

(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2015-526469  
(P2015-526469A)

(43) 公表日 平成27年9月10日(2015.9.10)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>A61K 35/50</b> (2015.01)	A 61 K 35/50	4 C 085
<b>A61P 35/00</b> (2006.01)	A 61 P 35/00	4 C 087
<b>A61P 35/02</b> (2006.01)	A 61 P 35/02	
<b>A61K 39/00</b> (2006.01)	A 61 K 39/00	H
<b>A61K 39/39</b> (2006.01)	A 61 K 39/39	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2015-528558 (P2015-528558)	(71) 出願人	515047666 ボリス, マルコシアン Markosian, Boris アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 1501, バーバンク, 北6番ストリ ート 217 アパートメント エイチ 217 N. Sixth Street , Apt. H, Burbank, California 91501, U nited States of Ame rica
(86) (22) 出願日	平成25年8月19日 (2013.8.19)	(74) 代理人	100101203 弁理士 山下 昭彦
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月20日 (2015.4.20)	(74) 代理人	100104499 弁理士 岸本 達人
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/055632		
(87) 國際公開番号	W02014/031553		
(87) 國際公開日	平成26年2月27日 (2014.2.27)		
(31) 優先権主張番号	61/691,187		
(32) 優先日	平成24年8月20日 (2012.8.20)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌に対する胎盤ワクチン接種療法

## (57) 【要約】

本発明は、癌組織、および宿主を打ち負かすために腫瘍により用いられる生物学的エフェクターに対する免疫応答を、胎盤の組織、細胞、分子、およびそれらの組合せを使用して哺乳動物を免疫処置することによって刺激する方法を開示する。一実施形態では、本発明は、免疫源として、同系、同種異系、異種、およびそれらの組合せを利用することを提供する。

【選択図】図 1

FIGURE 1

Table 1: B16 Data Exp 1

Antigen	Day 0 <sup>a</sup>	Day 4 <sup>a</sup>	Day 8 <sup>a</sup>	Day 12 <sup>a</sup>	Day 16 <sup>a</sup>	Day 20 <sup>a</sup>	Day 24 <sup>a</sup>
Saline	0	0	0	515	960	1900	2647
Saline	0	0	0	474	800	1690	2300
Saline	0	0	0	376	780	1560	2200
Saline	0	0	0	357	800	1206	1970
PLE**	0	0	0	543	1000	1363	1574
PLE	0	0	0	447	1023	1110	1755
PLE	0	0	0	845	880	1405	1647
PLE	0	0	0	375	790	1107	1364
PPLE**	0	0	0	0	0	0	0
PPLE	0	0	0	180	540	220	0
PPLE	0	0	0	150	440	109	0
PPLE	0	0	0	0	400	300	300
B.6 Extract	0	0	0	555	990	1127	1509
B.6 Extract	0	0	0	570	807	1380	1700
B.6 Extract	0	0	0	780	1506	1685	2200
B.6 Extract	0	0	0	770	1070	1500	1880

<sup>a</sup>Max: volume (0.1mL); \*\*Purified Liver Extract (Control for Xeropaceous Protein); \*\*\*Purified Placental Extract

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

免疫応答の抑制と関連した免疫不全を治療するための、異種宿主の免疫処置に適した胎盤または胎盤抽出物を含む組成物。

**【請求項 2】**

前記胎盤が実質的にホモジナイズされ、単離された細胞が免疫処置のために使用される、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 3】**

前記単離された細胞が、栄養膜、栄養膜の合胞細胞、および内皮細胞である、請求項 2 に記載の組成物。

**【請求項 4】**

抗原提示細胞をさらに含む、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 5】**

前記抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項 4 に記載の組成物。

**【請求項 6】**

前記免疫不全が、癌、ヒト免疫不全ウイルス、慢性疲労症候群、またはウイルス誘導免疫抑制である、請求項 1 に記載の組成物。

**【請求項 7】**

必要とするレシピエントへの異種胎盤の投与を含む、癌を治療するための方法。

**【請求項 8】**

前記胎盤が、実質的にホモジナイズされ、単離された細胞またはその生成物がワクチン接種のために使用される、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記単離された細胞が、栄養膜、栄養膜の合胞細胞、または内皮細胞である、請求項 8 に記載の方法。

**【請求項 10】**

抗原提示細胞の投与をさらに含む、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記抗原提示細胞が樹状細胞である、請求項 10 に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記胎盤調製物の起源がブタであり、前記レシピエントがヒトである、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 13】**

前記胎盤ワクチン接種が、免疫原性を高めるためにアジュバントと一緒に投与される、請求項 7 に記載の方法。

**【請求項 14】**

( a ) 胎盤タンパク質を単離し精製すること、

( b ) 前記精製された異種胎盤タンパク質の 1 つまたは複数を用いて、腫瘍担持実験レシピエントを免疫処置すること、および

( c ) 目的の個々の腫瘍に対する免疫の最も強力な誘導物質である、異種胎盤からのタンパク質を同定すること

を含む、腫瘍交差反応性抗原の抽出のための抗原供給源。

**【請求項 15】**

異種胎盤タンパク質抽出物、異種胎盤由来細胞、異種栄養膜、または同種異系もしくは異種腫瘍細胞と融合された異種栄養膜を含む組成物による、必要とする患者の免疫処置を含む、癌を治療する方法。

**【請求項 16】**

アジュバントが加えられる、請求項 15 に記載の方法。

**【請求項 17】**

前記アジュバントが、化学物質、化学物質の組成物、細菌由来の化合物、または免疫刺

10

20

30

40

50

激受容体のアゴニストである、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記アジュvantが、DETOX、IL-12、CpG-オリゴデオキシヌクレオチド、CTLA-4遮断薬、IFN-アルファ2b、CCR5遮断薬、水酸化アルミニウム、montanide ISA 51、GM-CSFからなる群から選択される、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記アジュvantが樹状細胞である、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記アジュvantが、4-IBBL、IL-2、IL-12、GM-CSF、OX-40リガンド、IFN-ガンマ、熱ショックタンパク質70、およびシャペロンリッチな細胞溶解物からなる群から選択された遺伝子でトランスフェクトされた樹状細胞である、請求項 1 9 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、癌組織、および宿主を打ち負かすために腫瘍により用いられる生物学的エフェクターに対する免疫応答を、胎盤の組織、細胞、分子、およびそれらの組合せを使用して哺乳動物を免疫処置することによって刺激する方法を開示する。一実施形態では、本発明は、免疫源として、同系、同種異系、異種、およびそれらの組合せを利用することを提供する。

20

【0 0 0 2】

優先権請求

本出願は 2012 年 8 月 20 日に出願された米国仮特許出願第 61/691,187 号明細書に対する優先権を主張するものであり、この仮出願の内容全体は参照によって本明細書に組み込まれるものとする。

【0 0 0 3】

開示の本発明は、免疫調節の分野に関する。より具体的には、本発明は、治療上有用な抗原を含有すると同時に、免疫機能を増強する両機能的調製物に関する。

30

【背景技術】

【0 0 0 4】

外科手術、放射線療法、および化学療法は、白血病、固形腫瘍、および転移を含む癌の治療に対する承認済みの標準的アプローチである。

【0 0 0 5】

不運にも、これらのアプローチには極めて高い毒性および有害作用が付随する。従来の癌治療に対する補助として、体内の免疫系を直接的または間接的に使用して、癌を縮小または根絶させる免疫療法が長年研究されてきた。ヒト免疫系が癌治療のための未開発の資源であり得ること、また、一旦免疫系の成分が適切に利用できれば、有効な治療法が開発され得ることが想定されている。重要な免疫制御分子および免疫シグナルが同定され、治療試薬として調製されているので、そのような試薬の臨床有効性を、確立された癌モデルを使用して試験することができる。免疫療法の戦略としては、ワクチン投与、活性化細胞、抗体、サイトカイン、ケモカイン、ならびに小分子阻害剤、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および遺伝子治療が挙げられる。本明細書に提供される本発明は、癌治療の現行のアプローチに付随した毒性を伴わない、癌治療のための新規方法を提供する。

40

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 6】

開示の本発明は、異種胎盤、胎盤抽出物、細胞、細胞株、または精製タンパク質の組合せによる免疫処置を介して、宿主に抗腫瘍および免疫刺激効果を誘導する新規方法を教示する。同種異系胎盤ワクチン接種に比較して、異種胎盤ワクチン接種のアプローチが有す

50

るいくつかの利点は、以下のものに対する免疫応答を刺激する異種抗原成分の予期せぬ効果的性質にある：（1）腫瘍関連抗原；（2）機能性腫瘍関連抗原；および（3）腫瘍分泌免疫抑制成分。開示の本発明の有用性および実用性については、宿主が免疫刺激を必要とする他の免疫抑制関連状態の治療に向いている。

#### 【0007】

本発明の一態様では、同種異系胎盤を利用するが、前記胎盤組織またはその細胞を、免疫原性を刺激することができる薬剤で前処理することにより免疫原性を増強する。免疫原性を刺激できる薬剤としては、以下に限定されるものではないが、サイトカイン、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、およびDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤などMHC発現の活性化剤が挙げられる。免疫調節のさらなる手段としては、異種または同種異系の成分による細胞のトランスフェクション、ならびに免疫刺激サイトカインによるトランスフェクションが挙げられる。

#### 【0008】

免疫刺激サイトカインの非限定例としては、Bリンパ球走化性因子（「BLC」）、C-Cモチーフケモカイン11（「エオタキシン-1」）、好酸球走化性タンパク質-2（「エオタキシン-2」）、果粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、IL-309、細胞間接着分子-1（「ICAM-1」）、インターフェロンガンマ（「IFN-ガンマ」）、インターロイキン-1アルファ（「IL-1アルファ」）、インターロイキン-1ベータ（「IL-1ベータ」）、インターロイキン1受容体アンタゴニスト（「IL-1ra」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-4（「IL-4」）、インターロイキン-5（「IL-5」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、インターロイキン-6可溶性受容体（「IL-6sR」）、インターロイキン-7（「IL-7」）、インターロイキン-8（「IL-8」）、インターロイキン-10（「IL-10」）、インターロイキン-11（「IL-11」）、インターロイキン-12のサブユニットベータ（「IL-12p40」または「IL-12p70」）、インターロイキン-13（「IL-13」）、インターロイキン-15（「IL-15」）、インターロイキン-16（「IL-16」）、インターロイキン-17（「IL-17」）、ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド2（「MCP-1」）、マクロファージコロニー刺激因子（「M-CSF」）、ガンマインターフェロンにより誘導されるモノカイン（「MIG」）、ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド2（「MIP-1アルファ」）、ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド4（「MIP-1ベータ」）、マクロファージ炎症性タンパク質-1-デルタ（「MIP-1デルタ」）、血小板由来増殖因子サブユニットB（「PDGF-BB」）、ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド5、ランテス（「RANTES」）、TIMPメタロペプチダーゼ阻害剤1（「TIMP-1」）、TIMPメタロペプチダーゼ阻害剤2（「TIMP-2」）、腫瘍壞死因子、リンフォトキシン-アルファ（「TNFアルファ」）、腫瘍壞死因子、リンフォトキシン-ベータ（「TNFベータ」）、可溶性TNF受容体タイプ1（「STNFR1」）、STNFR1IAR、脳由来神経栄養因子（「BDNF」）、塩基性線維芽細胞増殖因子（「bFGF」）、骨形態形成タンパク質4（「BMP-4」）、骨形態形成タンパク質5（「BMP-5」）、骨形態形成タンパク質7（「BMP-7」）、神経成長因子（「b-NGF」）、上皮増殖因子（「EGF」）、上皮増殖因子受容体（「EGFR」）、内分泌腺由来血管内皮細胞増殖因子（「EG-VEGF」）、線維芽細胞増殖因子4（「FGF-4」）、角化細胞増殖因子（「FGF-7」）、増殖分化因子15（「GDF-15」）、グリア細胞由来神経栄養因子（「GDNF」）、成長ホルモン、ヘパリン結合性EGF様増殖因子（「HB-EGF」）、肝細胞増殖因子（「HGF」）、インスリン様増殖因子結合タンパク質1（「IGFBP-1」）、インスリン様増殖因子結合タンパク質2（「IGFBP-2」）、インスリン様増殖因子結合タンパク質3（「IGFBP-3」）、インスリン様増殖因子結合タンパク質4（「IGFBP-4」）、インスリン様増殖因子結合タンパク質6（「IGFBP-6」）、インスリン様増殖因子1（「IGF-1」）、インスリン、マクロファージ

10

20

30

40

50

コロニー刺激因子（「M - C S F R」）、神経成長因子レセプター（「N G F R」）、ニューロトロphins - 3（「N T - 3」）、ニューロトロphins - 4（「N T - 4」）、破骨細胞形成抑制因子（「オステオプロテゲリン」）、血小板由来増殖因子受容体（「P D G F - A A」）、ホスファチジルイノシトール - グリカン生合成（「P I G F」）、S k p、カリニン、F - ボックス含有複合体（「S C F」）、幹細胞因子受容体（「S C F R」）、形質転換増殖因子アルファ（「T G F アルファ」）、形質転換増殖因子ベータ - 1（「T G F ベータ1」）、形質転換増殖因子ベータ - 3（「T G F ベータ3」）、血管内皮細胞増殖因子（「V E G F」）、血管内皮細胞増殖因子受容体2（「V E G F R 2」）、血管内皮細胞増殖因子受容体3（「V E G F R 3」）、V E G F - D 6 C k i n e、チロシン - プロテインキナーゼ受容体U F O（「A x 1」）、ベータセルリン（「B T C」）、粘膜関連上皮性ケモカイン（「C C L 2 8」）、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド2 7（「C T A C K」）、ケモカイン（C - X - C モチーフ）リガンド1 6（「C X C L 1 6」）、C - X - C モチーフケモカイン5（「E N A - 7 8」）、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド2 6（「エオタキシン - 3」）、顆粒球走化性タンパク質2（「G C P - 2」）、G R O、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド1 4（「H C C - 1」）、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド1 6（「H C C - 4」）、インターロイキン - 9（「I L - 9」）、インターロイキン - 1 7 F（「I L - 1 7 F」）、インターロイキン - 1 8 - 結合タンパク質（「I L - 1 8 B P a」）、インターロイキン - 2 8 A（「I L - 2 8 A」）、インターロイキン2 9（「I L - 2 9」）、インターロイキン3 1（「I L - 3 1」）、C - X - C モチーフケモカイン1 0（「I P - 1 0」）、ケモカイン受容体C X C R 3（「I - T A C」）、白血病抑制因子（「L I F」）、L i g h t、ケモカイン（C モチーフ）リガンド（「リンホタクチン」）、単球走化性タンパク質2（「M C P - 2」）、単球走化性タンパク質3（「M C P - 3」）、単球走化性タンパク質4（「M C P - 4」）、マクロファージ由来ケモカイン（「M D C」）、マクロファージ遊走阻止因子（「M I F」）、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド2 0（「M I P - 3 アルファ」）、C - C モチーフケモカイン1 9（「M I P - 3 ベータ」）、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド2 3（「M P I F - 1」）、マクロファージ刺激タンパク質アルファ鎖（「M S P アルファ」）、ヌクレオソームアセンブリータンパク質1様4（「N A P - 2」）、分泌型リン酸化タンパク質1（「オステオポンチン」）、肺性および活性化調節性サイトカイン（P u l m o n a r y a n d a c t i v a t i o n - r e g u l a t e d c y t o k i n e）（「P A R C」）、血小板第4因子（「P F 4」）、間質細胞由来因子 - 1 アルファ（「S D F - 1 アルファ」）、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド1 7（「T A R C」）、胸腺発現ケモカイン（「T E C K」）、胸腺間質性リンホポエチン（「T S L P - 4 - 1 B B」）、C D 1 6 6 抗原（「A L C A M」）、表面抗原分類8 0（「B 7 - 1」）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー1 7（「B C M A」）、表面抗原分類1 4（「C D 1 4」）、表面抗原分類3 0（「C D 3 0」）、表面抗原分類4 0（「C D 4 0 リガンド」）、癌胎児性抗原関連細胞接着分子1（胆汁糖タンパク質）（「C E A C A M - 1」）、細胞死受容体6（「D R 6」）、デオキシチミジンキナーゼ（「D t k」）、1型膜糖タンパク質（「エンドグリン」）、受容体型チロシンプロテインキナーゼe r b B - 3（「E r b B 3」）、内皮細胞 - 白血球間接着分子 - 1（「E - セレクチン」）、アポトーシス抗原1（「F a s」）、F m s 様チロシンキナーゼ3（「F l t - 3 L」）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー1（「G I T R」）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー1 4（「H V E M」）、細胞間接着分子3（「I C A M - 3」）、I L - 1 R 4、I L - 1 R I、I L - 1 0 R ベータ、I L - 1 7 R、I L - 2 R ガンマ、I L - 2 1 R、リソソーム膜タンパク質2（「L I M P I I」）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（「リポカリン - 2」）、C D 6 2 L（「L - セレクチン」）、リンパ内皮（「L Y V E - 1」）、M H C クラスIポリペプチド関連配列A（「M I C A」）、M H C クラスIポリペプチド関連配列B（「M I C B」）、N R G 1 - ベータ1、ベータ型血小板由来増殖因子受容体（「P D G F R ベータ」）、血小板内皮細胞接着分子（「P E C A M - 1」）、R A G E

