

(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2004-536615
(P2004-536615A)

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int.Cl.⁷

C12N 5/06
A61K 35/12
A61K 35/48
A61K 39/00
A61P 35/00

F 1

C 12 N 5/00
A 61 K 35/12
A 61 K 35/48
A 61 K 39/00
A 61 P 35/00

E

テーマコード(参考)

4 B 06 5
4 C 08 5
4 C 08 7
4 H 04 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 91 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-517263 (P2003-517263)
(86) (22) 出願日 平成14年7月25日 (2002. 7. 25)
(85) 翻訳文提出日 平成16年1月29日 (2004. 1. 29)
(86) 國際出願番号 PCT/1T2002/000488
(87) 國際公開番号 WO2003/012086
(87) 國際公開日 平成15年2月13日 (2003. 2. 13)
(31) 優先権主張番号 PCT/1T01/00419
(32) 優先日 平成13年7月30日 (2001. 7. 30)
(33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(71) 出願人 591043248
シグマータウ・インダストリエ・ファル
マチエウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル
・アチオニ
S I G M A - T A U I N D U S T R I E
F A R M A C E U T I C H E R I U N
I T E S O C I E T A P E R A Z I
O N I
イタリアOO144ローマ、ビアレ・シャ
ケスペアレ47番
(74) 代理人 100081422
弁理士 田中 光雄
(74) 代理人 100106518
弁理士 松谷 道子

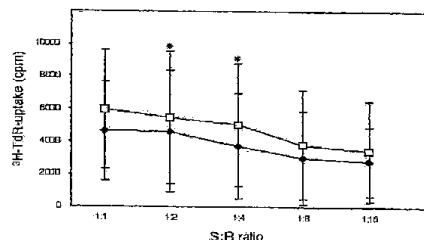
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗原提示細胞、その調製方法およびその癌ワクチンのための使用

(57) 【要約】

本発明は以下の工程を含む抗原提示細胞の作成方法を開示する：a. 対象から該細胞を収集する工程、b. 該収集した細胞を活性化する工程；c. 該活性化された細胞を生体外で培養し、所望により増加させる工程；d. 該培養し、所望により増加させた細胞を、DNA低メチル化剤で処理して該細胞に同時に複数の腫瘍関連抗原を発現させる工程。本発明の方法により入手可能な細胞、およびその細胞成分は、単独あるいは該細胞と組合せて、該細胞に発現している複数の腫瘍関連抗原の1または複数を構成的に発現する様々なヒストタイプの悪性腫瘍の予防および治療に有用である。便宜に、該細胞および/または細胞成分をワクチンの形態にすることができる。該ワクチンは、同時に複数の/すべてのメチル化-制御された腫瘍関連抗原を発現する点で従来技術のものより有用である。

Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/B-EBV (□) or control (◆) B-EBV cells (S)^a



^aData represent the mean values (mean) ± SD of [3H]-THR uptake obtained in four independent experiments.

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程を含む抗原提示細胞の作成方法：

- a) 対象から該細胞を収集する工程、
- b) 該収集した細胞を活性化する工程、
- c) 生体外で該活性化した細胞を培養および所望により増加させる工程、
- d) 該培養および所望により増加させた細胞をDNA低メチル化剤で処理して該細胞から同時に複数の腫瘍関連抗原を発現させる工程。

【請求項 2】

該対象が哺乳類である請求項1に記載の方法。 10

【請求項 3】

該対象がヒトである請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

該対象が癌患者である請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

該細胞が免疫細胞である請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

該細胞が非免疫細胞である請求項1から4のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

該細胞が共有免疫優性癌抗原を発現する請求項1から6のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 8】

該細胞が共有非免疫優性癌抗原を発現する請求項1から6のいずれかに記載の方法。

【請求項 9】

該細胞がエプスタイン・バーウイルス-不死化B-リンパ芽球腫細胞系である、請求項1から5、7、8のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

該細胞がヤマゴボウマイトイジエン(PWM)-活性化B-リンパ球である、請求項1から5、7、8のいずれかに記載の方法。

【請求項 11】

該細胞がCD40活性化B-リンパ球である、請求項1から5、7、8のいずれかに記載の方法。 30

【請求項 12】

該細胞がフィトヘマグルチニン(PHA)+組換えヒトインターロイキン-2(rhIL-2)-活性化PBM Cである、請求項1から5、7、8のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

該細胞がフィトヘマグルチニン(PHA)+組換えヒトインターロイキン-2(rhIL-2)+ヤマゴボウマイトイジエン(PWM)-活性化PBM Cである、請求項1から5、7、8のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

該細胞が樹状細胞、単球、マクロファージである、請求項1から4、6から8のいずれかに記載の方法。 40

【請求項 15】

該細胞がCD34+細胞、線維芽細胞、幹細胞、線維芽細胞および角化細胞である、請求項1から4、6から8のいずれかに記載の方法。

【請求項 16】

工程d)においてヒストン脱アセチル酵素阻害剤を使用する、請求項1から15のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

DNA低メチル化剤が5-アザ-シチジンまたは5-アザ-2'-デオキシシチジンから選択される、請求項1から16のいずれかに記載の方法。 50

【請求項 18】

請求項 1 から 17 のいずれかに記載の方法によって得られる細胞。

【請求項 19】

1 または複数の癌抗原を構成的に発現する様々なヒストタイプの悪性腫瘍の予防および治療のための、請求項 18 に記載の細胞および / またはその細胞成分の使用。

【請求項 20】

該共有癌抗原が免疫優性癌抗原である、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

該共有癌抗原が非免疫優性である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 22】

該癌抗原が癌精巣抗原である、請求項 18 に記載の使用。

【請求項 23】

該細胞がプールされた抗原の貯蔵所として保存される、請求項 19 から 22 のいずれかに記載の使用。

【請求項 24】

癌ワクチン用の請求項 23 に記載のプールされた抗原。

【請求項 25】

請求項 18 に記載の細胞を含む癌ワクチン。

【請求項 26】

該ワクチンが自己由来である請求項 25 に記載のワクチン。

【請求項 27】

該ワクチンが同種由来である請求項 25 に記載のワクチン。

【請求項 28】

細胞が請求項 23 に記載のように使用される、請求項 27 に記載のワクチン。

【請求項 29】

請求項 19 に記載の細胞成分が使用される、請求項 27 または 28 に記載のワクチン。

【請求項 30】

エフェクター免疫細胞の作成方法における請求項 18 に記載の細胞および / またはその細胞成分の使用であって、該エフェクター免疫細胞が養子免疫治療に有用な産物の調製のために用いられる使用。

【請求項 31】

請求項 25 から 29 のいずれかに記載のワクチンおよび低メチル化剤の全身的投与に好適な医薬組成物を含む製品。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は医学分野、特にヒトまたは動物の対象の治療方法に有用な製品、物質および組成物に関し、より具体的には癌の診断、治療、および予防に関する。本発明は、癌ワクチンおよびその調製方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

種々のヒストタイプ(histotype)の形質転換細胞によって構成的に発現される数々の腫瘍関連抗原 (TAA) が近年同定されている(Renkvisit N. et al. Cancer Immunol. Immunother. 50: 3-15, 2001)。

【0003】

これら TAA の多くは、特定の HLA クラス I 同種特異体(allospecificities)に関して CD8+ 細胞障害性 T リンパ球 (CTL) によって認識される複数の免疫優性抗原ペプチドを提供し得る(Renkvisit N. et al. Cancer Immunol. Immunother. 50: 3-15, 2001); さらに選択された TAA、例えば、MAGE (Jager E. et al., J. Exp. Med. 187: 265-270, 1998)、NY-ESO-1 (Jager E. et al., J. Exp. Med. 187: 265-270, 1998

10

20

30

40

50

)、SSX (Tureci O. et al. Cancer Res; 56 (20) : 4766-72 1996)、チロシナーゼ (Topalian S. L. et al. J. Exp. Med. 183 : 1965-1971, 1996.)、Melan-A / MART-1 (Zarour H. M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 : 400-405, 2000) は、特定のHLAクラスI同種特異体に関して同時にCD4+Tリンパ球によって認識されるエピトープを含み、したがって、TAA - 特異的 (directed) 体液性免疫応答を誘導することができる (Wang R. F. Trends Immunol., 22 : 269-276, 2001)。

【0004】

治療標的として主要な役割を果たす様々なクラスのTAAが同定されている：

i) 癌 - 精巣抗原 (CTA)、これは様々な組織の腫瘍で発現するが、精巣および胎盤を除く正常組織では発現せず、例えば、MAGE、GAGE、SSX SART-1、BAGE、NY-ESO-1、XAGE-1、TRAG-3およびSAGEが挙げられ、これらのなかには複数のファミリーを表すものもある (Traversari C.、Minerva Biotech., 11 : 243-253, 1999);

ii) 分化 - 特異的抗原、これは正常および腫瘍性メラニン細胞で発現し、例えば、チロシナーゼ、Melan-A / MART-1、gp100 / Pmel17、TRP-1 / gp75、TRP-2が挙げられる (Traversari C.、Minerva Biotech., 11 : 243-253, 1999);

iii) 様々な組織の悪性腫瘍組織に過剰発現するが、その良性の対応物にも存在する抗原、例えば、PRAME (Ikeda H. et al., Immunity, 6 : 199-208, 1997)、HER-2/neu (Traversari C.、Minerva Biotech., 11 : 243-253, 1999)、CEA、MUC-1 (Monges G. M. et al., Am. J. Clin Pathol., 112 : 635-640, 1999)、アルファ-フェトプロテイン (Meng W. S. et al., Mol. Immunol., 37 : 943-950, 2001) が挙げられる；

iv) 偏在的に発現するタンパク質をコードする遺伝子の点突然変異に由来する抗原、例えば、MUM-1、-カテニン、HLA-A2、CDK4およびカスパーゼ8が挙げられる (Traversari C.、Minerva Biotech., 11 : 243-253, 1999);

v) ウイルス抗原 (Traversari C.、Minerva Biotech., 11 : 243-253, 1999)。

【0005】

TAAに加えて、有効な免疫原性および効率的な宿主Tリンパ球による認識に重要な細胞要素には、HLAクラスIおよびHLAクラスII抗原、および同時刺激 / アクセサリー分子が含まれる (例えば、CD40、CD54、CD58、CD80、CD81) (Fleuren G. J. et al., Immunol. Rev., 145 : 91-122, 1995)。

【0006】

既知のクラスのTAAの中で、CTAは、癌患者の特に好適な有効な特異的免疫療法の治療標的である。というのはそれらの正常組織における発現は限られており、それらの生体対象、特にヒトを含む哺乳類におけるインビオ免疫原性が知られているからである (Jager E. et al., J. Exp. Med., 187: 265- 270, 1998 ; Reynolds S. R. et al., Int. J. Cancer, 72 : 972-976, 1997)。

【0007】

しかし、異なる患者の腫瘍性病変での特異的CTAの不均一な発現により、その生物学的適格性は、CTA - 特異的治療用ワクチン接種に制限される。実際、特定の癌患者の悪性腫瘍病変はしばしば選択されたCTAのみ発現することがあり得 (Sahin U. et al., Clin. Cancer Res., 6 : 3916-3922, 2000)、さらに下方制御された (Lethz B. et al., Melanoma Res., 7 : S83- S88, 1997) および / または不均一な (dos Santos N. R. et al., Cancer Res., 60 : 1654-1662, 2000) 特異的CTAの個々の腫瘍性病変における発現も報告されている (Jungbluth A. A. et al., Br. J. Cancer, 83 : 493-497, 2000)。これらの現象はインビオで別々にまたは同時に起こりうるが、おそらく疾患が進行しやすい悪性腫瘍細胞の免疫原性が構成的に乏しいことに寄与している可能性があり (Speiser D. E et al., J. Exp. Med. 186 : 645-653, 1997)、また、特異的CTAに対する免疫療法の過程におけるCTA - 陰性クローンの出現により、腫瘍性細胞のインビオ免疫選択が起こり

うる。したがって、単一の C T A の特定の免疫原性エピトープを免疫学的標的とする免疫療法アプローチは、標的 C T A のその腫瘍性病変における発現が無いことまたは下方制御されていることにより、多くの癌患者には適用することができない；さらに、インビオで単一の C T A を免疫学的標的とすることは、治療により誘導／増幅された C T A - 特異的免疫応答を効率的に回避する C T A - 欠損腫瘍変異体を生み出す可能性がある。単一の C T A を標的とする治療アプローチのさらなる限界は、その不均一な病変内の発現に由来し (Schultz-Thater E. et al., Br. J. Cancer, 83 : 204-208, 2000)、さらに、特異的 H L A クラス I または H L A クラス I I 同種特異体による単一の C T A の特定の免疫原性エピトープの提示により、特定の規定された H L A 表現型を有する患者の治療のみしか可能とならない。

10

【 0 0 0 8 】

こういった限界を部分的に避けるため、最近の治療戦略では 1 または複数の C T A の 2 以上の免疫原性エピトープか、または C T A タンパク質全体をワクチン接種剤として利用する (Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F. , Rome-Italy, November 15-16, 1999 ; <http://www.cancerresearch.org>)。

【 0 0 0 9 】

したがって、当該技術分野の現状の欠点、特に免疫原性が弱いことおよびインビオ免疫選択を克服できる癌ワクチンが強く求められており、多数の癌患者に対する癌ワクチンであって、特定の単一の標的とされた C T A または T A A に制限されないものの実用可能性が望まれている。この点で、求められる癌ワクチンは、選択された H L A クラス I および / または H L A クラス I I 抗原に「拘束」されないものである。

20

【 0 0 1 0 】

最近のインビトロでの証拠により、今までに知られているもののなかで調査されたすべての C T A 遺伝子の発現が、D N A 低メチル化剤に曝された後、様々な組織の腫瘍性細胞において誘導または上方制御されることが示された (dos Santos N. R. et al., Cancer Res., 60: 1654-1662, 2000 ; Weber J. et al, Cancer Res., 54 : 1766-1771, 1994)。C T A 誘導は持続的であり、治療後数週間検出可能であることが見出された。これらの知見は、C T A が総合的に D N A メチル化により制御される T A A のクラスに属することを支持する。さらに、D N A 低メチル化剤による腫瘍性細胞の処理は、その H L A クラス I 抗原の発現および調査した H L A クラス I 同種特異体の同時かつ持続的な上方制御を誘導し、そして同時刺激 / アクセサリー分子である C D 5 4 および C D 5 8 の発現を上方制御した (Coral S. et al., J. Immunother., 22: 16-24, 1999)。

30

【 0 0 1 1 】

有望な治療的側面であるにもかかわらず、C T A は多くの欠点を示す。例えば、今までに調査された特定の C T A は特定の腫瘍性病変の間で不均一な発現を示し、C T A - 陽性悪性腫瘍細胞と C T A - 陰性悪性腫瘍細胞が共存する；また、今までに同定されたもののかで選択された C T A のみが、特定の腫瘍性病変において、その組織学的起源とは独立に発現し得る；腫瘍性細胞上の特異的 C T A の発現の閾値が、C T A - 特異的 C T L による認識のために必要とされ、特異的 C T A に対するワクチン接種には、患者の適当な H L A クラス I 表現型が要求され、選択された C T A にはまた、患者の適当な H L A クラス I I 表現型が要求される。

40

【 0 0 1 2 】

その特有の生物学的特徴のために、選択された C T A は、様々な組織の悪性腫瘍疾患を患う患者における C T A - 特異的免疫応答を誘導または増強する目的の様々な臨床的試みに用いられている。臨床での治療的 C T A のインビオ投与のため、あるいは前臨床段階でのより強力なワクチン接種手段を作成するために、現在、当業者に知られている様々な戦略が用いられている (dos Santos N. R. et al., Cancer Res., 60: 1654-1662, 2000; Weber J. et al., Cancer Res., 54 : 1766-1771, 1994)。注目すべきことに、主に数々の技術的および実践的制限により、限られた数の特異的 C T A の免疫原性エピトープのみ、あるいは単一の全 C T A タンパク質のみが現在治療目的で臨床で利用されているにすぎな

50

い。

【 0 0 1 3 】

以下は、すでに利用されているかあるいは今までに提案されている、C T Aを癌患者に投与するための主な戦略を含むリストである；いままでに知られているT A Aのその他のクラスに属するT A Aを患者に投与するのにも同一の戦略が利用されており、また、様々なアジュバントおよび／またはキャリアを用いて治療薬の免疫原性を増強させることがあることに注意されたい。

【 0 0 1 4 】

C D 8 + T 細胞によって認識される単一または複数のC T Aの1または複数の免疫原性エピトープを提示する、合成ペプチド(Conference on Cancer Vaccines、Eds. Ferrantini M. and Belardelli F.、Rome- Italy、November 15-16、1999；<http://www.cancerresearch.org>)。 10

単一または複数のC T Aの1または複数の免疫原性エピトープを提示する、リポソームに封入された合成ペプチド(Steller M. A. et al. , Clin. Cancer Res. , 4: 2103-2109、1998)。

単一のC T Aの全体の合成タンパク質(Conference on Cancer Vaccines、Eds. Ferrantini M. and Belardelli F.、Rome-Italy、November 15-16、1999；<http://www.cancerresearch.org>)。 11

C D 8 + T 細胞によって認識される単一または複数のC T Aのエピトープを発現する組換えウイルスベクター(Jenne L. et al. , Trends Immunol. , 22 : 102-107、2001)。 20

裸の(Naked)D N A シューティング(Park J. H. et al. , Mol. Cells , 9 : 384-391、1999)。

C D 8 + T 細胞によって認識される単一または複数のC T Aのエピトープを提示する合成ペプチドを生体外で与えられた自己P B M C /マクロファージ(Conference on Cancer Vaccines、Eds. Ferrantini M. and Belardelli F.、Rome-Italy、November 15-16、1999；<http://www.cancerresearch.org>)。 21

C D 8 + T 細胞によって認識される単一または複数のC T Aのエピトープを提示する合成ペプチドまたは単一のC T Aの全合成タンパク質または全腫瘍細胞調製物を生体外で与えられた自己樹状細胞(Conference on Cancer Vaccines、Eds. Ferrantini M. And Belardelli F.、Rome- Italy、November 15-16、1999；<http://www.cancerresearch.org>；<http://www.cancerresearch.org>；Jenne L. et al. , Trends Immunol. , 22 : 102-107、2001)。 30

全長C T Aを発現するようにD N A / R N A を生体外で形質移入または形質導入されたか、あるいは全腫瘍細胞に融合された自己樹状細胞(Jenne L. et al. , Trends Immunol. , 22: 102-107、2001)；

全長C T Aを発現するようにD N A / R N A を生体外で形質移入または形質導入された自己T リンパ球。

【 0 0 1 5 】

本発明の主な目的である自己癌ワクチンに関しては、数多くの特許文献が引用される。国際特許出願第W O 9 9 / 4 2 1 2 8号には、適切な治療の選択および／または腫瘍の進行のモニタリングのための、 固形腫瘍のH L A 転写または発現プロフィールの測定方法が開示されている。この文献の目的はH L A - Gのいくつかのアイソフォームを阻害して自然の抗腫瘍応答を増加させることである。該方法は腫瘍サンプルから細胞を抽出し、それを溶解し、溶解物をH L A クラス I 抗原に対する抗体と反応させることを含む。 40

