

(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2017-533278

(P2017-533278A)

(43) 公表日 平成29年11月9日 (2017.11.9)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/20 (2006.01)	A 6 1 K 38/20	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-542805 (P2017-542805)	(71) 出願人	517154100 ニューメディシンス、 インコーポレイテッド NEUMEDICINES, INC. アメリカ合衆国 91107 カリフォルニア州 パサディナ #307 アルタディナ ドライヴ 133 エヌ.
(86) (22) 出願日	平成27年10月30日 (2015.10.30)	(74) 代理人	100123788 弁理士 宮崎 昭夫
(85) 翻訳文提出日	平成29年6月27日 (2017.6.27)	(74) 代理人	100127454 弁理士 緒方 雅昭
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/058355		
(87) 国際公開番号	W02016/070072		
(87) 国際公開日	平成28年5月6日 (2016.5.6)		
(31) 優先権主張番号	62/073,197		
(32) 優先日	平成26年10月31日 (2014.10.31)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL-12組成物および造血回復における使用方法

(57) 【要約】

本開示の形態と実施態様は、HSC T移植後の患者における造血回復を改善するために有用な治療方法およびインターロイキン12 (IL-12) を含む組成物を提供する。特に、本開示が提供する、代表的な方法およびIL-12を含む組成物は、BMCTと同様に有効に、致死量の放射線照射を浴びたマウスにおいて、造血を促進し、末梢血細胞の回復および生存率を増大させており、rHuIL-12療法は、HSC T後のHSC生着を増加させることができることを示している。発明者らは、可能性を有するIL-12の標的である、IL-12Rβ2発現細胞を、放射線照射を浴びたマウス骨髄中から同定した。rMuIL-12の投与は、マウス骨髄中のIL-12Rβ2発現性Lin⁺細胞の数を増加させており、骨髄HSCおよびニッチ細胞がrMuIL-12の直接的な標的であること、また、rMuIL-12の造血促進活性は、HSC上のIL-12受容体によって仲介されることを示している。最終的に、発明者らは、ヒト骨髄のLin⁺細胞およびCD34⁺細胞上でのIL-12Rβ2の発現を証明し、ヒトの移植におけ

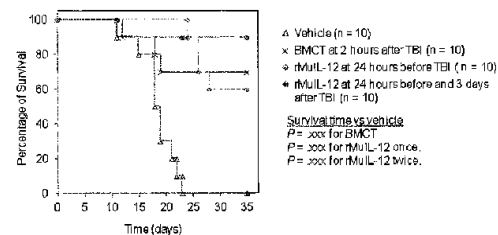


FIG. 1A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

造血作用を回復させる、ならびに、感染合併症を低減させるための医薬組成物であって

、

(a) 該医薬組成物は、IL-12を含有しており、かつ

(b) 該医薬組成物を使用して、造血作用を回復させ、そして、感染合併症を低減させるための方法は、骨髄破壊的療法に引き続き、骨髄破壊的療法に先立ち、または骨髄破壊的療法に先立ちおよび引き続いて、該医薬組成物の有効用量を1回またはそれ以上投与する工程を含む、

ことを特徴とする、医薬組成物。

10

【請求項 2】

造血作用を回復させるための医薬組成物であって、

(a) 該医薬組成物は、IL-12を含有しており、かつ

(b) 該医薬組成物を使用して、造血作用を回復させるための方法は、骨髄破壊的療法の前、後、または、前後のいずれかに、該医薬組成物の有効用量を1回またはそれ以上投与する工程を含み、

その際、骨髄中の造血細胞上のIL-12受容体の活性化を介して、造血作用が回復させられる、

ことを特徴とする、医薬組成物。

20

【請求項 3】

骨髄破壊的療法において、放射線療法が使用される

ことを特徴とする、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

骨髄破壊的療法において、化学療法が使用される

ことを特徴とする、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

骨髄破壊的療法は、放射線療法と化学療法の組み合わせである

ことを特徴とする、請求項1または2に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

骨髄中の前駆細胞の数の増加を介して、造血作用が回復させられる

ことを特徴とする、請求項1～5のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 7】

末梢血において、造血が回復させられる

ことを特徴とする、請求項1～6のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

末梢血球数が増加される

ことを特徴とする、請求項7に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

血小板が増加される

ことを特徴とする、請求項7または8に記載の医薬組成物。

40

【請求項 10】

白血球が増加される

ことを特徴とする、請求項7～9のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

網赤血球が増加される

ことを特徴とする、請求項7～10のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

赤血球が増加される

ことを特徴とする、請求項7～11のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

50

造血細胞は、ニッチ細胞および幹細胞を含んでいる
ことを特徴とする、請求項 2 ～ 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

ニッチ細胞は、骨芽細胞を含む
ことを特徴とする、請求項 13 に記載の医薬組成物。

【請求項 15】

巨核球上の IL-12 受容体の活性化に引き続いて、造血が回復される
ことを特徴とする、請求項 2 ～ 12 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記巨核球は、未成熟である
ことを特徴とする、請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

骨髓中の骨芽細胞、巨核球細胞および造血幹細胞上の IL-12 受容体の活性化に引き
続き、造血が回復される
ことを特徴とする、請求項 2 ～ 14 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

骨髓破壊的療法に続いて、自家移植がなされる
ことを特徴とする、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

骨髓破壊的療法に続いて、同種移植がなされる
ことを特徴とする、請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

骨髓破壊的療法に先立ち、造血幹細胞の動員および採取がなされる
ことを特徴とする、請求項 1 ～ 19 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 21】

造血幹細胞の動員および採取の結果、CD34⁺細胞数の低下が引き起こされる
ことを特徴とする、請求項 20 に記載の医薬組成物。

【請求項 22】

慢性骨髓性白血病、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、低悪性度非ホジキ
ンリンパ腫、急性骨髓性白血病、中悪性度リンパ腫、多発性骨髓腫、骨髓異形成症候群お
よびホジキン病からなる群から選択される造血器悪性腫瘍を治療するために、骨髓破壊的
療法が施されている
ことを特徴とする、請求項 1 ～ 21 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 23】

前記療法は、骨髓非破壊的である
ことを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 24】

慢性骨髓性白血病、慢性リンパ球性白血病、マンツル細胞リンパ腫、低悪性度非ホジキ
ンリンパ腫、急性骨髓性白血病、中悪性度リンパ腫、多発性骨髓腫およびホジキン病から
なる群から選ばれる造血器悪性腫瘍を治療するために、前記骨髓非破壊的療法が施されて
いる

ことを特徴とする、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

固形悪性腫瘍を治療するために、前記骨髓非破壊的療法が実施されている
ことを特徴とする、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 26】

前記骨髓非破壊的療法は、ミニ移植を含む
ことを特徴とする、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 27】

前記骨髓非破壊的療法は、強度軽減移植前治療（RIC）を含む

10

20

30

40

50

ことを特徴とする、請求項 2 3 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

I L - 1 2 は、組換えヒト I L - 1 2 である

ことを特徴とする、請求項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

本願は、参照によりその内容が全体として本明細書に組み込まれる、2 0 1 4 年 1 0 月 3 1 日に出願された米国仮特許出願第 62/073,197 号に基づく優先権の利益を主張する。

10

【0 0 0 2】

分野

本開示は、一般に、移植のための新規方法および組成物に関し；特には、I L - 1 2 を含む医薬組成物の治療有効量を、それを必要とする患者に投与することを含む、幹細胞移植後の造血作用の回復を促進するための方法、ならびに、組成物に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

背景

本開示の多様な形態ならびに態様を理解する上で、有用でありうる情報が、以下に含まれている。本明細書中に提供されるいかなる情報は、ここに記載されている、もしくは権利請求されている発明に対して、従来技術、あるいは、関連していること、あるいは、具体的または暗示的に参照されている、いかなる刊行物または文献が、従来技術であることを、自認するものではない。

20

【0 0 0 4】

幹細胞移植は、特定の悪性腫瘍、血液、骨髄の疾患を有する人のために施すことができる、血液学および腫瘍学の分野における医療行為である。造血幹細胞移植は、いまだに、多くの可能性のある合併症を伴う、リスクの大きな外科的手術であり、そして、伝統的に、生死にかかる疾患を有する患者のためにのみ、残されてきた。重篤な機能障害性の自己免疫疾患および循環器疾患等の、非悪性および非造血系の適応症において、時折、実験的に使用されているものの、より広い承認を獲得するためには、致死的な合併症のリスクが高すぎると思われる。

30

【0 0 0 5】

Worldwide Network for Blood and Marrow Transplantationによって実施された、71 か国における 1327 の医療センターの世界的調査によれば、2006 年には、世界中では、合計 50,417 例の初回造血幹細胞移植が施されたと報告された。このうち、28,901 例（57%）は、自家移植であり、21,516 例（43%）は、同種移植（家族ドナーからの 11,928 例および非血縁ドナーからの 9,588 例）であった。移植の主要な適応症は、リンパ球増殖性障害（54.5%）および白血病（33.8%）であり、そして、大半は、ヨーロッパ（48%）または南北アメリカ大陸（36%）において施された。世界骨髄ドナー協会によれば、2009 年には、非血縁間移植のために提供された、幹細胞製品は、世界的には、15,399 例（3,445 例の骨髄提供、8,162 例の末梢血幹細胞提供および 3,792 単位の臍帯血ユニット）に増加した。