10

20

30

40

50

、A型肝炎ウイルス細胞受容体1（「T I M - 1」）、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー10C（「T R A I L R 3」）、T r a p p i n タンパク質トランスクルタミナーゼ結合ドメイン（「T r a p p i n - 2」）、ウロキナーゼ受容体（「u P A R」）、血管細胞接着タンパク質1（「V C A M - 1」）、X E D A R A c t i v i n A、アグーチ関連タンパク質（「A g R P」）、リボヌクレアーゼ5（「アンジオゲニン」）、アンジオポエチン1、アンジオスタチン、カテプリンS（C a t h e p r i n S）、C D 4 0、潜在性ファミリータンパク質1B（「C r i p t o - 1」）、D A N、D i c k k o p f 関連タンパク質1（「D K K - 1」）、E - カドヘリン、上皮細胞接着分子（「E p C A M」）、F a s リガンド（F a s L またはC D 9 5 L）、F c g R I I B / C、フォリスタチン、ガレクチン-7、細胞間接着分子2（「I C A M - 2」）、I L - 1 3 R 1、I L - 1 3 R 2、I L - 1 7 B、I L - 2 R a、I L - 2 R b、I L - 2 3、L A P、神経細胞接着分子（「N r C A M」）、プラスミノーゲン活性化因子インヒビター-1（「P A I - 1」）、血小板由来増殖因子受容体（「P D G F - A B」）、レジスチン、ストロマ細胞由来因子1（「S D F - 1 ベータ」）、s g p 1 3 0、分泌型f r i z z l e d 関連タンパク質2（「S h h N」）、シアル酸結合免疫グロブリン型レクチン（「S i g l e c - 5」）、S T 2、形質転換増殖因子-ベータ2（「T G F ベータ2」）、T i e - 2、トロンボポイエチン（「T P O」）、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー10D（「T R A I L R 4」）、骨髄系細胞上に発現されるトリガー受容体1（T r i g g e r i n g r e c e p t o r e x p r e s s e d o n m y e l o i d c e l l s 1）（「T R E M - 1」）、血管内皮細胞増殖因子C（「V E G F - C」）、V E G F R 1 A d i p o n e c t i n、アディプシン（A d i p s i n）（「A N D」）、アルファ-フェトプロテイン（「A F P」）、アンジオポエチン様4（「A N G P T L 4」）、ベータ-2-ミクログロブリン（「B 2 M」）、基底細胞接着分子（「B C A M」）、糖鎖抗原125（「C A 1 2 5」）、癌抗原15-3（「C A 1 5 - 3」）、癌胎児性抗原（「C E A」）、c A M P 受容体タンパク質（「C R P」）、ヒト上皮増殖因子受容体2（「E r b B 2」）、フォリスタチン、卵胞刺激ホルモン（「F S H」）、ケモカイン（C - X - C モチーフ）リガンド1（「G R O アルファ」）、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（「ベータH C G」）、インスリン様増殖因子1受容体（「I G F - 1 s R」）、I L - 1 s R I I 、I L - 3、I L - 1 8 R b、I L - 2 1、レプチン、マトリックスマタロプロテイナーゼ-1（「M M P - 1」）、マトリックスマタロプロテイナーゼ-2（「M M P - 2」）、マトリックスマタロプロテイナーゼ-3（「M M P - 3」）、マトリックスマタロプロテイナーゼ-8（「M M P - 8」）、マトリックスマタロプロテイナーゼ-9（「M M P - 9」）、マトリックスマタロプロテイナーゼ-10（「M M P - 1 0」）、マトリックスマタロプロテイナーゼ-13（「M M P - 1 3」）、神経細胞接着分子（「N C A M - 1」）、エンタクチン（「ナイトジェン-1」）、ニューロン特異的エノラーゼ（「N S E」）、オンコスタチンM（「O S M」）、プロカルシトニン、プロラクチン、前立腺特異的抗原（「P S A」）、シアル酸結合I g 様レクチン9（「S i g l e c - 9」）、A D A M 1 7 エンドペプチダーゼ（「T A C E」）、チログロブリン、メタロプロテイナーゼ阻害剤4（「T I M P - 4」）、T S H 2 B 4、ディスインテグリンおよびメタロプロテイナーゼドメイン含有タンパク質9（「A D A M - 9」）、アンジオポエチン2、腫瘍壞死因子リガンドスーパーファミリーメンバー13 / 酸性ロイシンリッチ核リン酸化タンパク質32ファミリーメンバーB（「A P R I L」）、骨形態形成タンパク質2（「B M P - 2」）、骨形態形成タンパク質9（「B M P - 9」）、補体成分5a（「C 5 a」）、カテプシンL、C D 2 0 0、C D 9 7、ケメリソ、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー6B（「D c R 3」）、脂肪酸結合タンパク質2（「F A B P 2」）、線維芽細胞活性化タンパク質、アルファ（「F A P」）、線維芽細胞増殖因子19（「F G F - 1 9」）、ガレクチン-3、肝細胞増殖因子受容体（「H G F R」）、I F N - ガンマアルファ/ベータR 2、インスリン様増殖因子2（「I G F - 2」）、インスリン様増殖因子2受容体（「I G F - 2 R」）、

10

20

30

40

50

インターロイキン-1受容体6（「IL-1R6」）、インターロイキン24（「IL-24」）、インターロイキン33（IL-33）、カリクレイン14、アスパラギニルエンドペプチダーゼ（「Legumain」）、酸化低密度リポタンパク質受容体1（「LOX-1」）、マンノース結合レクチン（「MBL」）、ネブリライシン（「NEP」）、ノッチホモログ1、転座関連（ショウジョウバエ）（「ノッチ-1」）、腎芽細胞腫過剰発現（「NOV」）、オステオアクチビン、プログラム細胞死タンパク質1（「PD-1」）、N-アセチルムラモイル-L-アラニンアミダーゼ（「PGRP-5」）、セルピンA4、分泌型frizzled関連タンパク質3（「sFRP-3」）、トロンボモジュリン、Toll様受容体2（「TLR2」）、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー10A（「TRAIL\_R1」）、トランスフェリン（「TRF」）、WIF-1ACE-2、アルブミン、AMICA、アンジオポエチン4、B細胞活性化因子（「BAFF」）、糖鎖抗原19-9（「CA19-9」）、CD163、クラスタリン、CRTAM、ケモカイン（C-X-Cモチーフ）リガンド14（「CXCL14」）、シスタチンC、デコリン（「DCN」）、DICKkopf関連タンパク質3（「Dkk-3」）、デルタ様タンパク質（「DLL1」）、フェチュインA、ヘパリン結合性増殖因子1（「aFGF」）、葉酸受容体アルファ（「FOLR1」）、フューリン、GPCR関連ソーティングタンパク質1（「GASP-1」）、GPCR関連ソーティングタンパク質2（「GASP-2」）、果粒球コロニー刺激因子受容体（「GCSF\_R」）、セリンプロテアーゼヘプシン（「HAI-2」）、インターロイキン-17B受容体（「IL-17B\_R」）、インターロイキン27（「IL-27」）、リンパ球活性化遺伝子3（「LAG-3」）、アポリポタンパク質A-V（「LDL\_R」）、ペプシノゲンI、レチノール結合タンパク質4（「RBP4」）、SOST、ヘパラン硫酸プロテオグリカン（「シンデカン-1」）、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリーメンバー13B（「TACI」）、組織因子経路阻害物質（「TFPI」）、TSP-1、腫瘍壞死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10b（「TRAIL\_R2」）、TRANSC、トロポニンI、ウロキナーゼ型プラスミノーゲン活性化因子（「uPA」）、カドヘリン5、CD144としても知られる2型またはVE-カドヘリン（血管内皮）（「VE-カドヘリン」）、WNT1誘導性シグナル伝達経路タンパク質1（「WISP-1」）、および核因子B活性化受容体（「RANK」）が挙げられる。

## 【0009】

本発明の別の態様では、栄養膜系列に分化する多能性幹細胞を含む癌ワクチンを使用し、前記多能性幹細胞は、中胚葉、外胚葉、および内胚葉の組織に分化することができる細胞として定義され、さらに、前記多能性幹細胞は、以下の細胞群から選択される：(a) 胚性幹細胞；(b) 単為生殖由来幹細胞；(c) 誘導性多能性幹細胞；(d) 体細胞核移植由来幹細胞。

## 【0010】

本発明の別の態様では、癌ワクチンは、HLA-G、CD146、プロゲステロン、胎盤増殖因子、および胎盤性ラクトゲンの発現のために最適化された栄養膜系列細胞を含む。本発明はさらに、多能性幹細胞から生成した栄養膜系列委任細胞の使用を提供し、この細胞は、FGF-2の非存在下でBMP-4により多能性幹細胞を処理することにより分化したものである。あるいは、分化は、BMP-4を供与しながら、アクチビンおよびFGF2シグナル伝達の阻害剤に多能性細胞を曝露することにより行うことができる。

## 【0011】

本発明の別の態様では、栄養膜系列への分化は、細胞の支持細胞層の存在下でBMP-4を供与しながらアクチビンおよびFGF2シグナル伝達の阻害剤に前記多能性細胞を曝露することにより行なわれる。本発明のこの実施形態では、支持細胞層は、(a) 哺乳動物胚線維芽細胞；(b) 哺乳動物ケロイド組織由来細胞；(c) 哺乳動物内皮細胞；および(d) 哺乳動物間葉系幹細胞を含む群から選択される細胞で実質的に構成される。本発明の別の態様では、栄養膜分化細胞を、免疫原性を高めることができる薬剤に暴露するが、この薬剤は、栄養膜分化細胞上のMHCおよび/または1つもしくは複数の同時刺激分

10

20

30

40

50

子の発現をアップレギュレートすることができる。

【0012】

本発明のさらに別の態様では、癌ワクチンを提供するが、この癌ワクチンでは、(a) CD80；(b) CD86；(c) CD40；(d) ICAM-1；(e) LFA-3；および(f) IL-12を含む分子の群から選択される分子の発現を誘導または実質的にアップレギュレートする、免疫原性を高めることができる薬剤で栄養膜を処理している。

【0013】

本発明の別の態様では、栄養膜または栄養膜様細胞に、免疫原性を高める分子をコードする遺伝子をトランスフェクトするが、前記分子は、(a) ABCF1、(b) TNF-アルファ；(c) TNF-ベータ；(d) BCL6、(e) 補体C3；(f) 補体C4A；(g) 補体C5；(h) CEBPB；(i) CRP、(j) ICEBERG、(k) IL1R1、(l) IL1RN；(m) IL8RB；(n) LTB4R；(o) TOLLIP；(p) IFNA2；(q) IL12；(r) IL13RA1；(s) CD40L；(t) IFNA2；(u) IL17C；(v) IL18；(w) IL-21；(x) IL-22；(y) G-CSF；(z) GM-CSF；(aa) インターフェロンガンマ；(ab) HLAタンパク質の全体または構成部分；(ac) 同種異系HLAタンパク質の全体または構成部分；および(ad) 異種HLAタンパク質の全体または構成部分から選択される。

【0014】

本発明の一態様では、胎盤由来栄養膜、多能性由来栄養膜、または栄養膜が細胞の初期化により生成されたものであるかにかかわらず、免疫処置のために利用される細胞は、レシピエントに対して同種異系、異種、または同系である。レシピエントは、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、または他の哺乳動物を含む哺乳動物である。本発明の一態様では、癌ワクチンを提供するが、このワクチンは、十分量の末端炭水化物エピトープGa1アルファ(1、3)Ga1の発現を誘導するようにアルファ-1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼでトランスフェクトされている栄養膜または内皮細胞を含む。本発明の特定の一態様では、提供される癌ワクチンは、トランスフェクトされた細胞が、ヒト血液の存在下で補体カスケードの活性化を誘導することができるほど十分なレベルでトランスフェクトされているアルファ-1, 3-ガラクトシルトランスフェラーゼ遺伝子を含有する。本発明の一態様では、栄養膜様細胞は多能性幹細胞から作製されるが、この栄養膜様細胞は、腫瘍生物活性を示す抗原の発現のために最適化されている。本発明の一態様では、腫瘍ワクチン接種に使用される栄養膜細胞は、前記多能性幹細胞から、(a) 侵襲性；(b) 免疫回避；および/または(c) 血管新生を含む生物活性の群から選択される生物活性を発現するように分化している。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】本発明の一実施形態による、ブタ肝臓抽出物でも対照でもなく、ブタ胎盤ワクチン(異種)で免疫処置されたC57/BL6マウスにおけるB-16腫瘍増殖の予防を示す表である。

【図2】本発明の一実施形態による、ブタ肝臓抽出物でも対照でもなく、ブタ胎盤ワクチン(異種)で免疫処置されたC57/BL6マウスにおけるB-16腫瘍増殖の予防を示す表である。

【図3】本発明の一実施形態による、ブタ肝臓抽出物でも対照でもなく、ブタ胎盤ワクチン(異種)で免疫処置されたC57/BL6マウスにおけるB-16腫瘍増殖の予防を示す表である。

【図4】本発明の一実施形態による、アジュバントとして同系のDCを使用して、異種胎盤抽出物による免疫処置を示す表である。

【図5】本発明の一実施形態による、アジュバントとして同系のDCを使用して、異種胎盤抽出物による免疫処置を示す表である。

【図6】本発明の一実施形態による、アジュバントとして同系のDCを使用して、異種胎

10

20

30

40

50

盤抽出物による免疫処置を示す表である。

【図7】本発明の一実施形態による、B16細胞溶解物ワクチン接種と異種胎盤ワクチン接種との間の相乗作用を示す表である。

【図8】本発明の一実施形態による、結腸癌マウスモデルの処置における異種胎盤抽出物の治療効果を示す表である。

【発明を実施するための形態】

【0016】

別段の記載がない限り、本文書中で使用される定義および科学用語は、当業者が一般常識として解釈する意味を有する。本文書中で考察または参照される方法論は、当業者により一般に十分理解され、通常使用されるものである。さらに、別に定義されていない限り、本明細書で使用される技術用語および科学用語はすべて、開示の本発明が属する分野の当業者が通常理解するものと同じ意味を有する。具体的には、以下の用語および語句は以下の意味を有する。

【0017】

「癌の治療」、「癌の阻害」、「癌増殖の低減」は、癌細胞の腫瘍形成活性を阻害または予防することを指す。腫瘍形成活性には、癌細胞の遊走、浸潤、薬剤抵抗性、細胞生存、足場非依存性増殖、細胞死シグナルに対する非応答性、血管新生、またはそれらの組合せを阻害することが含まれ得る。

【0018】

「癌」、「癌細胞」、「腫瘍」、および「腫瘍細胞」という用語は、本明細書中で互換的に使用され、一般に、細胞の制御されない異常増殖（例えば、新生物）を特徴とする一群の疾患を指す。癌の一部の形態では、癌細胞は、局所的にまたは血流およびリンパ系を通して、他の身体各部に拡散することがある（「転移癌」）。「*ex vivo*活性化リンパ球」、「抗腫瘍活性が増強されたリンパ球」、および「樹状細胞サイトカインに誘導されたキラー」は、互換的に使用される用語であり、本発明の文脈内では、*ex vivo*で活性化され、その後再導入される細胞組成物を指す。

【0019】

「リンパ球」という単語が使用されるが、これには、樹状細胞、NKT細胞、ガンマデルタT細胞、および他の種々の自然免疫および適応免疫細胞を含む、*ex vivo*培養工程中に広がった不均一細胞も含まれる。本明細書で使用される場合、「癌」は、白血病、癌腫、および肉腫を含む、動物に見出されるあらゆるタイプの癌または新生物または悪性腫瘍を指す。癌の非限定例としては、脳、黒色腫、膀胱、乳房、子宮頸部、結腸、頭頸部、腎臓、肺、非小細胞肺、中皮腫、卵巣、前立腺、肉腫、胃、子宮、および髄芽腫の癌がある。