【 0 0 1 6 】

ドイツ国特許第2 9 9 1 3 5 2 2号には、腫瘍細胞の表面をそのままにしたまま腫瘍細胞を殺すか損傷を与えるために、患者から抽出した腫瘍細胞を2 0 0 - 9 0 0 バールの圧力にかけ、そして細胞を患者に再注入することによる癌ワクチンの調製装置が提供されている。

【 0 0 1 7 】

国際特許出願第W O 0 0 / 0 2 5 8 1号には、発癌遺伝子または突然変異腫瘍抑制タンパ 50

ク質あるいはペプチドに対するT細胞応答を誘導することができるテロメラーゼタンパク質またはペプチドが開示されている。該ペプチドは癌ワクチンに有用である。

【0018】

国際特許出願第WO00/18933号には、機能的に不活性な、改変された抗原の発現を引き起こすDNAコンストラクトが開示されており、該抗原はDNA、RNAの転写および翻訳の効率または抗原ペプチドの生成に関しては変化していないものである。癌を患う患者は改変されたヒト癌関連抗原、特にPSMA抗原をコードするRNAまたはプラスミドDNAの投与によって治療される。別の態様において、インビトロで該RNAまたはプラスミドDNAに曝された自己樹状細胞がワクチンとして用いられる。

【0019】

国際特許出願第WO00/20581号には、新たに単離されたMAGE-A3ヒト白血球抗原(HLA)クラスII-結合ペプチドを含む癌ワクチンが開示されている。該ペプチドを用いてTリンパ球の集団を選択的に濃縮して該ペプチドに特異的なCD4+Tリンパ球を得ることができる。該濃縮されたリンパ球は癌ワクチンとしても利用できる。

【0020】

国際特許出願第WO00/25813号には、主要組織適合遺伝子複合体分子に結合する普遍的な腫瘍関連抗原(TAA)が開示されている。治療方法は、該TAAをコードする核酸分子を投与する工程を含み、TAAは抗原提示細胞によってプロセシングされ、抗原提示細胞は細胞障害性リンパ球を活性化し、TAAを発現する細胞は殺される。特異的hTERTペプチド以外に、様々なTAAの同定が複雑なコンピュータ化された方法により可能となり、コンピュータにより設計されたペプチドの合成および該ペプチドの有効性の確認のための生物学的アッセイが可能となる。

【0021】

国際特許出願第WO00/26249号には、ヒトWT-1タンパク質またはヒトgata-1タンパク質の断片が開示されている。これらのペプチド断片は細胞障害性Tリンパ球(CTL)の活性化を介して癌ワクチンとして用いられる。

【0022】

米国特許第6077519号には、腫瘍組織からの酸によるエピトープの溶出により回収されたT細胞エピトープの組成物を含む癌ワクチンが提供されている。

【0023】

国際特許出願第WO00/46352号には、機能性のCD86分子を発現するヒトTリンパ球を含む癌ワクチンが提供されている。Tリンパ球はT細胞を少なくとも2回の連続刺激に曝すことによって得られ、各刺激は少なくとも1つのアクチベーター(抗体、抗CD2、3または28)およびT細胞増殖を刺激するサイトカイン(インターロイキン)を含む。

【0024】

Coral S. et al. Journal of Immunotherapy 22 (1) : 16-24, 1999には、黒色腫細胞の免疫原性能力およびその宿主細胞障害性細胞による認識が、ヒト白血球抗原(HLA)クラスI抗原、同時刺激分子および腫瘍性細胞上の黒色腫関連抗原(MAA)の発現の存否とレベルに依存することが教示されている。5-AZA-CdRの活動性および/または受動性のヒト黒色腫のためのその全身投与による特異的免疫療法における使用が、細胞障害性細胞による黒色腫細胞認識を促進することが示唆される。

【0025】

Momparler, Anticancer Drugs Apr ; 8 (4) : 358-68, 1997は、化学療法剤としての5-AZA-CdRについて言及している。

【0026】

Shichijo S. et al Jpn. J. Cancer Res. 87, 751-756, July 1996は、脱メチル剤5-AZA-CdRが正常および悪性腫瘍リンパ球においてMAGE1、2、3および6を誘導するか否かを調査し、細胞におけるそれらの発現機構をより明かにした。著者らは試験した選択されたサンプルにおける調査したCTAの誘導を示し、すべての場合において脱メ

10

20

30

40

50

チル反応がMAGE遺伝子の誘導のために十分な刺激であるわけではないと論じ、その結果細胞におけるMAGE遺伝子の発現機構がより明らかになった。治療上の見通しに付いての示唆は無かった。

(発明の概要)

【0027】

このたび新たに抗原提示細胞の作成方法が見出された。該方法は以下の工程を含む。

- a) 該細胞を対象から収集する工程、
- b) 該収集した細胞を活性化させる工程；
- c) 該活性化した細胞を生体外で培養および所望により増加させる工程；
- d) 該培養および所望により増加させた細胞をDNA低メチル化剤で処理して該細胞から同時に複数の腫瘍関連抗原を発現させる工程。

【0028】

本発明の方法によって得られる細胞およびその細胞成分は、単独でまたは該細胞と組合せて、該細胞において発現される複数の腫瘍関連抗原の1または複数を構成的に発現する様々なヒストタイプの悪性腫瘍の予防および治療、特に哺乳類、ヒトの予防および治療に有用である。

【0029】

本発明の以下の記載において、該細胞をADHAPI-細胞と略称する。

もっとも便宜的には、本方法により得られる細胞は癌ワクチンの形態で用いられる。

以下の記載において、本発明を実施例と図面によってより詳細に開示する。図面において：

【0030】

図1は、ADHAPI-細胞/B-EBVまたは対照B-EBV細胞(S)によって刺激された自己(aMLR)PBM C(R)の増殖を示す。

図2は、ADHAPI-細胞/PWM-Bまたは対照PWM-B細胞(S)によって刺激された自己(aMLR)PBM C(R)の増殖を示す。

図3は、ADHAPI-細胞/CD40L-Bまたは対照CD40L-B細胞(S)によって刺激された自己(aMLR)PBM C(R)の増殖を示す。

図4は、ADHAPI-細胞/PWM-PBMCまたは対照PWM-PBMC細胞(S)によって刺激された自己(aMLR)PBM C(R)の増殖を示す。

図5は、ADHAPI-細胞/PHA-PBMCおよび対照PHA-PBMCによって刺激された自己(aMLR)PBM C(R)の増殖を示す。

図6は、ADHAPI-細胞/PHA-+PWM-PBMCまたは対照PHA-+PWM-PBMC(S)によって刺激された自己(aMLR)PBM C(R)の増殖を示す。

(発明の詳細な開示)

【0031】

本発明によると、抗原提示細胞を作成するために処理される細胞のタイプに実質的に制限はないが、ただし、低メチル化剤によって好適に活性化および処理されるものである。

【0032】

本発明によると、対象から収集される細胞は、具体的には哺乳類、より好ましくはヒトである。本発明の可能な態様において、該ヒトは癌患者である。

【0033】

本発明の第1の好適な態様によると、本方法により得られる抗原提示細胞は免疫細胞である。

【0034】

本発明の第2の好適な態様において、本方法により得られる抗原提示細胞は非免疫細胞である。

【0035】

本発明により得られる細胞は共有(shared)免疫優性癌抗原を発現してもよく、共有非免疫優性癌抗原を発現してもよい。

10

30

40

50

【0036】

本発明の特定の態様において、本方法に好適な細胞は以下のものである：

エプスタイン・バーウイルスで不死化され、DNA低メチル化剤で処理されたB-リンパ球腫細胞系。これは疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象の末梢血単核細胞(PBMC)から作成したものである(ADHAPI-細胞/B-EBV)。

ヤマゴボウマイトジエン(PWM)で活性化され、DNA低メチル化剤で処理されたB-リンパ球。これは、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象のPBMCから精製したB-リンパ球から作成したものである(ADHAPI-細胞/PWM-B)。

CD40で活性化され、DNA低メチル化剤で処理されたB-リンパ球。これは、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象のPBMCから精製したB-リンパ球から作成したものである(ADHAPI-細胞/CD40-B)。10

ヤマゴボウマイトジエン(PWM)で活性化され、DNA低メチル化剤で処理されたPBMC。これは、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象の精製PBMCから作成した(ADHAPI-細胞/PWM-PBMC)。

フィトヘマグルチニン(PHA)+組換えヒトインターロイキン-2(rhIL-2)で活性化され、DNA低メチル化剤で処理されたPBMC。これは、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象の精製PBMCから作成した(ADHAPI-細胞/PHA-rhIL2-PBMC)。

フィトヘマグルチニン(PHA)+組換えヒトインターロイキン-2(rhIL-2)+ヤマゴボウマイトジエン(PWM)で活性化され、DNA低メチル化剤で処理されたPBMC。これは、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象の精製PBMCから作成した(ADHAPI-細胞/PHA-rhIL2-PWM-PBMC)。20

樹状細胞、单球、マクロファージ。

CD34+細胞、線維芽細胞、幹細胞、線維芽細胞および角化細胞。

【0037】

本発明の方法によって得られる細胞は、免疫優性であれ非免疫優性であれ、1または複数の癌抗原を構成的に発現する様々なヒストタイプの悪性腫瘍の予防薬および治療薬としての使用に好適である。

【0038】

本発明の別の可能な態様は、ワクチン接種する細胞の直接の抗原提示能力の利用が望ましくないか必要でない場合に適用できる。この場合、本発明の方法により得られるワクチン接種する細胞またはその細胞成分はワクチン接種される患者に対してプールされた癌抗原の「貯蔵所」として利用できる。30

【0039】

本発明の好適な態様において、選択されたTAはCTAである。

【0040】

本発明のこの態様は当業者に以下の利点を提供する。

CTAは免疫原性である。というのはそれらはHLAクラスI-拘束CTA-特異的CD8+CTLによって認識されるエピトープを含むからである。

CTAは免疫原性である。というのはそれらはHLAクラスII-拘束CTA-特異的CD4+Tリンパ球によって認識されるエピトープを含むからである。40

選択されたCTAは同時にHLAクラスIおよびHLAクラスII抗原によって提示されるエピトープを含む。したがって、選択されたCTAはCD8+CTLおよびCD4+Tリンパ球反応を同時に誘導できる。

CTAは精巣と胎盤を除き、良性の組織では発現しない。

異なるCTAが固形および造血性悪性腫瘍の腫瘍性細胞に同時に発現し得、形質転換細胞に同時発現している複数の治療標的を提供し得る。

特定のCTAは、所与の患者の同時のおよび逐次の転移性病変に均一に発現する。

特定のCTAは、異なる組織起源の悪性腫瘍組織に発現し得、その特異的ヒストタイプに関わらずヒト腫瘍症に共有される共通の治療標的を提供する。50

特定の C T A は、様々な H L A クラス I および H L A クラス I I 同種特異体において提示される複数の免疫原性ペプチドをコードし得る。

【 0 0 4 1 】

本発明のさらなる態様において、ヒストン脱アセチル酵素阻害剤が D N A 低メチル化剤と協同して C T A 、 H L A 抗原、および様々な組織の腫瘍性細胞の同時刺激 / アクセサリー分子の発現を誘導 / 上方制御し得る。実際、D N A メチル化およびヒストン脱アセチル化は、癌における後成的なジーンサイレンシングの相乗作用の層として作用し (Fuks F. et al., Nat. Genet.、24 : 88-91、2000) 、腫瘍抑制機能を有する選択された過剰メチル化遺伝子の強い再活性化が、ヒストン脱アセチル酵素阻害剤での処理後、最初の最小限の D N A 脱メチル反応に続いて結腸直腸癌細胞において観察された (Cameron E. E. et al., Nat. Genet.、21 : 103-107、1999) 。

【 0 0 4 2 】

本発明による方法における活性化工程は、一般的知識にしたがって行われ、いかなる場合も Current Protocols in Immunology 、 Coligan J. E. et al Eds 、 Wiley を参照すればよい。

【 0 0 4 3 】

本発明による方法における脱メチル反応処理は、一般的に周知であり、文献に一般的手順が記載されている。さらなる詳細な情報については Santini V. et al. , Ann. Intern. Med. 、 134 : 573-586, 2001 を参照されたい。

【 0 0 4 4 】

本発明の目的に有用な当該技術分野で脱メチル剤としても知られている低メチル化剤は、当該技術分野で周知である。D N A 脱メチル剤は文献に広く開示されている。例えば、国際特許出願第 W O 0 1 / 2 9 2 3 5 号、米国特許第 5 8 5 1 7 7 3 号を参照されたい。好適な D N A 脱メチル剤は 5 - アザ - シチジンであり、より好適には、 5 - アザ - 2 ' - デオキシシチジン (5 - A Z A - C d R) である。

【 0 0 4 5 】

本発明による抗原提示細胞は癌ワクチンの調製に好適である。本発明の好適な態様において、該ワクチンは自己ワクチンである。

【 0 0 4 6 】

本発明の別の好適な態様において、該ワクチンは同種 (allogeneic) ワクチンである。この態様において、本発明の方法により得られる細胞は、それが細胞であれ、その細胞成分であれ、抗原提示細胞として、そして、プールされた癌抗原の「貯蔵所」の形態として利用できる。

【 0 0 4 7 】

本発明のさらに好適な別の態様において、細胞および / または細胞成分は、エフェクター免疫細胞の作成方法に利用できる。該エフェクター免疫細胞は周知の養子免疫治療において有用な産物の調製に利用される。本発明のさらなる態様において、ここに記載するワクチンは、例えばデシタビンなどの低メチル化剤による癌患者の全身的前処理と組合せて用いることができる。この態様は例えば、本発明のワクチンと例えばデシタビンなどの低メチル化剤の全身投与に好適な医薬組成物とを含むキットなどの製品を用いて行なうことができる。

【 0 0 4 8 】

ワクチンは当業者に周知の技術によって、一般的知識によって調製することができる。例えば、本明細書において言及した特許文献は癌ワクチンの調製について十分開示している。例えば、国際特許出願第 W O 0 0 / 2 5 8 1 3 号または第 W O 0 0 / 4 6 3 5 2 号を参照されたい。

【 0 0 4 9 】

当業者であれば、特に投与プロトコールに関して、本発明によるワクチンを使用するための好適な方法を簡単に確立できるであろう。

【 0 0 5 0 】

10

20

30

40

50

以下の実施例において本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例 1】

【0051】

A D H A P I - 細胞 / B - E B V

P B M C 精製

P B M C は、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象のヘパリン処置した末梢血から標準的フィコール・ハイパック (Ficoll-Hyphaque) 密度勾配遠心分離によって精製した。

【0052】

エプスタイン・バーウイルス (E B V) によるP B M C の不死化による自己B - リンパ芽球腫細胞系の作成 10

B - E B V + リンパ芽球腫細胞系は、B 9 5 . 8 マー モセット細胞系からの上清とともに、P B M C を、3 7 、5 % C O₂ 加湿霧囲気で、1 0 % 热不活性化ウシ胎仔血清（またはヒトA B 血清）および2 m M L - グルタミンを追加したR P M I 1 6 4 0 培地中でインキュベートすることによって作成した。

【0053】

A D H A P I - 細胞 / B - E B V および対照B - E B V 細胞の作成

B - E B V + リンパ芽球腫細胞系 (7 . 5 × 1 0⁵ 細胞 / m l) を1 0 % 热不活性化ウシ胎仔血清（または1 0 % 热不活性化ヒトA B 血清）および2 m M L - グルタミンを追加したR P M I 1 6 4 0 培地中で3 7 、5 % C O₂ 加湿霧囲気で培養し、1 2 時間ごとに20
4回、1 μ M の5 - アザ - 2' - デオキシシチジン (5 - A Z A - C d R) によるパルス刺激を与えた；次いで培地の半分を新鮮な培地で交換し、培養をさらに4 8 時間続けた。次いで細胞を実験手順に使用および／または生存条件下で凍結した。対照細胞 (B - E B V 細胞) を同様の実験条件下で培養したが、5 - A Z A - C d R によるパルス刺激は与えなかった。

【0054】

A D H A P I - 細胞 / B - E B V および対照B - E B V - 細胞の最終的な収集
この結果について表1を参照されたい。

【0055】

自己混合リンパ球反応 (a M L R) およびM L R

A D H A P I - 細胞 / B - E B V および対照B - E B V 細胞（刺激細胞 = S）を収集し、ハンクス平衡塩類溶液 (H B S S) で2回洗浄し、x - 線で処理した (7 5 G y)。a M L R およびM L R のために、スカラー濃度 (1 × 1 0⁶ 細胞 / m l から 6 × 1 0⁴ 細胞 / m l) のA D H A P I - 細胞 / B - E B V または対照B - E B V 細胞を、熱不活性化ヒトA B 血清、2 m M L - グルタミン、1 0 0 U / m l ペニシリン、1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本I s c o v e 培地中の自己または同種P B M C (1 × 1 0⁶ 細胞 / m l) (反応細胞 = R) に添加した。そして9 6 ウェルU底プレートに最容積が2 0 0 μ l / ウェルとなるように播いた。3 7 、5 % C O₂ 加湿霧囲気での24時間のインキュベーションの後、1 0 0 μ l の培養上清を収集し、すぐに - 8 0 でサイトカインアッセイに使用するまで保存した。次いで1 0 0 μ l の新鮮な培地を各ウェルに添加し、培養をさらに5日間続けた後、培養物に³ H - T D R (1 μ L C i / ウェル) でO / N パルス刺激を与えた。次いでプレートを回収しR 細胞による³ H - T D R 取りこみを - カウンターによって測定した。 40

【0056】

a M L R においてA D H A P I - 細胞 / B - E B V または対照B - E B V 細胞 (S) によって刺激された自己P B M C (R) の増殖

図1を参照されたい。

【0057】

A D H A P I - 細胞 / B - E B V および対照B - E B V 細胞の表現型の特性
結果については表2を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0058】

A D H A P I - 細胞 / B - E B V および対照 B - E B V 細胞によって発現される C T A の R T - P C R 分析

調査する細胞上の C T A 発現を評価するために用いた実験条件およびプライマーは以下の通りである：

M A G E - 1 、 - 2 、 - 3 、 - 4 については、 Brasseur、 F. 、 et al. Int. J. Cancer 63: 375- 380、 1995 ; G A G E 1 - 6 については、 Van den Eynde、 B. 、 et al. J. Exp. Med. 182 : 689-698、 1995 ; N Y - E S O - 1 については、 Stockert、 E. et al. J. Exp. Med. 187 : 265- 270、 1998 ; S S X - 2 については； Sahin、 U. 、 et al. Clin. Cancer Res. 6 : 3916- 3922、 2000.

