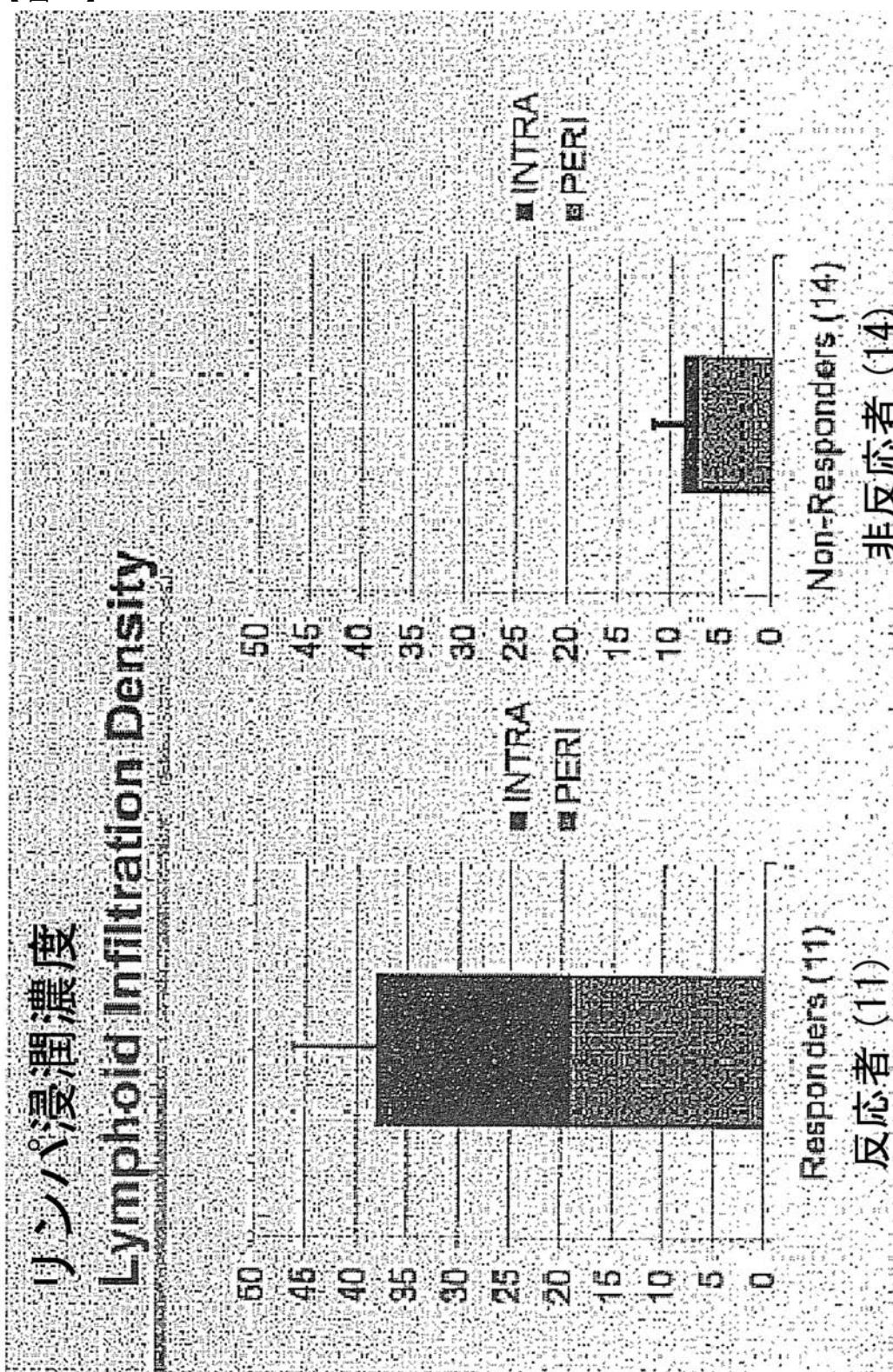


FIGURE 7

IRX-2 2005-A 免疫組織化学  
腫瘍内 / 腫瘍周囲リンパ球浸潤

【図 8】

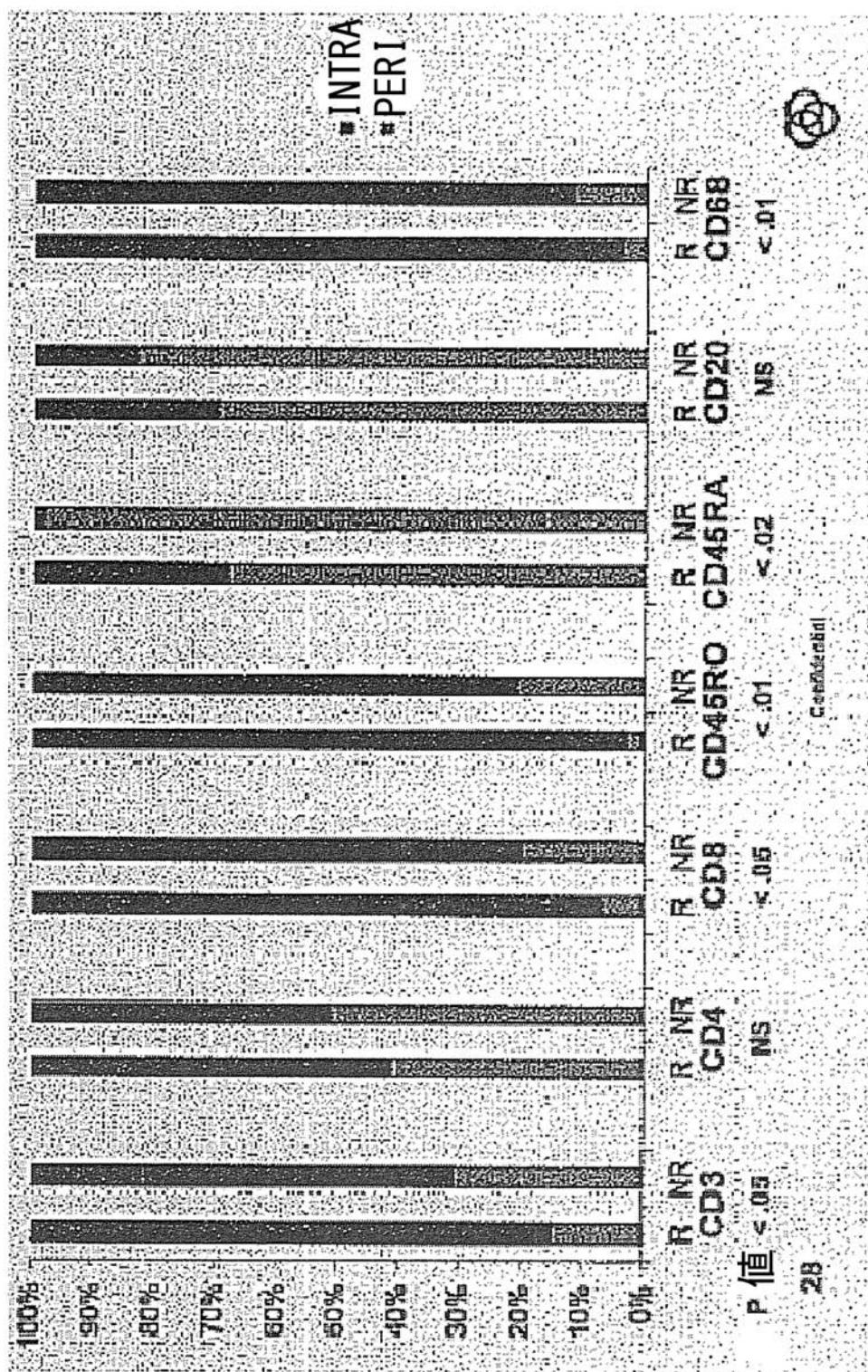


FIGURE 8

【図9】

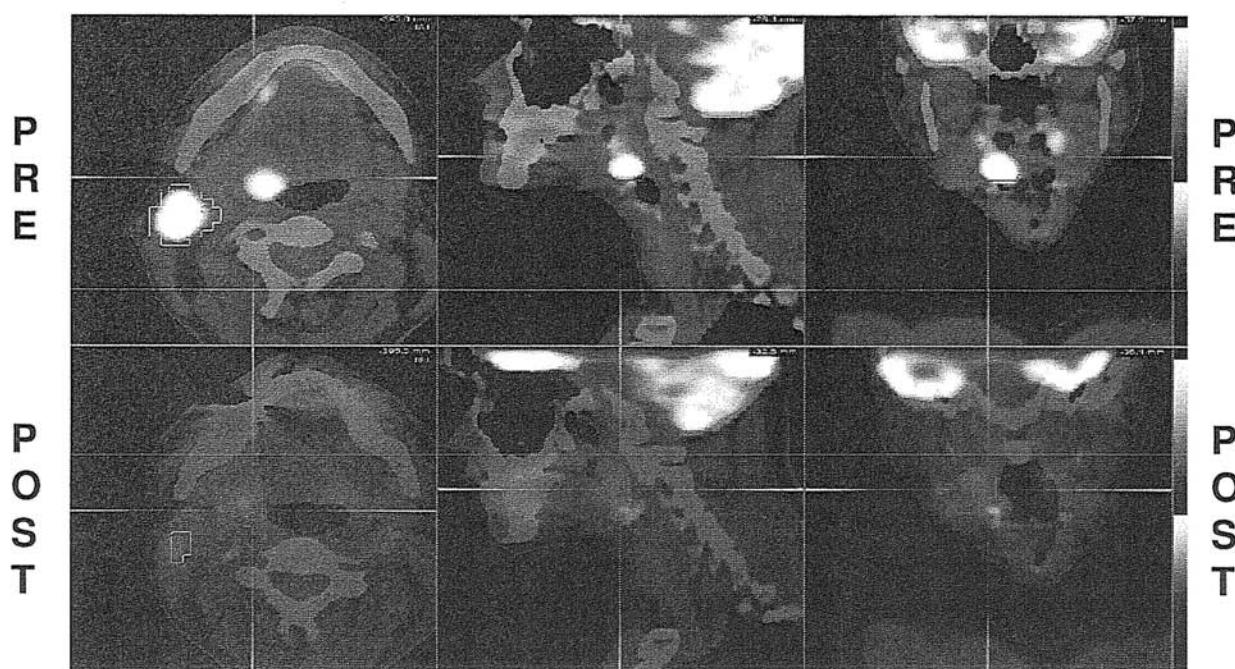


Figure 9

【図10】

Figure 10

第0日及び第21日



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 09/45550																					
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/395 (2009.01) USPC - 424/158.1, 424/85.2 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(8) - A61K 39/39 (2009.01) USPC -- 424/158.1, 424/85.2, 424/1.41, 424/145.1																							
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) WEST - PGPB, USPTO, USOC, EPAB, JPAB; Dialog Classic Files ? 854, 652, 351, 349, 6, 35, 65, 155; USPTO Web Page; Entrez PubMed, Google Scholar; Search terms -- treating/prevent cancer/tumors, lymph node migration, B cell/T cell migration and maturation, naïve T cells, helper T cells, killer T cells, dendritic cells																							
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category*</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>US 2007/0025958 A1 (HADDEN) 01 February 2007 (01.02.2007) para [0003], [0014], [0022], [0040], [0041], [0046], [0060], [0065]-[0068], [0071], [0077], [0089], [0092], [0102], [0103], [0113], [0119], [0121], [0132], [0134], [0143], [0153], [0173], [0180], [0182], [0196], [0199], Fig 12, 14, 15</td> <td>21, 30 ..... 