【0020】

「白血病」という用語は、広義には、造血器官／系の進行性の悪性疾患を意味し、一般に、血液および骨髄中の白血球およびその前駆体の異常な増殖および発生を特徴とする。白血病の非限定例としては、急性非リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T細胞白血病、無白血病性白血病、白血球血症性白血病（leukocytic hemolytic leukemia）、好塩基球性白血病、芽細胞性白血病、ウシ白血病、慢性骨髄球性白血病、皮膚白血病、胎生細胞性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、リーダー細胞性白血病、シリング白血病、幹細胞性白血病、亜白血性白血病、未分化細胞性白血病、有毛状細胞性白血病、血球芽細胞性白血病（hemoblastic leukemia）、血球芽細胞性白血病（hemocytoblastic leukemia）、組織球白血病、幹細胞性白血病、急性单球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ向性白血病、リンパ様白血病、リンパ肉腫細胞性白血病、肥満細胞白血病、巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、单球性白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄球性白血病、骨髄顆粒球性白血病、骨髄单球性白血病、ネーゲリ白血病、形質細胞白血病、形質細胞性白血病、および前骨髄球性白血病が挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0021】

「癌腫」という用語は、周辺組織に浸潤し、かつ／または生理学的および非生理学的細胞死シグナルに抵抗性で転移を起こしやすい上皮細胞で構成される悪性新生物を指す。癌腫の非限定的な例示的タイプとしては、腺房癌、小葉癌、腺囊癌腫、腺様囊胞癌、腺癌、副腎皮質癌、肺胞腺癌、肺胞上皮癌、基底細胞癌 (basal cell carcinoma)、基底細胞癌 (carcinoma basocellulare)、類基底細胞癌、基底扁平細胞癌 (basosquamous cell carcinoma)、細気管支肺胞上皮癌、細気管支癌、気管支原性癌、大脳様癌、胆管細胞癌、絨毛癌、膠様癌、面胞癌、子宮体部癌、篩状癌、鎧状癌、皮膚癌、円柱状癌、円柱細胞癌、腺管癌、硬性癌、胎生期癌、脳様癌、類表皮癌 (epiendothelial carcinoma)、腺上皮癌、外向発育癌、潰瘍癌、線維癌、膠様癌 (gelatiniform carcinoma)、巨細胞癌、印環細胞癌、単純癌、小細胞癌、バレイショ状癌、回転構円面細胞癌、紡錘体細胞癌、海綿様癌、扁平上皮癌、有棘細胞癌、紐様癌 (string carcinoma)、血管拡張癌、毛細血管拡張症様癌、移行上皮癌、結節癌 (carcinoma tuberosum)、結節癌 (tuberous carcinoma)、疣状癌、絨毛癌、巨大細胞癌、腺癌、顆粒膜細胞癌、毛母癌、血様癌、肝細胞癌、ヒュルトレ細胞癌、硝子状癌、副腎様癌 (hypemephroid carcinoma)、乳児胎生期癌、上皮内癌 (carcinoma in situ)、表皮内癌、上皮内癌 (intrapithelial carcinoma)、クロムペッヘル癌 (Krompecher's carcinoma)、クルチツキー細胞癌 (Kulchitzky-cell carcinoma)、大細胞癌、レンズ状癌 (lenticular carcinoma)、レンズ状癌 (carcinoma lenticulare)、脂肪腫様癌、リンパ上皮癌、髓様癌 (carcinoma medullare)、髓様癌 (medullary carcinoma)、悪性黒色腫、軟性癌、粘液性癌、粘液分泌癌、粘液細胞癌、粘液性類表皮癌、粘液癌、粘液性癌、粘液腫様癌、上咽頭癌、燕麦細胞癌、骨化性癌、類骨癌 (osteoid carcinoma)、乳頭状癌、門脈周囲癌、前浸潤癌、有棘細胞癌腫、軟性癌、腎臓の腎細胞癌、予備細胞癌、肉腫様癌、シユナイダー癌、硬性癌、および陰囊癌が挙げられる。

## 【0022】

「肉腫」という用語は、一般に、胎児結合組織のような物質で構成され、一般に、原線維性の不均一または均一な物質中に埋まった密に詰まった細胞で構成される腫瘍を指す。肉腫としては、以下に限定されるものではないが、軟骨肉腫、線維肉腫、リンパ肉腫、黒色肉腫、粘液肉腫、骨肉腫、子宮内膜肉腫、間質性肉腫、ユーイング肉腫、筋膜肉腫、線維芽細胞肉腫、巨細胞肉腫、アバーネシー肉腫 (Abemethy's sarcoma)、脂肪肉腫 (adipose sarcoma)、脂肪肉腫 (liposarcoma)、胞巣状軟部肉腫、エナメル上皮肉腫、ブドウ状肉腫、緑色腫肉腫 (chloroma sarcoma)、絨毛癌、胎児性肉腫、ウィルムス腫瘍肉腫、顆粒球肉腫、ホジキン肉腫、特発性多発性色素性出血性肉腫、B細胞の免疫芽球肉腫、リンパ腫、T細胞の免疫芽球肉腫、イエンセン肉腫、カポジ肉腫、クッパー細胞肉腫、血管肉腫、白血肉腫、悪性間葉腫肉腫、傍骨性骨肉腫、細網肉腫、ラウス肉腫、漿液囊胞性肉腫、滑膜肉腫、および毛細血管拡張性肉腫が挙げられる。

## 【0023】

さらなる例示的な新生物としては、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髓腫、神経芽細胞腫、乳癌、卵巣癌、肺癌、横紋筋肉腫、原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血症、小細胞肺腫瘍、原発性脳腫瘍、胃癌、結腸癌、悪性膵臓インスリノーマ (malignant pancreatic insuloma)、悪性カルチノイド、前癌皮膚病変、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞腫、食道癌、泌尿生殖路癌、悪性高カルシウム血症、子宮頸癌、子宮内膜癌、および副腎皮質癌が挙げられる。

## 【0024】

10

20

30

40

40

50

本発明の一部の実施形態では、治療される癌は黒色腫である。「黒色腫」という用語は、皮膚および他の器官のメラニン細胞系から発生する腫瘍を意味すると解釈される。黒色腫の非限定例としては、ハーディング・パッセー黒色腫、若年性黒色腫、悪性黒子型黒色腫、悪性メラノーマ、末端黒子型黒色腫、無色性黒色腫、良性若年性黒色腫、クラウドマン黒色腫(Cloudman's melanoma)、S91黒色腫、結節性黒色腫、爪下黒色腫(subungual melanoma)、および表在拡大型黒色腫がある。

【0025】

用語「ポリペプチド」という用語は、「ペプチド」、「改変されたペプチドリガンド」、および「フルオロ炭酸ペプチド(fluorocarbonated peptide)」と互換的に使用される。 10

【0026】

「薬学的に許容される担体」という用語は、すべての溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸收遅延剤等を含む。薬学的に活性な物質に対するこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で周知である。従来のいかなる媒体または薬剤でも、投与される活性化合物と適合しない場合を除いて、医薬組成物中でそれを使用することができる。二次的な活性化合物も本明細書に記載の組成物に組み込むことができる。

【0027】

「T細胞」という用語は、Tリンパ球とも呼ばれ、免疫応答に関与するリンパ球の中で胸腺に由来する細胞を意味する。T細胞には、CD8ポジティブT細胞(細胞傷害性T細胞: CTL)、CD4ポジティブT細胞(ヘルパーT細胞)、サブレッサーT細胞、制御性T細胞などの調節性T細胞、エフェクター細胞、ナイーブT細胞、記憶T細胞、TCRアルファ鎖およびベータ鎖を発現するアルファベータT細胞、およびTCRガンマ鎖およびデルタ鎖を発現するガンマデルタT細胞のいずれも含まれる。T細胞には、T細胞への分化が方向づけられているT細胞の前駆細胞が含まれる。 20

【0028】

「T細胞を含有する細胞集団」の例としては、血液(末梢血、臍帯血等)および骨髄液などの体液に加えて、体液から採取、単離、精製、または誘導された末梢血単核細胞(PBMC)、造血細胞、造血幹細胞、臍帯血単核細胞等を含有する細胞集団が挙げられる。 30

【0029】

さらに、T細胞を含有しあつ造血細胞に由来する種々の細胞集団を、本発明では使用することができる。種々の実施形態では、これらの細胞は、in vivoまたはex vivoで、IL-2などのサイトカインにより活性化されたものでもよい。これらの細胞として、生体から採取された細胞またはex vivo培養により得られた細胞、例えば、本発明の方法により得られたそのままのT細胞集団または凍結保存により得られたT細胞集団のいずれも使用することができる。「抗体」という用語は、インタクトな分子および抗原結合部位を含むそのフラグメントの両方を含むことを意図する。全抗体構造は、H<sub>2</sub>L<sub>2</sub>として示される場合が多く、抗体が2つのアミノ酸軽鎖(L)と2つのアミノ酸重鎖(H)とを一般に含む事実を指す。両鎖とも、構造的に相補的な抗原標的と相互作用することができる領域を有する。 40

【0030】

標的と相互作用する領域は、「可変」または「V」領域と呼ばれ、異なる抗原特異性の抗体とはアミノ酸配列が異なるという特徴がある。H鎖またはL鎖のいずれかの可変領域が、抗原標的に特異的に結合することができるアミノ酸配列を含有する。これらの配列内に、特異性が異なる抗体間で極端に可変性があるため「超可変」と呼ばれるさらに小さな配列がある。このような超可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」領域とも呼ばれる。これらのCDR領域により、特定の抗原決定基構造に対する抗体の基本的な特異性が説明される。

【0031】

10

20

30

40

50

CDRは、可変領域内に不連続なアミノ酸ストレッチを示すが、種にかかわらず、可変重鎖および軽鎖領域内のこれらの重要なアミノ酸配列の所在位置は、可変鎖のアミノ酸配列内の同様な位置にあることが見出されている。すべての抗体の可変重鎖および軽鎖はそれぞれ、3つのCDR領域を有し、それぞれのCDRは、軽鎖(L)および重鎖(H)それぞれについて、他のCDR(L1, L2, L3, H1, H2, H3と称される)と連続していない。

【0032】

本発明による開示の抗体は、全面的に合成されたものであってもよく、抗体のポリペプチド鎖は合成され、おそらく、受容体として本明細書に開示のポリペプチドに対する結合について最適化されている。このような抗体は、キメラ抗体であってもヒト化抗体であってもよく、構造的に完全に四量体であっても二量体であってもよく、单一重鎖と单一軽鎖のみを含むものでもよい。

10

【0033】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、治療される疾患状態の1つまたは複数の症状を治療、抑制、もしくは緩和するか、またはそうでなければ所望の薬理学的および/または生理的な効果を与える、特に選択した抗原に対するT細胞応答を亢進させるのに十分な投与量を意味する。正確な投与量は、被験体に依存する変数(例えば、年齢、免疫系の健全性等)、疾患、および投与処置などの種々の要因に応じて変わることになる。

20

【0034】

「個体」、「宿主」、「被験体」、および「患者」という用語は、本明細書で互換的に使用され、以下に限定されるものではないが、靈長類、例えばヒト、ならびにマウスおよびラットなどのげっ歯類および他の実験動物を含む哺乳動物を指す。

20

【0035】

本明細書で使用される場合、「治療レジメン」という用語は、疾患の治療、あるいは所望の生理学的变化、例えば、抗原または免疫源に対する免疫系の応答の増大または低下、例えば、そのような応答に関与する1つまたは複数の細胞または細胞型の数または活性の増大または低下を達成するための方法を指し、前記治療または方法は、動物、例えば哺乳動物、特にヒトに、疾患を有効に治療するかまたは前記生理学的变化をもたらすのに十分な量の、前記レジメンの2つ以上の化学薬剤または成分を投与することを含み、前記化学薬剤または成分は、同じ組成物の一部としてなど一緒に投与されるか、または個別にかつ同時にしくは異なる時に独立して投与され(すなわち、各薬剤または成分の投与は、その薬剤または成分の1つまたは複数とは、有限時間分離される)、前記1つまたは複数の薬剤または成分の投与により、単独でまたは分離して投与される場合における前記薬剤または成分のいずれの投与よりも良好な結果が得られる。

30

【0036】

「アネルギー」および「不応答性」という用語は、刺激、例えば活性化受容体またはサイトカインによる刺激に対する免疫細胞の不応答性を含む。アネルギーは、例えば、免疫サプレッサーへの曝露または高用量の抗原への曝露により起こり得る。そのようなアネルギーは、一般に抗原特異的であり、寛容化する抗原への曝露が終了した後でも継続する。例えば、T細胞および/またはNK細胞におけるアネルギーは、サイトカイン、例えばインターロイキン(IL)-2を産生しないことを特徴とする。T細胞アネルギーおよび/またはNK細胞アネルギーは、T細胞および/またはNK細胞の抗原への曝露に際して、第1のシグナル(TCRまたはCD-3を介するシグナル)が、第2のシグナル(共刺激シグナル)の非存在下で受け取られる場合に、部分的に生じる。

40

【0037】

用語「T細胞機能の増強」、「細胞傷害性の増強」、および「活性の増強」は、T細胞および/またはNK細胞のエフェクター機能が向上していることを意味する。T細胞および/またはNK細胞の機能の増強には、本発明を限定するものではないが、T細胞および/またはNK細胞の増殖速度の亢進、サイトカインの産生量の増加、または細胞傷害性の亢進が含まれる。さらに、T細胞および/またはNK細胞の機能の増強には、アネルギー

50

(不応答)状態などの抑制状態または休止状態にあるT細胞および/またはNK細胞の寛容性の解除および抑制、すなわち、T細胞および/またはNK細胞が抑制状態から、T細胞および/またはNK細胞が外部からの刺激に対して応答する状態に移ることが含まれる。

【0038】

「発現」という用語は、遺伝子、ポリヌクレオチド、およびオリゴヌクレオチドなどの核酸から、転写によりmRNAが生成すること、またはmRNAから転写によりタンパク質もしくはポリペプチドが生成することを意味する。発現は、RT-PCR、ノーザンプロット、またはin situハイブリダイゼーションを含む手段により検出することができる。

10

【0039】

「発現の抑制」は、抑制がない場合と比較して、転写産物量または翻訳産物量が顕著に減少することを指す。本明細書における発現の抑制は、例えば、30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは70%以上、最も好ましくは90%以上の転写産物量または翻訳産物量の減少を示す。

【0040】

栄養膜は、ヒト胎盤の形成に関する細胞の前駆体となる細胞である。胚が分化を開始する場合、胚盤胞の段階では、内部細胞塊中の細胞は胚になる細胞を形成するようにコミットされているが、胚盤胞の外部細胞は胎盤の発生に関するようにコミットされるようになる。ヒト栄養膜細胞株は、形質転換された胎盤細胞から作製されたものであるが、これは本発明の実施に有用となり得る。本発明の実施において、「栄養膜」には、比較的未分化な絨毛性細胞栄養膜、中間の細胞栄養膜、最終分化した絨毛性合胞栄養膜、および母体脱落膜に浸潤する絨毛外性細胞栄養膜が含まれる。これらの分化した栄養膜は、推定される栄養膜幹細胞集団から発生し、絨毛状の基底膜に細胞集団が含有されると提案されている。

20

【0041】

本発明の一実施形態では、第1のトリメスター期間（妊娠6週目から9週目の間）に妊娠を終了することを自発的に選んだ患者から絨毛膜絨毛組織を得る。HEPES（25mmol）、DNアーゼ1、およびコラゲナーゼ（15U/ml）（Sigma, St. Louis, USA）を含有するハンクス平衡塩類溶液（HBSS）中、37で30分間、攪拌しながら組織を細かく刻み分離することにより、絨毛性栄養膜細胞層細胞を単離する。分散した細胞を、網ふるい（直径40μmの孔）による濾過により分離し、10%FCSの存在下で保存する。バーコール勾配遠心分離の後、細胞を、約 $1 \times 10^6$ 個の単分散細胞の状態で得る。細胞は種々の培地中で培養することができ、一実施形態では、栄養膜細胞層細胞を、10%ウシ胎仔血清と1%ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した RPMI 培地中で培養する。培養物への他の添加物、例えば、2mMのL-グルタミン、100uMの2-メルカプトエタノール、およびマウス胚線維芽細胞の馴化培地を使用してもよい。

30

【0042】

本明細書で使用される場合、「1つ（「a」または「an」）」という単語は、特許請求の範囲および/または明細書中の「含む（comprising）」という用語と併せて使用される場合、「1つ」を意味し得るが、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」、および「1つまたは2つ以上」の意味とも一致する。

40

【0043】

「有する（having）」、「含む（including）」、「含有する（containing）」、および「含む（comprising）」という用語は、互換的であり、これらの用語がオープンエンド形式の用語であることを当業者は承知している。