10

【0059】

【化1】

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	NT	NT
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	NT	NT
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	2/4	4/4

20

【0060】

^a 陽性 / 被験 ; N T 、 試験せず。

【0061】

a M L R において A D H A P I - 細胞 / B - E B V または対照 B - E B V 細胞 (S) によって刺激された P B M C (R) によって放出された I F N - γ の E L I S A 評価結果については表 3 を参照されたい。

30

【実施例2】

【0062】

A D H A P I - 細胞 / P W M - B

B - リンパ球精製

P B M C を疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象のヘパリン処置した末梢血から標準的フィコール - ハイパック密度勾配遠心分離によって精製し、精製した B リンパ球をノイラミニダーゼ処理したヒツジ赤血球を用いた常套の E 口ゼット形成技術によって得た。

【0063】

P W M - 活性化 B 細胞の作成

精製 B - リンパ球 (1.5×10^6 細胞 / m l) に P W M ($3 \mu g / m l$) を添加し、 37 度 48 時間、 5 % C O ₂ 加湿雰囲気下で、 10 % 热不活性化ヒト A B 血清、 2 m M L - グルタミン、 1 0 0 U / m l ペニシリン、 1 0 0 μ G / m l ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本 I s c o v e 培地で培養した。

40

【0064】

A D H A P I - 細胞 / P W M - B および対照 P W M - B 細胞の作成

P W M - 活性化 B - リンパ球に 12 時間ごとに 1 μ M の 5 - アザ - 2 ' - デオキシシチジン (5 - A Z A - C d R) で 4 回パルス刺激を与えた；次いで培地の半分を新鮮な培地で交換し、さらに 48 時間培養を続けた。次に細胞を実験手順に使用および / または生存条件下で凍結した。対照細胞 (P W M - B) を同様の実験条件下で培養したが 5 - A Z A - C d R でのパルス刺激は与えなかった。

50

【0065】

A D H A P I - 細胞 / P W M - B および対照 P W M - B 細胞の最終的な収集結果については表 1 を参照されたい。

【0066】

自己混合リンパ球反応 (a M L R) および M L R

A D H A P I - 細胞 / P W M - B および対照 P W M - B 細胞 (刺激細胞 = S) を収集し、0.5% - メチルマンノピラノシドを追加したハンクス平衡塩類溶液で 3 回洗浄し、X - 線処理した (30 Gy)。a M L R および M L R のためにスカラ - 濃度 (1×10^6 細胞 / m l から 6×10^4 細胞 / m l) の A D H A P I - 細胞 / P W M - B または対照 P W M - B 細胞を、10% 熱不活性化ヒト A B 血清、2 mM L - グルタミン、100 U / m l ベニシリン、100 μg / m l ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本 I s c o v e 培地中の自己または同種 P B M C (1×10^6 細胞 / m l) (反応細胞 = R) に添加し、96 ウェル U - 底プレートに最終容積が 200 μl / ウェルとなるように播いた。37 で 5% CO₂ 加湿雰囲気下での 6 日間のインキュベーションの後、100 μl の培養上清を各ウェルから収集し、すぐにサイトカインアッセイに使用するまで -80° で保存した。

【0067】

次いで、100 μl の新鮮な培地を各ウェルに添加し、培養に ³ H - T d R (1 μCi / ウェル) で O / N パルス刺激を与えた；そして、プレートを収集し R 細胞による ³ H - T d R 取りこみを - カウンターで測定した。

【0068】

A D H A P I - 細胞 / P W M - B および対照 P W M - B 細胞の表現型の特性結果については表 2 を参照されたい。

【0069】

A D H A P I - 細胞 / P W M - B および対照 P W M - B 細胞によって発現される C T A の R T - P C R 分析

【化2】

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	0/4	4/4
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	0/4	4/4
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE- 1-6	0/4	4/4
SSX-2	1/4	4/4

30

【0070】

^a 陽性 / 被験 ; N T 、試験せず。

【0071】

a M L R において A D H A P I - 細胞 / P W M - B または対照 P W M - B 細胞 (S) によって刺激された自己 P B M C (R) の増殖結果については図 2 を参照されたい。

【0072】

A D H A P I - 細胞 / P W M - B または対照 P W M - B 細胞 (S) によって刺激された同種 (M L R) および自己 (a M L R) P B M C (R) により放出された I F N - の E L I S A 評価

結果については表 3 を参照されたい。

【実施例 3】

【0073】

40

50

A D H A P I - 細胞 / C D 4 0 L - B

P B M C 精製

P B M C を、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象のヘパリン処置または酸性ケン酸デキストロース (A C D) - 抗凝固処理した末梢血から、標準的なフィコール - ハイパック密度勾配遠心分離によって精製した。

【 0 0 7 4 】

N I H 3 T 3 - C D 4 0 L - 活性化 P B M C の作成

P B M C (2×10^6 細胞 / m l) を、半集密的な、x - 線処理した (7 5 G y) N I H 3 T 3 - C D 4 0 L と、3 7 で 5 % C O₂ 加湿霧囲気下で、1 0 % 熱不活性化ヒト A B 血清、2 mM L - グルタミン、2 n g / m l 組換えヒト (r h) インターロイキン 4 (r h I L - 4) 、5 0 μ g / m l ヒトトランスフェリン、5 μ g / m l r h インスリン、 5.5×10^{-7} M シクロスボリン A (C s A) 、1 0 0 U / m l ペニシリン、および 1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本 I s c o v e 培地 (完全培地) 中で共培養した。インキュベーションの 6 日後、P B M C を収集し、H B S S で 2 回洗浄し、完全培地に 1×10^6 細胞 / m l となるように再懸濁し、上記のようにして新たに調製した N I H 3 T 3 - C D 4 0 L と、さらに 3 日間 3 7 で 5 % C O₂ 加湿霧囲気下で共培養した。この手順を 2 - 3 日毎に繰り返し、最大培養時間を 1 6 - 1 8 日とした。10

【 0 0 7 5 】

A D H A P I - 細胞 / C D 4 0 L - B および対照 C D 4 0 L - B 細胞の作成

1 6 - 1 8 日間の培養後、活性化 P B M C を収集し、上記のようにして N I H 3 T 3 - C D 4 0 L で再刺激した；3 7 、5 % C O₂ 加湿霧囲気での O / N インキュベーションの後、培養に 1 2 時間ごとに 1 μ M 5 - アザ - デオキシシチジン (5 - A Z A - C d R) で 4 回パルス刺激を与えた；次いで、細胞を収集し、上記のように N I H 3 T 3 - C D 4 0 L で再刺激し、さらに 4 8 時間培養を続けた。次いで細胞を実験手順に使用および / または生存条件下で凍結した。対照細胞 (C D 4 0 L - B 細胞) を同様の実験条件で培養したが、5 - A Z A - C d R によるパルス刺激は与えなかった。20

【 0 0 7 6 】

最終的な A D H A P I - 細胞 / C D 4 0 L - B および対照 C D 4 0 L - B 細胞の収集結果については表 1 を参照されたい。

【 0 0 7 7 】

自己混合リンパ球反応 (a M L R) および M L R

A D H A P I - 細胞 / C D 4 0 L - B および対照 C D 4 0 L - B 細胞 (刺激細胞 = S) を収集し、ハンクス平衡塩類溶液で 3 回洗浄し、x - 線処理した (5 0 G y) 。 a M L R および M L R のために、スカラー濃度 (1×10^6 細胞 / m l から 6×10^4 細胞 / m l) の A D H A P I - 細胞 / C D 4 0 L - B または対照 C D 4 0 L - B 細胞を、1 0 % 熱不活性化ヒト A B 血清、2 mM L - グルタミン、1 0 0 U / m l ペニシリン、1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本 I s c o v e 培地で、自己または同種 P B M C (1×10^6 細胞 / m l) (反応細胞 = R) に添加し、9 6 ウェル U - 底プレートに最終容積が 2 0 0 μ l / ウェルとなるように播いた。3 7 での C O₂ 加湿霧囲気下での 2 4 時間のインキュベーション後、1 0 0 μ l の培養上清を収集し、すぐにサイトカインアッセイに使用するまで - 8 0 で保存した。次いで、1 0 0 μ l の新鮮な培地を各ウェルに添加し、培養をさらに 5 日間続け、そして培養に ³ H - T d R (1 μ C i / ウェル) で O / N パルス刺激を与えた；次いでプレートを収集し、R 細胞による ³ H - T d R 取りこみを - カウンターで測定した。40

【 0 0 7 8 】

A D H A P I - 細胞 / C D 4 0 L - B および対照 C D 4 0 L - B 細胞の表現型の特性結果については表 2 を参照されたい。

【 0 0 7 9 】

A D H A P I - 細胞 / C D 4 0 L - B および対照 C D 4 0 L - B 細胞によって発現される C T A の R T - P C R 分析50

【0080】

【化3】

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/10 ^a	10/10
MAGE-2	0/10	9/10
MAGE-3	0/11	10/11
MAGE-4	0/11	11/11
NY-ESO-1	0/14	14/14
GAGE-1-6	0/14	14/14
SSX-2	0/14	13/14

10

【0081】

^a 陽性 / 被験

【0082】

a M L R において A D H A P I - 細胞 / C D 4 0 L - B または対照 C D 4 0 L - B 細胞 (S) によって刺激された自己 (a M L R) P B M C (R) の増殖
結果については図3を参照されたい。

【0083】

a M L R において A D H A P I - 細胞 / C D 4 0 L - B または対照 C D 4 0 L - B 細胞 S (S) によって刺激された P B M C (R) によって放出された I F N - の E L I S A 評価
結果については表3を参照されたい。

【実施例4】

【0084】

A D H A P I - 細胞 / P W M - P B M C

P B M C 精製

P B M C を、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象のヘパリン処置した末梢血から標準的なフィコール - ハイパック密度勾配遠心分離によって精製した。

【0085】

P W M - 活性化 P B M C の作成

P B M C (1.5 × 10⁶ 細胞 / m l) に P W M (3 μg / m l) を添加し、48時間37度5%CO₂加湿雰囲気で、10%熱不活性化ヒトAB血清、2 mM L-グルタミン、100U / m l ベニシリン、100μg / m l ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本 I s c o v e 培地中で培養した。

【0086】

A D H A P I - 細胞 / P W M - P B M C および対照 P W M - P B M C 細胞の作成

P W M - 活性化 P B M C に、12時間ごとに4回、1μMの5'-アザ-2'-デオキシシチジン (5-AZA-CdR) でパルス刺激を与えた；次いで、培地の半分を新鮮な培地で交換し、培養をさらに48時間続けた。次いで細胞を実験手順に使用および／または生存条件下で凍結した。対照細胞 (P W M - P B M C) を同様の実験条件下で培養したが、5-AZA-CdRによる刺激は与えなかった。

【0087】

A D H A P I - 細胞 / P W M - P B M C および対照 P W M - P B M C 細胞の最終的な収集結果については表1を参照されたい。

【0088】

自己混合リンパ球反応 (a M L R) および M L R

A D H A P I - 細胞 / P W M - P B M C および対照 P W M - P B M C 細胞 (刺激細胞 = S) を収集し、0.5% - メチルマンノピラノシドを追加したハンクス平衡塩類溶液で3回洗浄し、x - 線処理した (30Gy)。a M L R および M L R のために、スカラー濃度

40

50

(1×10^6 細胞 / ml から 6×10^4 細胞 / ml) の A D H A P I - 細胞 / P W M - P B M C または対照 P W M - P B M C 細胞を、10%熱不活性化ヒト A B 血清、2 mM L - グルタミン、100 U / ml ペニシリン、100 μ g / ml ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本 I s c o v e 培地中で、自己または同種 P B M C (1×10^6 細胞 / ml) (反応細胞 = R) に追加し、96 ウエル U - 底プレートに最終容積が 200 μ l / ウエルとなるように播いた。37 で 5% CO₂ 加湿雰囲気下での 6 日間のインキュベーションの後、100 μ l の培養上清を各ウェルから収集し、すぐにサイトカインのために使用するまで -80 で保存した。100 μ l の新鮮な培地を各ウェルに添加し、³H-T d R (1μ Ci / ウエル) で N / O パルス刺激を与えた；次いで収集し、R 細胞による ³H-T d R 取りこみを - カウンターにより測定した。

10

【0089】

A D H A P I - 細胞 / P W M - P B M C および対照 P W M - P B M C 細胞の表現型の特性結果については表 2 を参照されたい。

【0090】

A D H A P I - 細胞 / P W M - P B M C および対照 P W M - P B M C 細胞によって発現する C T A の R T - P C R 分析

【0091】

【化4】

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	0/4	3/4
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	1/4	3/4
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	3/4
SSX-2	0/4	3/4

20

【0092】

30

^a 陽性 / 被験 ; N T 、試験せず。

【0093】

a M L R において A D H A P I - 細胞 / P W M - P B M C または対照 P W M - P B M C 細胞によって刺激された自己 (a M L R) P B M C (R) の増殖結果については図 4 を参照されたい。

【0094】

a M L R において A D H A P I - 細胞 / P W M - P B M C または対照 P W M - P B M C 細胞 (S) によって刺激された自己 P B M C - (R) によって放出された I F N - の E L I S A 評価

結果については表 3 を参照されたい。

40

【実施例 5】

【0095】

A D H A P I - 細胞 / P H A - P B M C

P B M C 精製

P B M C を、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象のヘパリン処置した末梢血から、標準的なフィコール - ハイパック密度勾配遠心分離によって精製した。

【0096】

P H A - 活性化 P B M C の作成

P B M C (1.5×10^6 細胞 / ml) に P H A - M (10μ g / ml) および 100 U I / ml の r h I L - 2 を添加し、48 時間 37 で 5% CO₂ 加湿雰囲気下で、10%

50

熱不活性化ウシ胎仔血清を追加した RPMI 1640 培地（または 10% 热不活性化ヒト AB 血清を追加した基本 Iscove 培地）（これらには、2 mM L-グルタミン、100 U / ml ペニシリン、100 µg / ml ストレプトマイシン硫酸塩が追加されている（完全培地））中で培養した。

【0097】

ADHAPI - 細胞 / PHA - PBMC および対照 PHA - PBMC の作成

PHA - 活性化 PBMC に、12時間ごとに4回、1 µM の 5'-アザ-2'-デオキシシチジン (5-AZA-CdR) によってパルス刺激を与えた；次いで培地の半分を新鮮な PHA - M を含有しない完全培地と交換し、さらに 48 時間培養を続けた。次いで細胞を実験手順に使用および / または生存条件下で凍結した。対照細胞 (PHA - PBMC) を同様の実験条件下で培養したが、5-AZA-CdR によるパルス刺激は与えなかった。

10

【0098】

ADHAPI - 細胞 / PHA - PBMC および対照 PHA - PBMC の最終的な収集結果については表 1 を参照されたい。

【0099】

自己混合リンパ球反応 (aMLR) および MLR

ADHAPI - 細胞 / PHA - PBMC および対照 PHA - PBMC (刺激細胞 = S) を収集し、0.5% - メチルマンノピラノシドを追加したハンクス平衡塩類溶液で 3 回洗浄し、x - 線処理した (50 Gy)。aMLR および MLR のために、スカラー濃度 (1×10^6 細胞 / ml から 6×10^4 細胞 / ml) の ADHAPI - 細胞 / PHA - PBMC または対照 PHA - PBMC を、10% 热不活性化ヒト AB 血清、2 mM L-グルタミン、100 U / ml ペニシリン、100 µg / ml ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本 Iscove 培地中、自己または同種 PBMC (1×10^6 細胞 / ml) (反応細胞 = R) に添加し、96 ウエル U - 底プレートに最終容量が 200 µl / ウエルとなるように播いた。37°、5% CO₂ 加湿霧囲気下での 24 時間のインキュベーション後、100 µl の培養上清を各ウェルから収集し、すぐにサイトカインアッセイでの使用まで -80° で保存した。次いで、100 µl の新鮮な培地を各ウェルに添加し、培養をさらに 5 日間続け、そして培養に ³H-TdR (1 µCi / ウエル) によって O/N パルス刺激を与えた；次いでプレートを収集し、R 細胞による ³H-TdR 取りこみを - カウンターによって測定した。

20

30

【0100】

ADHAPI - 細胞 / PHA - PBMC および対照 PHA - PBMC の表現型の特性結果については表 2 を参照されたい。

【0101】

ADHAPI - 細胞 / PHA - PBMC および対照 PHA - PBMC により発現する CT A の RT - PCR 分析

【0102】

【化5】

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/12 ^a	12/12
MAGE-2	0/3	3/3
MAGE-3	0/12	12/12
MAGE-4	0/4	4/4
NY-ESO-1	0/6	6/6
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	0/6	6/6

40

【0103】

^a 陽性 / 被験 ; NT、試験せず。

50

【0104】

a M L R において A D H A P I - 細胞 / P H A - P B M C および対照 P H A - P B M C によって刺激された自己 P B M C (R) の増殖
結果については図 5 を参照されたい。

【0105】

A D H A P I - 細胞 / P H A - P B M C または対照 P H A - P B M C (S) によって刺激された同種 (M L R) および自己 (a M L R) P B M C (R) によって放出された I F N - の E L I S A 評価

結果については表 3 を参照されたい。

【実施例 6】

【0106】

A D H A P I - 細胞 / P H A + P W M - P B M C

P B M C 精製

P B M C を、疾患の進行状態にある癌患者または健康な対象のヘパリン処置または A C D - 抗凝固処理した末梢血から、標準的なフィコール - ハイバック密度勾配遠心分離によって精製した。

【0107】

P H A + P W M - 活性化 P B M C の作成

P B M C (1.5×10^6 細胞 / m l) に、 P H A - M ($10 \mu g / m l$) 、 P W M ($3 \mu g / m l$) 、 $100 \text{U} / \text{I} / \text{m l}$ の r h I L - 2 を添加し、 37°C で 48 時間 $5\% \text{CO}_2$ 加湿霧囲気下で、 10% 熱不活性化ヒト A B 血清 (または 10% 熱不活性化自己血清) 、 $2 \text{mM} \text{L-グルタミン}$ 、 $100 \text{U} / \text{m l}$ ベニシリン、 $100 \mu g / \text{m l}$ ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本 I s c o v e 培地 (完全培地) 中で培養した。

【0108】

A D H A P I - 細胞 / P H A + P W M - P B M C および対照 P H A + P W M - P B M C の作成

P H A + P W M - 活性化 P B M C に、 12 時間ごとに 4 回、 $1 \mu M$ の 5 - アザ - 2 ' - デオキシシチジン (5 - A Z A - C d R) によりパルス刺激を与えた ; 次いで培地の半分を P H A または P W M を含有しない新鮮な完全培地と交換し、 培養をさらに 48 時間続けた。 次いで細胞を実験手順に使用および / または生存条件下で凍結した。 対照細胞 (P H A + P W M - P B M C) を同様の実験条件下で培養したが、 5 - A Z A - C d R でのパルス刺激は与えなかった。

【0109】

A D H A P I - 細胞 / P H A + P W M - P B M C および対照 P H A + P W M - P B M C の最終的な収集

結果については表 1 を参照されたい。

【0110】

自己混合リンパ球反応 (a M L R) および M L R

A D H A P I - 細胞 / P H A + P W M - P B M C および対照 P H A + P W M - P B M C (刺激細胞 = S) を収集し、 0.5% - メチルマンノピラノシドを追加したハンクス平衡塩類溶液で 3 回洗浄し、 γ - 線処理した (50Gy) 。 a M L R および M L R のためにスカラ - 濃度 (1×10^6 細胞 / m l から 6×10^4 細胞 / m l) の A D H A P I - 細胞 / P H A - r h I L 2 - + P W M - P B M C または対照 P H A + P W M - P B M C を、 10% 熱不活性化ヒト A B 血清、 $2 \text{mM} \text{L-グルタミン}$ 、 $100 \text{U} / \text{m l}$ ベニシリン、 $100 \mu g / \text{m l}$ ストレプトマイシン硫酸塩を追加した基本 I s c o v e 培地中で、 自己または同種 P B M C (1×10^6 細胞 / m l) (反応細胞 = R) に添加し、 96 ウエル U - 底プレートに最終容積が $200 \mu l$ / ウエルとなるように播いた。 37°C で $5\% \text{CO}_2$ 加湿霧囲気下での 6 日間のインキュベーション後、 $100 \mu l$ の培養上清を各ウェルから収集し、 すぐにサイトカインアッセイに使用するまで - 80° で保存した。 次いで、 $100 \mu l$ の新鮮な培地を各ウェルに添加し、 培養に ${}^3\text{H-TdR}$ ($1 \mu \text{Ci} / \text{ウェル}$) で O / N