40

【0 0 0 6】

かつては、造血幹細胞は骨髄から直接採取された；しかし、現在では、骨髄から循環系中への幹細胞の移動を引き起こさせる、成長因子を、患者に投与した後、患者の血流から、これらの幹細胞を直接収集されることができる。幹細胞の採取に使用される機器は、アフレーシス装置と呼ばれる。このタイプの移植は、高用量療法を施す前に、実際には、その幹細胞は、患者から収集されるため、自家移植と呼ばれる。移植の他の主要形態は、造血幹細胞は、ドナー（通常は、兄弟もしくは姉妹または適合ドナー）から収集される、

50

同種移植と称される。同種移植は、患者は、本質的に新しい免疫系を獲得するという、付加的利益を有している。現在、科学者は、患者が高用量療法を受けた後でも残存する、腫瘍細胞をしばしば根絶することができるのは、この新しい免疫系であることを認識している。この現象は、移植片対腫瘍（GVT）効果として知られている。

【0007】

広く使用されているにもかかわらず、自家または同種いずれであろうと、造血細胞移植は、いまだに、リスクの大きな外科的手術のままである。よって、造血細胞移植の分野は、最近5～10年にわたって、変化を受けてきた。特に、同種移植後に再発した患者に、ドナー由来の免疫エフェクター細胞（Tリンパ球）を患者中に再注入した場合、その後、完全な鎮静に回復させ、そして、最終的には、その疾患から治癒することができたという現象が、特筆されている。この情報は、移植分野におけるパラダイムシフトをもたらし、そして、「ミニアロ（mini-allo）」移植、「トランスプラントライト（transplant lite）」、「ドライブスルー（drive-thru）」移植、「強度軽減（reduced intensity）」移植または「混合キメラ」移植等の、他の名前でも知られる、骨髄非破壊的な同種幹細胞移植の誕生をもたらす。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

しかし、造血細胞移植のための、ミニ移植ならびに新しい手法の導入によってさえ、感染ならびに、他の合併症のリスクは、高いままである。主要な合併症は、静脈閉塞性疾患、粘膜炎、感染症（敗血症）、移植片対宿主病、ならびに新しい悪性腫瘍の発生である。よって、造血細胞移植手術を受けている患者における、その結果の改善を促進することのできる、新規薬剤が望まれている。そのような新規薬剤は、造血細胞移植引き続く、重篤な合併症の機会を低減させるとともに、造血回復の機会を増大させるだろう。

【課題を解決するための手段】

【0009】

発明の概要

したがって、造血幹細胞移植（HSCT）に引き続く、造血作用の回復のために有用な新規な方法ならびに、組成物が必要とされている。

【0010】

本開示は、造血および自然免疫の複数の経路を標的とし、そして、造血幹細胞移植（HSCT）に引き続く造血作用の回復をはじめとする、広範囲の臨床的障害にたいして、治療目的で使用方法が可能な方法および治療剤を提供する。いくつかの形態では、本開示は、HSCTに引き続く、造血回復を改善することのできる方法および治療剤を提供する。

【0011】

一形態では、本発明は、組換えヒトインターロイキン-12（rHuIL-12）および／またはそのマウスホモログ、IL-12（rMuIL-12）を含む組成物、ならびに、全身放射線照射（TBI）の前または後のいずれかに投与される、単回の低用量を使用して、骨髄を再構築するために、それらの組成物を使用する方法に関する。驚くべきことに、例えば、組換えヒトインターロイキン-12（rHuIL-12）ならびにそのマウスホモログ、IL-12（rMuIL-12）が、全身放射線照射（TBI）の前または後のいずれかに投与される単回の低用量を使用して、骨髄を再構成する、卓越した能力を有していることが証明された。

【0012】

他の形態では、本発明は、例えば、rHuIL-12と、HSCおよびニッチ細胞上に発現されているIL-12受容体との相互作用を介して、作用することのできる、rHuIL-12を、造血を刺激するために投与する方法に関する。他の形態では、本発明は、補助剤として、rHuIL-12を用いて、造血細胞移植に対する治療を施す方法または移植に引き続く、HSC移植ならびに骨髄回復を増進するための他の方法に関する。

【0013】

一形態では、電離放射線への患者の曝露に引き続く、系統、器官、組織または細胞の損傷から患者を保護する方法は、骨髄破壊および骨髄非破壊に引き続き、患者に対して、実質的に単離されたIL-12を含む医薬組成物の治療有効量の用量を投与する工程を含んでいる。代表的な骨髄破壊的な方法には、例えば、放射線、化学療法および／または放射線と化学療法が含まれる。代表的な骨髄非破壊的な方法には、例えば、ミニ移植あるいは強度軽減移植前治療が含まれる。

【0014】

一形態では、全身放射線照射として、骨髄破壊的な放射線照射を受ける。

【0015】

一形態では、2つまたはそれ以上に分割された、分割線量として、放射線照射を受ける。別の形態では、多分割照射療法における、分割線量として、放射線照射を受ける。別の形態では、加速分画療法における、分割線量として、放射線照射を受ける。

【0016】

一形態では、IL-12の有効用量は、50～300 ng/Kgの1回またはそれ以上の用量で投与される。IL-12の他の有効用量は、100～200 ng/kgの用量範囲にある。

【0017】

一形態では、1またはそれ以上のIL-12の有効用量が、HSC Tの前に投与される。他の形態では、1またはそれ以上のIL-12の有効用量が、HSC Tの前後に、投与される。別の形態では、1またはそれ以上のIL-12の有効用量が、HSC Tの後に投与される。

【0018】

一形態では、1またはそれ以上のIL-12の有効用量が、局所的に、皮下に、皮内に、静脈内に、腹腔内に、筋肉内に、硬膜外に、腸管外に、鼻腔内におよび／または頭蓋内に投与される。

【0019】

一形態では、例示的な方法および／または組成物として、本開示は、放射線照射を浴びたマウスにおいて、骨髄細胞移植(BMCT)とrMuIL-12の造血促進活性のin vivoでの比較を提供しており、そして、rHuIL-12の潜在的な細胞標的、ならびに、ヒトの造血における、IL-12受容体の役割をin vitroで実証した。

【0020】

別の形態では、例示的な方法および／または組成物として、本開示は、致死線量の放射線照射を浴びたマウスに対する、低用量(10 ng/マウス)の少なくとも1回のrMuIL-12の投与が、BMCTと同様に有効に、生存率および末梢血液細胞の回復を増大させることを実証した。一実施態様では、放射線照射の12日後においては、rMuIL-12で治療されたマウスのマウス骨髄は、IL-12受容体β2-サブユニット(IL-12Rβ2)を発現する骨髄前駆細胞、巨核球ならびに骨芽細胞の存在により、特徴付けられていた。

【0021】

一形態では、例示的な方法および／または組成物として、rMuIL-12の投与は、マウス骨髄Lin細胞中における、IL-12Rβ2を発現する細胞の数も増大させていた。一実施態様では、ヒト骨髄細胞の分析が、多能性のLin-細胞およびCD34⁺細胞は、造血幹細胞(HSC)の他のマーカーとともに、IL-12Rβ2を発現していたことを示していた。

【0022】

本明細書中に記載され、また、特許請求されている発明は、それには限定されないが、上述されたもの、あるいは、この概要中において、説明もしくは言及されたものをはじめとする、多くの性状ならびに実施態様を有する。該概要は、包括的なものであることを意図しておらず、そして、本明細書中に記載され、また、特許請求されている発明は、限定

10

20

30

40

50

ではなく、単に例示の目的でのみ、含まれている、該概要中において見出された、特徴もしくは実施態様により、限定されず、またはそれにより制限もされない。さらなる実施態様は、以下の詳細な説明中において、開示される。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1A】図1は、照射マウスにおける、生存率(a)および血液細胞回復(b~d)の増加に対する、骨髓細胞移植(BMCT)と同程度の、rMuIL-12の有効性を示す図である。動物は、静脈内への、ビヒクル、rMuIL-12(10ng/マウス)、またはBMCT(1.1×10^6 個の細胞)を受け、そして、35日間、生存率および血球数について、モニターされた。TBI=全身照射。

10

【図1B】図1は、照射マウスにおける、生存率(a)および血液細胞回復(b~d)の増加に対する、骨髓細胞移植(BMCT)と同程度の、rMuIL-12の有効性を示す図である。動物は、静脈内への、ビヒクル、rMuIL-12(10ng/マウス)、またはBMCT(1.1×10^6 個の細胞)を受け、そして、35日間、生存率および血球数について、モニターされた。TBI=全身照射。

【図1C】図1は、照射マウスにおける、生存率(a)および血液細胞回復(b~d)の増加に対する、骨髓細胞移植(BMCT)と同程度の、rMuIL-12の有効性を示す図である。動物は、静脈内への、ビヒクル、rMuIL-12(10ng/マウス)、またはBMCT(1.1×10^6 個の細胞)を受け、そして、35日間、生存率および血球数について、モニターされた。TBI=全身照射。

20

【図1D】図1は、照射マウスにおける、生存率(a)および血液細胞回復(b~d)の増加に対する、骨髓細胞移植(BMCT)と同程度の、rMuIL-12の有効性を示す図である。動物は、静脈内への、ビヒクル、rMuIL-12(10ng/マウス)、またはBMCT(1.1×10^6 個の細胞)を受け、そして、35日間、生存率および血球数について、モニターされた。TBI=全身照射。