【0044】

「胚性生殖細胞」または「EG細胞」は、精子または卵子を生じるように運命づけられている胚または胎仔の始原生殖細胞に由来する細胞である。EG細胞は、本発明により培

50

養することができる胚性幹細胞の1つである。

【0045】

「胚性幹細胞」または「ES細胞」は、動物（例えば、ヒトなどの靈長類）の胚、好ましくは、約8週齢未満の胚から得られる細胞である。始原的な胚性幹細胞を単離するために好ましい胚形成期には、着床前段階の胚の桑実胚または胚盤胞段階が含まれる。細胞を幹細胞とみなすための周知の基準を本明細書では用いるとする。例えば、参照によりその内容全体が組み込まれる、Hoffmann and Carpenter, *Nature Biotech.* 23: 699-708, 2005を参照されたい。

【0046】

「細胞外マトリックス」(ECM)または「マトリックス」とは、支持細胞により合成される細胞外マトリックスにより提供される状態と同じ細胞増殖を支持する状態を実質的に提供する1つまたは複数の物質を指す。マトリックスは基質上に用意することができる。あるいは、マトリックスを含む成分は、溶液で用意することができる。このように、ECMは、細胞の外部に固定化される分泌分子を基本的にすべて包含する。ECMは、*in vivo*では、細胞外空間に秩序を与え、分化した組織および器官を確立、分離、および維持することと関連する機能を果たす。ECMは、例えば結合組織および基底膜の中に見出される複雑な構造であり、基底層とも呼ばれる。結合組織は、典型的には、細胞から天然に分泌されるECMに取り囲まれた単離細胞を含有する。ECMの成分は、増殖因子および分化因子、サイトカイン、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)、組織メタロプロテアーゼ阻害因子(TIMP)、および細胞の増殖、遊走、および分化を調節する他の可溶性因子と相互作用および/または結合することが示されている。ECMおよびその成分の説明は、とりわけ、*Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*, 2d ed., Kreis and Vale, eds., Oxford University Press, 1999(「Kreis et al.」); Geiger et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2: 793-803, 2001; lozzo, *Annual Review of Biochemistry*, 1998, *Annual Reviews*, Palo Alto, Calif.; Boudreau and Jones, *Biochem. J.* 339: 481-88, 1999; *Extracellular Matrix Protocols*, Streuli and Grant, eds., Humana Press 2000; Metzler, *Biochemistry the Chemical Reactions of Living Cells*, 2d ed., vol. 1, 2001, Academic Press, San Diegoに見つけることができる。これらのそれぞれは、その内容全体が参照により組み込まれる。

【0047】

「多能性」とは、必ずしもすべての細胞型である必要はないが、複数の異なる細胞型の1つに分化することができる細胞を指す。多能性細胞の非限定的な例示的クラスとして、胚性幹細胞があり、これは人体のいかなる細胞型にも分化することができる。したがって、多能性細胞は、複能性細胞(multipotent cell)および他の分化が進行した細胞型に分化することができるが、逆分化の過程(すなわち、脱分化)は、もっと複雑であると考えられ、初期状態に近くなるように細胞の「初期化」を必要とすることが認識されよう。これは、初期化後、細胞は初期化前に可能であった細胞型よりも多くのまたは異なる細胞型に分化する能力を有するようになることを意味する。本発明により培養される、靈長類の始原幹細胞を含む幹細胞は、任意の適切な技術を使用して任意の適切な供給源から得ることができる。例えば、ヒト始原幹細胞を単離し増殖させるための手順は、米国特許第6,090,622号明細書に記載されている。アカゲザルおよび他の非ヒト靈長類の始原幹細胞を得るための手順は、国際公開第96/22362号パンフレットに記載されている。加えて、アカゲザルの始原幹細胞を単離するための方法は、Thomson, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 784

10

20

30

40

50

4 - 7 8 4 8 , 1 9 9 5 に記載されている。

【0048】

「幹細胞」には、ヒトまたは非ヒト供給源由来にかかわらず、いかなる幹細胞または前駆細胞も含まれ、また前駆細胞の特徴を保持する、幹細胞由来の細胞も含まれる。ヒト胚性幹細胞 (h E S C) は、例えば、ヒトの *in vivo* 着床前胚、*in vitro* 受精胚、または胚盤胞段階に拡大増殖した 1 細胞ヒト胚から得られる胚盤胞から単離することができる。例えば、B o n g s o , e t a l . ( 1 9 8 9 ) , H u m . R e p r o d . 4 : 7 0 6 を参照されたい。

【0049】

ヒト胚は、G 1 . 2 および G 2 . 2 培地中で培養して胚盤胞段階にすることができる。10 例えば、G a r d n e r , e t a l . , F e r t i l . S t e r i l . 6 9 : 8 4 ( 1 9 9 8 ) を参照されたい。プロナーゼ ( S i g m a ) に短時間曝露することにより胚盤胞から透明帯を除去する。内部細胞塊は、免疫手術または機械的分離により単離することができ、マウス胚支持細胞層上にまたは本明細書に記載の合成培養系に播種する。9 ~ 1 5 日後、内部細胞塊に由来する増殖物は、1 mM の E D T A を含む、カルシウムおよびマグネシウム不含リン酸緩衝生理食塩水 ( P B S ) に曝露するか、ディスパーゼ、コラゲナーゼ、もしくはトリプシンに曝露するか、またはマイクロピペットにより機械的に解離させることにより、凝集塊に解離させる。次いで、解離細胞を、前のように新たな培地中に再播種し、コロニー形成について観察する。未分化形態を示すコロニーを、マイクロピペットにより個々に選択し、機械的に解離して凝集塊にし、再播種する。

20

【0050】

胚性幹細胞様形態は、見かけ上高い核対細胞質比および目立つ核小体を有するコンパクトなコロニーとして特徴付けられる。次いで、得られた胚性幹細胞を、短時間トリプシン処理し、ダルベッコの P B S (カルシウムもマグネシウムも不含で、2 mM の E D T A を含有) に曝露し、I V 型コラゲナーゼ ( 約 2 0 0 U / m L ) に曝露することによって、または例えばマイクロピペットを使用して機械的に解離させることにより個々のコロニーを選択することによって、1 ~ 2 週間ごとにルーチン的に分割する。

20

【0051】

幹細胞は、単細胞レベルにおいて、自己再生する能力ならびに自己再生前駆体、非再生前駆体、および最終分化細胞を含む子孫細胞を産生するように分化する能力の両方を有することによって定義される未分化細胞である。幹細胞はまた、複数の胚葉 ( 内胚葉、中胚葉、および外胚葉 ) から種々の細胞系列の機能細胞に *in vitro* で分化する能力、および移植後に複数の胚葉の組織を生じさせ、かつ胚盤胞への注入後にすべてではないにしてもほとんどの組織に実質的に寄与する能力によっても特徴づけられる。

30

【0052】

幹細胞は、以下のようにその発生上の能力により分類される：( 1 ) 全能性 - すべての胚細胞型および胚外細胞型を生じさせることができる；( 2 ) 多能性 - すべての胚細胞型を生じさせることができる；( 3 ) 複能性 - 細胞系列のサブセットであるが、特定の組織、器官、または生理系内のすべてを生じさせることができる ( 例えば、造血幹細胞 ( H S C ) は、H S C ( 自己再生 ) 、血液細胞に限定される少能性 ( o l i g o p o t e n t ) 前駆体、および血液の正常成分であるすべての細胞型および要素 ( 例えば、血小板 ) を含む子孫を産生することができる ) ；( 4 ) 少能性 - 複能性幹細胞よりも限定された細胞系列のサブセットを生じさせることができる；および ( 5 ) 単能性 - 単一細胞系列を生じさせることができる ( 例えば、精子形成幹細胞 ) 。

40

【0053】

癌は、種々の型の悪性新生物および腫瘍を指し、原発腫瘍および腫瘍転移を含む。本発明のセンサーリレイおよび系により検出することができる癌の非限定例としては、脳、卵巣、結腸、前立腺、腎臓、膀胱、乳房、肺、口腔、および皮膚の癌がある。癌の特定例としては、癌腫、肉腫、骨髄腫、白血病、リンパ腫、および混合型腫瘍がある。特定の腫瘍カテゴリとしては、リンパ球増殖性疾患、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮頸癌、子宮体癌

50

、骨癌、肝癌、胃癌、結腸癌、肺臓癌、甲状腺癌、頭頸部癌、中枢神経系の癌、末梢神経系の癌、皮膚癌、腎臓癌、および上記のすべての癌の転移が挙げられる。特定の腫瘍型としては、肝細胞癌、肝細胞腫、肝芽腫、横紋筋肉腫、食道癌、甲状腺癌、神経節芽細胞腫、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨原性肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、ユーリング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋皮肉腫 (rhabdomyosarcoma) 、浸潤性腺管癌、乳頭腺癌、黒色腫、肺有棘細胞癌、基底細胞癌、腺癌 (高分化型、中分化型、低分化型、および未分化型) 、細気管支肺胞上皮癌、腎細胞癌、副腎腫、副腎様腺癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、精巣腫瘍、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、および大細胞肺癌を含む肺癌、膀胱癌、神経膠腫、星状細胞腫、髓芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、網膜芽細胞腫、神経芽細胞腫、結腸癌、直腸癌、すべての型の白血病を含む造血悪性腫瘍、ならびに急性骨髓性白血病、急性骨髓球性白血病、急性リンパ球性白血病、慢性骨髓性白血病、慢性リンパ球性白血病、肥満細胞白血病、多発性骨髓腫、骨髓性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫が挙げられる。

10

## 【0054】

「実質的に未分化」とは、幹細胞 (例えば、靈長類始原幹細胞) の集団が、少なくとも約 50%、好ましくは少なくとも約 60%、70%、または 80%、さらにより好ましくは少なくとも約 90% の未分化幹細胞を含有することを意味する。所望の未分化状態 (例えば、始原状態) を表す 1 つまたは複数のマーカーに対する標識抗体またはレポーター遺伝子 / タンパク質 (例えば、高感度緑色蛍光タンパク質または EGFP) を使用する蛍光標識細胞分取を使用して、所与の幹細胞集団のうち未分化の細胞の数を測定することができる。この評価を行う目的で、未分化状態と関連する 1 つまたは複数の細胞表面マーカー (例えば Oct-4、SSEA-4、Tra-1-60 および Tra-1-81) を検出することができる。

20

## 【0055】

テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT) 活性およびアルカリホスファターゼもアッセイすることができる。靈長類始原幹細胞の文脈において、ポジティブおよび / またはネガティブセレクションを使用して、例えば、免疫染色またはレポーター遺伝子 (例えば、EGFP) の使用によって、特定のマーカーの発現 (またはその欠如) (例えば、Oct-4、SSEA-4、Tra-1-60、Tra-1-81、SSEA-1、SSEA-3、ネスチン、テロメラーゼ、Myc、p300、および Tip60 ヒストンアセチルトランスフェラーゼ、およびアルカリホスファターゼ活性) 、または特定の翻訳後修飾 (例えば、アセチル化ヒストン) の存在を検出することができ、それによって自己再生または細胞分化の状態の評価が容易になる。

30

## 【0056】

「全能性」とは、以下に限定されるものではないが、胚性幹細胞、神経幹細胞、骨髓幹細胞、造血幹細胞、心筋細胞、神経細胞、星状細胞、筋細胞、および結合組織細胞など、多能性細胞、複能性細胞、および完全に分化した細胞 (すなわち、種々の細胞型にも分化できない細胞) を含む、いかなる細胞型にも分化することができる細胞を指す。分子遺伝学および遺伝子工学の一般的方法は、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」(Sambrook, et al., Cold Spring Harbor); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller & Calos eds.) ; および「Current Protocols in Molecular Biology」(Ausubel, et al. eds., Wiley & Sons) の最新版に記載されている。細胞生物学、タンパク質化学、および抗体技術は、「Current Protocols in Protein Science」(Colligan, et al. eds., Wiley & Sons); 「Current Protocols in Cell Biology」(Bonifacino, et al., Wiley & Sons) 、および「Current Protocols in Immu

40

50

n o l o g y」(Colligan et al. eds., Wiley & Sons.)に見つけることができる。本開示で言及された遺伝子操作のための試薬、クローニングベクター、およびキットは、BioRad、Stratagene、Invitrogen、Clontech、およびSigma-Aldrich Coなどの商用ベンダーから入手可能である。

【0057】

量、一定期間等の計測可能な値に言及する場合に本明細書で使用される「約」とは、所定値の±20%、±10%、±5%、±1%、および±0.1%の変動を包含することを意図するものであり、このような変動は開示方法の実施にとって妥当なものである。

【0058】

本発明の特定の実施形態を以下に記載する。本発明の実施形態では、免疫抑制および腫瘍抗原の供給源として異種胎盤の利用を教示する。異種胎盤またはそれに由来する生成物を使用するレシピエントの免疫処置によって、免疫抑制因子および腫瘍関連腫瘍抗原に対する免疫応答を刺激することができる。この免疫応答により、胎盤で見出される免疫抑制化合物と相同性を有する内因性免疫抑制因子が中和され得る。この調製物の異種成分が、同種異系の胎盤組織による免疫処置に比較して、より強固な免疫応答を刺激することにとつて重要であることが発見された。具体的には、癌に罹患した宿主を、当技術分野で公知の方法により精製された胎盤抽出物で免疫処置することができる。本発明の具体的な適用としては、以下に限定されるものではないが、ヒト癌患者への免疫処置のためにブタ由来の異種胎盤を利用することができる。分娩する雌ブタから得られる胎盤組織を入手して、5%のペニシリン-ストレプトマイシン混合物を含有する無菌リン酸緩衝生理食塩水中で洗浄する。次いで、50mlのチューブに入れた胎盤組織(約1gの組織/チューブ)を、電子ホモジナイザー(Ultra Turrax T25-S1; Janke & Kunkel KG, Staufen, Germany)を使用して、無菌生理食塩水中で直ちにホモジナイズする。ホモジナイゼーションに続いて、チューブを1000gで1時間回転させ、組織デブリをペレットにする。次いで、全タンパク質内容物を当技術分野で公知の方法を使用して濃縮する。

10

20

20

【0059】

特定の一実施形態では、胎盤タンパク質の濃縮は、Waters Corp. 製のSep-Pak C<sub>18</sub>カートリッジなどの固相抽出カラムによって遂行する。別の実施形態では、上清を凍結乾燥し、脱塩用の1000Da超の透析チューブ中で濃縮する。次いで、精製されたタンパク質を、腫瘍免疫処置に関する以前の研究に基づいて、1,125ug~2,000ugの間の濃度で患者に注射する。例えば、Hollinshead, A. C., T. H. Stewart, and R. B. Herberman, Delayed hypersensitivity reactions to soluble membrane antigens of human malignant lung cells. J. Natl. Cancer Inst., 1974. 52(2): p. 327-38を参照されたい。注射スケジュールとしては、腕の三角筋部などへの皮下投与での月1回の注射が挙げられる。

30

【0060】

注射プロトコールは、患者の必要性に応じて調整することができる。加えて、免疫処置は、当技術分野で公知の他の方法によって実施してもよく、例えば、注射(例えば、皮下、皮内、筋肉内)、エアロゾル、経口、経皮、髄腔内、経粘膜、胸膜腔内、または一般に使用される経路によるものがある。ワクチン調製物の変形態には、アジュバントとの同時投与、またはDCをパルスするための抗原供給源としてのタンパク質調製物の利用、およびワクチン接種調製物としてのパルスDCの使用を挙げることができる。

40

【0061】

本発明の別の実施形態には、ワクチン源としての精製されたブタ栄養膜の投与がある。前記栄養膜は、当技術分野で公知の方法により精製することができる。一方法は以下のとおりである: 約30gの胎盤絨毛叢の塊を生理食塩水中ですすぎ、膜および結合組織から

50

分離し、次いで、はさみで粗く切り刻み、0.185%のトリプシン、25 mMのHEPES、および0.4 mg/mlのI型DNアーゼを含有する、カルシウムおよびマグネシウム不含のハンクス液に移す。次いで、5分ごとに搅拌しながら、37で30分間、水浴中で組織をインキュベートする。次いで、上清のアリコートを子ウシ血清の上に重層し、室温で5分間、1000gで遠心する。次いで、ペレットをパーコール勾配の上に重層し、Reis, F. M., et al., Corticotropin-releasing factor, urocortin and endothelin-1 stimulate activin A release from cultured human placental cells. Placenta, 2002. 23(6) : p. 522-5にある報告のように、約35%パーコールレベルを使用して精製する。前記栄養膜は、サイトケラチン、ビメンチン、およびCD45の染色により判定すると、約95%の純度である。栄養膜は、必要に応じて、約10<sup>7</sup>~10<sup>8</sup>個の細胞を癌患者に注入することができる。あるいは、精製された栄養膜は、ワクチン接種のための異種タンパク質源として利用することができる。タンパク質抽出は、当技術分野で詳細に記載されており、凍結融解サイクルまたはホモジナイザーの使用により実施することができる。