10

20

30

40

50

パルス刺激を与えた；次いでプレートを収集し、R細胞による³H-TdR取りこみをカウンターにより測定した。

【0111】

ADHAPI-細胞 / PHA + PWM - PBMC および対照 PHA + PWM - PBMC の表現型の特性

結果については表2を参照されたい。

【0112】

ADHAPI-細胞 / PHA + PWM - PBMC および対照 PHA + PWM - PBMC によって発現されるCTAのRT-PCR分析

【0113】

【化6】

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/7 ^a	7/7
MAGE-2	0/7	7/7
MAGE-3	0/7	7/7
MAGE-4	0/7	7/7
NY-ESO-1	0/7	7/7
GAGE-1-6	0/7	7/7
SSX-2	0/7	7/7

10

20

【0114】

^a陽性 / 被験

【0115】

aMLRにおいてADHAPI-細胞 / PHA + PWM - PBMC または対照 PHA + PWM - PBMC によって刺激された自己(aMLR)PBMC(R)の増殖

結果については図6を参照されたい。

【0116】

ADHAPI-細胞 / PHA + PWM - PBMC または対照 PHA + PWM - PBMC(S)によって刺激された同種(MLR)および自己(aMLR)PBMC(R)によって放出されたIFN-γのELISA評価

結果については表3を参照されたい。

【0117】

ADHAPI-細胞のインビオ腫瘍形成能

生ADHAPI-細胞 / PHA - rhIL2 - PWM - PBMC (12×10^6) およびその対照細胞 (14×10^6)、ADHAPI-細胞 / CD40L-B (8×10^6) およびその対照細胞 (8×10^6) またはx-線処理した (30Gy) ADHAPI-細胞 / PHA - rhIL2 - PWM - PBMC (12×10^6) およびその対照細胞 (14×10^6)、x-線処理した (50Gy) ADHAPI-細胞 / CD40L-B (15×10^6) およびその対照細胞 (18×10^6) の単一の皮下異種移植は、注入部位でも離れた(臨床調査可能な)部位でも腫瘍形成を誘導せず、ADHAPI-細胞投与後180日のBALB/c nu/nuマウスの総合的な健康状態および体重に影響を与えたなかった。

40

【0118】

生ADHAPI-細胞 / B-EBV (5×10^6 / 第1回注入; 1×10^7 / 第2回およびその後の注入) および対照B-EBV細胞 (5×10^6 / 第1回注入; 1×10^7 / 第2回およびその後の注入) またはx-線処理したADHAPI-細胞 / B-EBV (75Gy) (5×10^6 / 第1回注入; 1×10^7 / 第2回およびその後の注入) およびx-線処理した (75Gy) 対照B-EBV細胞 (5×10^6 / 第1回注入; 1×10^7 / 第2回およびその後の注入) の0、33、63および96日目の繰り返し皮下異種移植は、

50

注入部位でも離れた（臨床調査可能な）部位でも腫瘍形成を誘導せず、第1回投与後180日のBALB/c nu/nuマウスの総合的な健康状態および体重に影響を与えたかった。ADHAPI-細胞で処理された動物の総合的な健康状態および体重は、未処理またはB-EBV細胞を移植された対照動物と同等であった。

【0119】

多価細胞CTAワクチンとしてのADHAPI-細胞の利点

公知のCTAを癌患者にもっとも効率的に投与するため既に利用あるいは提案されている主な戦略と比較して、ADHAPI-細胞は全体として新規で革新的なアプローチであり、数多くの顕著な注目すべき利点を含む。これらのなかには以下のものがある：

【0120】

ADHAPI-細胞対遺伝的に未変化の細胞CTAワクチン

ADHAPI-細胞は、同時に複数の／すべてのメチル化・制御されたCTAを発現することから新規で独特のAPCワクチンである；内因的に合成されるため、CTAは直接および同時にADHAPI-細胞中のHLAクラスIおよびHLAクラスIIの両方の抗原プロセシング経路にアクセスすることができる（Jenne L. et al., Trends Immunol., 22: 102-107, 2001）。

【0121】

したがって、HLAクラスIおよびHLAクラスII抗原の両方が細胞膜に構成的に発現することから、ADHAPI-細胞は、内因的に合成されたCTAの免疫原性エピトープを同時にCD8+およびCD4+T自己リンパ球の両方に提示することができる；それゆえ、ADHAPI-細胞は同時にCTA-特異的CTLおよび体液性免疫応答を誘導／増幅させることができる。さらに、ADHAPI-細胞は、今までに同定、特徴づけがされていないメチル化・制御されたCTAを発現し、宿主T細胞に提示することができる（既知または未知のCTAの非免疫優性エピトープと同様である）。

【0122】

ADHAPI-細胞とは反対に、合成CTAペプチドによりパルス刺激を与えた、合成CTA全タンパク質によりパルス刺激を与えた、または全腫瘍細胞調製物によりパルス刺激を与えた自己APCワクチン（例えば、樹状細胞、PBMC）、および電気融合で作成した腫瘍細胞樹状細胞ハイブリッド（Kugler A. et al., Nat. Med., 6: 332-336, 2000. Tureci O. et al., Cancer Res., 56: 4766-4772, 1996. Eds）はともに以下の主要な制限を有する：

i) 生体外で与えられた合成CTAペプチド、全合成CTAタンパク質または腫瘍由来CTAは、インビボでの振る舞いが知られていないために、宿主免疫系の抗原提示の寿命に重大な影響を与える可能性がある；

ii) 細胞ワクチンのHLAクラスIおよび／またはHLAクラスII抗原に生体外で与えられる合成CTAペプチド、全合成CTAタンパク質または腫瘍由来CTAの量が制限されているため、投与したCTAの免疫原性をひどく妨害してしまう可能性がある；

iii) 患者のHLA表現型による拘束があり、いまだに比較的既知のHLAクラスI抗原の数が少なく、今までに同定されたCTAのHLAクラスII抗原に拘束される免疫原性エピトープの数が少ない；

iv) 十分な量の新鮮な腫瘍組織が入手しにくく、その腫瘍組織は腫瘍性病変において発現される様々なCTAを十分に代表するものでなければならない（Jenne L. et al., Trends Immunol., 22: 102-107, 2001）。

【0123】

ADHAPI-細胞によって内因的に合成されたCTAの発現は長期間持続する；したがって、生体外で合成されたCTAペプチドによりパルス刺激を与えたか、合成CTA全タンパク質によりパルス刺激を与えたか、または全腫瘍細胞調製物によりパルス刺激を与えた自己APCワクチンと異なり、ADHAPI-細胞によると宿主免疫応答のインビボでの刺激を長期にすることができる、患者への投与回数を少なくすることができます。

【0124】

10

20

30

40

50

この仮説は A D H A P I - 細胞はインビボでの長期腫瘍形成能が無いことにより A D H A P I - 細胞を生きた、X - 線処理されていない細胞ワクチンとして投与することが可能であろうということにより支持される。

【 0 1 2 5 】

さらに、A D H A P I - 細胞は一旦インビボで生理的な死を経ると、それらは内因的に合成される C T A ペプチドおよびタンパク質の「貯蔵所」として機能し、これによってさらにクロスプライミングの免疫機構を介して患者の樹状細胞による C D 8 + T 細胞に対する C T A の H L A クラス I - 拘束エピトープの効率的な追加的提示が可能となり、また、周知の抗原プロセシングの外来経路を介して C D 4 + T 細胞に対する C T A の H L A クラス I I - 拘束エピトープの提示も可能となる。

10

【 0 1 2 6 】

A D H A P I - 細胞はその A P C 機能を保持している；実際、それは効率的に自己および同種 P B M C の増殖および I F N - γ 放出を刺激する；さらに、A D H A P I - 細胞は多くの場合、それらに対応する対照細胞と比較してより強力な刺激細胞である。この点に関して、C T A に加えて、A D H A P I - 細胞は H L A クラス I 抗原および／または様々な同時刺激細胞／アクセサリー分子を、対応する対照細胞と比較してより高レベルに同時に発現することができる。これらの証拠により免疫原性が低く、いくつかの同時刺激／アクセサリー分子を構成的に発現しない自己腫瘍細胞と比べて、A D H A P I - 細胞は自己細胞ワクチンとして明かに大きな利点を有する。さらに、生体外で作成して増加させた自己樹状細胞と比較して、A D H A P I - 細胞ワクチンは完全に成熟した免疫適格性の A P C により作成される；この側面により細胞ワクチンの作成に利用してきた樹状細胞の成熟段階によって表れる、免疫原性よりも寛容に対して影響を与える可能性のある潜在的な制限が克服される。

20

【 0 1 2 7 】

その他の細胞ワクチンと比較して、複数の／全てのメチル化 - 制御された C T A を同時に発現する A D H A P I - 細胞ワクチンの生体外での作成は、簡単であり多くの場合迅速に行なえ、困難なインビトロの細胞操作を必要とせず、遺伝子操作を伴わず、自己腫瘍組織を必要とせず、健康な個人および癌患者の P B M C の両方から高い再現性をもって行なうことができる。

30

【 0 1 2 8 】

さらに、100%に近い A D H A P I - 細胞調製物が A P C において脱メチル反応が誘導できるすべての調査した C T A を発現する。これらの特徴により、A D H A P I - 細胞ワクチンの作成は標準化しやすく質（例えば選択された細胞表面分子のためのフローサイトメトリーや選択された C T A のための R T - P C R による）および効力（例えば選択された C T A のための定量的 R T - P C R による）を制御しやすい。さらに、その他の今日までの細胞ワクチンは患者に投与するたびに新たに調製しなければならず、明かに調製物の間に変動があったのに対し（例えば細胞生存度、ワクチン接種する細胞の表現型の特性、与える合成 C T A ペプチドまたは合成 C T A 全タンパク質または全腫瘍細胞調製物の量、電気融合による腫瘍細胞 - 樹状細胞ハイブリッドの作成効率など）、A D H A P I - 細胞ワクチンは、一旦調製して生存度、質および効力について確認したら、アリコットに保存し、適宜凍結し、生存条件下で治療用に用いるまで保存することができる。さらに、自己細胞ワクチンにパルス刺激を与えるため、または生体外で腫瘍細胞 - 樹状細胞ハイブリッドを作成するために自己腫瘍組織の生存度が必要とされないため、また繰り返し白血球血漿交換（leukapheresis）を行なうことによって大量に迅速に調製することができるため、A D H A P I - 細胞ワクチンは各患者のための治療薬の実践的な無制限のソースである。

40

【 0 1 2 9 】

内因的に合成され、H L A クラス I および H L A クラス I I 抗原プロセシング経路に直接かつ同時にアクセスすることができる複数の／すべてがメチル化 - 制御された C T A の同時発現を鑑みると、それらがいまだに同定および特徴づけされていないメチル化制御された C T A （および既知および未知の C T A の非免疫優性エピトープ）を発現して宿主 T 細

50

胞に提示する能力により、また、患者の HLA 表現型に応じた治療用途にしか用いることができなかつた今までに同定された CTA の、HLA クラス I 抗原 - および HLA クラス II 抗原 - 拘束免疫原性エピトープは限られた数しか知られていないため、ADHAPI - 細胞のさらなる利点はあらゆる複数の HLA クラス I および HLA クラス II 同種特異体に関する様々な CTA の既知のおよび未知の免疫原性エピトープを同時に提示することができるであろうということである。したがって、合成 CTA ペプチドによりパルス刺激を与えた、または合成 CTA 全タンパク質によりパルス刺激を与えた細胞ワクチンと比較して、ADHAPI - 細胞ワクチンによる治療は特定の HLA 表現型の患者に制限されない；したがってその腫瘍性病変が 1 または複数の CTA を発現するすべての癌患者が、その HLA 表現型にかかわらず ADHAPI - 細胞ワクチンによる治療の候補となりうる。この点で、今までに知られている CTA のなかの 1 または複数は、様々なヒストタイプの調査した悪性腫瘍のほとんどにおいて一般的に発現している；それゆえ、ADHAPI - 細胞によるワクチン接種は癌患者の大多数において好適である。MAGE、GAGE または NY-ESO-1 がヒト腫瘍の 96 % において発現しているということは重要な情報である (Cancer Immunol. Immunother. 50 : 3-15, 2001)。

10

【0130】

合成 CTA ペプチドによりパルス刺激を与えた細胞ワクチンおよび合成 CTA 全タンパク質によりパルス刺激を与えた細胞ワクチンは、細胞ワクチンの HLA クラス I および / または HLA クラス II 抗原に対して生体外で限られた量のタンパク質しか与えることができず、投与された CTA の免疫原性が大幅に低減されるのに対して、複数のすべてのメチル化 - 制御された CTA が同時発現することにより、ADHAPI - 細胞ワクチンは、1 または数個の CTA に対する治療過程に生じる CTA - 陰性腫瘍変異体の免疫選択という欠点を克服し、また、特定の腫瘍性病変においておこる特定の CTA の構成的に不均一な、またときには下方制御された発現という欠点を克服することができる。

20

【0131】

ADHAPI - 細胞ワクチンは、同時に複数の / すべての既知のメチル化 - 制御された CTA を発現し、その発現が DNA メチル化によって制御されるいまだに同定されていない CTA を発現する自己の機能的な APC によって構成される；さらに、ADHAPI - 細胞ワクチンは様々なヒストタイプの CTA - 陽性腫瘍を患う患者に利用できる。これらの機能的および表現型の特性は、今まで用いられてきた同種腫瘍細胞ワクチン（例えば、全プール (pooled) 腫瘍性細胞系の溶解液またはその非精製抽出物、プール腫瘍性細胞系からの脱落 (shed) 抗原）と比べて明かに有利である。実際、これらの腫瘍細胞ワクチンは既知のおよびいまだに未知の免疫学的に関連する CTA を含まないか、含むとしても不充分な量であり、免疫応答に関して CTA と競合する不適切な細胞性分を含み、毒性が強いであろう。また同種であるため、患者の免疫系による効率的なプロセシングが要求され、同じ組織タイプの悪性腫瘍を患う患者においてのみしか利用できない。

30

【0132】

ADHAPI - 細胞対遺伝的に改変された細胞 CTA ワクチン

ADHAPI - 細胞の作成は生体外での自己樹状細胞またはその他の自己 APC の遺伝子操作を伴わず、一方、遺伝的に改変されたワクチンの作成には遺伝子操作が要求され、これは形質移入または形質導入の後に選択された CTA を発現させるものである。さらに ADHAPI - 細胞と比較して、遺伝的に改変された細胞ワクチンには数々の問題点がある；それらには以下のものが挙げられる：

40

i) 利用可能な形質移入方法の効率が比較的低い。

ii) 細胞形質導入に利用されるウィルスベクターの抗原に対する細胞の免疫応答が誘導され、遺伝的に改変されたワクチン細胞の破壊が起こる。

iii) ワクチン投与を妨害する、既存のまたはワクチン接種により誘導される中和抗体が存在する。

iv) 形質導入細胞の生存、成熟および抗原提示能力に対してウィルスベクターが直接影響を与える (Jenne L. et al., Trends Immuno Z., 22 : 102-107, 2001)。

50

【 0 1 3 3 】

【表 1 】

表 1

ADHAPI-細胞および対照細胞の収集

細胞タイプ	ADHAPI-細胞	対照細胞
B-EBV ^a	114± 25	175± 51
PWM-B ^b	16±5	38± 17
CD40L-B ^c	75± 27	96±5
PWM-PBMC ^d	26± 11	45± 16
PHA-PBMC ^e	23± 10	63± 25
PHA+PWM-PBMC ^f	35± 28	63± 36

10

20

【 0 1 3 4 】

^a データは収集した細胞の、3回の(a)、4回の(b)、4回の(c)、4回の(d)、7回の(e)および5回の(f)の独立した実験においてその作成に用いた細胞数(100 %)に対する平均 % ± S D である。

【 0 1 3 5 】

【表 2 】

表2
自己対照細胞と比較した
ADHAPI-細胞の表現型の特性*

抗原	ADHAPI 細胞					
	CD40L-B ^{a†}	B-EBV ^b	Pwm-PBMC ^c	PWM-B ^d	PHA-PBMC ^e	PHA+PBM-PBMC ^f
HLA クラスI	ns ^f	ns	ns	ns	ns	0.02 ^g
HLA-A 座位	ns	ns	nt ^h	nt	0.004	nt
HLA-B 座位	ns	ns	nt	nt	0.05	nt
HLA-A アレル	0.01	ns	ns	ns	0.008	0.006
HLA-B アレル	ns	ns	nt	nt	ns	nt
CD40	ns	0.01	ns	0.005	ns	ns
CD54	0.03	0.01	ns	ns	0.003	ns
HLA クラスII	ns	ns	ns	0.03	ns	0.05
CD56	nt	nt	nt	ns	nt	nt
CD58	ns	ns	nt	nt	ns	ns
CD59	nt	nt	ns	ns	nt	0.04
CD80	0.05	ns	ns	ns	ns	ns
CD81	nt	0.002	nt	nt	ns	nt
CD86	0.008	nt	ns	ns	nt	ns

【0136】

* データは、6回の(a)、6回の(b)、4回の(c)、4回の(d)、6回の(e)、および2回の(f)の独立の実験においてフローサイトメトリーによって得た平均蛍光強度の平均値の対応スチュードントt-検定による比較によって得た。統計的有意差は、自己対照細胞と比較してADHAPI-細胞上の調査した抗原の発現が常に上方制御されていることを示した。

^f 有意差無し

^g p 値

^h 試験せず；

+ ADHAPI-細胞 / CD40L-B = 82 - 100% CD20+ ; 対照 CD40L-B 細胞 = 87 - 99% CD20+.