【図2】図2：照射マウスにおける、rMuIL-12により増加された造血再構築。無照射、治療無しのマウスについて(A)、ならびに、TBIの12日後の、ビヒクルまたはrMuIL-12(20ng/マウス)の皮下注射を施した動物について、IL-12R β 2に対する染色を施した、大腿骨骨髓の切片を示している。ビヒクルによる治療が施されたマウスでは、IL-12R β 2発現細胞を欠き、そして、造血再生の兆候を示していない(B)が、rMuIL-12による治療が施されたマウスでは、造血再構築およびIL-12R β 2-発現巨核球、骨髓系前駆細胞、および骨芽細胞の存在が示されている(C-D)。rMuIL-12治療後の、造血、ならびに、IL-12R β 2発現幹細胞および非幹細胞に、記を付す。倍率=100 $\times$ 。

30

【図3】図3：海綿骨付近に観察される、巨核球の島。TBIの24時間前ならびに3日後に、rMuIL-12(20ng/マウス)の皮下注射を施されたマウスの、TBIの12日後における、IL-12R β 2に対する染色(オレンジ色)を施した、大腿骨骨髓の切片。倍率=100 $\times$ 。

【図4】図4：IL-12R β 2を発現している、マウス骨髓Lin⁻細胞。IL-12R β 2に対する抗体による標識に引き続き、マウス骨髓細胞中から、Lin⁻細胞を免疫磁気的に選択し、そして、フローサイトメトリーで解析した。ゲート領域(R6)は、IL-12R β 2を発現しているサブセットを示しており、合計すると、Lin⁻細胞のおよそ5%である。

40

【図5A】図5：IL-12R β 2を発現している、ヒト骨髓Lin⁻細胞ならびにCD34⁺細胞。ヒトLin⁻細胞(A)およびCD34⁺細胞(B、C)は、IL-12R β 2に対する抗体およびCD34に対する抗体で標識され、そして、フローサイトメトリー(AおよびB)または免疫細胞化学(C)で分析した。非染色およびアイソタイプ対照を使用して、四分象限を設定した。R2：IL-12R β 2⁺CD34⁻、R3：IL-12R β 2⁺CD34⁺、R5：IL-12R β 2⁻CD34⁺。

【図5B】図5：IL-12R β 2を発現している、ヒト骨髓Lin⁻細胞ならびにCD

50

3 4⁺細胞。ヒト L i n⁺細胞 (A) および C D 3 4⁺細胞 (B、C) は、I L-1 2 R β 2 に対する抗体および C D 3 4 に対する抗体で標識され、そして、フローサイトメトリー (A および B) または免疫細胞化学 (C) で分析した。非染色およびアイソタイプ対照を使用して、四分象限を設定した。R 2 : I L-1 2 R β 2⁺ C D 3 4⁻、R 3 : I L-1 2 R β 2⁺ C D 3 4⁺、R 5 : I L-1 2 R β 2⁻ C D 3 4⁺。

【図 5 C】図 5 : I L-1 2 R β 2 を発現している、ヒト骨髄 L i n⁺細胞ならびに C D 3 4⁺細胞。ヒト L i n⁺細胞 (A) および C D 3 4⁺細胞 (B、C) は、I L-1 2 R β 2 に対する抗体および C D 3 4 に対する抗体で標識され、そして、フローサイトメトリー (A および B) または免疫細胞化学 (C) で分析した。非染色およびアイソタイプ対照を使用して、四分象限を設定した。R 2 : I L-1 2 R β 2⁺ C D 3 4⁻、R 3 : I L-1 2 R β 2⁺ C D 3 4⁺、R 5 : I L-1 2 R β 2⁻ C D 3 4⁺。

【図 6 A】図 6 は、他の幹細胞マーカーを共発現している、ヒト L i n⁺ I L-1 2 R β 2⁺細胞および C D 3 4⁺ I L-1 2 R β 2⁺細胞。L i n⁺細胞 (A) および C D 3 4⁺細胞 (B) は、I L-1 2 R β 2 に対する抗体、ならびに、幹細胞の指標マーカーで共標識して、そして、フローサイトメトリーで分析した。なお、I L-1 2 R β 2 は、L i n⁺細胞の 1 ~ 4 % および C D 3 4⁺細胞の 6 ~ 5 0 % 上で発現していることに付記する。

【図 6 B】図 6 は、他の幹細胞マーカーを共発現している、ヒト L i n⁺ I L-1 2 R β 2⁺細胞および C D 3 4⁺ I L-1 2 R β 2⁺細胞。L i n⁺細胞 (A) および C D 3 4⁺細胞 (B) は、I L-1 2 R β 2 に対する抗体、ならびに、幹細胞の指標マーカーで共標識して、そして、フローサイトメトリーで分析した。なお、I L-1 2 R β 2 は、L i n⁺細胞の 1 ~ 4 % および C D 3 4⁺細胞の 6 ~ 5 0 % 上で発現していることに付記する。

【図 7】図 7 : T B I への曝露、ならびに、ビヒクルまたは r H u I L-1 2 のいずれかによる、T B I の 2 4 時間後の治療に引き続く、アカゲザルの生存率。

【0024】

各治療群について、試験期間にわたる生存のカプラン-マイヤープロットを示す。各用量群は、18匹の動物で構成されている。50 ng / k g、100 ng / k g、250 ng / k g および 500 ng / k g 用量群の、ビヒクル治療対照群対する、ログ・ランク検定 p-値は、それぞれ、0.0305、0.0344、0.0404、および 0.0265 であった。

【図 8】図 8 : 致死 T B I への曝露、ならびに、ビヒクルまたは r H u I L-1 2 のいずれかによる、T B I の 2 4 時間後の治療が施された、アカゲザルの経時的な血球数 (平均 ± S E M) 。

【0025】

A) 血小板 ; B) 平均血小板容積 ; C) 好中球 ; D) リンパ球 ; E) 網赤血球。正常な範囲は以下の通りである : リンパ球、1.85 ~ 8.71 × 10⁹ / L ; 好中球、1.21 ~ 10.29 × 10⁹ / L ; 血小板、252 ~ 612 × 10⁹ / L ; 平均血小板容積、6.3 ~ 9.4 f L ; 網赤血球、29.9 ~ 103.9 × 10⁹ / L。

【図 9-1】図 9 : 骨髄再生島の同定。

【0026】

(A) : 再生骨髄の病理組織学的な同定。別途切除された骨髄中に出現している、細胞のクラスターを、1つの再生島としてスコア化した。左パネル、切除された骨髄 ; 中央パネル、再生している骨髄 ; 右パネル、非照射骨髄。(O l y m p u s B X 4 1 複合型顕微鏡 ; I n f i n i t y A n a l y z e S o f t w a r e v 5.0、倍率 : 10 ×) 。

【0027】

(B) : 個々の治療群の再生島の数の定量 (左パネル、500 ng / k g 群対対照、P < 0.01)、および、ビヒクル治療対照に対する、r H u I L-1 2 治療群の組合せ (右パネル、p < 0.05) 。

【0028】

(C) 個々の治療群の再生領域の定量 (左パネル、50 および 500 ng / k g 群対対

10

20

30

40

50

照、 $p < 0.05$ ）、および、ビヒクル治療対照に対する、 $rHuIL-12$ 治療群の組合せ（右パネル、 $p < 0.05$ ）。

【0029】

（D）個々の治療群の巨核球の定量（左パネル）および、ビヒクル治療対照に対する、 $rHuIL-12$ 治療群の組合せ（右パネル）。

【図9-2】図9：骨髓再生島の同定。

【0030】

（A）：再生骨髓の病理組織学的な同定。別途切除された骨髓中に出現している、細胞のクラスターを、1つの再生島としてスコア化した。左パネル、切除された骨髓；中央パネル、再生している骨髓；右パネル、非照射骨髓。（Olympus BX41 複合型顕微鏡；Infinity Analyze Software v5.0、倍率：10×）。

【0031】

（B）：個々の治療群の再生島の数の定量（左パネル、 500 ng/kg 群対対照、 $P < 0.01$ ）、および、ビヒクル治療対照に対する、 $rHuIL-12$ 治療群の組合せ（右パネル、 $p < 0.05$ ）。

【0032】

（C）個々の治療群の再生領域の定量（左パネル、 50 および 500 ng/kg 群対対照、 $p < 0.05$ ）、および、ビヒクル治療対照に対する、 $rHuIL-12$ 治療群の組合せ（右パネル、 $p < 0.05$ ）。

【0033】

（D）個々の治療群の巨核球の定量（左パネル）および、ビヒクル治療対照に対する、 $rHuIL-12$ 治療群の組合せ（右パネル）。

【図10】図10：致死的照射を受けたマウスにおける、BMTと同様に有効な、 $rMuIL-12$ により増大される生存率（percentage survival）。

【0034】

マウスは、静脈内注射で、ビヒクル、 $rMuIL-12 \times 1$ （TBIの24時間前に 10 ng 投与）、 $rMuIL-12 \times 2$ （TBIの24時間前および3日後に 10 ng 投与）、またはBMT（TBIの2時間後に 1.1×10^6 個の細胞投与）による治療が施された。各群の生存曲線は、マンテル-コックス検定により統計的に比較された。