10

20

30

40

50

## 【0062】

他の栄養膜細胞株が、マウス、ブタ、およびヒトを含む種々の種から作製されている。これらの代替細胞株の異種レシピエントへの利用は、本発明の他の実施形態を表わす。増殖および成長を阻害するために、細胞株を照射することができる。免疫原性を高めるために、インターフェロンガンマまたは細胞上のMHC IIなどの免疫原性分子の発現を増大させることができが公知の他の薬剤による前処理によって免疫刺激分子を発現するように、栄養膜細胞株を誘導する。細胞株の免疫原性は、以下の方法など当技術分野で公知の方法により高めることができる：(1)免疫刺激サイトカインまたは膜タンパク質、例えば、それぞれIL-1、IL-2、IL-4、IL-12、TNF-アルファ、GM-CSF、またはMHC I、MHC II、CD40、CD80、CD86によるトランスフェクション；(2)高熱またはフリーラジカルストレスなどの「ストレッサー」の投与；および/または(3)IL-10など内因的に発現される免疫抑制分子の阻害。

## 【0063】

DCのトランスフェクションのために胎盤抽出物由来のmRNAを利用することにより、開示の本発明を実行する別の方法が生まれる。胎盤組織由来のRNAは、Trizol試薬の利用など当技術分野で公知の方法を使用して抽出することができる。DCにトランスフェクトされた精製RNAから、内因性経路を介してDCによりプロセシングされるようになる抗原タンパク質の翻訳が始まる。この方法は、腫瘍由来RNAを使用して腫瘍ワクチンを作製するためにGiliboaのグループが利用した。トランスフェクトされたDCは、LPSおよび/もしくはTNF-アルファ、ならび/またはポリ(IIC)などのtoll様受容体(TLR)アゴニストの投与など当技術分野で公知の方法を使用して成熟するように誘導することができる。次いで、成熟または未成熟DCを、免疫刺激のために癌患者に注入することができる。

## 【0064】

抗異種応答は高度に強力かつ強固であるが、アジュバントの添加により、胎盤調製物の免疫原性をさらに高めることができる。免疫刺激に適したアジュバントは当業者に周知であり、BCG、De-Tox、または非メチル化cpgモチーフとの同時投与が含まれる。

## 【0065】

一実施形態では、本発明は、殺腫瘍能を有する細胞集団を生成させる手段を提供する。具体的には、50mlの末梢血を癌患者から採取し、フィコール法を使用して末梢血単核細胞(PBMC)を単離する。次いで、PBMCを10mlのSTEM-34培地に再懸濁し、プラスチック表面上に2~4時間付着させる。次いで、ハンクス緩衝生理食塩水(HBSS)中で緩やかに洗浄することにより非付着細胞を除去した後、付着細胞を、1,000U/mlの顆粒球-単球コロニー刺激因子および500U/mlのIL-4を添加

した S T E M - 3 4 培地の中で 3 7 にて培養する。 G M - C S F および I L - 4 を添加した培地の容量の半分を一日おきに交換する。未成熟 D C を 7 日目に回収する。

【 0 0 6 6 】

特定の実施形態では、作製した D C を使用して、異種抗原と共にインキュベートすることにより、T 細胞および N K 細胞の殺腫瘍活性を刺激する。異種抗原の供給源としては、以下に限定されるものではないが、異種腫瘍またはその抽出物が挙げられる。種々の実施形態では、T 細胞および / または N K 細胞を活性化するために、栄養膜抽出物を使用して *in vitro* でヒト樹状細胞をパルスする。栄養膜抽出物は、胎盤組織、または高濃度の栄養膜を含有するように精製された胎盤組織を溶解させることにより作製する。より具体的には、抗原として使用する前に、栄養膜を *in vitro* で培養して増殖させる。

10

【 0 0 6 7 】

ヒト胎盤に加えて、ブタ、マウス、イヌ、ウシ、ウマの栄養膜を使用することができる。特定の一実施形態では、血絨毛型胎盤を有する哺乳動物の胎盤から栄養膜を単離する。具体的には、作製した D C は、フローサイトメトリーソーティングまたは磁気活性化セルソーティング ( M A C S ) を使用して培養物からさらに精製してもよく、または半精製集団として患者に投与してもよい。 D C は、*in vivo* で N K および T 細胞活性を刺激するというコンセプトの下で、治療を必要とする前記患者に加えてもよく、あるいは、他の実施形態では、T 細胞および / または N K 細胞を含有する細胞集団と共に *in vitro* でインキュベートしてもよい。

20

【 0 0 6 8 】

種々の特定の実施形態では、*in vitro* で成熟を刺激することができる薬剤に D C を曝露する。*in vitro* で成熟を刺激する非限定的手段としては、D C または D C 含有集団を *to 1 1* 様受容体アゴニストと培養することが挙げられる。 D C 成熟を達成する別の手段には、約 2 0 n g / m L 濃度の T N F - アルファに D C を曝露することができる。

20

【 0 0 6 9 】

*in vitro* で T 細胞および / または N K 細胞を活性化するために、約 1 0 0 0 I U / m l のインターフェロンガンマを含有する培地中で細胞を培養する。インターフェロンガンマと一緒にインキュベーションは、2 時間 ~ 7 日間実施することができる。好ましい実施形態では、インキュベーションを約 2 4 時間実施し、その後 T 細胞および / または N K 細胞を、胎盤抗原の存在下で、 C D 3 および C D 2 8 により刺激する。胎盤抗原は、同種異系、同系、または異種である。これを達成する手段として、これらの受容体を活性化することができる抗体の添加によるものがある。

30

【 0 0 7 0 】

例示的な一実施形態では、約 1 u g / m l の抗 C D 2 8 と一緒に、約 2 u g / m l の抗 C D 3 抗体を添加する。 T 細胞および N K 細胞の生存を促進しつつ増殖を刺激するために、 T 細胞 / N K 有系分裂促進物質を使用する。特定の一実施形態では、サイトカイン I L - 2 を利用する。本発明の実施に有用な I L - 2 濃度の一例は、約 5 0 0 u / m L である。 I L - 2 および抗体を含有する培地は、約 8 ~ 1 4 日間、 4 8 時間ごとに交換する。特定の一実施形態では、腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を付与するために、 T 細胞および / または N K 細胞に D C を含める。特定の実施形態では、 T 細胞および / または N K 細胞のアポトーシスの割合を低下させるように、カスパーゼ阻害剤を培養物に添加する。作製した細胞を、以下に限定されるものではないが、皮内、筋肉内、皮下、腹腔内、動脈内、静脈内 ( カテーテルの留置を含む ) 、腫瘍内、または輸入リンパ管中を含む、適切な手段によって被験体に投与する。

40

【 0 0 7 1 】

一実施形態では、異種免疫処置による腫瘍への免疫刺激は、 I L - 2 などの公知の免疫刺激剤と組み合わせることができる。過剰免疫処置が有害事象をもたらし得る場合、免疫刺激と一緒に静脈内アスコルビン酸 ( A A ) を利用することが、本明細書に提供される本発明により企図される。 A A には全身性炎症プロセスに有益な効果がある。例えば、敗血

50

症様状態を誘導するためにクレブシエラ肺炎桿菌 ( *Klebsiella pneumonia* ) をチャレンジした後、アスコルビン酸欠乏動物では、対照に比較して、3倍高い死亡率が観察されることが、マウス実験で示された。例えば、Gaut, J. P., et al., Vitamin C fails to protect amino acids and lipids from oxidation during acute inflammation. *Free Radic Biol Med*, 2006. 40 (9) : p. 1494 - 501; および Tyml, K., F. Li, and J. X. Wilson, Septic impairment of capillary blood flow requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase but not nitric oxide synthase and is rapidly reversed by ascorbate through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Crit Care Med*, 2008. 36 (8) : p. 2355 - 62 を参照されたい。  
10

#### 【0072】

他の実験では、AAを過剰補給すると、敗血症関連低血糖、微小循環異常、および内皮応答性の鈍化に関し良好なアウトカムがもたらされることが示された。例えば、Shen, K. P., et al., Antioxidant eugenosedin-A protects against lipopolysaccharide-induced hypotension, hyperglycaemia and cytokine immunoreactivity in rats and mice. *J Pharm Pharmacol*, 2005. 57 (1) : p. 117 - 25; Tyml, K., F. Li, and J. X. Wilson, Delayed ascorbate bolus protects against maldistribution of microvascular blood flow in septic rat skeletal muscle. *Crit Care Med*, 2005. 33 (8) : p. 1823 - 8; Wu, F., K. Tyml, and J. X. Wilson, Ascorbate inhibits iNOS expression in endothoxin- and IFN gamma-stimulated rat skeletal muscle endothelial cells. *FEBS Lett*, 2002. 520 (1 - 3) : p. 122 - 6; Wu, F., J. X. Wilson, and K. Tyml, Ascorbate inhibits iNOS expression and preserves vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle of septic mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003. 285 (1) : p. R50 - 6; および Wu, F., J. X. Wilson, and K. Tyml, Ascorbate protects against impaired arteriolar constriction in sepsis by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. *Free Radic Biol Med*, 2004. 37 (8) : p. 1282 - 9 を参照されたい。  
20  
30  
40

#### 【0073】

本明細書に開示の免疫刺激調製物の治療効果を最適化するために、これらの発見を利用することは本発明の範囲内である。AAの使用のさらなる支持は、AAおよびビタミンEを使用して、敗血症性患者（免疫過剰活性化状態を示す敗血症）で実施された無作為化臨床試験から得られ、これは、酸化ストレスのパラメーターの低下と同様に、優れたアウトカムを示している。

#### 【0074】

最近の一試験では、全身性炎症の患者においてAAを単独で評価した。研究者らは、全

身表面積の30%超が傷害された熱傷患者について検討した。患者に静脈内AAをi.v.投与するか(66mg/kg/時を24時間、n=19)、または標準医療のみを施した(対照、n=18)。AA処置により、24時間全輸液量および体液貯留(血管の漏出を示す)の統計的に有意な減少がもたらされた。おそらく最も顕著なことは、機械的人工呼吸の必要性の低下であった: 処置群は、平均12.1±8.8日間必要としたが、一方対照群は21.3±15.6日間必要とした。例えば、Tanaka, H., et al., Reduction of resuscitation fluid volumes in severely burned patients using ascorbic acid administration: a randomized, prospective study. Arch Surg, 2000. 135(3): p. 326-31を参照されたい。10

#### 【0075】

血管漏出症候群に伴う数多くの炎症性マーカーがSIRSおよび重篤な熱傷患者でも見出されることを考慮すると、AAが、IL-2療法に対して、毒性見込みの軽減および効力の促進の両方によるいくらかの有益な効果を及ぼし得る可能性が提示される。

#### 【0076】

本発明の一部の実施形態では、精製されたリンパ球集団と一緒に異種応答性免疫細胞の培養を実施する。例えば、細胞集団とT細胞を含有する細胞亜集団とを分離するステップを、例えば密度勾配遠心分離による单核細胞画分の分画または指標としてT細胞の表面マーカーを使用する分離手段により実施することができる。次いで、表面マーカーに基づいた単離を実施することができる。表面マーカーの非限定例としては、CD3、CD8、およびCD4が挙げられ、これらの表面マーカーに依存する分離法は当技術分野で公知である。20

#### 【0077】

例えば、このステップは、抗CD8抗体が固定化されているビーズなどの担体または培養容器を、T細胞を含有する細胞集団と混合し、担体に結合したCD8ポジティブT細胞を回収することによって、実施することができる。抗CD8抗体が固定化されているビーズとして、例えば、CD8 MicroBeads、DynaBeads M450 CD8、およびEli-gix抗CD8 mAbコーティングニッケル粒子が好適に使用されている。30

#### 【0078】

これは、指標としてCD4を使用して実施することでも同じであり、例えば、CD4 MicroBeads、DynaBeads M-450 CD4も使用することができる。本発明の一部の実施形態では、培養の開始前に制御性T細胞を枯渇させる。制御性T細胞の枯渇は、ニューロピリン、CD25、CD4、CTLA4、および膜結合性TGF-ベータなどのマーカーを発現する細胞を除去することによるネガティブセレクションにより実施することができる。当業者による実験は、腫瘍死滅および腫瘍部位への遊走の両方に關して最大活性を有するエフェクターリンパ球または細胞傷害性細胞を生成するために種々の培養条件で実施することができる。例えば、細胞集団およびT細胞を含有する細胞亜集団を培養するステップは、細胞集団に応じた適切な公知の培養条件を選択することにより実施することができる。40

#### 【0079】

加えて、癌細胞に由来する異種抽出物を使用して細胞集団を刺激するステップでは、栄養膜または栄養膜様細胞が培養を行う培地に加えられる。例えば、サイトカイン、ケモカイン、または他の成分を培地に添加することができる。本明細書では、サイトカインは、T細胞に作用することができる限り、特に限定されることなく、その例としては、IL-2、IFN-ガンマ、形質転換増殖因子(TGF)-ベータ、IL-15、IL-7、IFN-アルファ、IL-12、CD40L、およびIL-27が挙げられる。

#### 【0080】

細胞性免疫を増強する観点から、特定の実施形態では、IL-2、IFN-ガンマ、ま50

たは IL - 12 が使用され、また *in vivo* での移入 T 細胞の生存を向上させる観点からは、IL - 7、IL - 15、または IL - 21 が使用される。加えて、ケモカインは、T 細胞に作用し、遊走活性を示す限り、限定されない。その非限定例としては、RANTES、CCL21、M1P1アルファ、M1P1ベータ、CCL19、CXCL12、IP - 10、および MIG が挙げられる。細胞集団の刺激は、T 細胞の表面上に存在する分子、例えば CD3、CD28、もしくは CD44 に対するリガンド、および / またはその分子に対する抗体の存在によって実施することができる。

#### 【 0081 】

さらに、細胞集団は、細胞表面上の癌抗原に由来するペプチドなどの標的ペプチドを提示する抗原提示細胞（樹状細胞）などの他のリンパ球と接触させることにより刺激することができる。特定の一実施形態では、栄養膜を使用して、*in vivo* 投与前に *in vitro* で増殖または感作されるように T 細胞および / または NK 細胞を刺激する。エンドポイントとして細胞障害性および遊走を評価することに加えて、T 細胞活性を評価する他の手段に基づいて細胞産物を最適化することも本発明の範囲内である。例えば、本発明の方法における T 細胞の機能増強は、サイトカインアッセイ、抗原特異的細胞アッセイ（テトラマーアッセイ）、増殖アッセイ、細胞溶解性細胞アッセイ、あるいは組換え腫瘍関連抗原または免疫原性フラグメントまたは抗原由来ペプチドを用いた *in vivo* 遅延型過敏性試験を使用して、各ステップの前後の複数時点で評価することができる。

#### 【 0082 】

免疫応答の増大を測定するためのさらなる方法の例としては、遅延型過敏性試験、ペプチド主要組織適合遺伝子複合体テトラマーを使用するフローサイトメトリー、リンパ球増殖アッセイ、酵素結合免疫吸着測定法、酵素結合免疫スポット測定法（enzyme-linked immunospot assay）、サイトカインフローサイトメトリー、直接細胞傷害性アッセイ、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応によるサイトカイン mRNA の測定、または限界希釈法など T 細胞応答を測定するために現在使用されているアッセイが挙げられる。

#### 【 0083 】

本発明を使用する、作製した細胞の効力の *in vivo* 評価は、本発明の機能が増強された T 細胞の最初の投与前または治療開始後の種々の時点で、抗原特異的細胞アッセイ、増殖アッセイ、細胞溶解性細胞アッセイ、あるいは組換え腫瘍関連抗原または免疫原性フラグメントまたは抗原由来ペプチドを用いた *in vivo* 遅延型過敏性試験を使用して、生体で評価することができる。

#### 【 0084 】

免疫応答の増大を測定するためのさらなる方法の例としては、遅延型過敏性試験、ペプチド主要組織適合遺伝子複合体テトラマーを使用するフローサイトメトリー、リンパ球増殖アッセイ、酵素結合免疫吸着測定法、酵素結合免疫スポット測定法（enzyme-linked immunospot assay）、サイトカインフローサイトメトリー、直接細胞傷害性アッセイ、定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応によるサイトカイン mRNA の測定、または限界希釈法など T 細胞応答を測定するために現在使用されているアッセイが挙げられる。さらに、免疫応答は、体重、生体が保持する腫瘍の直径または悪性度、あるいは被験体または被験体群の生存率または生存期間によって評価することができる。