【0137】

10

20

30

40

50

【表3】

表3

ADHAPI-細胞 (S)または対照細胞 (S)によって刺激された
自己 (R)(aMLR)および同種(MLR)PBMC (R)によって放出された
IFN- γ の固相酵素免疫検定法 (ELISA)評価*

細胞タイプ	AMLR		対照細胞	ADHAPI- 細胞
	対照細胞	ADHAPI- 細胞		
B-EBV ^a	1770±919	2360±85 0.5 ^g	nt ^h	nt
PWM-B ^b	4330±629	5530±804 0.06	4040±721	4950±476 0.08
CD40L-B ^c	330 ±197	429 ±153 0.1	nt	nt
PWM-PBMC ^d	1500±135	1520±175 0.6	nt	nt
PHA-pBMC ^e	140 ±70	956 ±436 0.1	267 ±119	1040±545 0.07
PHA+PWM+ PBMC ^f	790 ±236	831 ±244 0.09	819 ±184	830 ±169 0.7

【0138】

* データは2回の(a)、4回の(b)、4回の(c)、4回の(d)、3回の(e)および4回の(f)の独立した実験において放出されたIFN- γ (pg/ml)の平均値±SDを表す。S/R比は、以下の通り: 3:1(a)、1:1(b)、1:2(e)、1:1(d)、1:1(e)、1:2(f)。IFN- γ 放出は培養開始から24時間後(a)、6日間後(b)、24時間後(c)、6日間後(d)、24時間後(e)および6日間後(f)にアッセイした。

^g 対応スチュードントt-検定によって得た対照細胞に対するp値。

^h 試験せず。

【図面の簡単な説明】

【0139】

【図1】図1は、ADHAPI-細胞/B-EBVまたは対照B-EBV細胞(S)によって刺激された自己(aMLR)PBMC(R)の増殖を示す。

【図2】図2は、ADHAPI-細胞/PWM-Bまたは対照PWM-B細胞(S)によって刺激された自己(aMLR)PBMC(R)の増殖を示す。

【図3】図3は、ADHAPI-細胞/CD40L-Bまたは対照CD40L-B細胞(S)によって刺激された自己(aMLR)PBMC(R)の増殖を示す。

【図4】図4は、ADHAPI-細胞/PWM-PBMCまたは対照PWM-PBMC細胞(S)によって刺激された自己(aMLR)PBMC(R)の増殖を示す。

【図5】図5は、ADHAPI-細胞/PHA-pBMCおよび対照PHA-pBMCによって刺激された自己(aMLR)PBMC(R)の増殖を示す。

【図6】図6は、ADHAPI-細胞/PHA-+PWM-PBMCまたは対照PHA-+PWM-PBMC(S)によって刺激された自己(aMLR)PBMC(R)の増殖を示す。

10

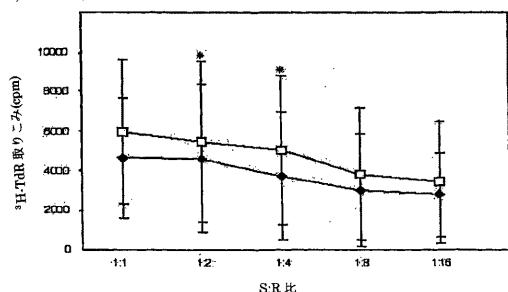
20

30

40

【図1】

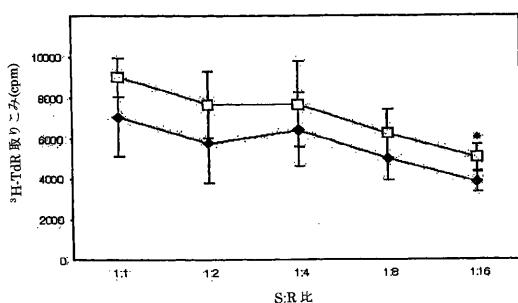
図1
ADHAPI細胞/B-EBV (□) または対照 (◆) B-EBV細胞 (S)によって刺激された自己(aMLR)PBMC (R)の増殖*



*データは4回の独立した実験において得られた [³H] - T d R取りこみの平均値(cpm)±SDを表す

【図2】

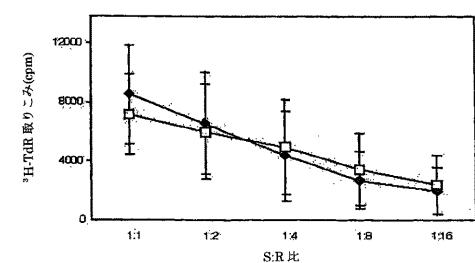
図2
ADHAPI細胞/PWM-B (□) または対照 (◆) PWM-B細胞 (S)によって刺激された自己(aMLR)PBMC (R)の増殖*



*データは4回の独立した実験において得られた [³H] - T d R取りこみの平均値(cpm)±SDを表す

【図4】

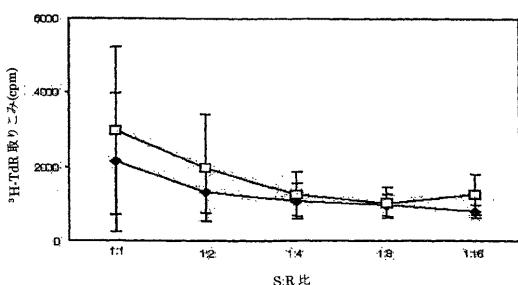
図4
ADHAPI細胞/PWM-PBMC (□) または対照 (◆) PWM-PBMC細胞 (S)によって刺激された同種(MLR)および自己(aMLR)PBMC (R)の増殖*



*データは4回の独立した実験において得られた [³H] - T d R取りこみの平均値(cpm)±SDを表す

【図5】

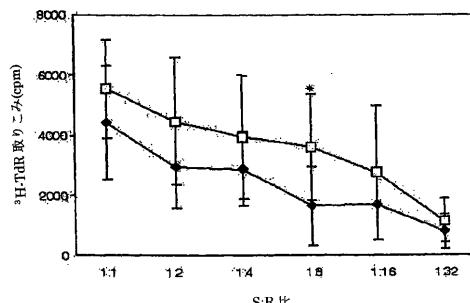
図5
ADHAPI細胞/PHA-PBMC (□) および対照 (◆) PHA-PBMC によって刺激された自己(aMLR)PBMC (R)の増殖*



*データは5回の独立した実験において得られた [³H] - T d R取りこみの平均値(cpm)±SDを表す

【図3】

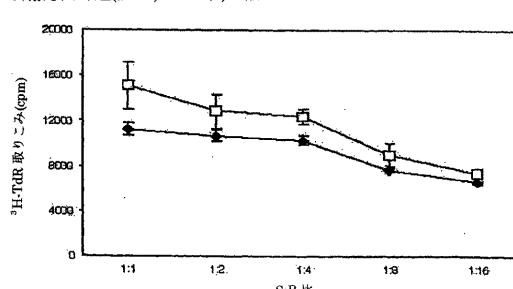
図3
ADHAPI細胞/CD40L-B (□) または対照 (◆) CD40L-B細胞 (S)によって刺激された自己(aMLR)PBMC (R)の増殖*



*データは8回の独立した実験において得られた [³H] - T d R取りこみの平均値(cpm)±SDを表す

【図6】

図6
ADHAPI細胞/PHA+PWM-PBMC (□) または対照 (◆) PHA+PWM-PBMC (S)によって刺激された自己(aMLR)PBMC (R)の増殖*



*データは4回の独立した実験において得られた [³H] - T d R取りこみの平均値(cpm)±SDを表す

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 February 2003 (13.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/012086 A1

- (51) International Patent Classification*: C12N 5/10, C12Q 1/48, A61K 39/00
- (21) International Application Number: PCT/IT02/00488
- (22) International Filing Date: 25 July 2002 (25.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: PCT/IT01/00419 30 July 2001 (30.07.2001) IT
- (71) Applicant (for all designated States except US): SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A. [IT/IT]; Viale Shakespeare, 47, I-00144 Rome (IT).

(72) Inventor; and

(75) Inventor/Applicant (for US only): DE SANTIS, Rita [IT/IT]; c/o Sigma-Tau Industrie, Farmaceutiche Riunite S.p.A., Via Pontina, Km. 30.400, I-00040 Pomezia (IT).

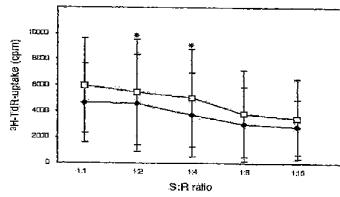
(74) Agents: SPADARO, Marco et al.; Viale dei Parioli, 160, I-00197 Roma (IT).

(54) Title: ANTIGEN PRESENTING CELLS, METHOD FOR THEIR PREPARATION AND THEIR USE FOR CANCER VACCINES



WO 03/012086 A1

Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/B-EBV (□) or control (◆) B-EBV cells (S)*

*Data represent the mean values (\bar{x}) \pm SD of [^{3}H]-TDR uptake obtained in four independent experiments.

- (57) Abstract: The present invention discloses a method of generation of antigen presenting cells, comprising: a. collecting said cells from a subject, b. activating said collected cells; c. culturing and optionally expanding ex vivo said activated cells; d. treating said cultured and optionally expanded cells with DNA hypomethylating agents so that said cells concomitantly express multiple tumor associated antigens. The cells obtainable according to the method of the present invention, as well as the cellular components thereof whether alone or in combination with said cells, are useful for prevention and treatment of malignancies of different histotype that constitutively express one or more of the multiple tumor associated antigens that are expressed in said cells. Conveniently, said cells and/or cellular components are in the form of a vaccine. Said vaccines are advantageous over the prior art in that as they concomitantly express multiple/all methylation-regulated tumor associated antigens.

**ANTIGEN PRESENTING CELLS, METHOD FOR THEIR
PREPARATION AND THEIR USE FOR CANCER VACCINES**

The present invention relates to the medical field, in particular to products, substances and compositions for use in methods for the treatment of human or animal subjects, more in particular for the diagnosis, treatment, and prevention of cancer. The present invention relates to cancer vaccines and methods for their preparation.

Background of the invention

Several tumor-associated antigens (TAA) constitutively expressed by transformed cells of different histotype have been recently identified (*Renkvist N. et al. Cancer Immunol. Immunother. 50:3-15, 2001*).

A number of these TAA can provide multiple immunodominant antigenic peptides recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes (CTL) in the context of specific HLA class I allospecificities (*Renkvist N. et al. Cancer Immunol. Immunother. 50:3-15, 2001*); furthermore selected TAA, such as for example MAGE (*Jager E. et al., J. Exp. Med., 187: 265-270, 1998*), NY-ESO-1 (*Jager E. et al., J. Exp. Med., 187: 265-270, 1998*), SSX (*Tureci O. et al. Cancer Res; 56(20):4766-72 1996*), tyrosinase (*Topalian S.L. et al., J. Exp. Med., 183: 1965-1971, 1996*), Melan-A/MART-1 (*Zarour H.M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 400-405, 2000*) concomitantly include epitopes recognized by CD4+ T lymphocytes in the context of specific HLA class II allospecificities,

thus being able to induce a TAA-directed humoral immune response (*Wang R.F., Trends Immunol., 22: 269-276, 2001*).

Different classes of TAA that may play a major role as therapeutic targets have been identified:

- 5 i) cancer-testis antigens (CTA), expressed in tumors of various histology but not in normal tissues, other than testis and placenta such as for example MAGE, GAGE, SSX SART-1, BAGE, NY-ESO-1, XAGE-1, TRAG-3 and SAGE, some of which represent multiple families (*Traversari C., Minerva Biotech., 11: 243-253, 1999*);
10
- ii) differentiation-specific antigens, expressed in normal and neoplastic melanocytes, such as for example tyrosinase, Melan-A/MART-1, gp100/Pmel17, TRP-1/gp75, TRP-2 (*Traversari C., Minerva Biotech., 11: 243-253, 1999*);
15
- iii) antigens over-expressed in malignant tissues of different histology but also present in their benign counterpart, for example PRAME (*Ikeda H. et al., Immunity, 6: 199-208, 1997*), HER-2/neu (*Traversari C., Minerva Biotech., 11: 243-253, 1999*), CEA, MUC-1 (*Monges G.M. et al., Am. J. Clin. Pathol., 112: 635-640, 1999*), alpha-fetoprotein (*Meng W.S. et al., Mol. Immunol., 37: 943-950, 2001*);
20
- iv) antigens derived from point mutations of genes encoding ubiquitously expressed proteins, such as MUM-1, β -

catenin, HLA-A2, CDK4, and caspase 8 (*Traversari C., Minerva Biotech.*, 11: 243-253, 1999);

v) viral antigens (*Traversari C., Minerva Biotech.*, 11: 243-253, 1999).

In addition to TAA, the cellular elements that are crucial for their effective immunogenicity and efficient recognition by host's T lymphocytes include HLA class I and HLA class II antigens, and co-stimulatory/accessory molecules (e.g., CD40, CD54, CD58, CD80, CD81) (*Fleuren G.J. et al., Immunol. Rev.*, 145: 91-122, 1995).

Among known classes of TAA, CTA are particularly suitable therapeutic targets for active specific immunotherapy of cancer patients, because of their limited expression in normal tissues and their known in vivo immunogenicity in living subjects, in particular mammals, humans included (*Jager E. et al., J. Exp. Med.*, 187: 265-270, 1998; *Rejnolds S.R. et al., Int. J. Cancer*, 72: 972-976, 1997). However, the heterogeneous expression of specific CTA among neoplastic lesions of different patients limits their biological eligibility to CTA-directed therapeutic vaccination. In fact, malignant lesions of distinct cancer patients can frequently express only selected CTA (*Sahin U. et al., Clin. Cancer Res.*, 6: 3916-3922, 2000), additionally down-regulated (*Lethž B. et al., Melanoma Res.*, 7: S83-S88, 1997) and/or heterogeneous (*dos Santos N.R. et al., Cancer Res.*, 60: 1654-1662, 2000) expression of specific CTA within individual neoplastic lesions has also been reported (*Jungbluth A.A.*

et al., *Br. J. Cancer*, 83: 493-497, 2000). These events, that can occur in vivo separately or concomitantly, may also contribute to the constitutively poor immunogenicity of malignant cells favouring disease progression (*Speiser D.E. et al.*, *J. Exp. Med.*, 186: 645-653, 1997), and may as well lead to in vivo immunoselection of neoplastic cells with the emergence of CTA-negative clones, in the course of immunologic treatment against specific CTA. Thus, immunotherapeutic approaches that focus on the immunologic targeting of distinct immunogenic epitopes of single CTA cannot be applied to large numbers of cancer patients, due to the absence or the possibly down-regulated expression of target CTA in their neoplastic lesions; furthermore, the immunological targeting of single CTA in vivo may generate CTA-loss tumor variants that efficiently escape treatment-induced/amplified CTA-specific immune response. An additional limit to therapeutic approaches that target single CTA derive from their heterogeneous intralesional expression (*Schultz-Thater E. et al.*, *Br. J. Cancer*, 83: 204-208, 2000), moreover, the presentation of distinct immunogenic epitopes of single CTA by specific HLA class I or HLA class II allospecificities allows treatment only of patients with certain defined HLA phenotypes.

To partially obviate to these limitations, recent therapeutic strategies are utilizing more than one immunogenic epitope of single or multiple CTA, or the whole CTA protein as vaccinating agent

(Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; <http://www.cancerresearch.org>).

Accordingly, there is a strongly felt need for a cancer vaccine which can overcome the drawbacks of the state of the art, in particular poor immunogenicity, in vivo immunoselection, the possibility to practice a cancer vaccine on a wide population of cancer patients, not limited to the specific single targeted CTA, or TAA, and in that the cancer vaccine not be "restricted" to selected HLA class I and/or HLA class II antigens.

Recent in vitro evidences have demonstrated that the expression of all CTA genes that have been investigated, among the so far known, is induced or up-regulated in neoplastic cells of different histology following their exposure to DNA hypomethylating agents (dos Santos N.R. et al., *Cancer Res.*, 60: 1654-1662, 2000; Weber J. et al.; *Cancer Res.*, 54: 1766-1771, 1994). CTA induction was found to be persistent being still detectable several weeks after the end of treatment. These findings support the notion that CTA belong to a class of TAA that is comprehensively regulated by DNA methylation. Furthermore, treatment of neoplastic cells with DNA hypomethylating agents induced a concomitant and persistent up-regulation of their expression of HLA class I antigens and of investigated HLA class I allospecificities, and also up-modulated the expression of the co-stimulatory/accessory molecules CD54 and CD58 (Coral S. et al., *J. Immunother.*, 22: 16-24, 1999).

Notwithstanding their promising therapeutic profile, CTA, however, show a number of drawbacks, such as that specific CTA so far investigated show a heterogeneous expression within distinct neoplastic lesions, with the co-existence of CTA-positive and - negative malignant cells; that only selected CTA among the ones so far identified may be expressed on distinct neoplastic lesions, independently from their histological origin; that threshold levels of expression of specific CTA on neoplastic cells are required for their recognition by CTA-specific CTL and that vaccination against a specific CTA requires an appropriate HLA class I and, for selected CTA also HLA class II phenotype of patients.

Due to their unique biologic features, selected CTA are being utilized in different clinical trials that aim to induce or potentiate a CTA-specific immune response in patients affected by malignant diseases of different histology. Diverse strategies are currently utilized for the in vivo administration of therapeutic CTA in the clinic or for the generation of more powerful vaccinating tools at pre-clinical level (*dos Santos N.R. et al., Cancer Res., 60: 1654-1662, 2000; Weber J. et al., Cancer Res., 54: 1766-1771, 1994*) as the person expert in the art is aware of. Noteworthy, mainly due to a number of technical and practical limitations, only a limited number of immunogenic epitopes of specific CTA, or single whole CTA protein are currently utilized in the clinic for the therapeutic purposes. Following is a list including the main strategies already utilized, or

hypothesised so far, to administer CTA to cancer patients; it should also be emphasised that identical strategies are utilized to administer to patients TAA that belong to the other classes of so far known TAA, and that different adjuvants and/or carriers are sometimes utilized to potentiate the immunogenicity of therapeutic agents.

- Synthetic peptides representing immunogenic epitope(s) of single or multiple CTA recognized by CD8+ T cells (*Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; http://www.cancerresearch.org*).
- Liposome-encapsulated synthetic peptides representing immunogenic epitope(s) of single or multiple CTA (*Steller M.A. et al., Clin. Cancer Res., 4: 2103-2109, 1998*).
- Whole synthetic protein of a single CTA (*Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; http://www.cancerresearch.org*).
- Recombinant viral vectors expressing epitopes of single or multiple CTA recognized by CD8+ T cells (*Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001*).
- Naked DNA shooting (*Park J.H. et al., Mol. Cells, 9: 384-391, 1999*).
- Autologous PBMC/macrophages loaded ex vivo with synthetic peptides representing epitopes of single or multiple CTA recognised by CD8+ T cells (*Conference on Cancer Vaccines, Eds.*

Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; <http://www.cancerresearch.org>.

- Autologous dendritic cells loaded ex vivo with synthetic peptides representing epitopes of single or multiple CTA recognised by CD8+ T cells or loaded with whole synthetic protein of a single CTA, or loaded with whole tumour cell preparations (*Conference on Cancer Vaccines, Eds. Ferrantini M. and Belardelli F., Rome-Italy, November 15-16, 1999; <http://www.cancerresearch.org>; Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001*).
- Autologous dendritic cells transfected or transduced ex vivo with DNA/RNA to express full-length CTA or fused with whole tumor cells (*Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001*);
- Autologous T lymphocytes transfected or transduced ex vivo with DNA/RNA to express full-length CTA.

As far as autologous cancer vaccines, which the present invention refers to as the main object, a number of patent references may be cited. WO 99/42128 discloses methods for determining the HLA transcription or expression profile of a solid tumor, for selection of appropriate treatments and/or for monitoring progress of the tumor. The purpose of this reference is to inhibit some isoforms of HLA-G in order to increase the native antitumor response. The method comprises extracting cells from a tumor sample, lysing them and reacting the lysate with antibodies directed against HLA Class I antigens.

DE 29913522 provides an apparatus for preparing a cancer vaccine by submitting tumor cells extracted from a patient to pressures of 200-9000 bar, in order to kill or damage the cells while leaving their surface intact then reinjecting the cells to the patient.

5 WO 00/02581 discloses a telomerase protein or peptide, capable of inducing a T cell response against an oncogene or mutant tumor suppressor protein or peptide. Said peptides are used for a cancer vaccine.

WO 00/18933 discloses DNA constructs causing expression of
10 functionally inactive, altered antigens which are unaltered with respect to the efficiency of transcription and translation of DNA, RNA or the generation of antigenic peptides. The patient affected by cancer is treated by the administration of the RNA or plasmid DNA encoding an altered human cancer associated antigen, in particular
15 PSMA antigen. In a different embodiment, autologous dendritic cells that have been exposed in vitro to the RNA or the plasmid DNA are used as vaccine.