【図11A】図11： $rMuIL-12$ ならびにBMTにより治療された、致死的照射がなされたマウスにおける血液細胞回復は同等であった。マウスは、 $rMuIL-12 \times 1$ （TBIの24時間前に 10 ng 投与）、 $rMuIL-12 \times 2$ （TBIの24時間前および3日後に 10 ng 投与）、あるいは、TBIの2時間後に投与されたBMT（ 1.1×10^6 個の細胞）により治療された。A）好中球；B）RBC；C）血小板の血球数が、21、28、および35日目に測定された。統計分析を、スチューデントのT検定を使用して実施した。パネルA、B、およびCの破線は、マウスにおける正常レベルを示す。エラーバーは、平均±標準偏差を表す。

【図11B】図11： $rMuIL-12$ ならびにBMTにより治療された、致死的照射がなされたマウスにおける血液細胞回復は同等であった。マウスは、 $rMuIL-12 \times 1$ （TBIの24時間前に 10 ng 投与）、 $rMuIL-12 \times 2$ （TBIの24時間前および3日後に 10 ng 投与）、あるいは、TBIの2時間後に投与されたBMT（ 1.1×10^6 個の細胞）により治療された。A）好中球；B）RBC；C）血小板の血球数が、21、28、および35日目に測定された。統計分析を、スチューデントのT検定を使用して実施した。パネルA、B、およびCの破線は、マウスにおける正常レベルを示す。エラーバーは、平均±標準偏差を表す。

【図11C】図11： $rMuIL-12$ ならびにBMTにより治療された、致死的照射がなされたマウスにおける血液細胞回復は同等であった。マウスは、 $rMuIL-12 \times 1$ （TBIの24時間前に 10 ng 投与）、 $rMuIL-12 \times 2$ （TBIの24時間前および3日後に 10 ng 投与）、あるいは、TBIの2時間後に投与されたBMT（ 1.1

×10⁶個の細胞)により治療された。A)好中球;B)RBC;C)血小板の血球数が、21、28、および35日目に測定された。統計分析を、スチューデントのT検定を使用して実施した。パネルA、B、およびCの破線は、マウスにおける正常レベルを示す。エラーバーは、平均±標準偏差を表す。

【図12A】図12:ヒト骨髓CD34⁺細胞がIL-12Rベータ2を発現する。

【0035】

A)ヒトCD34⁺細胞を、IL-12Rベータ2に対する抗体で標識して、そして、免疫細胞化学を使用して分析した。分析は、Olympus BX41複合型顕微鏡上で、×200(20×対物および10×対眼レンズ)で実施した。

【0036】

B)ヒト骨髓CD34⁺細胞上のIL-12Rベータ2発現を、フローサイトメトリーによって分析した(ドットプロットを示す)。各抗体について、そのアイソタイプ型一致対照も、含めた。3回の独立した分析中の1つの代表的な画像を示している。

【図12B】図12:ヒト骨髓CD34⁺細胞がIL-12Rベータ2を発現する。

【0037】

A)ヒトCD34⁺細胞を、IL-12Rベータ2に対する抗体で標識して、そして、免疫細胞化学を使用して分析した。分析は、Olympus BX41複合型顕微鏡上で、×200(20×対物および10×対眼レンズ)で実施した。

【0038】

B)ヒト骨髓CD34⁺細胞上のIL-12Rベータ2発現を、フローサイトメトリーによって分析した(ドットプロットを示す)。各抗体について、そのアイソタイプ型一致対照も、含めた。3回の独立した分析中の1つの代表的な画像を示している。

【図13A】図13:正常ヒト骨髓由来のCD34⁺細胞上における、IL-12Rベータ2と、他の幹細胞マーカーと共発現。CD34⁺細胞を、IL-12R 2に対する抗体ならびに、それぞれ、示された幹細胞マーカーで共標識して、フローサイトメトリーによって分析した。A)CD117(ckit);B)CD135(Flt3);C)CD133;D)CD318(CDCP1)。結果の各セットについて、左パネルは、それぞれ、アイソタイプ対照を示す。3回の独立した分析中の1つの代表的な画像を示している。

【図13B】図13:正常ヒト骨髓由来のCD34⁺細胞上における、IL-12Rベータ2と、他の幹細胞マーカーと共発現。CD34⁺細胞を、IL-12R 2に対する抗体ならびに、それぞれ、示された幹細胞マーカーで共標識して、フローサイトメトリーによって分析した。A)CD117(ckit);B)CD135(Flt3);C)CD133;D)CD318(CDCP1)。結果の各セットについて、左パネルは、それぞれ、アイソタイプ対照を示す。3回の独立した分析中の1つの代表的な画像を示している。

【図13C】図13:正常ヒト骨髓由来のCD34⁺細胞上における、IL-12Rベータ2と、他の幹細胞マーカーと共発現。CD34⁺細胞を、IL-12R 2に対する抗体ならびに、それぞれ、示された幹細胞マーカーで共標識して、フローサイトメトリーによって分析した。A)CD117(ckit);B)CD135(Flt3);C)CD133;D)CD318(CDCP1)。結果の各セットについて、左パネルは、それぞれ、アイソタイプ対照を示す。3回の独立した分析中の1つの代表的な画像を示している。

【図13D】図13:正常ヒト骨髓由来のCD34⁺細胞上における、IL-12Rベータ2と、他の幹細胞マーカーと共発現。CD34⁺細胞を、IL-12R 2に対する抗体ならびに、それぞれ、示された幹細胞マーカーで共標識して、フローサイトメトリーによって分析した。A)CD117(ckit);B)CD135(Flt3);C)CD133;D)CD318(CDCP1)。結果の各セットについて、左パネルは、それぞれ、アイソタイプ対照を示す。3回の独立した分析中の1つの代表的な画像を示している。

。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0039】

詳細な説明

造血幹細胞移植（H S C T）を含む、移植に引き続く、造血回復のための方法および組成物が提供される。造血幹細胞移植（H S C T）は、骨髓、末梢血幹細胞または臍帯血に由来する複能性造血幹細胞の移植を含む。本明細書中で使用されるH S C T骨髓破壊的な方法は、放射線、化学療法および／または放射線と化学療法の使用を含むことができる。方法および組成物は、ミニ移植または強度軽減前処置のような骨髓非破壊的な方法にも、有用であることができる。

【0040】

本開示の形態および実施態様は、造血幹細胞移植（H S C T）を含む移植後の造血回復のための、組換えヒトインターロイキン-12（I L - 12）調製物を含むI L - 12を含む、治療用組成物およびその使用方法を提供する。

【0041】

代表的な組成物および／または方法として、組換えヒトインターロイキン-12（r H u I L - 12）およびそのマウスホモログ、I L - 12（r M u I L - 12）は、全身放射線照射（T B I）の前または後のいずれかに投与される、単回の低用量を使用して、骨髓を再構成する卓越した能力を示す。これらの新規で驚くべきかつ予想外の知見は、r H u I L - 12が、H S Cおよびニッチ細胞上に発現されたI L - 12受容体に直接作用して、造血を刺激するという証拠を提供した。さらなる臨床試験は、移植に引き続く、H S C生着および骨髓回復を増進するための、造血細胞移植物の補助剤としてのr H u I L - 12の使用の有効性を裏付ける。

【0042】

本開示は、H S C Tに引き続く、造血回復を向上することのできる方法および治療剤にも関する。例として、H S C Tの前に、I L - 12の有効用量を、投与することができる。他の例では、1回またはそれ以上のI L - 12の有効用量を、H S C Tの前および後に、投与する。別の例では、1回またはそれ以上のI L - 12の有効用量を、H S C Tの後に、投与する。

【0043】

加えて、本開示は、実質的に単離されたI L - 12を含む医薬組成物の治療有効量の用量を、骨髓破壊ならびに骨髓非破壊に引き続き、患者に投与する工程を含む；電離放射線への患者の曝露に引き続く、系統、器官、組織または細胞の損傷から、患者を保護する方法に関する。骨髓破壊的方法には、例えば、放射線、化学療法および／または放射線と化学療法が含まれる。代表的な骨髓非破壊的方法には、例えば、ミニ移植または強度軽減前処置が含まれる。

【0044】

本開示は、例えば、全身放射線照射として、あるいは、体の一部の放射線照射を介して、施すことができる、骨髓破壊的放射線照射にも関する。放射線照射は、2つまたはそれ以上の画分の分割線量として、施すこともできる。別の実施態様では、放射線照射は、多分割照射療法においては、分割線量として、施される。別の形態では、放射線照射は、加速分割療法においては、分割線量として、施される。

【0045】

一形態では、I L - 12の有効用量は、1回またはそれ以上の100～300 ng / K gの用量で投与される。

【0046】

一形態では、1回またはそれ以上のI L - 12の有効用量が、局所的に、皮下に、皮内に、静脈内に、腹腔内に、筋肉内に、硬膜外に、腸管外に、鼻腔内におよび／または頭蓋内に投与される。

【0047】

本発明は、放射線照射された患者における、組換えI L - 12と骨髓細胞移植（B M C

10

20

30

40

50

T) の造血促進活性を *in vivo* で比較するための方法、ならびに、*rHuIL-12* の潜在的な細胞標的、およびヒトの造血における、*IL-12* 受容体の役割を *in vitro* で実証する方法にも関する。

【0048】

本発明は、*BMC T* と同等に有効に、生存率および末梢血液細胞の回復を増大させた、致死的な放射線照射を受けたマウスに対する、少なくとも1回の低用量 ($10 \text{ ng} / \text{マウス}$) の *rMuIL-12* の投与にも関する。一実施態様では、放射線照射の12日後における、*rMuIL-12* で治療されたマウスのマウス骨髄は、*IL-12* 受容体 $\beta 2$ -サブユニット (*IL-12R β 2*) を発現する骨髄前駆細胞、巨核球および骨芽細胞の存在にとり、特徴付けられた。