#### 【 0085 】

異種免疫処置の起こり得る用量制限毒性の 1 つは、血管漏出症候群（VLS）である可能性がある。これは、IL - 2 投与などの他の免疫療法の主要な用量制限有害作用であるとみなされている。転移性腎細胞癌患者で実施された試験のメタ分析では、目的の応答が患者の 23 % で観察され、それらの大多数は、10 年を超えて持続した。不運にも、患者の 65 % は、VLS のために治療を中断または中止しなければならない。この症候群は、細胞外液溢出の増大、低血圧、腹水、肺水腫、および水胸症を特徴とし、全身性炎症反応症候群（SIRS）と臨床的に類似している。皮膚症状には、紅斑性発疹、ならびに皮膚

10

20

30

40

50

の熱傷および搔痒に関連する軽度の乳頭状浮腫が含まれる。

【0086】

VLS の重篤な形態は、肺不全または心不全を伴い、約 1 % の治療患者が死に至るアウトカムになる。典型的には、VLS の症状は、昇圧療法、および浸透圧効果のためのコロイド溶液を含むものなど妥当な補液により治療される。患者はまた、テオフィリンおよびテルブタリンで治療することも可能であり、これに対する臨床経験によると、急性発作の重症度および頻度の低減が可能になることが示唆される。

【0087】

細胞レベルでは、VLS は内皮細胞活性化および血管透過性の亢進と関連することがよく知られている。IL-2 を投与された患者の生検により、ICAM および LFA-1 などの接着分子の発現が増大することが示された。これらのタンパク質は顆粒球の血管外遊走を促進することが知られているが、そのようなアップレギュレーションは、内皮細胞培養物に直接 *in vitro* で IL-2 を添加した場合には観察されず、この効果が他の宿主成分に媒介されることが示唆される。IL-2 の主要な細胞標的の 1 つが、2 つの IL-2 受容体型を発現する T 細胞であることを考慮すると、最初の T 細胞活性化が、IL-2 投与後の内皮に対する下流炎症性効果への主要な寄与要因であるように見える。

【0088】

初期の研究において、Rosenberg のグループは、IL-2 を投与したマウスに、放射性ヨウ素化アルブミンを投与して組織の放射活性を評価することにより VLS を定量化するためのマウスモデルを確立した。このモデルでは、ガンマ線カウントの増加が、内皮透過性および組織へのアルブミン漏出と相關する。彼らは、放射線、シクロホスファミド、またはステロイドにより免疫抑制されたヌードマウスまたはマウスへの IL-2 の投与が、血管漏出の顕著な低下または血管漏出がないことと関連することを見出した。例えば、Rosenstein, M., S. E. Etttinghausen, and S. A. Rosenberg, Extravasation of intravascular fluid mediated by the systemic administration of recombinant interleukin 2. J Immunol, 1986. 137(5): p. 1735-42 を参照されたい。したがって、LAK 生成のプロセスは、VLS の刺激に関係している可能性がある。

【0089】

興味深いことには、研究者らは、宿主リンパ球の枯渇により、IL-2 および LAK 移入に対する応答ではなく、IL-2 単独に対する応答でのみ血管漏出が低減することを見出した。他の研究では、NK マーカーのアシアロ - GM1 を有する細胞が、IL-2 関連毒性の一部と関連することが示された。一群は、アシアロ GM1 に対する抗血清が、死亡率、血管漏出症候群、および肝損傷を抑制し、IL-2 処置により誘導されたアシアロ GM1 + リンパ球による肺血管系および肝血管系の浸潤を低減することを示した。アシアロ - GM1 搀持細胞の枯渇は、リンパ過形成、Lyt 2 + リンパ球による組織浸潤、組織および末梢の好酸球増加または血小板減少を変化させなかった。興味深いことには、この抗血清は、colon 38 結腸癌を担持する BDF マウスにおける IL-2 療法の抗腫瘍効果に影響を及ぼさなかった。したがって、高用量 IL-2 による T 細胞および NK 細胞活性化は、これに限定されるものではないが、内皮細胞活性化を局的に誘導することが知られ、全身性には SIRS のメディエーターである TNF-アルファを含む種々のサイトカインの産生を誘導し得る。癌において免疫系の過剰活性化により誘導される炎症性カスケードについての知識は、当業者が治療効果を維持しながら、有害作用を最小限に抑える方法で本発明を実行するのに有用である。

【0090】

IL-2 などの効力のある免疫促進剤の投与に付随する別の事象に、補体活性化がある。補体系は、肝臓で主に生成する約 30 種の循環タンパク質の酵素カスケードであり、炎症および種々の免疫応答の増幅を引き起こす。補体系は、古典的（抗体媒介）経路、副経路（抗体非依存性）、またはマンノース結合レクチン経路を介して活性化することができ

10

20

30

40

50

、これらすべてによって、膜に細孔を生成させることにより細胞溶解を引き起こす膜侵襲複合体の形成がもたらされる。

【0091】

3 × 10 (6) U / m<sup>2</sup> の 1 日用量で連続 5 日間、24 時間 i.v. 点滴により IL-2 を投与された転移性腎癌患者の臨床試験において、古典補体経路成分の C3 および C4 が、IL-2 点滴中およびその休止後毎日測定された。IL-2 投与は、C3 および C4 の両方のレベルの顕著な低下を伴った。このレベルは IL-2 点滴終了後の平均 5 日に關し標準化したものである。例えば、Lissoni, P., et al., Activation of the complement system during immunotherapy of cancer with interleukin-2: a possible explanation of the capillary leak syndrome. Int J Biol Markers, 1990. 5 (4) : p. 195 - 7 を参照されたい。  
10

【0092】

別の試験では、IL-2 を投与された患者における VLS の存在が C3a および古典的補体成分 C4a のレベルにより評価された補体活性化と関連した。この試験では、C3a のレベルは、敗血症および熱傷の患者で見出されたレベルと同様に上昇した。例えば、Thijs, L. G., et al., Activation of the complement system during immunotherapy with recombinant IL-2. Relation to the development of side effects. J Immunol, 1990. 144 (6) : p. 2419 - 24 を参照されたい。  
20

【0093】

インターロイキン 2 およびリンフォカイン活性化キラー細胞による治療を受けた 23 人の癌患者を調査する別の試験では、治療 8 日目までに C3a des Arg 濃度が 3 倍上昇すること、また C4a des Arg の濃度も治療終了までに上昇することが示された。補体系の活性化と関連して、補体受容体 1 型および補体受容体 3 型の好中球表面における発現が増大した。例えば、Moore, F. D., Jr., et al., The systemic complement activation caused by interleukin-2 / lymphokine-activated killer-cell therapy of cancer causes minimal systemic neutrophil activation. Int J Cancer, 1991. 49 (4) : p. 504 - 8 を参照されたい。  
30

【0094】

補体活性化が T 細胞に興味深いことに依存することは、IL-2 投与に伴う内皮活性化および VLS に T 細胞が必要であることを実証する研究を橋渡しする可能性がある。一試験では、癌患者が同様の前処置を受けて、C3a、B a、B b、および SC5b-9 の血漿レベルが制御されることが示された。IL-2 処置後、C3a レベルは対照と比較して平均 15.6 倍増大することが示された。補体活性化副経路に属する B a および B b タンパク質はそれぞれ、IL-2 処置後 8.0 倍および 5.0 倍増大した。エフェクター補体複合体の SC5b-9 の血漿レベルは、5.0 倍増大し、血漿 C4b および iC3b 濃度はそれぞれ、処置後 4.8 倍および 2.9 倍増大した。  
40

【0095】

補体活性化における患者のリンパ球の関与を示すために、研究者らは、T 細胞マーカーの CD3 を発現する細胞が、IL-2 療法後、抗 C3c および抗 SC5b-9 の表面発現をそれぞれ 6.2 倍および 5.1 倍増大させることを見出した。これらの結果は、T 細胞が IL-2 誘導補体活性化に関与していると研究者に結論を下せるものである。これはまた、炎症性タンパク質である C 反応性タンパク質 (CRP) の濃度増大が IL-2 療法後に見出されること、また T 細胞が CRB に結合することにおいて示された。T 細胞結合 CRP は、補体副経路を活性化することができた。Deehan, D. J., et al  
50

., Correlation of serum cytokine and acute phase reactant levels with alterations in weight and serum albumin in patients receiving immunotherapy with recombinant IL-2. *Clin Exp Immunol*, 1994. 95 (3) : p. 366 - 72; Vachino, G., et al., Complement activation in cancer patients undergoing immunotherapy with interleukin-2 (IL-2) : binding of complement and C-reactive protein by IL-2-activated lymphocytes. *Blood*, 1991. 78 (10) : p. 2505 - 13を参照されたい。  
10

【0096】

治療的には、補体阻害剤であるC1エステラーゼ阻害剤の投与は、患者におけるIL-2誘導低血圧および補体活性化を軽減することができる。補体カスケードの種々の成分は、直接内皮細胞を活性化し、内皮細胞活性化は、リンパ球および好中球の血管外遊走を引き起こすだけでなく、組織因子のアップレギュレーションにより血栓症も引き起こす。C5aは、内皮細胞の活性化および透過性を誘導することが実証されている補体活性化の副生成物である。このタンパク質はまた、全身性炎症性障害の主要なエフェクターであり、その抗体は、一部の効果シグナルおよび内皮活性化の抑制に関する、この条件について臨床的に評価されている。  
20

【0097】

補体エフェクター複合体SC5b-9が、補体に対する応答遺伝子(Response Gene to Complement) (RGC)-32の発現を刺激することによって(これにより、次いでCDC2およびAKT経路が活性化する)、内皮細胞活性化を誘導することがin vitroで示された。Jeffrey Plat tのグループは、補体活性化がIL-1の誘導と関連すると結論した。IL-1の誘導により、E-セレクチン、細胞内接着分子-1、血管細胞接着分子-1、Iカッパ-Bアルファ、インテロイキン(IL)-1アルファ、IL-1ベータ、IL-8、および組織因子の内皮細胞発現が刺激される。Saadi, S., et al., Endothelial cell activation by pore-forming structures: pivotal role for interleukin-1 alpha. *Circulation*, 2000. 101 (15) : p. 1867 - 73を参照されたい。したがって、IL-2誘導VLSのカスケードでは、T細胞活性化が補体活性化と関連している可能性があり、補体活性化により内皮細胞活性化が刺激される。  
30

【0098】

内皮細胞活性化の基本的特徴の1つは、凝固カスケードの刺激である。したがって、本発明の種々の特定の実施形態では、免疫関連活性化から内皮細胞を保護することが想定される。内皮を保護する手段には、静脈内アスコルビン酸などの静脈内抗酸化剤の投与が含まれる。一般に、アスコルビン酸またはその塩は、5.0 ~ 30.0 gの量、好ましくは5.0 ~ 10.0 gの量で使用される。非経口製剤のpHは、6.0 ~ 8.0の間である。腫瘍患者に対する静脈内アスコルビン酸の使用に関する手引きは、米国特許第6,284,786号明細書および米国特許第6,426,076号明細書で見つけることができる。  
40

【0099】

VLSにはSIRSと多くの共通の要素があるという新たな見方によれば、共通の特徴の1つは、局所血小板の発生および凝固系活性化である。自然免疫応答は、凝固刺激およびその結果としての隔離によって病原体を局所的に排除する能力を有する。しかしながら、このプロセスは、SIRSまたはVLSなど、全身性レベルで起こる場合には病態になる。組織因子発現のアップレギュレーションが、IL-2で処置された動物に由来する内皮細胞で見られた。例えば、Trichonas, G., et al., A novel  
50

nonradioactive method to evaluate vascular barrier breakdown and leakage. Invest Ophthalmol Vis Sci. 51(3): p. 1677-82を参照されたい。

【0100】

このタンパク質の発現は、凝固カスケードの活性を引き起こすと共に、炎症過程を刺激することが知られている。Hackらは、IL-2療法の患者では第XII因子およびブレカリクレインの分解があることを示すことによって、凝固タンパク質の接触系の活性化を実証した。これらのタンパク質の減少は、アルブミン減少に対して補正した場合、それらのレベルが依然として顕著に低下、すなわち、それぞれ80および50%であったので、間隙へのタンパク質漏出によるものではないように見えた（内皮はアルブミンに対してよりもこれらの凝固因子に対して透過性が高い可能性がまだあり、これが「ように見えた」を選ぶ理由である）。Hack, C. E., et al., Studies on the contact system of coagulation during therapy with high doses of recombinant IL-2: implications for septic shock. Thromb Haemost, 1991. 65(5): p. 497-503を参照されたい。

10

【0101】

したがって、凝固系の非特異的活性化およびその結果生じる血栓症の可能性が、IL-2処置の結果として起こる。多くの癌患者が本質的に血栓形成促進状態であることを考慮すると、IL-2療法が血栓合併症をもたらし得ることは理論的にあり得る。本発明の特定の実施形態では、凝固カスケードの操作が、免疫活性化の間に発生し得る凝固異常を低減するように免疫療法と併用して実施される。

20

【0102】

顆粒球活性化および組織浸潤は、全身性の免疫／炎症活性化の特徴である。IL-2に関する4人の患者の試験において、顆粒球はIL-2後に活性化されるようになり、IL-2後6時間に生じたエラスター／アルファ1-アンチトリプシン（Eアルファ1A）およびラクトフェリンの平均ピーク値は、それぞれ212（標準誤差=37）および534（標準誤差=92）ng/mlであった。補体カスケードの活性化は、IL-2の5日目におけるC3aピーク値の用量依存的な上昇により証明された。C3aレベルとIL-2後最初の24時間における低血圧の程度との間の顕著な相関（r=0.91）、ならびにC3aレベルと体重の増加および血清アルブミンの減少などの毛細管漏出のパラメーターとの間の顕著な相関（r=0.71）が認められ、これにより、PMNが活性化されると、内皮細胞の損傷が惹起され、次いで補体カスケードの活性化がもたらされるという結論が得られた。

30

【0103】

IL-2療法の患者の好中球は、強力な好中球活性化の表現型による証拠（CD11b/CD18接着受容体発現のアップレギュレーション）および機能的な証拠（過酸化水素および次亜塩素酸の産生）の両方を示した。したがって、腫瘍に対する過剰免疫の誘導中の好中球活性化についての知識を考慮に入れるべきであり、必要に応じて抗炎症剤を使用することによって、適切に処置されるべきである。心不全、粘膜炎などの慢性的な炎症状態、および敗血症またはGVHDなどの急性状態と関連するものとして、細菌叢の体循環への移行がある。

40

【0104】

興味深いことには、腸内細菌叢および炎症に対する干渉もまたIL-2毒性の中にあるように見える。最近の試験では、51匹の雄性ラットを無作為化して、10(5)(n=15)、10(4)(n=8)、10(3)(n=8)、または10(2)(n=8)の用量(IU)で、1日2回腹腔内注射によりrIL-2を投与するか、または生理食塩水をボーラス投与した(n=12)。5日後に、回腸の組織形態を評価し、腸間膜リンパ節複合体を培養した。結果から、大腸菌(*Escherichia coli*)による腸間

50

膜リンパ節のコロニー形成が、rIL-2の10(5)IUで処置されたすべてのラットで、また用量が低減されたrIL-2で処置されたラットの62%、37%、および12%で起こることがわかった。移行は対照動物では観察されなかった。粘膜下リンパ管の増加および時々の粘膜破壊が10(5)IUを投与された群にのみ見られた。このデータから、rIL-2が細菌移行を促進することがわかり、ヒトにおける高用量rIL-2の毒性を悪化させる機序が示唆される。Reynolds, J. V., et al., High-dose interleukin 2 promotes bacterial translocation from the gut. Br J Cancer, 1995, 72(3): p. 634-6を参照されたい。

【0105】

10

恒常に誘導されるリンパ球活性化に関して臨床的に見られる顕著な効果、およびT細胞の恒常的増殖が腸内細菌叢移行と関連していると考えられる最近の発見を考慮すると、IL-2の腫瘍抑制活性は、腸内細菌叢に高度に依存している可能性があると考えられ、したがってこれにより患者間変動があそらく説明される。したがって、本発明の一実施形態では、抗生物質またはプロバイオティクスによる腸ミクロビオームの操作は、本発明の文脈内にあると企図される。米国特許第8,197,805号明細書；同第5,728,380号明細書；同第5,589,168号明細書、および同第7,195,906号明細書に記載されるように、乳酸菌を含む数多くのプロバイオティクスが炎症を軽減することが示されている。これらの文献のそれぞれは、参照により本明細書に組み込まれる。