WO 00/20581 discloses a cancer vaccine comprising a new isolated MAGE-A3 human leukocyte antigen (HLA) class II-binding
20 peptide. The peptide can also be used to enrich selectively a population of T lymphocytes with CD4+ T lymphocytes specific the said peptide. Said enriched lymphocytes are also used as cancer vaccine.

WO 03/012086

PCT/IT02/00488

10

WO 00/25813 discloses universal Tumor-Associated Antigen (TAA) binding to a major histocompatibility complex molecule. The method of treatment comprises administering a nucleic acid molecule encoding the TAA, which is processed by an antigen-presenting cell which activates cytotoxic lymphocytes and kills cells expressing TAA. Other than the specific hTERT peptide, the identification of different TAAs is enabled by a complex computer-aided method synthesis of the computer-designed peptide and biological assays for confirmation of the usefulness of the peptide.

10 WO 00/26249 discloses fragments of human WT-1 protein or human gata-1 protein. These peptide fragments are used for cancer vaccine through activation of cytotoxic T lymphocytes (CTL).

15 US 6077519 provides a cancer vaccine comprising a composition of T cell epitopes recovered through acid elution of epitopes from tumor tissue.

20 WO 00/46352 provides a cancer vaccine comprising human T lymphocytes that express a functional CD86 molecule. T lymphocytes are obtained by subjecting T cells to at least two sequential stimuli, each involving at least one activator (an antibody anti CD2, 3 or 28) and a cytokine (interleukine) that stimulates T cell proliferation.

Coral S. et al. *Journal of Immunotherapy* 22(1):16-24, 1999, teach that the immunogenic potential of melanoma cells and their recognition by the host's cytotoxic cells depend on the presence and

on the level of expression of Human Leukocytic Antigen (HLA) class I antigens, costimulatory molecules and melanoma-associated antigens (MAA) on neoplastic cells. There may be a suggestion that 5-AZA-CdR for use in active and/or passive specific immunotherapy 5 for human melanoma through its systemic administration might enhance melanoma cells recognition by cytotoxic cells.

Momparler, *Anticancer Drugs Apr; 8(4):358-68, 1997*, mentions 5-AZA-CdR as chemotherapeutic.

Shichijo S. et al *Jpn. J. Cancer Res. 87, 751-756, July 1996*,
10 investigated whether the demethylating agent 5-AZA-CDR induces
MAGE 1, 2, 3 and 6 in normal and malignant lymphoid cells in order
to better understand the mechanisms of their expression in the
cells. The authors showed the induction of investigated CTA in
selected samples tested and discussed that demethylation is not a
15 sufficient stimulus to induce MAGE genes in all cases and that their
results should lead to a better understanding of mechanisms of
MAGE genes expression in cells. No perspective therapeutic
implications were suggested.

Abstract of the Invention

20 It has now been found a method of generation of antigen presenting cells, comprising:

- a) collecting said cells from a subject,
- b) activating said collected cells;

- c) culturing and optionally expanding ex vivo said activated cells;
- d) treating said cultured and optionally expanded cells with DNA hypomethylating agents so that said cells concomitantly express multiple tumor associated antigens.

10 The cells obtainable according to the method of the present invention, as well as the cellular components thereof whether alone or in combination with said cells, are useful for prevention and treatment, in particular in a mammal, human beings included, of malignancies of different histotype that constitutively express one or 10 more of the multiple tumor associated antigens that are expressed in said cells.

In the foregoing of the present invention, said cells are briefly named ADHAPI-Cells.

15 Most conveniently, the cells obtainable from the method above mentioned are used in the form of a cancer vaccine.

In the foregoing, the present invention shall be disclosed in detail also by means of examples and figures, wherein:

Figure 1 shows the proliferation of autologous (aMLR)PBMC (R) 20 stimulated with ADHAPI-Cells/B-EBV or control B-EBV cells (S);

Figure 2 shows the proliferation of autologous (aMLR)PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PWM-B or control PWM-B cells (S);

Figure 3 shows the proliferation of autologous (aMLR)PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/CD40L-B or control CD40L-B cells (S);

Figure 4 shows the proliferation of autologous (aMLR)PBMC (R) 5 stimulated with ADHAPI-Cells/PWM-PBMC or control PWM-PBMC cells (S);

Figure 5 shows the proliferation of autologous (aMLR)PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PHA-PBMC and control PHA-PBMC;

Figure 6 shows the proliferation of autologous (aMLR)PBMC (R) 10 stimulated with ADHAPI-Cells/PHA-+PWM-PBMC or control PHA-+PWM-PBMC (S);

Detailed Disclosure of the Invention

According to the present invention, there is virtually no limit as to the type of cells that can be treated in order to generate the 15 antigen-presenting cells, provided that they are suitably activated and treated with a hypomethylating agent.

According to the present invention, the cells are collected from a subject, in particular a mammal, more in particular a human. In a possible embodiment of the present invention, said human is a 20 cancer patient.

In a first preferred embodiment of the present invention, antigen-presenting cells obtainable by the method above described are immune cells.

In a second preferred embodiment of the present invention, antigen-presenting cells obtainable by the method above described are non-immune cells.

The cells obtainable according to present invention can express
5 shared immunodominant cancer antigens or can express shared not immunodominant cancer antigens.

In certain specific embodiments of the present invention, cells suitable for the method herein disclosed are:

- Epstein-Barr virus-immortalized, DNA hypomethylating agent-treated B-lymphoblastoid cell lines, generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects (ADHAPI-Cells/B-EBV).
- Pokeweed mitogen (PWM)-activated, DNA hypomethylating agent-treated B-lymphocytes, generated from B-lymphocytes purified from PBMC of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects (ADHAPI-Cells/PWM-B).
- CD40 activated, DNA hypomethylating agent-treated B-lymphocytes, generated from B-lymphocytes purified from PBMC of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects (ADHAPI-Cells/CD40-B).
- Pokeweed mitogen (PWM)-activated, DNA hypomethylating agent-treated PBMC, generated from purified PBMC of

cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects (ADHAPI-Cells/PWM-PBMC)

- Phytohemagglutinin (PHA) + recombinant human interleukin-2 (rhIL-2)-activated, DNA hypomethylating agent-treated PBMC, generated from purified PBMC of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects (ADHAPI-Cells/PHA-rhIL2-PBMC)
- Phytohemagglutinin (PHA) + recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) + pokeweed mitogen (PWM)-activated, DNA hypomethylating agent-treated PBMC, generated from purified PBMC of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects (ADHAPI-Cells/PHA-rhIL2-PWM-PBMC)
- Dendritic cells, monocytes, macrophages.
- CD34+ cells, fibroblasts, stem cells, fibroblasts and cheratinocytes.

The cells obtainable by the method according to the present invention are suitable for use as agents for the prevention and treatment of malignancies of different histotype that constitutively express one or more of cancer antigens, whether immunodominant or not immunodominant.

Another possible embodiment of the present invention is applicable to those cases wherein it is not wished or necessary to utilize the direct antigen presenting ability of vaccinating cells. In

this case, vaccinating cells or their cellular components obtainable by the method of the present invention can be used as "reservoir" of pooled cancer antigens to vaccinate patients.

In a preferred embodiment of the present invention, the
5 selected TAA are CTA.

This embodiment of the present invention offers to the skilled person the following advantages:

CTA are immunogenic since they include epitopes recognized by HLA class I-restricted CTA-specific CD8+ CTL.

10 CTA are immunogenic since they include epitopes recognized by HLA class II-restricted CTA-specific CD4+ T lymphocytes.

Selected CTA simultaneously include epitopes presented by HLA class I and by HLA class II antigens; thus, selected CTA can concomitantly induce CD8+ CTL and CD4+ T lymphocytes reactions.

15 CTA are not expressed in benign tissues with the exception of testis and placenta.

Different CTA can be concomitantly expressed in neoplastic cells of solid and hemopoietic malignancies, providing multiple therapeutic targets that are co-expressed on transformed cells.

20 Distinct CTA are homogeneously expressed among concomitant and sequential metastatic lesions of given patients.

Distinct CTA can be expressed in malignant tissues of different histological origin providing common therapeutic targets shared by human neoplasia regardless of their specific hystotype.

Distinct CTA may encode for multiple immunogenic peptides presented in the context of different HLA class I and HLA class II allospecificities.

In a further embodiment of the present invention, histone deacetylase inhibitors can synergize with DNA hypomethylating agents in inducing/up-regulating the expression of CTA, of HLA antigens and of co-stimulatory/accessory molecules on neoplastic cells of different histology. In fact, DNA methylation and histone deacetylation act as synergistic layers for the epigenetic gene silencing in cancer (*Fuks F. et al., Nat. Genet., 24: 88-91, 2000*), and a strong reactivation of selected hypermethylated genes, with tumor suppressor function, has been observed in colorectal carcinoma cells after treatment with histone deacetylase inhibitors, following an initial minimal DNA demethylation (*Cameron E.E. et al., Nat. Genet., 21: 103-107, 1999*).

The activation step in the method according to the present invention is carried out following the general common knowledge, in any case reference can be made to *Current Protocols in Immunology, Coligan J.E. et al. Eds, Wiley*.

20 The demethylation treatment in the method according to the present invention is generally well-known and the literature generally reports the procedure, for further information see also *Santini V. et al., Ann. Intern. Med., 134: 573-586, 2001*.

Hypomethylating agents, also known in the art as demethylating agents, useful for the purposes of the present invention are well known in the art. DNA demethylating agents are widely disclosed in the literature, see for example WO 01/29235, US 5,851,773. A preferred DNA demethylating agent is 5-aza-cytidine or, more preferred, 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR).

Antigen presenting cells according to the present invention are suitable for the preparation of cancer vaccines. In a preferred embodiment of the present invention, said vaccines are autologous 10 vaccines.

In another preferred embodiment of the present invention, said vaccines are allogeneic vaccines. In this embodiment, the cells obtainable according to the method above disclosed may be used both as antigen presenting cells and as in the form of "reservoir" of 15 pooled cancer antigens, whether as cells or cellular components thereof.

In a still further another embodiment of the present invention, the cells and/or the cellular components can be used in a method for generating effector immune cells, said effector immune cells 20 being used for the preparation of a product useful in the well-known adoptive immunotherapy. In another embodiment of the present invention, the vaccine herein disclosed can be used in combination with a systemic pre-treatment of the cancer patient with a hypomethylating agent, for example decitabine. This embodiment

may be performed with an article of manufacture, for example a kit, comprising a vaccine according to the present invention and a pharmaceutical composition suitable for systemic administration of a hypomethylating agent, for example decitabine.

5 Vaccines can be prepared according to techniques well-known to the person skilled in this art, just resorting to the general common knowledge. For example, the patent references mentioned in the present description are a sufficient disclosure for the preparation of cancer vaccines, see for example WO 00/25813 or WO 00/46352.

10 The skilled person will have no difficulty in establishing the proper manner for using the vaccines according to the present invention, in particular as to the administration protocol.

The following examples further illustrate the present invention.

EXAMPLE 1

15 **ADHAPI-Cells/B-EBV**

PBMC purification

PBMC were purified by standard Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation from heparinized peripheral blood of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects.

20 Generation of autologous B-lymphoblastoid cell lines by the immortalization of PBMC with Epstein-Barr Virus (EBV)

B-EBV+ lymphoblastoid cell lines were generated by incubating PBMC with supernatant from B95.8 marmoset cell line at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, in RPMI 1640 medium

supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (or human AB serum) and 2 mM L-glutamine.

Generation of ADHAPI-Cells/B-EBV and control B-EBV cells

B-EBV+ lymphoblastoid cell lines (7.5×10^5 cells/ml) were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (or 10% heat-inactivated human AB serum) and 2 mM L-glutamine at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, and pulsed four times with 1 µM 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR) every 12 h; then, half of the culture medium was replaced with fresh medium and cultures were allowed to proceed for additional 48 h. Then cells were utilized for experimental procedures and/or frozen under viable conditions. Control cells (B-EBV cells) were cultured under similar experimental conditions but without pulses of 5-AZA-CdR.

15 Final recovery of ADHAPI-Cells/B-EBV and control B-EBV cells

For the results, see Table I.

Autologous Mixed Lymphocyte Reaction (aMLR) and MLR

ADHAPI-Cells/B-EBV and control B-EBV cells (stimulators=S) were collected, washed twice with Hanks' balanced salt solution (HBSS) and x-ray treated (75 Gy). For aMLR and MLR scalar concentrations (from 1×10^6 cells/ml to 6×10^4 cells/ml) of ADHAPI Cells/B-EBV or control B-EBV cells were added to autologous or allogeneic PBMC (1×10^6 cells/ml) (responder=R) in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum,

2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulphate, and seeded in 96 well U-bottom plates to a final volume of 200 µl/well. After a 24 h incubation at 37°C in a 5%CO₂ humidified atmosphere, 100 µl of culture supernatant were collected and 5 immediately stored at -80°C until use for cytokine assay. Then, 100 µl of fresh medium were added to each well and cultures were allowed to proceed for additional five days, when cultures were pulsed O/N with ³H-TdR (1 µLCi/well); then plates were harvested and ³H-TdR incorporation by R cells was measured by a β-counter.

10 Proliferation of autologous PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/B-EBV or control B-EBV cells (S) in aMLR

See Figure 1.

15 Phenotypic profile of ADHAPI-Cells/B-EBV and control B-EBV cells

See Table II for results.

15 RT-PCR analysis of CTA expressed by ADHAPI-Cells/B-EBV and control B-EBV cells

Experimental conditions and primers utilized to assess CTA expression on investigated cells were as follows:

20 for MAGE-1, -2, -3, -4 *Brasseur, F., et al. Int. J. Cancer* 63: 375-380, 1995; for GAGE 1-6 *Van den Eynde, B., et al. J. Exp. Med.* 182: 689-698, 1995; for NY-ESO-1 *Stockert, E. et al. J. Exp. Med.* 187: 265-270, 1998; for SSX-2 ; Sahin, U., et al. *Clin. Cancer Res.* 6: 3916-3922, 2000.

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	NT	NT
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	NT	NT
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	2/4	4/4

^a positive/tested; NT, not tested;

ELISA evaluation of IFN-γ released by PBMC (R) stimulated in aMLR by ADHAPI-Cells/B-EBV or control B-EBV cells (S)

5 See Table III for results.

EXAMPLE 2

ADHAPI-Cells/PWM-B

B-Lymphocyte purification

PBMC were purified by standard Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation from heparinized peripheral blood of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects, and purified B lymphocytes were obtained by conventional E rosetting technique utilizing neuraminidase-treated sheep red blood cells.

Generation of PWM-activated B cells

15 Purified B-Lymphocytes (1.5×10^6 cells/ml) were added with PWM (3 µg/ml) and cultured for 48 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulphate.

20 Generation of ADHAPI-Cells/PWM-B and control PWM-B cells

PWM-activated B-Lymphocytes were pulsed four times with 1 μ M 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR) every 12 h; then, half of the culture medium was replaced with fresh medium and cultures were allowed to proceed for additional 48 h. Then cells were utilized for 5 experimental procedures and/or frozen under viable conditions. Control cells (PWM-B) were cultured under similar experimental conditions but without pulses of 5-AZA-CdR.

Final recovery of ADHAPI-Cells/PWM-B and control PWM-B cells

10 See Table I for results

Autologous Mixed Lymphocyte Reaction (aMLR) and MLR

ADHAPI-Cells/PWM-B and control PWM-B cells (stimulators=S) were collected, washed three times with Hanks' balanced salt solution supplemented with 0.5% α -methylmannopyranoside, and 15 x-ray treated (30 Gy). For aMLR and MLR scalar concentrations (from 1×10^6 cells/ml to 6×10^4 cells/ml) of ADHAPI-Cells/PWM-B or control PWM-B cells were added to autologous or allogeneic PBMC (1×10^6 cells/ml) (responder=R) in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mM 20 L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin sulphate, and seeded in 96 well U-bottom plates to a final volume of 200 μ l/well. After a 6 day incubation at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, 100 μ l of culture supernatant were collected from each well and immediately stored at -80°C until use for cytokine assay.

Then, 100 µl of fresh medium were added to each well and cultures were pulsed O/N with ^3H -TdR (1 µCi/well); then, plates were harvested and ^3H -TdR incorporation by R cells was measured by a β -counter.

5 Phenotypic profile of ADHAPI-Cells/PWM-B and control PWM-B cells.

See Table II for results

RT-PCR analysis of CTA expressed by ADHAPI-Cells/PWM-B and control PWM-B cells

10

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	0/4	4/4
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	0/4	4/4
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	1/4	4/4

^a positive/tested; NT, not tested.

Proliferation of autologous PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PWM-B or Control PWM-B cells (S) in aMLR

15

See Figure 2 for results.

ELISA evaluation of IFN- γ released by allogeneic (MLR) and autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PWM-B or control PWM-B cells (S)

See Table III for results.

EXAMPLE 3**ADHAPI-Cells/CD40L-B****PBMC purification**

PBMC were purified by standard Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation from heparinized or acid citrate dextrose (ACD)-anticoagulated peripheral blood of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects.

Generation of NIH3T3-CD40L-activated PBMC

PBMC (2×10^6 cells/ml) were co-cultured with semiconfluent, 10 x-ray treated (75 Gy) NIH3T3-CD40L at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mM L-glutamine, 2 ng/ml recombinant human (rh) interleukin 4 (rhIL-4), 50 µg/ml human transferrin, 5 µg/ml rh insulin, 5.5×10^{-7} M cyclosporin A (CsA), 100 15 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin sulphate (complete medium). After six days of incubation, PBMC were collected, washed twice with HBSS, resuspended at 1×10^6 cells/ml in complete medium and co-cultured for additional 3 days at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere with NIH3T3-CD40L freshly prepared as 20 described above. This procedure was repeated every 2-3 days to a maximum culture time of 16-18 days.

Generation of ADHAPI-Cells/CD40L-B and control CD40L-B cells

After 16-18 days of culture, activated PBMC were harvested and restimulated with NIH3T3-CD40L as described above; after an O/N incubation at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, cultures were pulsed four times with 1 μM 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR) every 12 h; then, cells were harvested and restimulated with NIH3T3-CD40L as described above and cultures were allowed to proceed for additional 48 h. Then cells were utilized for experimental procedures and/or frozen under viable conditions. Control cells (CD40L-B cells) were cultured under similar experimental conditions but without pulses of 5-AZA-CdR.

Final recovery of ADHAPI-Cells/CD40L-B and control CD40L-B cells

See Table I for results.

Autologous Mixed Lymphocyte Reaction (aMLR) and MLR

ADHAPI-Cells/CD40L-B and control CD40L-B cells (stimulators=S) were collected, washed three times with Hanks' balanced salt solution and x-ray treated (50 Gy). For aMLR and MLR scalar concentrations (from 1x10⁶ cells/ml to 6x10⁴ cells/ml) of ADHAPI-Cells/CD40L-B or control CD40L-B cells were added to autologous or allogeneic PBMC (1x10⁶ cells/ml) (responder=R) in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin sulphate, and seeded in 96 well U-bottom plates to a final volume of 200 μl/well. After a 24 h incubation at 37°C in a

CO₂ humidified atmosphere, 100 µl of culture supernatant were collected and immediately stored at -80°C until use for cytokine assay. Then, 100 µl of fresh medium were added to each well and cultures were allowed to proceed for additional 5 days when cultures 5 were pulsed O/N with ³H-TdR (1 µCi/well); then plates were harvested and ³H-TdR incorporation by R cells was measured by a β-counter.