10

【0049】

本発明は、マウス骨髄 *Lin* 細胞中における、*IL-12R β 2* を発現する細胞の数を増大させるための *rMuIL-12* の投与にも関する。一実施態様では、ヒト骨髄細胞の分析は、多能性 *Lin* 細胞および *CD34⁺* 細胞は、造血幹細胞 (*HSC*) の他のマーカーとともに、*IL-12R β 2* をも発現したことを示した。

【0050】

本明細書中に記載され、また、特許請求されている発明は、それには限定されないが、上述されたもの、あるいは、この概要中において、説明もしくは言及されたものをはじめとする、多くの性状ならびに実施態様を有する。該概要は、包括的なものであることを意図しておらず、そして、本明細書中に記載され、また、特許請求されている発明は、限定ではなく、単に例示の目的でのみ、含まれている、該概要中において見出された、特徴もしくは実施態様により、限定されず、またはそれにより制限もされない。さらなる実施態様は、以下の詳細な説明中において、開示される。

20

【0051】

本明細書中で使用される場合、*IL-12* は、免疫におけるその役割に関して、周知である、*p40* および *p35* サブユニットを両方含む、ヘテロ二量体サイトカインである。約20年間にわたる多数の報告中には、*IL-12* は、炎症反応、感染に対する自然抵抗性および適応免疫を調節することによって、免疫性の自然免疫部分および適応免疫部分の間の相互作用において、重要な役割を有していることが解明されている。内因性の *IL-12* は、多くの病原体、ならびに、移植可能な腫瘍、および化学物質により誘発された腫瘍に対する抵抗性において、要求されている。免疫系における、*IL-12* の特徴的な効果は、ナチュラルキラー (*NK*) 細胞、マクロファージおよび *T* 細胞からのインターフェロン-ガンマ (*IFN- γ*) の産生を刺激する能力である。さらに、90年代初期～中期における、いくつかの *in vitro* の研究は、*IL-12* が、他のサイトカインとともに、相乗的に造血を刺激することができると報告している。これらの研究では高度精製の前駆細胞または均一な単一細胞が使用されているので、*IL-12* の造血促進活性は、骨髄幹細胞に対する直接作用に因っていると見做される。いくつかの研究が、造血の促進および抑制の両方を、*IFN- γ* に結び付いているように、*IL-12* の造血活性における *IFN- γ* の役割は、明らかではない。

30

【0052】

インターロイキン-12 (*IL-12*) は、全身放射線照射への曝露の前、またはその直後に使用した場合、放射線防護機能を有することが示されている (Neta, et al., (1994) "IL-12 protects bone marrow from and sensitizes intestinal tract to ionizing radiation." *J Immunol* 153: 4230~4237; Chen, et al., (2007) "IL-12 facilitates both the recovery of endogenous hematopoiesis and the engraftment of stem cells after ionizing radiation." *Exp Hematol* 35: 203~213; さらに、US20110206635 および US7939058 の開示全体は、参照により本明細書に組み込まれる)。該研究においては、マウスは、致死的な全身放射線照射の有害作用から救済された。放射線照射防護効果は、骨髄中の未知の細胞集団の中、おそらくは、長期再増殖造血幹細胞に帰されると、報告されている。別の研究においては、*IL-12* は、担腫瘍マウスへの亜致死的線量の放射線照射に

40

50

引き続く、末梢血球数の早期回復を提供することが示されている。(Basile, et al., (2008); "Multilineage hematopoietic recovery with concomitant antitumor effects using low dose Interleukin-12 in myelosuppressed tumor-bearing mice." J Transl Med 6: 26)。この後者の研究では、腫瘍体積の低減においては、IL-12は、放射線照射と相乗的であったことが示された。特に、IL-12は、放射線曝露の前または後のいずれかに投与された場合、腫瘍体積を増加させなかった。

【0053】

よって、IL-12は、全身放射線照射に引き続く、骨髄に対する放射線防護における可能性を有する。しかしながら、早期の研究は、IL-12は、骨髄における、放射線防護効果を有するが、胃腸(GI)系は、放射線損傷に対して敏感になったと報告した(Neta, et al.)。その後の報告において、IL-12のGIを敏感化する効果は、投与されたIL-12の用量に依存することがわかった(Chen, et al.)。骨髄以外の、他の組織または器官に対するIL-12の放射線防護効果についての報告はない。

10

【0054】

本発明は、特定のマウス組換えIL-12(例えば、m-HemaMax)およびヒト組換えIL-12(例えば、HemaMax)が、患者における、HSC T移植に引き続く、造血回復を向上させる能力を有しているという、驚くべき、予想外の発見に基づいている。

【0055】

造血幹細胞移植(HSC T)は、高用量の化学療法および／または放射線療法によって破壊された幹細胞を修復する手術である。幹細胞移植のために、全身放射線照射(TBI)を施された患者は、血小板が低い個数である、延長された期間を有している。これらの低い血小板の個数は、出血および感染を引き起こす。これまで、血小板の回復を加速する用途に利用可能な薬物はなく、したがって、輸血がしばしば必要とされている。

20

【0056】

HSC Tによって治療が可能な、疾患、障害および／または症状は、例えば、多発性骨髄腫；非ホジキンリンパ腫(NHL)；ホジキンリンパ腫；急性骨髄性白血病；神経芽細胞腫；胚細胞腫瘍；自己免疫障害；アミロイドーシスが含まれる。

【0057】

自家HSC T：急性骨髄性白血病；急性リンパ性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性リンパ球性白血病；骨髄増殖性障害；骨髄異形成症候群；多発性骨髄腫；非ホジキンリンパ腫；ホジキン病；再生不良性貧血；

30

同種HSC T；赤芽球ろう；発作性夜間ヘモグロビン尿症；ファンコーニ貧血；重症型サラセミア；鎌状赤血球貧血；重症複合免疫不全症(SCID)；ウィスコット・アルドリッチ症候群；血球貪食性リンパ組織球症(HLH)；先天性代謝異常

特定の実施態様では、従来のBMTには適しているとは以前は考えられていなかった、患者のために、特別に開発されたBMT手技が、強度軽減移植前治療(「RIC」)である。RIC移植の着想は、患者にドナーの幹細胞を受け入れさせるためには、高用量療法は、必ずしも必要ではないということにある。この高用量療法の回避は、高齢あるいは、前から存在している健康上の問題を有する患者において、該手術をより安全なものとする。そのかわりに、患者に、比較的毒性の低い前処置療法を施す。軽減の程度に依って、時に、前処置療法は、患者を入院患者ユニットに収容するよりも、外来患者ユニットにおいて施される。強度軽減移植前治療は、患者の免疫系が十分に抑制され、その結果、ドナーの幹細胞を受け入れるように、設計される。

40

【0058】

一形態では、骨髄は、全身放射線照射、または高用量化学療法および全身放射線照射の組み合わせによって完全に破壊される。そのような極端な処置の目的は、骨髄中に存在するすべての疾患細胞(例えば、白血病細胞または固形腫瘍に由来する転移した腫瘍細胞)を排除することである。この手技に引き続き、骨髄幹／前駆細胞の移植が施される。

【0059】

50

一形態では、空の骨空洞に再生息するために使用される成人幹／前駆細胞は、骨髓から（例えば、後部腸骨稜から）直接に、または末梢血から取得することができる。後者の場合、ドナー（例えば、患者彼／彼女自身または近親者）は、骨髓細胞を動態化し、そして、末梢血前駆細胞の収率を高めるために、G-CSFおよび／またはGM-CSFによって前処理することができる。幹／前駆細胞集団は、様々な方法、例えば、単球もしくはTリンパ球を除去するための磁気細胞分離法（magnetic-activated cell sorting）またはFicoll-Hypaque密度勾配遠心法を使用することによって、濃縮することができる。移植に先立ち、通常、幹／前駆細胞は、液体窒素の蒸気相中において、イスコフ改変ダルベッコ培地等の、5～20%のジメチルスルホキシド含有培地中にf貯蔵される。本分野で周知の幹／前駆細胞の単離、濃縮および貯蔵のための任意の標準化された手順を使用することもできる。

10

【0060】

先行している造血支持療法（EPO）は、腫瘍成長に対するそれらの効果に対して、ブラックボックス警告が通知された。造血幹細胞に対するHemaMaxの作用の直接的なメカニズムは、（Procrit、AranespおよびEpogenという商標を付けられた）EPO、および（NeulastaおよびNeupogenという商標を付けられた）G-CSF、ならびに、（NplateおよびPromactaという商標を付けられた）TPO模倣体および（Neumegaという商標を付けられた）IL-11等の、他の周知の造血成長因子とは、対比されることができる。EPO様分子は、赤血球前駆細胞のレベルで作用して、赤血球の増加をもたらす。G-CSF様分子は、好中球前駆細胞のレベルで作用して、好中球の増加をもたらす。TPO模倣体およびIL-11は、巨核球のレベルで作用して、血小板の増加をもたらす。これらの造血成長因子の標的細胞集団は、すべて、HemaMaxの標的細胞である造血幹細胞の下流にある。