1-20, 22-29, 31-38</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2007/0128174 A1 (KLEINSEK et al.) 07 June 2007 (07.06.2007) para [0185], [0457], [0460], [0467], [0640]</td> <td>1-20, 22-26, 28, 29, 31-36</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2007/0031372 A1 (HADDEN) 08 February 2007 (08.02.2007) para [0015], [0034], [0037], [0118], [0135]</td> <td>11, 17, 25, 27-29</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BAJENOFF, M., et al., Stromal Cell Networks Regulate Lymphocyte Entry, Migration, and Territoriality in Lymph Nodes. Immunity, December 2006, Vol. 25, No 6, pages 989-1001 (pg 1-22 In online pdf format); pg 1, abstract; pg 7, para 1, para 5 - pg 8, para 1</td> <td>4-8</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,759,239 B1 (SUCIU-FOCA et al.) 06 July 2004 (06.07.2004) col 46., ln 51-60</td> <td>10, 25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2006/0140983 A1 (PALUCKA et al.) 29 June 2006 (29.06.2006) para [0049], [0067]</td> <td>37, 38</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	US 2007/0025958 A1 (HADDEN) 01 February 2007 (01.02.2007) para [0003], [0014], [0022], [0040], [0041], [0046], [0060], [0065]-[0068], [0071], [0077], [0089], [0092], [0102], [0103], [0113], [0119], [0121], [0132], [0134], [0143], [0153], [0173], [0180], [0182], [0196], [0199], Fig 12, 14, 15	21, 30 ..... 