Phenotypic profile of ADHAPI-Cells/CD40L-B and control CD40L-B cells

10 See Table II for results.

RT-PCR analysis of CTA expressed by ADHAPI-Cells/CD40L-B and control CD40L-B cells

15

^a positive/tested.

Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/CD40L-B or control CD40L-B cells (S) in aMLR

See Figure 3 for results.
20 ELISA evaluation of IFN-γ released by PBMC (R) stimulated in aMLR by ADHAPI-Cells/CD40L-B or control CD40L-B cells (S)

S-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/10 ^a	10/10
MAGE-2	0/10	9/10
MAGE-3	0/11	10/11
MAGE-4	0/11	11/11
NY-ESO-1	0/14	14/14
GAGE-1-6	0/14	14/14
SSX-2	0/14	13/14

See Table III for results.

EXAMPLE 4

ADHAPI-Cells/PWM-PBMC

PBMC purification

5 PBMC were purified by standard Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation from heparinized peripheral blood of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects.

Generation of PWM-activated PBMC

10 PBMC (1.5×10^6 cells/ml) were added with PWM (3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and cultured for 48 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin sulphate.

15 **Generation of ADHAPI-Cells/PWM-PBMC and control PWM-PBMC cells**

PWM-activated PBMC were pulsed four times with 1 μM 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR) every 12 h; then, half of the culture medium was replaced with fresh medium and cultures were allowed to proceed for additional 48 h. Then cells were utilized for 20 experimental procedures and/or frozen under viable conditions. Control cells (PWM-PBMC) were cultured under similar experimental conditions but without pulses of 5-AZA-CdR.

Final recovery of ADHAPI-Cells/PWM-PBMC and control PWM-PBMC cells

See Table I for results.

Autologous Mixed Lymphocyte Reaction (aMLR) and MLR

ADHAPI-Cells/PWM-PBMC and control PWM-PBMC cells (stimulators=S) were collected, washed three times with Hanks' balanced salt solution supplemented with 0.5% α -methylmannopyranoside, and x-ray treated (30 Gy). For aMLR and MLR scalar concentrations (from 1×10^6 cells/ml to 6×10^4 cells/ml) of ADHAPI-Cells/PWM-PBMC or control PWM-PBMC cells were added to autologous or allogeneic PBMC (1×10^6 cells/ml) (responder=R) in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin sulphate, and seeded in 96 well U-bottom plates to a final volume of 200 μ l/well. After a 6 day incubation at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, 100 μ l of culture supernatant were collected from each well and immediately stored at -80°C until use for cytokine 100 μ l of fresh medium were added to each well were pulsed O/N with ³H-TdR (1 μ Ci/well); then harvested and ³H-TdR incorporation by R cells was measured by a β -counter.

Phenotypic profile of ADHAPI-Cells/PWM-PBMC and control

20 PWM-PBMC cells

See Table II for results.

RT-PCR analysis of CTA expressed by ADHAPI-Cells/PWM-PBMC and control PWM-PBMC cells

WO 03/012086

PCT/IT02/00488

30

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/4 ^a	4/4
MAGE-2	0/4	3/4
MAGE-3	0/4	4/4
MAGE-4	1/4	3/4
NY-ESO-1	0/4	4/4
GAGE-1-6	0/4	3/4
SSX-2	0/4	3/4

^apositive/tested; NT, not tested.

Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PWM-PBMC or control PWM-PBMC cells (S) in

5 aMLR

See Figure 4 for results.

ELISA evaluation of IFN- γ released by autologous PBMC -(R) stimulated in aMLR by ADHAPI-Cells/PWM-PBMC or control PWM-PBMC cells (S)

10 Sec Table III for results.

EXAMPLE 5**ADHAPI-Cells/PHA-PBMC****PBMC purification**

PBMC were purified by standard Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation from heparinized peripheral blood of cancer patients in advanced stage of disease or healthy subjects.

Generation of PHA-activated PBMC

PBMC (1.5×10^6 cells/ml) were added with PHA-M (10 μ g/ml) and 100 UI/ml rhIL-2, and cultured for 48 h at 37°C in a 5% CO₂

humidified atmosphere in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (or in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulphate 5 (complete medium).

Generation of ADHAPI-Cells/PHA-PBMC and control PHA-PBMC

PHA-activated PBMC were pulsed four times with 1 µM 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR) every 12 h; then, half of the 10 culture medium was replaced with fresh complete medium without PHA-M and cultures were allowed to proceed for additional 48 h. Then cells were utilized for experimental procedures and/or frozen under viable conditions. Control cells (PHA-PBMC) were cultured under similar experimental conditions but without pulses of 15 5-AZA-CdR.

Final recovery of ADHAPI-Cells/PHA-PBMC and control PHA-PBMC

See Table I for results.

Autologous Mixed Lymphocyte Reaction (aMLR) and MLR

20 ADHAPI-Cells/PHA-PBMC and control PHA-PBMC (stimulators=S) were collected, washed three times with Hanks' balanced salt solution supplemented with 0.5% α-methylmannopyranoside, and x-ray treated (50 Gy). For aMLR and MLR scalar concentrations (from 1x10⁶cells/ml to 6x10⁴cells/ml) of

ADHAPI-Cells/PHA-PBMC or control PHA-PBMC were added to autologous or allogeneic PBMC (1×10^6 cells/ml) (responder=R) in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulphate and seeded in 96 well U-bottom plates to a final volume of 200 µl/well. After a 24 h incubation at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, 100 µl of culture supernatant were collected from each well and immediately stored at -80°C until use for cytokine assay. Then, 100 µl of fresh medium were added to each well and cultures were allowed to proceed for additional 5 days when cultures were pulsed O/N with ³H-TdR (1 µCi/well); then, plates were harvested and ³H-TdR incorporation by R cells was measured by a β-counter.

Phenotypic profile of ADHAPI-Cells/PHA-PBMC and control PHA-PBMC.

See Table II for results.

RT-PCR analysis of CTA expressed by
ADHAPI-Cells/PHA-PBMC and control PHA-PBMC

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/12 ^a	12/12
MAGE-2	0/3	3/3
MAGE-3	0/12	12/12
MAGE-4	0/4	4/4
NY-ESO-1	0/6	6/6
GAGE-1-6	0/4	4/4
SSX-2	0/6	6/6

*positive/tested; NT, not tested.

Proliferation of autologous PBMC [R] stimulated with ADHAPI-Cells/PHA-PBMC and control PHA-PBMC in aMLR

See Figure 5 for results.

5 ELISA evaluation of IFN-γ (released by allogeneic (MLR) and autologous (aMLR) PBMC [R] stimulated with ADHAPI-Cells/PHA-PBMC or control PHA-PBMC(S)

See Table III for results.

EXAMPLE 6

10 ADHAPI-Cells/PHA+PWM-PBMC

PBMC purification

PBMC were purified by standard Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation from heparinized or ACD-anticoagulated peripheral blood of cancer patients in advanced stage of disease or
15 healthy subjects.

Generation of PHA+PWM-activated PBMC

PBMC (1.5×10^6 cells/ml) were added with PHA-M (10 µg/ml),
PWM (3 µg/ml), 100 UI/ml rhIL-2 and cultured for 48 h at 37°C in a
5% CO₂ humidified atmosphere in Basal Iscove's medium
20 supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum (or with
10% heat-inactivated autologous serum), 2 mM L-glutamine, 100
U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulphate (complete
medium).

Generation of ADHAPI-Cells/PHA+PWM-PBMC and control

PHA+PWM-PBMC

PHA+PWM-activated PBMC were pulsed four times with 1 μ M 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR) every 12 h; then, half of the culture medium was replaced with fresh complete medium without PHA or PWM and cultures were allowed to proceed for additional 48 h. Then cells were utilized for experimental procedures and/or frozen under viable conditions. Control cells (PHA+PWM-PBMC) were cultured under similar experimental conditions but without pulses of 5-AZA-CdR.

10 Final recovery of ADHAPI-Cells/PHA+PWM-PBMC and controlPHA+PWM-PBMC

See Table I for results.

Autologous Mixed Lymphocyte Reaction (aMLR) and MLR

ADHAPI-Cells/PHA+PWM-PBMC and control PHA+PWM-PBMC
15 (stimulators=S) were collected, washed three times with Hanks' balanced salt solution supplemented with 0.5% α -methylmannopyranoside, and x-ray treated (50 Gy). For aMLR and MLR scalar concentrations (from 1×10^6 cells/ml to 6×10^4 cells/ml) of ADHAPI-Cells/PHA-rhIL2-+PWM-PBMC or control PHA+PWM-PBMC
20 were added to autologous or allogeneic PBMC (1×10^6 cells/ml) (responder=R) in Basal Iscove's medium supplemented with 10% heat-inactivated human AB serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin sulphate, and seeded in 96 well U-bottom plates to a final volume of 200 μ l/well. After a 6 day

incubation at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, 100 µl of culture supernatant were collected from each well and immediately stored at -80°C until use for cytokine assay. Then, 100 µl of fresh medium were added to each well and cultures were pulsed O/N with 5 ³H-TdR (1 µCi/well); then, plates were harvested and ³H-TdR incorporation by R cells was measured by a β-counter.

Phenotypic profile of ADHAPI-Cells/PHA+PWM-PBMC and control

PHA+PWM-PBMC
10 See Table II for results.
RT-PCR analysis of CTA expressed by
ADHAPI-Cells/PHA+PWM-PBMC and control PHA+PWM-PBMC

5-AZA-CdR	-	+
MAGE-1	0/7 ^a	7/7
MAGE-2	0/7	7/7
MAGE-3	0/7	7/7
MAGE-4	0/7	7/7
NY-ESO-1	0/7	7/7
GAGE-1-6	0/7	7/7
SSX-2	0/7	7/7

15 ^apositive/tested.

Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with
ADHAPI-Cells/PHA+PWM-PBMC or control PHA+PWM-PBMC in
aMLR

See Figure 6 for results.

ELISA evaluation of IFN- γ released by allogeneic (MLR) and autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PHA+PWM-PBMC or control PHA+PWM-PBMC (S).

See Table III for results.

5 In Vivo Tumorigenicity of ADHAPI-Cells

Single subcutaneous xenografts of viable ADHAPI Cells/PHA-rhIL2-PWM-PBMC (12×10^6) and their control cells (14×10^6), ADHAPI-Cells /CD40L-B (8×10^6) and their control cells (8×10^6) or x-ray-treated (30 Gy) ADHAPI-Cells/PHA-rhIL2 10 PWM-PBMC (12×10^6) and their control cells (14×10^6), x-ray treated (50 Gy) ADHAPI-Cells /CD40L-B (15×10^6) and their control cells (18×10^6), neither induced tumor formation at injection or distant (clinically explorable) sites, nor affected general health and weight of BALB/c nu/nu mice 180 days after ADHAPI-Cells administration.

15 Repeated subcutaneous xenografts of viable ADHAPI-Cells/B-EBV (5×10^6 /1st injection; 1×10^7 /2nd and subsequent injections) and control B-EBV cells (5×10^6 /1st injection; 1×10^7 /2nd and subsequent injections) or x-ray-treated ADHAPI-Cells/B-EBV (75 Gy) (5×10^6 /1st injection; 1×10^7 /2nd and subsequent injections) and x-ray-treated 20 (75 Gy) control B-EBV cells (5×10^6 /1st injection; 1×10^7 /2nd and subsequent injections), at day 0, 33, 63 and 96, neither induced tumor formation at injection or distant (clinically explorable) sites, nor affected general health and weight of BALB/c nu/nu mice 180 days after the first administration. General health and weight of

ADHAPI-Cells-treated animals was comparable to control animals, untreated or grafted with B-EBV cells.

Advantages of ADHAPI-Cells as Polyvalent Cellular CTA Vaccines

5 As compared to the main strategies already utilized, or so far hypothesised, to most effectively administer known CTA to cancer patients, ADHAPI-Cells represent a totally new and innovative approach, and comprise a number of prominent/remarkable advantages. Among these:

10 ADHAPI-Cells vs not genetically-modified cellular CTA vaccines

ADHAPI-Cells are new and unique APC vaccines as they concomitantly express multiple/all methylation-regulated CTA; being endogenously synthesised, CTA can directly and simultaneously access both HLA class I and HLA class II antigen 15 processing pathways within ADHAPI-Cells (*Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001*).

Thus, due to their constitutive cell membrane expression of both HLA class I and HLA class II antigens, ADHAPI-Cells can concomitantly present immunogenic epitopes of endogenously 20 synthesised CTA both to CD8+ and to CD4+ T autologous lymphocytes; therefore, ADHAPI-Cells can simultaneously induce/amplify a CTA-directed CTL and humoral immune responses. Additionally, ADHAPI-Cells may express and present to host's T cells methylation-regulated CTA that have not been

identified and characterized yet (as well as not immunodominant epitopes of known and still unknown CTA).

Opposite to ADHAPI-Cells, synthetic CTA peptide(s)-pulsed, synthetic CTA whole protein-pulsed, or whole tumor cell preparations-pulsed autologous APC vaccines (e.g., dendritic cells, PBMC), as well as electrofusion-generated tumor cell dendritic cell hybrids (*Kugler A. et al., Nat. Med., 6: 332-336, 2000. Tureci O. et al., Cancer Res., 56: 4766-4772, 1996. Eds*), share major limitations including: i) the unknown fate *in vivo* of the *ex vivo*-loaded synthetic CTA peptide(s), of whole synthetic CTA protein or of tumor-derived CTA, which may significantly affect the longevity of antigen presentation to host's immune system; ii) limited amounts of synthetic CTA peptide(s), of whole synthetic CTA protein or of tumor-derived CTA that can be loaded *ex vivo* onto HLA class I and/or HLA class II antigens of cellular vaccines, which may significantly hamper the immunogenicity of administered CTA; iii) the restriction by the patient's HLA phenotype, and the still relatively limited number of known HLA class I antigens- and even more HLA class II antigens restricted immunogenic epitopes of so far identified CTA; iv) availability of adequate amounts of fresh tumor tissue, that should also be sufficiently representative of the diverse CTA expressed in neoplastic lesions (*Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001*).

The expression of endogenously synthesised CTA by ADHAPI-Cells is long lasting; thus, at variance with ex vivo synthetic CTA peptide(s)-pulsed or synthetic CTA whole protein-pulsed or whole tumor cell preparations-pulsed autologous APC vaccines, ADHAPI-
5 Cells can provide a prolonged stimulation *in vivo* of hosts immune response and with a lower number of administrations to patients. This hypothesis is reinforced by the foreseen possibility to administer ADHAPI-Cells as a viable, not x-ray-treated, cellular vaccines due to their absence of long term tumorigenicity *in vivo*.
10 Furthermore, once ADHAPI-Cells would undergo physiological death *in vivo*, they could still act as a "reservoir" of endogenously synthesised CTA peptides and proteins, that could further and efficiently boost the presentation of HLA class I-restricted epitopes of CTA to CD8+ T cells by patient's dendritic cells, through the
15 immunologic mechanism of cross-priming, as well as the presentation of HLA class II-restricted epitopes of CTA to CD4+ T cells, through the well-defined exogenous pathway of antigen processing.

ADHAPI-Cells retain their APC function; in fact, they efficiently
20 stimulate the proliferation and IFN- γ release of autologous and allogeneic PBMC; furthermore, ADHAPI-Cells are in most instances more potent stimulators as compared to their respective control cells. In this respect, it is relevant that in addition to CTA, ADHAPI-Cells may concomitantly express higher levels of HLA class I

antigens and/or of different co-stimulatory/accessory molecules as compared to their respective control cells. These evidences clearly represent a great advantage of ADHAPI-Cells as autologous cellular vaccines, compared to autologous tumor cells that are poorly immunogenic, and do not constitutively express several co-stimulatory/accessory molecules. Furthermore, as compared to ex vivo-generated and expanded autologous dendritic cells, ADHAPI-Cells vaccines are generated by fully mature and immunocompetent APC; this aspect overcomes the potential limitation represented by the maturation stage of dendritic cells utilized for the generation of cellular vaccines, which may influence their tolerogenic rather than immunogenic potential.

As compared to other cellular vaccines, the ex vivo generation of ADHAPI-Cells vaccines, that concomitantly express multiple/all methylation-regulated CTA, is simple, in most cases rapid, does not require cumbersome in vitro cellular manipulations, does not involve genetic manipulations, does not require autologous tumor tissue, and it is highly reproducible both from PBMC of healthy individuals and cancer patients.

Furthermore, close to 100% of ADHAPI-Cells preparations express all investigated CTA that are demethylation-inducible in APC. Due to these characteristics, the generation of ADHAPI-Cells vaccines is easier to standardize and to control for quality (for example by flow cytometry for selected cell surface molecules and

RT-PCR for selected CTA) and potency (for example by quantitative RT-PCR for selected CTA). Additionally, compared to other cellular vaccines that to date must be freshly prepared each time they must be administered to patients, thus generating obvious 5 inter-preparations variability (e. g., cellular viability, phenotypic profile of vaccinating cells, amount of loaded synthetic CTA peptide(s) or synthetic CTA whole protein or of whole tumor cell preparations, efficiency of generation of tumor cell-dendritic cell hybrids by electrofusion), ADHAPI-Cells vaccines, once prepared and 10 checked for viability, quality and potency, can be aliquoted, appropriately frozen, and stored under viable conditions until use for therapeutic purposes. Furthermore, since they do not require the availability of autologous tumor tissue to pulse autologous cellular vaccines or to generate tumor cell-dendritic cell hybrids *ex vivo*, and 15 since they can be rapidly prepared in large number from repeated leukaphereses, ADHAPI-Cells vaccines represent a practically unlimited source of therapeutic agent for each patient.

In light of their concomitant expression of multiple/all methylation-regulated CTA that are endogenously synthesised, and 20 that can directly and simultaneously access the HLA class I and HLA class II antigen-processing pathway, owing to their possibility to express and present to host's T cells methylation regulated CTA that have not been identified and characterized yet (as well as not immunodominant epitopes of known and still unknown CTA), and

due to the still limited number of known HLA class I antigens- and HLA class II antigens-restricted immunogenic epitopes of so far identified CTA that can thus be utilized for therapeutic applications according to patient's HLA phenotype, an additional advantage of 5 ADHAPI-Cells is that they are most likely able to concomitantly present known and still unknown immunogenic epitopes of different CTA in the context of any and multiple HLA class I and HLA class II allospecificities. Thus, as compared to synthetic CTA peptide(s)-pulsed or synthetic CTA whole protein-pulsed cellular 10 vaccines, treatment with ADHAPI-Cells vaccines is not limited to patients with defined HLA phenotypes; hence, all cancer patients whose neoplastic lesions express one or more CTA can be candidate to treatment with ADHAPI-Cells vaccines, regardless of their HLA phenotype. In this respect, among the so far known CTA, one or 15 more of them is generally expressed in most investigated malignancies of different histotype; therefore, vaccination with ADHAPI-Cells is suitable in the large majority of cancer patients. A significant information is that MAGE, GAGE or NY-ESO-1 are expressed in 96% of human tumors (*Cancer Immunol. Immunother.* 20 50:3-15, 2001).