20

【0061】

HemaMaxの作用メカニズムと、周知の造血成長因子のそれとの間には重複がない。HemaMaxの作用メカニズムは、他の造血因子の作用の上流の造血幹細胞の活性化を伴っている。結論として、HemaMaxは、除去した後に、造血系および免疫系を再充填し、そして、再生させることができるが、下流の作用因子は、前駆細胞を標的として、単一の血液細胞タイプをもたらすのみで、これらの下流の作用因子には、上流の造血幹細胞の活性化はできない。この早期に作用する（上流の）メカニズムを介して、HemaMaxによる、原始造血幹細胞の活性化は、すべての主要血液細胞タイプを復元することができる。前臨床試験において、HemaMaxは、その免疫療法の作用メカニズム（INF- γ の増加ならびにTおよびNK細胞の上方制御）による、抗腫瘍効果を有している。

30

【0062】

HemaMaxに対するマウス対応物（rMuIL-12）は、亜致死性または致死的な全身放射線照射（TBI）に曝露された、正常および担腫瘍マウス両方において、白血球および赤血球ならびに血小板をはじめとする、全系列血液細胞の回復を促進する。HemaMaxの活性は、骨髓コンパートメント内に存在する原始細胞（造血および非造血幹細胞）のレベルで開始される。これらの原始細胞の活性化は、放射線照射または化学療法により引き起こされた骨髓破壊または骨髓機能抑制に引き続く、骨髓コンパートメントの再生をもたらす。

40

【0063】

HemaMaxは、HSC Tに先立つ、幹細胞移植の前／後における、現行方法の再定義、ならびに、HSC T後の造血幹細胞（HSC）生着エンハンサーのアジュバントとして、特有の役割を有する。HSC Tは、白血病およびリンパ腫（また、神経芽細胞腫および多発性骨髄腫）の治療において、最も一般的に使用され、寛解期にある場合には、最も有効である。HemaMaxは、早期の造血幹細胞（HSC－移植前に動員し、移植後のHSC生着を助ける）の再生ならびに分化を刺激することによって、化学療法の処置により破壊された幹細胞／骨髓を回復することができた。

50

【0064】

本開示の目的では、以下の定義は全体として、技術用語を定義するため、ならびに、請求の範囲において、権利保護が求められている、組成物の範囲を定義するために使用されるものとする。

【0065】

本明細書中で使用する際、「患者」は、治療、観察または実験の対象である動物をさす。「動物」は、魚類、甲殻類、爬虫類および、特に哺乳動物等の、冷血および温血脊椎動物および無脊椎動物を含む。「哺乳動物」は、これらに限定されないが、マウス；ラット；ウサギ；モルモット；イヌ；ネコ；ヒツジ；ヤギ；雌牛；ウマ；サル、チンパンジー、類人猿ならびに、胎児期の、小児のおよび成人のヒトのような、霊長類を含む。

10

【0066】

本明細書中で使用される際、「予防すること」または「保護すること」は、全体的にまたは部分的に防止すること、あるいは寛解させることまたは抑制することを意味する。

【0067】

本明細書中で使用される際、用語「治療すること」は、治療的処置および予防的または防止的手段の両方、あるいは治療的潜在力を有する疑いのある作用剤を投与することをさす。

【0068】

本明細書中で使用される際、用語「薬学的有効量」は、治療されている疾患の症状の軽減または緩和を含む、研究者、獣医師、医師または他の臨床医によって求められている、組織、器官、動物またはヒトにおける生物学的または医学的応答を引出す、活性化合物または医薬品の量を意味する。

20

【0069】

本明細書中で使用される際、本開示の医薬組成物に関して、「有効量」は、有用性を有し、所望の治療的な結果を提供するのに十分な量をさす。

【0070】

本明細書中で使用される際、全身放射線照射（TBI）に引き続く放射線誘発損傷は、以下の：骨髄、リンパ系、免疫系、粘膜組織、粘膜免疫系、胃腸管系、循環器系、神経系、生殖器官、前立腺、卵巣、肺、腎臓、皮膚および脳に付随している、器官、組織、系に悪影響を及ぼしえる。

30

【0071】

本明細書中で使用される際、放射線曝露は、放射線誘発性の急性、慢性および全身性の損傷効果を伴っている。一形態では、本開示は、放射線誘発性の急性損傷効果を治療するための治療用組成物およびその使用方法を提供する。代表的な損傷効果は、必ずしも、放射線照射ビーム中の正常組織に限定されるわけではない。代表的な損傷効果には、処置部位を越えて拡がり、例えば、食道炎（嚥下困難）；肺内の肺炎（咳、発熱、肺液貯留）；小腸放射線照射誘導性の炎症（下痢、けいれん、腹部痛）；悪心および嘔吐；疲労、倦怠感、下痢、頭痛、組織膨満、皮膚の紅斑、咳および呼吸困難も含まれる。代表的な損傷効果は、皮膚の領域、例えば、紅斑、落屑；口腔粘膜、例えば、粘膜炎、鼻咽頭；中咽頭；声帯；扁桃；皮膚（扁平上皮または癌腫）に悪影響を及ぼしうる。特定の実施態様では、代表的な効果には、毛細血管拡張症、線維症、脊髄炎（spinal cord myelitis）および軟骨の線維症（cartilage fibrosis）も含まれる。

40

【0072】

特定の実施態様では、代表的な放射線誘発損傷効果には、（骨髄、脾臓およびリンパ組織等の）最も早いペースで分裂する細胞への損傷が特徴である、造血器（骨髄）症候群も含まれる。代表的な症状には、内部出血、倦怠感、細菌感染および発熱が含まれる。

【0073】

特定の実施態様では、代表的な放射線誘発損傷効果には、（胃および小腸の内壁等の）それほど急速に分裂しない細胞への損傷が特徴である、胃腸管症候群も含まれる。代表的な症状には、悪心、嘔吐、下痢、脱水、電解質不均衡、消化能力喪失、出血性潰瘍および

50

造血器症候群の症状が含まれる。

【0074】

特定の実施態様では、代表的な放射線誘発損傷効果には、粘膜炎も含まれる。一実施態様では、放射線誘発粘膜炎は、口腔粘膜炎である。

【0075】

特定の実施態様では、代表的な放射線誘発損傷効果には、神経細胞のような再生されない細胞への損傷が特徴である、中枢神経系症候群も含まれる。代表的な症状は、協調運動障害、錯乱、昏睡、けいれん、ショックならびに造血器および胃腸管症候群の症状を含む。

【0076】

特定の実施態様では、代表的な放射線誘発損傷効果には、胎児期の放射線曝露に因る、胎児に対する効果も含まれる。（胚／胎児細胞は急速に分裂している）、胚／胎児は、特に、妊娠の最初の20週間において、放射線照射に対して特に敏感である。

【0077】

特定の実施態様では、代表的な放射線誘発効果には、電離放射線照射と酸素および水の相互作用に由来する、スーパーオキシド、ヒドロキシルラジカル、酸化窒素および過酸化窒素をはじめとする、電離放射線照射誘発性のラジカル酸素種（ROS）生成に因る損傷も含まれる。

【0078】

一形態では、本開示は、放射線誘発性の慢性損傷効果を治療するための治療用組成物およびその使用方法を提供する。慢性の放射線照射効果は、すべての患者において非常に重要であるが、全身放射線照射（TBI）を施されている者においては特別である。全身放射線照射は、いくつかのがん治療において、特に、骨髄移植を必要とする患者に対して、利用される。

【0079】

代表的な放射線誘発性の慢性損傷効果は、例えば、白髪になること、皮膚の菲薄化および乾燥、白内障発生、早期心筋線維症、心筋梗塞、神経変性、骨減少症／骨軟化症（osteomalasia）および神経認知異常のような早期老化に共通する特徴を含むことができる。

【0080】

特定の実施態様では、代表的な放射線誘発効果には、線維症（患部の制限された動きをもたらす、瘢痕組織による正常組織の置換）；下痢および出血を引き起こす、腸への損傷；記憶喪失；不妊および／または発癌／白血病誘発も含まれる。

【0081】

特定の実施態様では、本開示の方法および組成物は、幹細胞移植に引き続く造血を改善するために有用である。代表的な骨髄破壊的な照射（delivery）のモダリティ／レジメンは、例えば、従来の分割照射療法、多分割照射法、少分割照射法および加速分割照射法を含むことができる。

【0082】

一実施態様では、治療モダリティ／レジメンは、多分割照射法である。多分割照射法において、目標は、臨床的に許容される長期の組織損傷のレベルを維持しつつ、より高い腫瘍線量を照射することである。画分当たりの線量を減少させつつ、一日当たりの用量は、不変であるかまたは僅かに増加するのみで、そして、全体的な処置時間が一定のままである。

【0083】

一実施態様では、治療モダリティ／レジメンは、加速分割照射療法である。加速分割照射療法においては、一日当たりの用量は増加する一方、画分当たりの線量是不変であり、そして、治療のための合計時間は減少する。

【0084】

一実施態様では、治療モダリティ／レジメンは、持続的多分割加速放射線療法（CHART）である。（CHART）療法においては、短縮された期間内において、複数の日々

10

20

30

40

50

画分が投与される、治療の集中スケジュールが施される。

【0085】

一実施態様では、治療モダリティ／レジメンは、IMRT（強度変調放射線治療）である。

【0086】

化学療法との組み合わせ

多数の化学療法剤が、放射線療法の効果を高めることができる。一形態では、本開示の形態および実施態様は、既存の化学療法モダリティとの併用療法として利用されることができる。（連続的または同時の）併用療法は、同時投与または共製剤とすることができる。