【0106】

20

いくつかの研究から、酸化ストレスが、優先的に補体カスケードを活性化する様式で、内皮細胞を修飾することが実証されている。酸化ストレス後の内皮細胞による補体活性化の促進にマンノース結合レクチンおよびレクチン補体活性化経路（LCP）が関与することが、低酸素（24時間；1%O<sub>2</sub>）/再酸素負荷（3時間；21%O<sub>2</sub>）ヒト内皮細胞を使用する試験で示された。補体活性化のマーカーとしてiC3b沈着を使用すると、N-アセチル-D-グルコサミン、またはL-マンノースではなくD-マンノースが活性化を遮断することが示され、酸化ストレスがマンノース依存性経路をアップレギュレートすることが示唆された。これはまた、マンノース結合レクチン欠損血清およびマンノース結合レクチンに対する抗体を使用して実証された。さらに、C3沈着が、酸化ストレスの公知の誘発要因である心虚血再灌流傷害を受けたラットの虚血領域で見出された。

30

【0107】

本発明の一部の実施形態では、細胞傷害性または他の癌治療薬の投与は、腫瘍体積を縮小させるために、免疫処置の前に行われる。本明細書に記載される本発明の種々の実施形態に有用な癌治療薬としては、以下に限定されるものではないが、アセグラトン；アクラルビシン；アルトレタミン；アミノグルテチミド；5-アミノグレブリン酸（5-Aminoglycavulinic Acid）；アムサクリン；アナストロゾール；塩酸アンシタビン；17-1A抗体；抗リンパ球免疫グロブリン；アンチネオプラスチックA10；アスパラギナーゼ；ペガスバルガーゼ；アザシチジン；アザチオプリン；バチマスタット；ベンゾポルフィリン誘導体；ビカルタミド；塩酸ビサントレン；硫酸ブレオマイシン；ブレキナルナトリウム；ブロクスウリジン；ブスルファン；キャンパス-IH；カラセミド；カルベチマー；カルボプラチン；カルボコン；カルモフル；カルムスチン；クロランプシル；クロロゾトシン；クロモマイシン；シスプラチン；クラドリビン；コリネバクテリウムパルブム（Corynebacterium parvum）；シクロホスファミド；シクロスボリン；シタラビン；ダカルバジン；ダクチノマイシン；塩酸ダウノルビシン；デシタビン；ジアジコン；ジクロロジエチルスルフィド；ジデムニンB；ドセタキセル；ドキシフルリジン；塩酸ドキソルビシン；ドロルオキシフェン（Droxifene）；エキノマイシン；エダトレキサート；エリプチニウム；エルムスチン；エンロプラチン；エノシタビン；塩酸エピルビシン；リン酸エストラムスチンナトリウム；エタニダゾール；エトグルシド；エトポシド；塩酸ファドロゾール；ファザラビン；フェンチニド；ブロクスウリジン；リン酸フルダラビン；フルオロウラシル；フルタミド；ホル

40

50

メスタン；ホテムスチン；硝酸ガリウム；ゲンシタビン (Gencitabine)；グスペリムス；ホモハリントニン；ヒドロキシ尿素；塩酸イダルビシン；イホスファミド；イルモホシン；トシリ酸イソプロスルファン；イノリモマブ (Inolimomab)；インターロイキン-2；イリノテカン；JM-216；レトロゾール；リチウムガモレネート (Lithium Gamolenate)；ロバプラチン；ロムスチン；ロニダミン；マホスファミド；メイファラン (Meiphalan)；メノガリル；メルカプトプリン；メトレキセート；メトレキセートナトリウム；ミボプラチン；ミルテホシン；ミソニダゾール；ミトプロニトール；ミトグアゾン二塩酸塩；ミトラクトール；マイトイシン；ミトタン；塩酸ミトザントロン (Mitozantrone Hydrochloride)；ミゾリビン；モピダモール；ムイトライチルペプチド (Muitali chil peptide)；ムロモナブ-CD3；塩酸ムスチン；ミコフェノール酸；ミコフェノール酸モフェチル；ネダプラチン；ニルタミド；塩酸ニムスチン；オキサリプラチン；パクリタキセル；PCNU；ペノスタチン；硫酸ペプロマイシン；ピボプロマン；ピラルビシン；イセチオニ酸ピリトレキシム；塩酸ビロキサントロン；ブリカマイシン；ポルフィマーナトリウム；ブレドニムスチン；塩酸プロカルバジン；ラルチトレキセド；ラニムスチン；ラゾキサン；ログレチミド；ロキニメックス；セブリプラチン；セムスチン；シロリムス；シゾフィラン；ソブゾキサン；ナトリウムブロメブレート (Sodium Bromobrante)；スバルホス酸；スバルホサートナトリウム；ストレプトゾシン (Sreptozocin)；スロフェヌル；タクロリムス；タモキシフェン；テガフル；塩酸テロキサントロン；テモゾロミド；テニポシド；テストラクトン；四ナトリウムメソテトラフェニルポルフィンスルホン酸塩 (Tetrasodium Mesotetraphenylporphine-sulphonate)；チオグアニン；チオイノシン；チオテバ；トポテカン；トレミフェン；トレオスルファン；トリメトレキサート；トロホスファミド；腫瘍壞死因子；ウベニメクス；ウラムスチン (Uramustine)；硫酸ビンプラスチン；硫酸ビンクリスチン；硫酸ビンデシン；酒石酸ビノレルビン；ボロゾール；ジノスタチン；ゾリモマブ・アリトックス (Zolimomab Aritox)；および塩酸ゾルビシンが挙げられる。

## 【0108】

以下の実施例は、本発明の実施形態をさらに詳細に説明するために提供するものであり、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。これらは、使用され得るもの典型であるが、当業者に公知の他の手順、方法論、または技術を代替的に使用することができる。本発明の結果に顕著にまたは実質的に影響を及ぼさない、本開示発明の変更形態は、本開示の手段の範囲内に包含されることを理解されたい。以下に提供される実施例は、本発明の範囲を限定するものではなく、特定の実施形態を説明することを意図するものである。

## 【実施例】

## 【0109】

実施例1：異種胎盤ワクチンの予防的投与

ブタ組織およびB16溶解物の調製：

ブタ胎盤組織を分娩するブタから入手し、5%のペニシリン-ストレプトマイシン混合物を含有する無菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、輸送のために氷上に置いた。胎盤組織を組織粉碎機でホモジナイズし、液体窒素と42の水浴に交互に浸す4回の凍結融解サイクルに付した。細胞デブリを1500gで45分間遠心分離してペレットにした。上清を回収して、0.2ミクロンのミリポアフィルターで滅菌した。全タンパク質濃度は、Bradfordアッセイ (BioRad) を使用して測定した。対照組織のために、同一プロトコールを使用してブタ肝臓およびB16黒色腫細胞株のタンパク質を単離した。

## 【0110】

ワクチンの調製および投与：

全タンパク質調製物を、2mg/mlの濃度で無菌注射用PBSに溶解し、腫瘍チャレ

10

20

30

40

40

50

ンジ 7 日前に C 5 7 / B L 6 マウスに 5 0  $\mu$  L (全重量 1 0  $\mu$  g) を皮下注射した。

【 0 1 1 1 】

腫瘍モデル

5  $\times$  1 0  $^5$  個の B 1 6 細胞 (米国培養細胞系統保存機関 (Manassas, VA)) を、6 ~ 8 週齢の雌性 C 5 7 B L / 6 (The Jackson Laboratory: Bar Harbor, ME) の後肢側腹部に皮下注射した。腫瘍増殖は、カリパスによる 2 つの直交する直径の測定により 3 日ごとに評価し、腫瘍がいずれかの方向で 1 cm のサイズに達したときに動物を屠殺した。腫瘍容積は、次式により計算した：(最短直径  $\times$  最長直径) / 2

【 0 1 1 2 】

実験群

1 群当たり 4 匹の C 5 7 / B L 6 マウスに、腫瘍チャレンジの 7 日前に、以下の処置を施した：

A . 5 0  $\mu$  l の生理食塩水の処置

B . 5 0  $\mu$  L の生理食塩水中の 1 0  $\mu$  g のブタ肝臓抽出物

C . 5 0  $\mu$  L の生理食塩水中の 1 0  $\mu$  g のブタ胎盤抽出物

D . 5 0  $\mu$  L の生理食塩水中の 1 0  $\mu$  g の B 1 6 黒色腫細胞抽出物

【 0 1 1 3 】

結果：

図 1 ~ 3 に示すように、B 1 6 黒色腫細胞増殖の統計的に有意な阻害がブタ胎盤抽出物を投与されたマウスで観察されたが、対照のブタ肝臓抽出物では観察されなかった。これは、異種胎盤の組織特異的な癌免疫能力を示す。

【 0 1 1 4 】

実施例 2：アジュバントとして自己由来の樹状細胞を使用する異種胎盤ワクチン接種

本発明をさらに詳細に説明するために、上記実施例に記載のように、胎盤タンパク質抽出物を精製した。腫瘍モデルとして、B 1 6 黒色腫担持 C 5 7 / B L 6 マウスを使用し、同系 DC 源を必要とした。手短に言えば、C 5 7 / B L 6 マウス (Jackson Labs, Bar Harbor ME) の大腿骨および脛骨から骨髄細胞を摘出し、洗浄し、組換え GM - CSF (1 0 ng / ml; Peprotech, Rocky Hill, NJ) および組換えマウス IL - 4 (1 0 ng / ml; Peprotech) を添加された、2 ml の完全培地 (2 mM の L - グルタミン、1 0 0 U / ml のベニシリン、1 0 0  $\mu$  g のストレプトマイシン、5 0  $\mu$  g の 2 - メルカプトエタノール、および 1 0 % のウシ胎仔血清 (すべて Gibco RBL 製) を添加された RPMI - 1 6 4 0 ) 中、2 4 ウエルプレート (1 ウエル当たり  $2 \times 1 0 ^6$  細胞) で培養した。すべての培養物は、5 % 加湿 CO<sub>2</sub> 中、3 7 °C でインキュベートした。4 8 時間の培養後、非付着顆粒球を除去し、新鮮培地を加えた。

【 0 1 1 5 】

7 日間の培養後、FACS により測定すると、細胞の 9 0 % 超が特徴的な DC 特異的マーカーを発現していた。DC を洗浄し、4 0 0  $\mu$  l の無血清 RPMI - 1 6 4 0 中、ウェル当たり  $2 \times 1 0 ^5$  個の細胞の濃度で、2 4 ウエルプレートに播種した。7 日目に、骨髄由来 DC をパルスしないままにするか、または 1 0  $\mu$  g / ml のブタ肝臓ホモジネート (抽出物) もしくは異種ブタ胎盤ホモジネート (抽出物) でパルスした。パルスのために、肝臓または胎盤の抽出物と共に DC を 2 4 時間インキュベートした。次いで、マウス当たり 5 0 0 , 0 0 0 個の細胞濃度で DC を皮下投与した。上記に記載のように、5  $\times$  1 0  $^5$  個の B 1 6 黒色腫細胞を同時に注射投与した。対照として、ブタ肝臓ホモジネートおよび DC 単独を投与した。図 4、5、および 6 に示すように、異種胎盤をパルスされた DC を投与されたマウスはいずれも顕著な腫瘍を発生しなかった。

【 0 1 1 6 】

実施例 3：異種胎盤ワクチン接種は、腫瘍細胞溶解物ワクチンの免疫原性を高めることができる

10

20

30

40

50

異種胎盤ワクチン接種の利用に対する潜在的な懸念は、腫瘍組織特異性の欠如である。胎盤ワクチン接種の免疫刺激特性を考慮すると、異種ワクチン調製物の同時投与が既存の癌ワクチン源の免疫原性を増強するか否かについて疑問があった。

【0117】

C 57 / B 6 マウスに、実施例 1 に記載のように、B 16 黒色腫を投与した。次いで、同日にマウスを以下のもので処置した：(a) 生理食塩水；(b) B 16 溶解物；(c) ブタ肝臓溶解物と一緒に B 16 溶解物；(d) ブタ胎盤溶解物と一緒に B 16 溶解物；(e) ブタ肝臓溶解物単独；および(f) ブタ胎盤溶解物単独。

【0118】

腫瘍細胞をワクチン調製物と同時にマウスに接種した場合、黒色腫 B 16 細胞単独で免疫処置したときには、保護効果はなかった。これに対して、共混合物による免疫処置は、異種胎盤単独よりも強力な効果を示した。注目すべきことには、胎盤単独でも幾分腫瘍予防活性があった(図 7)。

【0119】

実施例 4：異種胎盤ワクチン接種による結腸癌の処置

6 ~ 8 週齢の雌性 C 57 / B 6 マウスの側腹部位に、200,000 個の MC 38 結腸癌細胞を皮下注射した。腫瘍チャレンジ後 5 日目、10 日目、および 15 日目に、動物を以下のいずれかで処置した：(a) 生理食塩水；(b) ブタ肝臓抽出物 (P L E)；および(c) ブタ胎盤抽出物 (P P E)。(2 × 10 (5)) 個の MC 38 マウス結腸腺癌細胞、腫瘍を 1 週間に 2 回測定した。図 8 に示すように、異種胎盤抽出物 (ブタ) は、腫瘍増殖を阻止した。

【0120】

特定の実施形態を上記に記載したが、これら記載の実施形態は例としてのみ示したものであることを理解されよう。したがって、本明細書に記載の系および方法は、記載の実施形態に基づいて限定されるべきではない。正しくは、本明細書に記載の組成物および方法は、上記の説明および添付図面と併せて解釈される場合、後続する特許請求の範囲に照らしてのみ限定されるべきである。

【0121】

特許、特許出願、および刊行物を含む、本明細書に引用のすべての参考文献は、これまでに具体的に組み込まれているか否かにかかわらず、その内容全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0122】

本開示では、その特定の実施形態と関連させて説明しているが、さらなる変更形態も可能であることを理解されよう。本出願は、一般に、本開示の原理に従い、本開示が関係する技術範囲内で公知または通例の実行範囲内になるような、また本明細書の上記に示される基本的な特徴に適用され得るような本開示からの逸脱を含む、本開示のいかなる変更形態、使用、または適応も包含することを意図するものである。

10

20

30

## 【図1】

表1:B16データ、実験1

処置	0日目*	3日目*	6日目*	9日目*	12日目*	15日目*	18日目*
生理食塩水	0	0	0	515	960	1900	2647
生理食塩水	0	0	0	474	800	1690	2300
生理食塩水	0	0	0	376	780	1560	2200
生理食塩水	0	0	0	557	800	1206	1970
PLE**	0	0	0	543	1000	1363	1574
PLE	0	0	0	447	1020	1110	1755
PLE	0	0	0	845	880	1405	1647
PLE	0	0	0	375	790	1107	1364
PPE***	0	0	0	0	0	0	0
PPE	0	0	0	180	540	220	0
PPE	0	0	0	150	440	109	0
PPE	0	0	0	0	400	300	300
B16抽出物	0	0	0	555	990	1127	1509
B16抽出物	0	0	0	570	807	1380	1700
B16抽出物	0	0	0	780	1506	1685	2200
B16抽出物	0	0	0	770	1070	1500	1880

\*腫瘍体積(mm3);\*\*ブタ肝臓抽出物(異種タンパク質についてのお照);\*\*\*ブタ胎盤抽出物

## 【図2】

表2:B16データ:

処置	0日目*	3日目*	6日目*	9日目*	12日目*	15日目*	18日目*
生理食塩水	0	0	0	440	550	990	1900
生理食塩水	0	0	0	470	708	1253	2380
生理食塩水	0	0	0	780	1100	1600	2907
生理食塩水	0	0	0	700	1200	1908	3332
生理食塩水	0	0	0	450	770	1898	3032
生理食塩水	0	0	0	300	590	1100	2225
生理食塩水	0	0	0	400	660	1200	2408
PLE**	0	0	200	607	1297	2262	死亡
PLE	0	0	0	350	790	1774	死亡
PLE	0	0	0	289	660	1408	2784
PLE	0	0	0	274	507	1333	3076
PLE	0	0	0	235	674	959	1709
PLE	0	0	0	226	758	2704	死亡
PLE	0	0	0	114	425	994	2351
PPE***	0	0	0	365	694	1626	0
PPE	0	0	0	0	0	0	0
PPE	0	0	0	0	0	157	274
PPE	0	0	0	258	195	180	150
PPE	0	0	0	462	306	251	268
PPE	0	0	0	356	608	500	347
PPE	0	0	0	0	0	0	0
B16抽出物	0	0	0	744	1759	2774	死亡
B16抽出物	0	0	0	327	774	2682	死亡
B16抽出物	0	0	152	479	1537	3002	死亡
B16抽出物	0	0	0	438	1000	2527	3272
B16抽出物	0	0	0	362	706	1749	2268
B16抽出物	0	0	0	202	809	1774	2582
B16抽出物	0	0	0	164	538	994	2314

\*腫瘍体積(mm3);\*\*ブタ肝臓抽出物(異種タンパク質についてのお照);\*\*\*ブタ胎盤抽出物

## 【図3】

表3:B16データ:

処置	0日目*	3日目*	6日目*	9日目*	12日目*	15日目*	18日目*
生理食塩水	0	0	0	142	794	1860	3250
生理食塩水	0	0	0	347	895	1964	3011
生理食塩水	0	0	0	358	950	1594	2967
生理食塩水	0	0	0	225	748	1953	3538
生理食塩水	0	0	0	352	945	2033	3693
生理食塩水	0	0	124	462	905	2002	死亡
生理食塩水	0	0	0	338	946	2362	死亡
PLE**	0	0	0	264	994	1957	3523
PLE	0	0	0	437	859	2749	3268
PLE	0	0	0	336	539	1794	2973
PLE	0	0	0	297	479	1362	3573
PLE	0	0	0	276	589	1643	死亡
PLE	0	0	0	215	573	1513	3216
PLE	0	0	0	219	968	2053	3537
PPE***	0	0	0	0	0	0	0
PPE	0	0	0	164	199	175	90
PPE	0	0	0	80	148	254	332
PPE	0	0	0	0	0	0	0
PPE	0	0	0	253	574	758	367
PPE	0	0	0	114	241	262	153
PPE	0	0	0	357	442	427	326
B16抽出物	0	0	0	448	956	1672	3336
B16抽出物	0	0	235	747	2363	死亡	死亡
B16抽出物	0	0	0	468	1473	死亡	死亡
B16抽出物	0	0	0	356	973	2452	死亡
B16抽出物	0	0	0	305	903	3256	死亡
B16抽出物	0	0	24	537	945	1742	2967
B16抽出物	0	0	213	474	1152	2251	3251

\*腫瘍体積(mm3);\*\*ブタ肝臓抽出物(異種タンパク質についてのお照);\*\*\*ブタ胎盤抽出物

## 【図4】

表4:実験1 DCとの組合せ

処置	0日目*	3日目*	6日目*	9日目*	12日目*	15日目*	18日目*
生理食塩水	0	0	142	463	1253	2692	死亡
生理食塩水	0	0	0	573	1173	2538	死亡
生理食塩水	0	0	124	468	1537	2548	死亡
生理食塩水	0	0	0	327	1112	2164	3251
生理食塩水	0	0	0	349	1852	2267	3351
生理食塩水	0	0	0	222	1253	2363	3253
DC	0	0	0	427	852	1633	2996
DC	0	0	0	556	1684	2628	3272
DC	0	0	0	329	1326	2371	3617
DC	0	0	0	269	253	462	662
DC	0	0	0	539	637	1288	2373
DC	0	0	0	328	1424	1994	2572
DC	0	0	0	371	1384	3151	死亡
DC+PLE**	0	0	0	115	963	2314	死亡
DC+PLE	0	0	0	316	624	1299	2363
DC+PLE	0	0	0	161	772	2151	2963
DC+PLE	0	0	0	142	368	974	1953
DC+PLE	0	0	0	361	862	1683	2374
DC+PLE	0	0	0	237	641	1672	2689
DC+PLE	0	0	0	348	974	2074	死亡
DC+PPE***	0	0	0	0	0	126	0
DC+PPE	0	0	0	427	894	538	582
DC+PPE	0	0	0	362	163	169	124
DC+PPE	0	0	0	114	0	0	0
DC+PPE	0	0	0	50	233	166	120
DC+PPE	0	0	0	243	0	0	100

\*腫瘍体積(mm3);\*\*ブタ肝臓抽出物;\*\*\*ブタ胎盤抽出物

## 【図5】

表5:実験2 DCとの組合せ

処置	0日目*	3日目*	6日目*	9日目*	12日目*	15日目*	18日目*
生理食塩水	0	0	0	243	947	1644	3423
生理食塩水	0	0	0	315	633	1474	2641
生理食塩水	0	0	0	215	836	1375	2731
生理食塩水	0	0	0	125	805	1478	2426
生理食塩水	0	0	0	331	894	1854	2426
生理食塩水	0	0	0	252	855	1563	2844
生理食塩水	0	0	0	125	756	1531	2942
DC	0	0	0	356	653	1643	2996
DC	0	0	0	436	975	1833	死亡
DC	0	0	0	485	638	1263	3617
DC	0	0	0	573	964	1442	2361
DC	0	0	0	427	845	1372	3215
DC	0	0	0	375	784	1126	2513
DC	0	0	0	426	956	2163	3263
DC + PLE**	0	0	0	364	868	2953	死亡
DC + PLE	0	0	0	426	986	2326	死亡
DC + PLE	0	0	0	423	638	2633	死亡
DC + PLE	0	0	0	462	853	2832	死亡
DC + PLE	0	0	0	236	875	2647	死亡
DC + PLE	0	0	0	352	752	2325	死亡
DC + PLE	0	0	0	362	754	2942	死亡
DC + PPE***	0	0	0	0	0	0	0
DC + PPE	0	0	0	0	0	0	0
DC + PPE	0	0	0	0	0	0	0
DC + PPE	0	0	0	0	0	0	0
DC + PPE	0	0	0	0	0	0	0
DC + PPE	0	0	0	0	0	0	0

\*腫瘍体積(mm<sup>3</sup>);\*\*ブタ肝臓抽出物;\*\*\*ブタ胎盤抽出物

## 【図6】

表6:実験3 DCとの組合せ

処置	0日目*	3日目*	6日目*	9日目*	12日目*	15日目*	18日目*
生理食塩水	0	0	36	572	2025	死亡	
生理食塩水	0	0	0	315	633	1474	
生理食塩水	0	0	0	424	1537	2741	死亡
生理食塩水	0	0	0	473	904	1853	3174
生理食塩水	0	0	0	379	1035	2362	3117
生理食塩水	0	0	0	226	794	1994	3614
生理食塩水	0	0	0	257	689	1316	2221
DC	0	0	0	164	783	2164	3167
DC	0	0	0	325	753	1262	3262
DC	0	0	0	427	997	1742	2278
DC	0	0	0	237	478	856	1682
DC	0	0	0	332	573	1083	2276
DC	0	0	0	237	648	1758	2186
DC	0	0	0	117	484	804	1934
DC + PLE**	0	0	0	258	648	1775	2372
DC + PLE	0	0	0	32	853	1864	2489
DC + PLE	0	0	0	399	994	2175	死亡
DC + PLE	0	0	0	153	558	1974	死亡
DC + PLE	0	0	0	694	死亡		
DC + PLE	0	0	0	993	1783	死亡	
DC + PLE	0	0	0	368	856	1684	3001
DC + PPE***	0	0	0	0	0	0	0
DC + PPE	0	0	0	0	0	0	0
DC + PPE	0	0	0	0	0	0	0
DC + PPE	0	0	0	0	0	0	0
DC + PPE	0	0	0	0	0	0	0

\*腫瘍体積(mm<sup>3</sup>);\*\*ブタ肝臓抽出物;\*\*\*ブタ胎盤抽出物

## 【図7】

表7:異種胎盤抽出物による全細胞ワクチン活性の増強

処置	0日目*	3日目*	6日目*	9日目*	12日目*	15日目*	18日目*
生理食塩水	0	0	0	341	748	1422	3125
生理食塩水	0	0	0	225	864	2153	3522
生理食塩水	0	0	0	374	964	2563	死亡
生理食塩水	0	0	0	125	444	1753	2875
生理食塩水	0	0	0	2.5	853	1076	死亡
生理食塩水	0	0	0	288	890	2111	死亡
生理食塩水	0	0	0	153	995	2185	3674
B16抽出物	0	0	0	0	342	864	2621
B16抽出物	0	0	0	885	1644	死亡	
B16抽出物	0	0	0	125	910	2031	死亡
B16抽出物	0	0	0	42	1035	2212	死亡
B16抽出物	0	0	0	325	1743	2952	死亡
B16抽出物	0	0	0	274	954	1536	2724
B16抽出物	0	0	0	210	836	1971	死亡
B16 + PLE**	0	0	0	102	972	2071	死亡
B16 + PLE	0	0	0	86	792	1726	死亡
B16 + PLE	0	0	0	310	1106	2436	死亡
B16 + PLE	0	0	0	33	181	802	2073
B16 + PLE	0	0	0	102	702	1924	371
B16 + PLE	0	0	0	42	104	259	1022
B16 + PLE	0	0	0	126	845	2051	死亡
B16 + PPE***	0	0	0	0	0	0	0
B16 + PPE	0	0	0	0	0	0	0
B16 + PPE	0	0	0	0	0	0	0
B16 + PPE	0	0	0	0	0	0	0
B16 + PPE	0	0	0	0	0	0	0
PLE	0	0	0	124	752	1748	2578
PLE	0	0	0	252	842	1845	3262
PLE	0	0	0	212	783	1567	死亡
PLE	0	0	0	136	837	1583	3261
PLE	0	0	0	415	1593	2631	死亡
PLE	0	0	0	184	574	1963	2841
PLE	0	0	0	121	315	505	2415
PPE	0	0	0	245	263	532	963
PPE	0	0	0	0	105	144	196
PPE	0	0	0	321	425	638	527
PPE	0	0	0	0	183	152	125
PPE	0	0	0	0	124	325	251
PPE	0	0	0	0	415	673	1251
PPE	0	0	0	0	251	734	2153

\*腫瘍体積(mm<sup>3</sup>);\*\*ブタ肝臓抽出物;\*\*\*ブタ胎盤抽出物

## 【図8】

表8:異種胎盤抽出物による結腸癌の処置

処置	0日目*	4日目*	8日目*	12日目*	16日目*	20日目*	24日目*
生理食塩水	0	21	36	73	152	235	357
生理食塩水	0	23	47	123	167	257	361
生理食塩水	0	25	34	68	195	362	死亡
生理食塩水	0	25	75	262	死亡		
生理食塩水	0	21	83	153	275	死亡	
生理食塩水	0	52	72	146	347	死亡	
PLE**	0	11	25	63	112	274	398
PLE	0	23	46	95	274	死亡	
PLE	0	34	63	125	158	257	362
PLE	0	22	27	164	268	299	356
PLE	0	11	56	179	352	死亡	
PLE	0	25	48	88	168	352	死亡
PLE	0	23	79	124	258	死亡	
PPE***	0	0	0	34	0	0	0
PPE	0	12	27	36	32	28	36
PPE	0	0	0	0	0	0	0
PPE	0	24	36	55	74	43	21
PPE	0	11	13	35	21	20	0
PPE	0	17	26	24	26	23	25
PPE	0	23	23	32	36	31	25

\*腫瘍体積(mm<sup>3</sup>);\*\*ブタ肝臓抽出物;\*\*\*ブタ胎盤抽出物

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/US 2013/055632
<b>Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)</b>	
<p>1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:</p> <p>a. (means)</p> <p><input type="checkbox"/> on paper</p> <p><input type="checkbox"/> in electronic form</p> <p>b. (time)</p> <p><input type="checkbox"/> in the international application as filed</p> <p><input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form</p> <p><input type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purposes of search</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 2013/055632

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

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

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

**Remark on Protest**

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

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US 2013/055632</b>																		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <div style="text-align: center; margin-top: 10px;"> <i>A61K 35/50 (2006.01)</i>  <i>C12N 5/073 (2010.01)</i>  <i>A61P 37/04 (2006.01)</i>  <i>A61P 35/00 (2006.01)</i> </div>																				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>A61K 35/50, 35/48, 35/12, 35/00, C12N 5/073, 5/071, 5/07, 5/00, A61P 37/04, 37/00, 35/00</b> Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>RUPAT, Patentscope, DWPI, Espacenet, NCBI (PubMed), SpringerLink</b>																				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">ZHAOHUI ZHONG et al. Induction of antitumor immunity through xenoplacental immunization. <i>Journal of Translational Medicine</i>, 2006, 4:22, doi:10.1186/1479-5876-4-22, pp.1-9,especially, p. 2, col. 1, 2, pp. 4, 5, 7, fig. 2, 3, 6</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-16, 19 17, 18, 20</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">US 2004/0076618 A1 (RU-CHEIN YU) 22.04.2004, claims 1, 2, 9, paragraphs [0028]-[0031]</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1, 6, 7, 12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">EP 1133990 A1 (BLAVA, PIER MARIO et al.) 19.09.2001, claims 1, 3, 8</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1, 6, 7, 12</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">LIANG Wen et al. In vitro induction of specific anti-tumoral immunity against laryngeal carcinoma by using human interleukin-12 gene-transfected dendritic cells. <i>Chinese Medical Journal</i>, 2011, 124(9), pp. 1357-1361</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">20</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	ZHAOHUI ZHONG et al. Induction of antitumor immunity through xenoplacental immunization. <i>Journal of Translational Medicine</i> , 2006, 4:22, doi:10.1186/1479-5876-4-22, pp.1-9,especially, p. 2, col. 1, 2, pp. 4, 5, 7, fig. 2, 3, 6	1-16, 19 17, 18, 20	Y	US 2004/0076618 A1 (RU-CHEIN YU) 22.04.2004, claims 1, 2, 9, paragraphs [0028]-[0031]	1, 6, 7, 12	X	EP 1133990 A1 (BLAVA, PIER MARIO et al.) 19.09.2001, claims 1, 3, 8	1, 6, 7, 12	Y	LIANG Wen et al. In vitro induction of specific anti-tumoral immunity against laryngeal carcinoma by using human interleukin-12 gene-transfected dendritic cells. <i>Chinese Medical Journal</i> , 2011, 124(9), pp. 1357-1361	20			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																		
X	ZHAOHUI ZHONG et al. Induction of antitumor immunity through xenoplacental immunization. <i>Journal of Translational Medicine</i> , 2006, 4:22, doi:10.1186/1479-5876-4-22, pp.1-9,especially, p. 2, col. 1, 2, pp. 4, 5, 7, fig. 2, 3, 6	1-16, 19 17, 18, 20																		
Y	US 2004/0076618 A1 (RU-CHEIN YU) 22.04.2004, claims 1, 2, 9, paragraphs [0028]-[0031]	1, 6, 7, 12																		
X	EP 1133990 A1 (BLAVA, PIER MARIO et al.) 19.09.2001, claims 1, 3, 8	1, 6, 7, 12																		
Y	LIANG Wen et al. In vitro induction of specific anti-tumoral immunity against laryngeal carcinoma by using human interleukin-12 gene-transfected dendritic cells. <i>Chinese Medical Journal</i> , 2011, 124(9), pp. 1357-1361	20																		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.																		
<table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 30%; padding: 2px;">* Special categories of cited documents:</td> <td style="width: 10%; padding: 2px;">"T"</td> <td style="width: 60%; padding: 2px;">later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td style="padding: 2px;">"X"</td> <td style="padding: 2px;">document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td style="padding: 2px;">"Y"</td> <td style="padding: 2px;">document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td style="padding: 2px;">"&amp;"</td> <td style="padding: 2px;">document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																		
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																		
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family																		
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																				
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																				
Date of the actual completion of the international search 21 November 2013 (21.11.2013)		Date of mailing of the international search report 26 December 2013 (26.12.2013)																		
Name and mailing address of the ISA/ FIPS Russia, 123995, Moscow, G-59, GSP-5, Berezkovskaya nab., 30-1 Facsimile No. +7 (499) 243-33-37		Authorized officer V.Temnova Telephone No. 495 531 65 15																		

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/US 2013/055632
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CUI J et al. Dendritic cells transfected with lentiviral vector-encoding human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augment antitumour T-cell response in vitro. <i>Int J Immunogenet</i> , 2010, 37(5), pp. 329-336, (abstract), [online], [retrieved on 26.11.2013]. Retrieved from PubMed, PMID: 20518832	20
Y	BRAMLETTE TB et al. Interferon Alfa-2b or not 2b? Significant differences exist in the decision-making process between melanoma patients who accept or decline high-dose adjuvant interferon Alfa -2b treatment. <i>Dermatol Surg</i> , 2007, 33(1), pp. 11-16, (abstract), [online], [retrieved on 26.11.2013]. Retrieved from PubMed, PMID: 17214673	17, 18
A	ZIMING YU et al. Lysis of Porcine Trophoblast Cells by Endometrial Natural Killer-Like Effector Cells In Vitro Does Not Require Interleukin-2. <i>Biology of Reproduction</i> , 1994, 51, pp. 1279-1284	1-20

---

フロントページの続き

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

(74)代理人 100129838

弁理士 山本 典輝

(72)発明者 ポリス, マルコシアン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 91501, バーバンク, 北6番ストリート 217

アパートメント エイチ

F ターム(参考) 4C085 AA02 AA38 BB01 BB11 CC03 CC04 CC05 CC27 EE03 EE06

FF02 FF11 FF16 FF19 FF24 FF30 GG01 GG08

4C087 AA01 AA02 BB58 CA04 CA06 CA16 NA14 ZB26 ZB27