Compared to synthetic CTA peptide(s)-pulsed and synthetic CTA whole protein-pulsed cellular vaccines, in which limited amounts of protein(s) can be loaded ex vivo onto HLA class I and/or HLA class II antigens of cellular vaccines, significantly hampering

the immunogenicity of administered CTA, and due to their concomitant expression of multiple all methylation-regulated CTA, ADHAPI-Cells vaccines can overcome the immunoselection of CTA-negative tumor variants occurring in the course of treatment 5 against single or few CTA, and overcome the constitutively heterogeneous and sometimes down-regulated expression of distinct CTA occurring in specific neoplastic lesions.

ADHAPI-Cells vaccines are constituted by autologous functional APC that concomitantly express multiple/all known 10 methylation-regulated CTA, and that most likely express still unidentified CTA whose expression is regulated by DNA methylation; furthermore, ADHAPI-Cells vaccines can be utilized in patients affected by CTA-positive tumors of different histotype. These functional and phenotypic features represent a clear advantage over 15 currently utilized allogeneic tumor cell vaccines (e.g., lysates of whole pooled neoplastic cell lines or their non-purified extracts, shed antigens from pooled neoplastic cell lines). In fact, these tumor cell vaccines may not contain or may contain insufficient amounts of known and of still unknown immunologically-relevant CTA, contain 20 irrelevant cellular components that may compete with CTA for immunological responses, may have increased toxicity being allogeneic, require efficient processing by patients' immune system, and can be utilized exclusively in patients affected by malignancies of the same histologic type.

ADHAPI-Cells vs genetically modified cellular CTA vaccines

The generation of ADHAPI-Cells does not involve the ex vivo genetic manipulations of autologous dendritic cells or of other autologous APC, that are required to produce genetically-modified 5 cellular vaccines expressing selected CTA following transfection or transduction. Furthermore, as compared to ADHAPI/Cells, a number of limitations affect genetically-modified cellular vaccines; among these are: i) the relative low efficiency of available transfection methodologies; ii) the induction of cellular immune 10 responses against antigens of the viral vectors utilized for cellular transduction, which leads to the destruction of genetically-modified vaccinating cells; iii) the presence of pre-existing or vaccination-induced neutralizing antibodies that interfere with vaccine administration(s); iv) direct effects of viral vectors on the 15 viability, maturation and antigen-presentation ability of transduced cells (*Jenne L. et al., Trends Immunol., 22:102-107, 2001*).

Table I

Recovery of ADHAPI-Cells and control cells

Cell Type	ADHAPI-Cells	Control cells
B-EBV ^a	114± 25	175± 51
PWM-B ^b	16±5	38± 17
CD40L-B ^c	75± 27	96±5
PWM-PBMC ^d	26± 11	45± 16
PHA-PBMC ^e	23± 10	63± 25
PHA+PWM-PBMC ^f	35± 28	63± 36

5 ^a Data represent the mean % ±SD of recovered cells as compared to
the number of cells (100%) utilized for their generation in 3 (a), 4 (b),
4 (c), 4 (d), 7 (e) and 5 (f) independent experiments.

Table II

Phenotypic profile of ADHAPI-Cells compared to
autologous control cells*

5

Antigen	ADHAPI Cells					
	CD40L- B ^{a†}	B-EBV ^b	Pwm- PBMC ^c	PWM-B ^d	PHA- PBMC ^e	PHA+P WM-PB MC ^f
HLA Class I	ns ^f	ns	ns	ns	ns	0.02 ^g
HLA-A Locus	ns	ns	nt ^h	nt	0.004	nt
HLA-B Locus	ns	ns	nt	nt	0.05	nt
HLA-A Alleles	0.01	ns	ns	ns	0.008	0.006
HLA-B Alleles	ns	ns	nt	nt	ns	nt
CD40	ns	0.01	ns	0.005	ns	ns
CD54	0.03	0.01	ns	ns	0.003	ns
HLA Class II	ns	ns	ns	0.03	ns	0.05
CD56	nt	nt	nt	ns	nt	nt
CD58	ns	ns	nt	nt	ns	ns
CD59	nt	nt	ns	ns	nt	0.04
CD80	0.05	ns	ns	ns	ns	ns
CD81	nt	0.002	nt	nt	ns	nt
CD86	0.008	nt	ns	ns	nt	ns

* Data were obtained comparing by Student's paired t-test the mean values of mean fluorescence intensity obtained by flow cytometry in 6 (a), 6 (b), 4 (c), 4 (d), 6 (e), and 2 (f) independent

experiments. Statistically significant differences were invariably representative of an up-regulated expression of investigated antigen on ADHAPI-Cells compared to autologous control cells.

^f not significant;

^g p value;

^h not tested;

†ADHAPI-Cells/CD40L-B= 82-100% CD20+; Control CD40L-B cells= 87-99% CD20+.

10

Table III.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) evaluation of IFN- γ released by autologous (R) (aMLR) and allogeneic (MLR) PBMC (R) stimulated by ADHAPI-Cells (S) or by control cells (S).*

Cell type	aMLR		MLR	
	Control cells	ADHAPI-Cells	Control cells	ADHAPI-Cells
B-EBV ^a	1770±919	2360±85 0.5 ^g	nt ^h	nt
PWM-B ^b	4330±629	5530±804 0.06	4040±721	4950±476 0.08
CD40L-B ^c	330 ±197	429 ±153 0.1	nt	nt
PWM-PBMC ^d	1500±135	1520±175 0.6	nt	nt
PHA-pBMC ^e	140 ±70	956 ±436 0.1	267 ±119	1040±545 0.07
PHA+PWM+PBMC ^f	790 ±236	831 ±244 0.09	819 ±184	830 ±169 0.7

15

*Data represent the mean values ± SD of IFN- γ (pg/ml) released in two (a), four (b), four (c), four (d), three (e) and four (f)

independent experiments. S/R ratios were: 3:1 (a), 1: 1 (b), 1:2 (e), 1:
1 (d), 1: 1 (e), 1: 2 (f). IFN- γ release was assayed 24 h (a), six days (b),
24 h (c), six days (d), 24 h (e) and 6 days (f) after the beginning of
culture; ^g p value vs control cells obtained by Student's paired t-test;
⁵ ^h not tested.

CLAIMS

1. A method for the generation of antigen presenting cells comprising:
 - a) collecting said cells from a subject,
 - b) activating said collected cells;
 - c) culturing and optionally expanding ex vivo said activated cells;
 - d) treating said cultured and optionally expanded cells with DNA hypomethylating agents so that said cells concomitantly express multiple tumor associated antigens.
2. A method according to claim 1, wherein said subject is a mammal.
3. A method according to claim 2, wherein said subject is a human.
4. A method according to claim 2, wherein said subject is a cancer patient.
5. A method according to any of claims 1-4, wherein said cells are immune cells.
- 20 6. A method according to any of claims 1-4, wherein said cells are non-immune cells.
7. A method according to any of claims 1-6, wherein said cells express shared immunodominant cancer antigens.

8. A method according to any of claims 1-6, wherein said cells express shared not immunodominant cancer antigens.
9. A method according to any of claims 1-5 and any of claims 7-8, wherein said cells are Epstein-Barr virus-immortalized B-lymphoblastoid cell lines.
5
10. A method according to any of claims 1-5 and any of claims 7-8, wherein said cells are Pokeweed mitogen (PWM)-activated B-lymphocytes.
11. A method according to any of claims 1-5 and any of claims 10 7-8, wherein said cells are CD40 activated B-lymphocytes.
12. A method according to any of claims 1-5 and any of claims 7-8, wherein said cells are Phytohemagglutinin (PHA) + recombinant human interleukin-2 (rhIL-2)-activated PBMC.
13. A method according to any of claims 1-5 and any of claims 15 7-8, wherein said cells are Phytohemagglutinin (PHA) + recombinant human interleukin-2 (rhIL-2) + pokeweed mitogen (PWM)-activated PBMC.
14. A method according to any of claims 1-4 and any of claims 20 6-8, wherein said cells are dendritic cells, monocytes, macrophages.
15. A method according to any of claims 1-4 and any of claims 6-8, wherein said cells are CD34+ cells, fibroblasts, stem cells, fibroblasts and cheratinocytes.

16. A method according to any of claims 1-15, wherein histone deacetylase inhibitors are used in step d).
17. A method according to any of claims 1-16, wherein said DNA hypomethylating agent is selected from 5-aza-cytidine or 5-aza-2'-deoxycytidine.
18. Cells obtainable by the method according to any one of claims 1-17.
19. Use of cells of claim 18, and/or their cellular components for prevention and treatment of malignancies of different histotype that constitutively express one or more of cancer antigens.
20. Use according to claim 19, wherein said shared cancer antigens are immunodominant cancer antigens.
21. Use according to claim 18, wherein said shared cancer antigens are not immunodominant.
22. Use according to claim 18, wherein said cancer antigens are Cancer Testis Antigens.
23. Use according to any of claims 19-22, wherein said cells are stored as reservoir of pooled antigens.
24. Pooled antigens as referred in claim 23 for use as cancer vaccine.
25. Cancer vaccine comprising cells of claim 18.
26. Vaccine according to claim 25, said vaccine being autologous.

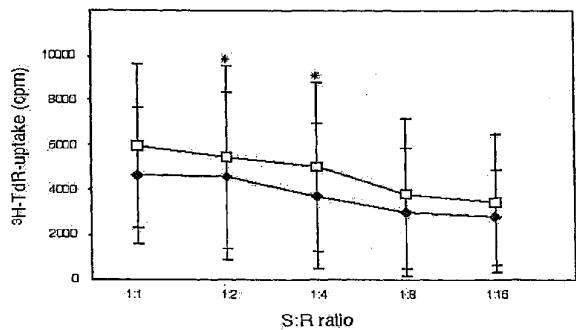
27. Vaccine according to claim 25, said vaccine being allogeneic.
28. Vaccine according to claim 27, wherein the cells are used as according to claim 23.
- 5 29. Vaccine according to claim 27 or 28, wherein cellular components according to claim 19 are used.
30. Use of cells of claim 18 and/or their cellular components in a method for generating effector immune cells, said effector immune cells being used for the preparation of a product useful in adoptive immunotherapy.
- 10 31. An article of manufacture comprising a vaccine according to any of claims 25-29 and a pharmaceutical composition suitable for systemic administration of a hypomethylating agent.

WO 03/012086

PCT/IT02/00488

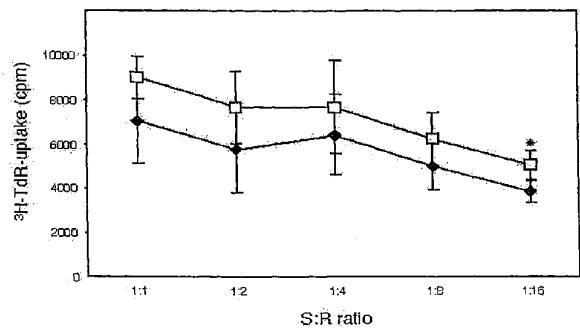
1/6

Figure 1. Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/B-EBV (□) or control (◆) B-EBV cells (S)^a



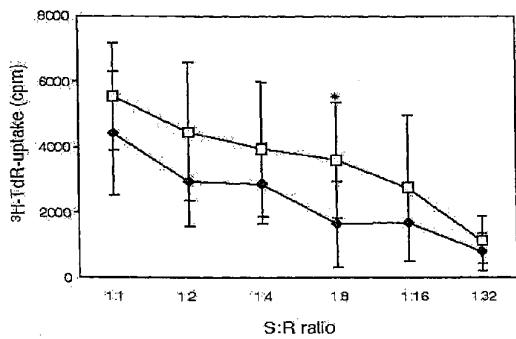
^aData represent the mean values (cpm)±SD of $[3\text{H}]\text{-TdR}$ uptake obtained in four independent experiments.

Figure 2. Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PWM-B (□) or control (◆) PWM-B cells (S)^a



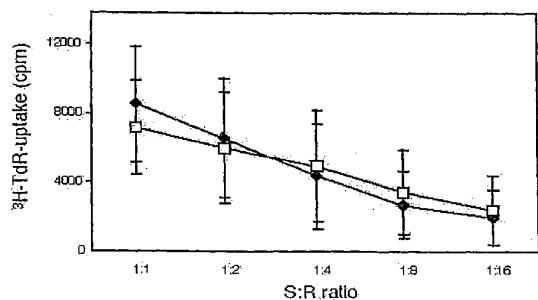
^aData represent the mean values (cpm)±SD of $[^3\text{H}]$ -TdR uptake obtained in four independent experiments.

Figure 3. Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/CD40L-B (\square) or control (\blacklozenge) CD40L-B cells (S)^a



^aData represent the mean values (cpm) \pm SD of [3H]-TdR uptake obtained in eight independent experiments.

Figure 4. Proliferation of allogeneic (MLR) and autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PWM-PBMC (□) or control (◆) PWM-PBMC cells (S)^a



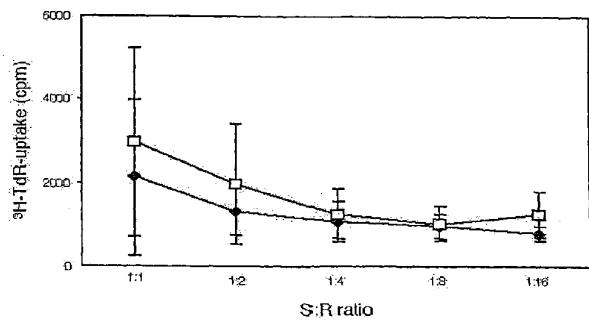
^aData represent the mean values (cpm) \pm SD of $[^3\text{H}]$ -TdR uptake obtained in four independent experiments.

WO 03/012086

PCT/IT02/00488

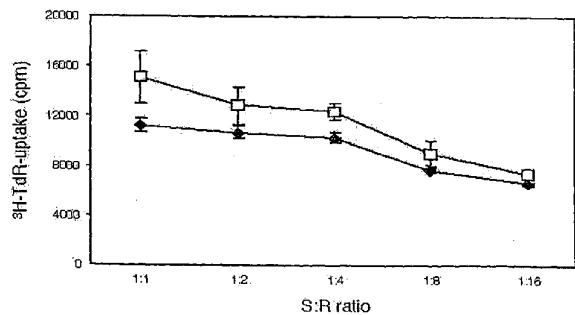
5/6

Figure 5. Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PHA-PBMC (□) and control (◆) PHA-PBMC



*Data represent the mean values (cpm) \pm SD of $[3\text{H}]\text{-TdR}$ uptake obtained in five independent experiments.

Figure 6. Proliferation of autologous (aMLR) PBMC (R) stimulated with ADHAPI-Cells/PHA+PWM-PBMC (□) or control (◆)
PHA+PWM-PBMC (S)^a



^aData represent the mean values (cpm)±SD of [^3H]TdR uptake obtained in four independent experiments.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Inte onal Application No PCT/IT 02/00488
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N/10 C12Q/48 A61K39/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C12Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHICHIJO SHIGEKI ET AL: "Induction of NAGE genes in lymphoid cells by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine." JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, vol. 87, no. 7, 1996, pages 751-756, XP001038219 ISSN: 0910-5050 cited in the application the whole document ---	1-24 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or demonstration</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
7 October 2002	17/10/2002	
Name and mailing address of the ISA EPO - Patent Office, P.O. Box 5810 Patentlaan 2 NL - 2290 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Herrmann, K	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RODDIE PATRICK H ET AL: "Leukemic blasts from patients with karyotypically poor risk AML are resistant to cytokine induced differentiation into dendritic like cells." BLOOD, vol. 96, no. 11 Part 1, 16 November 2000 (2000-11-16), page 707a XP001026796 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology; San Francisco, California, USA; December 01-05, 2000 ISSN: 0006-4971 the whole document ---	1-27,31
X	MOLDENHAUER ANJA ET AL: "Use of a histone deacetylase inhibitor to optimize the induction of a leukemia-specific cytotoxic T-cell response by dendritic cells derived from AML blasts." BLOOD, vol. 96, no. 11 Part 1, 16 November 2000 (2000-11-16), page 118a XP001026797 42nd Annual Meeting of the American Society of Hematology; San Francisco, California, USA; December 01-05, 2000 ISSN: 0006-4971 the whole document ---	1-24
Y	MEIDENBAUER NORBERT ET AL: "Dendritic cells for specific cancer immunotherapy." BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 382, no. 4, April 2001 (2001-04), pages 507-520, XP001027293 ISSN: 1431-6730 the whole document ---	1-17,31
Y	CORAL SANDRA ET AL: "Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR)." JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 22, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 16-24, XP001038514 cited in the application the whole document ---	1-27,31
1		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DOS SANTOS NUNO R ET AL: "Heterogeneous expression of the SSX cancer/testis antigens in human melanoma lesions and cell lines." CANCER RESEARCH, vol. 60, no. 6, 15 March 2000 (2000-03-15), pages 1654-1662, XP001037933 ISSN: 0008-5472 cited in the application the whole document -----	1-27,31
Y	NICKLOFF BRIAN J ET AL: "Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: New insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes." IMMUNOLOGY TODAY, vol. 15, no. 10, 1994, pages 464-469, XP001026789 ISSN: 0167-4919 the whole document -----	6,15
Y	SAUERWEIN R W ET AL: "INDUCTION OF IMMUNOGLOBULIN M PRODUCTION BY POKEWEEED MITOGEN AND INTERLEUKIN 2 DIFFERENT RESPONSES BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD CELLS AND TONSIL CELLS" CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY, vol. 39, no. 3, June 1986 (1986-06), pages 431-441, XP001027175 ISSN: 0090-1229 the whole document -----	10,12,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/AT 02/00488

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210
<p>Continuation of Box I.2</p> <p>Claims Nos.: 28-30</p> <p>Claims 28 and 29: The category of a claim must be clear (Art. 6 PCT). Claims 28 and 29 does not meet this requirement because it is directed to a product (vaccine) but also to the use thereof. For this reason a reasonable search could not be carried out for the subject-matter of claims 28 and 29.</p> <p>Claim 30: Claim 30 is not clear since it comprises two uses: (i) the use of cells for generating effector immune cells and (ii) the preparation of a medicament (Art. 6 PCT). Therefore, a reasonable search for the subject-matter of claim 30 is not possible.</p> <p>The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT					
national application No. PCT/IT 02/00488					
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)					
<p>This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 19-23 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition. 2. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 28-30 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: see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210 3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a). 					
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)					
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p>					
<ol style="list-style-type: none"> 1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims. 2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee. 3. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> 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.: 					
<p>Remark on Protest</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 15%; text-align: right; vertical-align: top;"><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.</td> </tr> <tr> <td style="text-align: right; vertical-align: top;"><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>		<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.				
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.				

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 07K 14/705	C 07K 14/705	
C 07K 14/82	C 07K 14/82	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,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,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N 0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 リタ・デ・サンティス

イタリア、イ-00040ポメツィア、ヴィア・ポンティーナ、キロメトロ30,400、シグマ
-タウ・インドウストリエ・ファルマチェウチケ・リウニテ・ソシエタ・ペル・アチオニ内

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BA24 BD25 CA45

4C085 AA03 CC01 CC29 FF19
4C087 AA01 AA02 BB64 DA20 DA32 DA40
4H045 AA11 AA30 CA41 DA86 EA31 FA72