10

【0087】

「インターロイキン-12（IL-12）」は、天然のIL-12分子、ならびに、現在公知であるか、または将来的に開発され、本分野で現在公知のもしくは将来的に開発される任意の方法で生成される、変異型IL-12分子および共有結合性に修飾されたIL-12分子をはじめとする、本明細書に開示された造血特性のうちの少なくとも1つをもたらす、IL-12分子をさす。

【0088】

IL-12分子は、実質的に単離された形態で存在しうる。この生成物は、この生成物の意図された用途を妨害することのない、担体または希釈剤と混合することができ、そして、依然として、実質的に単離されているとみなされうことは理解されよう。本発明の生成物は、実質的に純粋な形態であることもでき、その場合、例えば、少なくとも約95%、少なくとも約98%または少なくとも約99%をはじめとし、一般的に、調製物のペプチドまたは乾燥質量の約80%、85%または90%を構成する。

20

【0089】

一般に、本発明の実施態様において使用されるIL-12分子のアミノ酸配列は、本発明の方法によって治療される特定の哺乳動物に由来する。よって、一例としては、ヒトにおいては、一般に、ヒトIL-12または組換えヒトIL-12が本発明の方法においてヒトに投与され、また、同様に、ネコにおいては、例えば、ネコIL-12または組換えネコIL-12が、本発明の方法においてネコに投与される。

【0090】

しかしながら、IL-12分子のアミノ酸配列が本発明の治療方法の対象である哺乳動物に由来していない、特定の実施態様も本発明に含まれる。一例としては、ヒトIL-12または組換えヒトIL-12を、ネコ科の哺乳動物に対して利用することもできる。本発明のさらに他の実施態様は、IL-12の天然のアミノ酸配列を、天然の配列から変更されているが、該IL-12分子は本明細書中に開示された、IL-12の造血特性をもたらすように機能しうる、IL-12分子をも含む。IL-12の天然の種特異的なアミノ酸配列からの変更は、IL-12の一次配列中の変化を含み、また、変異型IL-12分子をもたらすための、一次アミノ酸配列への欠失および付加をも包含する。高度に誘導体化がなされているIL-12分子の一例は、Maxygen, Incにより製造される、再設計が施されたIL-12分子（Leong S Rら、Proc Nati Acad Sci USA. 2003 Feb. 4; 100 (3): 1163-8ページ）であり、該変異型IL-12分子は、DNAシャッフリング法によって生成されている。修飾IL-12分子、例えば、保存可能期間、半減期、有効性、溶解度、送達性を増加させる、IL-12分子への共有結合的修飾、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号または同第4,179,337号に示された手法でのポリレチレングリコール基、ポリプロピレングリコールなどの付加も、本発明の方法に含まれる。IL-12分子への共有結合的修飾の1つのタイプは、IL-12ポリペプチドの選択された側鎖またはN-もしくはC-末端残基と反応することのできる有機誘導体化剤を用いて、IL-12ポリペプチドの標的アミノ酸残基を反応させることによって、分子内に導入される。天然配列IL-12およびIL-12のアミノ酸配列変異体は、ともに、共有結合性に修飾することができる。

30

40

50

本明細書中で言及される際、I L-1 2 分子は、組換え法をはじめとする、本分野で知られた多様な方法によって生成することができる。本開示に含まれる、他の I L-1 2 変異体は、標準配列が翻訳後修飾、例えば、グリコシル化されるものである。特定の実施態様では、I L-1 2 は、哺乳動物発現系または細胞系において発現される。一実施態様では、I L-1 2 は、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞における発現によって産生される。

【0091】

変異型 I L-1 2 ポリペプチドの特徴を前もって予測することは困難なことが多いため、最適な変異体を選択するため、回収された変異体の何等かのスクリーニングが必要とされることは理解される。変異型 I L-1 2 分子の血液学的な刺激または亢進特性における変化を評価する好ましい方法は、以下に開示される、致死的な放射線照射のレスキューのプロトコールによる。酸化還元もしくは温度安定性、疎水性、タンパク質分解に対する感受性、または担体と、もしくは多量体に凝集する傾向等の、タンパク質またはポリペプチドの特性の他の可能性のある修飾は、本分野で周知の方法を用いて、評価される。

【0092】

I L-1 2 に関する、一般的記載に関しては、米国特許第5,573,764号、同第5,648,072号、同第5,648,467号、同第5,744,132号、同第5,756,085号、同第5,853,714号および同第6,683,046号を参照されたい。インターロイキン-1 2 (I L-1 2) は、一般に、免疫反応に関与する細胞の活性を制御する炎症促進性サイトカインとして記述されている、ヘテロ二量体サイトカインである (Fitz K Mら、1989、J. Exp. Med. 170:827-45ページ)。一般に、I L-1 2 は、ナチュラルキラー (N K) 細胞およびT細胞からのインターフェロン γ (I F N- γ) の産生を刺激し (Lertmemongkolchai G, Caiら、2001、Journal of Immunology. 166:1097~105ページ; Cui J, Shin Tら、1997、Science. 278:1623~6ページ; Ohteki T, Fukao Tら、1999、J. Exp. Med. 189:1981~6ページ; Airoidi I, Gri Gら、2000、Journal of Immunology. 165:6880~8ページ)、Tヘルパー1 (T H 1) 細胞の分化を助力し (Hsieh C Sら、1993、Science. 260:547~9ページ; Manetti Rら、1993、J. Exp. Med. 177:1199~1204ページ)、自然抵抗性と適応免疫の間の関連を形成する。

【0093】

I L-1 2 は、その免疫調節および抗血管新生効果を介して、がん成長を阻害することも示されている (Brunda M Jら、1993、J. Exp. Med. 178:1223~1230ページ; Noguchi Yら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:11798~11801ページ; Giordano P Nら、2001、J. Exp. Med. 194:1195~1206ページ; Colombo M Pら、2002、Cytokine Growth factor rev. 13:155~168ページ; Yao Lら、2000、Blood 96:1900~1905ページ)。I L-1 2 は、主に樹状細胞 (D C) および貪食細胞 (マクロファージおよび好中球) が、遭遇した病原性細菌、真菌または細胞内寄生生物によって活性化されると、それらにより産生される (Reis Cら、1997、J. Exp. Med. 186:1819~1829ページ; Gazzinelli R Tら、1994、J. Immunol. 153:2533~2543ページ; Dalod Mら、2002、J. Exp. Med. 195:517~528ページ)。I L-1 2 受容体 (I L-1 2 R) は、主に活性化されたT細胞およびN K細胞によって発現される (Presky D Hら、1996、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:14002~14007ページ; Wu C Yら、1996、Eur J. Immunol. 26:345~50ページ)。

【0094】

一般に、I L-1 2 の産生は、I N F- γ の産生を刺激し、これが、今度は、I L-1 2 の産生を高める、すなわち、ポジティブ・フィードバック・ループを形成する。i n v i t r o の系では、I L-1 2 は、他のサイトカイン (例えば、I L-3 および S C F) と相乗して、初期造血前駆細胞の増殖および分化を刺激できると報告されている。 (Jacobsen S Eら、1993、J. Exp Med 2:413~8ページ; Ploemacher R Eら、1993、Leukemia 7:1381~8ページ; Hirao Aら、1995、Stem Cells 13:47~53ページ)

I L-1 2 の i n v i v o 投与では、末梢血球数および骨髓造血を減少させることが

観察された (Robertson M Jら、1999、Clinical Cancer Research 5 : 9~16ページ ; Lenz i Rら、2002、Clinical Cancer Research 8 : 3686~95ページ ; Ryffel B. 1997、Clin Immunol Immunopathol. 83 : 18~20ページ ; Car B Dら、1999、The Toxicol Pathol. 27 : 58~63ページ)。I N F - γ 受容体ノックアウトマウスを用いて、E n g らおよびC a r らは、高用量のI L - 1 2 が一般的にみられる毒性効果を誘発しない、すなわち、造血の阻害はなかったことを実証した、(Eng V Mら、1995、J. Exp Med. 181 : 1893~8ページ ; Car B Dら、1995、American Journal of Pathology 147 : 1693~707ページ)。この観察結果は、先に報告されたとおり、一般的なI L - 1 2 の現象によって促進された分化した造血細胞の亢進は、支配的な骨髄抑制的方法において、作用する、I N F - γ の産生によって、i n v i v o で釣り合いがとれることを示唆している。

10

【0095】

最近の証拠は、代表的なI L - 1 2 調製物、組換えヒトI L - 1 2 (例えば、H e m a M a x) が、体内で少なくとも4つのレベルで応答を引き起こすことを示唆している (図14を参照されたい)。レベル1の応答においては、H e m a M a x は、既存の放射線感受性免疫細胞、すなわち、NK細胞、マクロファージおよび樹状細胞の増殖および活性化を促進する。H e m a M a x 誘発性のI L - 1 5 およびI L - 1 8 の血漿中上昇は、NK細胞の成熟も促進し、I F N - γ の放出をもたらし、これが次に、マクロファージおよび樹状細胞、およびおそらくNK細胞からの内因性I L - 1 2 の産生に良い影響を及ぼす。これらの事象は、H e m a M a x 投与に引き続き、早期に自然免疫能を高める。レベル2の応答においては、H e m a M a x は、生き残っている造血幹細胞、骨芽細胞および巨核球の、増殖および最適の造血を確実にする特定の細胞構成への分化を促進する。C D 3 4⁺、I L - 1 2 R β 2 - 陽性骨髄細胞からのE P OのH e m a M a x 誘発性の分泌も、骨髄における局所的なI F N - γ の過剰産生を抑制し、こうして、造血細胞の拡大を促進する環境を提供する。骨髄における造血再生は、自然免疫能および適応免疫能を両方とも高める。レベル3の応答において、H e m a M a x は、G I 幹細胞を維持し、病原体の漏出の低減、摂食量の増加および下痢の減少をもたらす。レベル4の応答において、恐らくは、H e m a M a x が、器官／組織の多様な集合において、細胞生育力を高める、細胞保護因子である、E P Oの腎臓からの放出を直接的に増加させている。主に病原体および／またはE P Oによって活性化された、樹状細胞からの内因性I L - 1 2 の継続した産生は、