1-20, 22-29, 31-38	Y	US 2007/0128174 A1 (KLEINSEK et al.) 07 June 2007 (07.06.2007) para [0185], [0457], [0460], [0467], [0640]	1-20, 22-26, 28, 29, 31-36	Y	US 2007/0031372 A1 (HADDEN) 08 February 2007 (08.02.2007) para [0015], [0034], [0037], [0118], [0135]	11, 17, 25, 27-29	Y	BAJENOFF, M., et al., Stromal Cell Networks Regulate Lymphocyte Entry, Migration, and Territoriality in Lymph Nodes. Immunity, December 2006, Vol. 25, No 6, pages 989-1001 (pg 1-22 In online pdf format); pg 1, abstract; pg 7, para 1, para 5 - pg 8, para 1	4-8	Y	US 6,759,239 B1 (SUCIU-FOCA et al.) 06 July 2004 (06.07.2004) col 46., ln 51-60	10, 25	Y	US 2006/0140983 A1 (PALUCKA et al.) 29 June 2006 (29.06.2006) para [0049], [0067]	37, 38
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	US 2007/0025958 A1 (HADDEN) 01 February 2007 (01.02.2007) para [0003], [0014], [0022], [0040], [0041], [0046], [0060], [0065]-[0068], [0071], [0077], [0089], [0092], [0102], [0103], [0113], [0119], [0121], [0132], [0134], [0143], [0153], [0173], [0180], [0182], [0196], [0199], Fig 12, 14, 15	21, 30 ..... 1-20, 22-29, 31-38																					
Y	US 2007/0128174 A1 (KLEINSEK et al.) 07 June 2007 (07.06.2007) para [0185], [0457], [0460], [0467], [0640]	1-20, 22-26, 28, 29, 31-36																					
Y	US 2007/0031372 A1 (HADDEN) 08 February 2007 (08.02.2007) para [0015], [0034], [0037], [0118], [0135]	11, 17, 25, 27-29																					
Y	BAJENOFF, M., et al., Stromal Cell Networks Regulate Lymphocyte Entry, Migration, and Territoriality in Lymph Nodes. Immunity, December 2006, Vol. 25, No 6, pages 989-1001 (pg 1-22 In online pdf format); pg 1, abstract; pg 7, para 1, para 5 - pg 8, para 1	4-8																					
Y	US 6,759,239 B1 (SUCIU-FOCA et al.) 06 July 2004 (06.07.2004) col 46., ln 51-60	10, 25																					
Y	US 2006/0140983 A1 (PALUCKA et al.) 29 June 2006 (29.06.2006) para [0049], [0067]	37, 38																					
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" 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 08 July 2009 (08.07.2009)	Date of mailing of the international search report <b>20 JUL 2009</b>																						
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: <b>Lee W. Young</b> <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>																						

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2007)

---

フロントページの続き

(51) Int.CI.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	

(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,S K,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,K E,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