20

30

【0096】

I L - 1 2 の投与方法

本開示は、所望の治療効果を達成するために、ある期間、I L - 1 2 の有効用量の1回またはそれより多くの、患者への投与による治療方法を提供する。患者は、好ましくは、雌ウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌなどの動物を含むが、それに限定されない哺乳動物であり、そして、最も好ましくは、ヒトである。

【0097】

本発明の方法に従ってI L - 1 2 を投与するために、多様な送達系、例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルへの封入、I L - 1 2 を発現可能な組換え細胞、受容体媒介性のエンドサイトーシス (例えば、WuおよびWu、1987、J. Biol. Chem. 262 : 4429~4432ページを参照されたい)、レトロウイルスもしくは他のベクター等の一部として、I L - 1 2 遺伝子を含む核酸の構築等が知られており、また、使用可能である。導入方法は、それに限定されないが、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外および経口経路を含む。

40

【0098】

I L - 1 2 は、任意の便利な経路により、例えば、点滴またはボラス注入により、上皮もしくは粘膜皮膚裏層 (例えば、口腔粘膜、直腸および小腸粘膜など) を経由する吸収により、投与することができ、また、他の生物学的活性剤と一緒に投与することができる

50

。投与は、全身的または局所的であることができる。さらに、脳室内またはクモ膜下腔内注射を含む、任意の好適な経路により中枢神経系中へ I L - 1 2 を含む医薬組成物を導入することが望ましい可能性があり；脳室内注射は、例えば、O m m a y a リザーバーのようなりザーバーに取り付けられた脳室内カテーテルによって容易に施すことができる。肺内投与も、例えば、吸入器またはネブライザー、およびエアロゾル化剤を含む製剤の使用により、採用することができる。I L - 1 2 を含む医薬組成物を、治療を必要とする領域へ局所的に投与することが好ましい可能性があり；これは、例えば、それに限定はされないが、局所投与により、注射により、カテーテルにより、坐剤により、またはインプラントにより、達成することができ、前記インプラントは、シラスティック (sialastic) 膜のような膜、または繊維をはじめとする、多孔質の、無孔性の、またはゼラチン状の材料でできている。

10

【0099】

I L - 1 2 投与の他の様式は、ベシクル、特にリボソーム中での送達を含む (Langer, Science 249:1527~1533ページ、(1990); Treatら、Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer中、Lopez-Berestein および Fidler (編)、Liss, New York、353-365ページ、(1989); Lopez-Berestein、同上所収、317~327ページ；一般に、同上を参照されたい)。

【0100】

I L - 1 2 投与のさらに他の様式は、制御放出システムにおける送達を含む。特定の実施態様では、ポンプが使用される (Langer、上記; Sefton、CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201ページ(1987); Buchwaldら、Surgery 88:507 (1980); Saudekら、N. Engl. J. Med. 321:574ページ(1989)を参照されたい)。さらに、ポリマー材料も使用可能である (Medical Applications of Controlled Release、LangerおよびWise (編)、CRC Pres, Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, SmolenおよびBall(編)、Wiley、N.Y. (1984); RangerおよびPeppas、J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61ページを参照されたい(1983; Levyら、Science 228:190 (1985); Duringら、Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howardら、J. Neurosurg. 71:105ページ(1989)も参照されたい)) ；あるいは、制御放出システムを、治療標的、すなわち、脳の近傍に設置することもでき、したがって、全身用量の一部のみが必要とされる (例えば、Goodson、Medical Applications of Controlled Release中、上記、vol. 2、115~138ページ、(1984)を参照されたい)。他の制御放出システムは、L a n g e r (Science 249:1527~1533ページ、(1990)) による総説中に論じられている。

20

30

【0101】

I L - 1 2 の形態および投薬量

本発明の実施態様での使用のための I L - 1 2 の好適な剤形は、本質的に無毒性であり、非治療的である生理学的に許容される担体を包含する。そのような担体の例としては、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンのような血清タンパク質、リン酸塩のような緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩、または硫酸プロタミンのような電解質、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質および P E G が挙げられる。I L - 1 2 ポリペプチドの局所的またはゲル性の形態のための担体は、カルボキシメチルセルロースナトリウムまたはメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリアクリレート、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンブロックコポリマー、P E G およびウッドワックスアルコール (wood wax alcohol) などのポリサッカライドを含む。すべての投与のために、従来のデポー形態が好適に使用される。そのような形態は、例えば、マイクロカプセル、ナノカプセル、リボソーム、プラスター、吸入形態、鼻スプレー、舌下錠および持続放出製剤を含む。

40

【0102】

持続放出製剤の好適な例としては、ポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透

50

性マトリックスが挙げられ、該マトリックスは、成形品の形態、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルである。持続放出マトリックスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、上記のLangerらおよび上記のLangerにより記載されたポリ（2-ヒドロキシエチルーメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とγ-エチルーL-グルタミン酸のコポリマー（Sidmanら、上記）、非分解性のエチレン-酢酸ビニル（Langerら、上記）、Lupron Depot（商標）等の分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドからなる注射用ミクロスフィア）、およびポリ-D-（-）-3-ヒドロキシブチル酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸等のポリマーが100日間にわたる分子の放出を可能とする一方、特定のヒドロゲルは、より短い期間、タンパク質を放出する。封入されたIL-12ポリペプチドが長期間、体内に留まる場合、37℃における水分への曝露の結果として、変性または凝集し、生物学的活性の喪失および免疫原性において可能性のある変化をもたらされる。関与するメカニズムに依存する、安定化のための合理的な対策を考案することができる。例えば、凝集メカニズムがチオ-ジスルフィド相互変換による、分子内S-S結合形成であることがわかった場合、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性の溶液から凍結乾燥すること、適切な添加剤を用いて水分含量を制御すること、および特定のポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成されうる。

【0103】

また、持続放出IL-12含有組成物には、リボソームに取り込まれたポリペプチドも含まれる。IL-12ポリペプチドを含有するリボソームは、Eppsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688~3692ページ（1985）；Hwangら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4030ページ（1980）；および米国特許第4,485,045号および同第4,544,545号に記載されたような、本分野で公知の方法によって調製される。通常は、リボソームは、その中で脂質含量が約30モル%コレステロールを超え、選択された割合は最適のWntポリペプチド療法のために調整されている、小さな（約200~800オングストローム）単層タイプである。向上した循環時間を具える、リボソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

【0104】

疾患の治療のために、IL-12ポリペプチドの適切な投薬量は、上で定義した、治療される疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、先の治療、患者の臨床歴ならびに本明細書に開示されたIL-12治療法に対する応答性、ならびに担当医の裁量に依存する。本発明によれば、IL-12は、1回または一連の治療にわたって、好適に患者に投与される。

【0105】

疾患のタイプおよび重症度に依存して、例えば、1回またはそれ以上の別個の投与による、あるいは、持続注入による、約10ng/kg~2000ng/kgのIL-12が患者への投与のための初回投薬量候補である。ヒトは、約500ng/kgの反復投薬量に安全に耐えることができる、但し、約200ng/kgまでの単回投薬量は毒性の副作用を生じてはならない。例えば、用量は、G-CSF、GM-CSFおよびEPOのような他のサイトカインと同じであってもよい。数日以上にわたる反復投与のためには、症状に依存して、疾患症状の所望の抑制が起こるまで治療が持続される。しかしながら、他の投薬量レジメンも有用である。この治療法の進行は、従来の技術およびアッセイ法によって容易にモニターすることができる。

【0106】

IL-12は、直接同時投与または連続投与のいずれかによって、他のサイトカインとともに投与することができる。1つまたはそれ以上のサイトカインがIL-12と同時投与される場合、より低い用量のIL-12を採用することができる。他のサイトカイン、すなわち、IL-12以外のサイトカインの好適な用量は、約1μg/kg~約15mg

／k gのサイトカインである。例えば、その用量は、G－C S F、G M－C S FおよびE P O等の他のサイトカインと同じであることができる。I L－1 2の投与に先立ち、同時に、または、引き続いて、他のサイトカインを投与することができる。哺乳動物への同時投与のための医薬組成物を形成するために、該サイトカインおよびI L－1 2を、組み合わせることができる。特定の実施態様では、I L－1 2およびサイトカインの量は、哺乳動物へのI L－1 2および他のサイトカインの投与に際して、哺乳動物において血液細胞の相乗的再増殖（または造血細胞の増殖および／または分化における相乗的增加）が起こるようなものである。言い換えれば、血液細胞の再増殖（または造血細胞の増殖および／または分化）に関する2つ以上の作用剤（すなわち、I L－1 2および1つまたは複数のサイトカイン）の協調作用が、これらの分子の個々の効果の合計を超えている。

10

【0107】

貯蔵のために、I L－1 2の治療用製剤は、所望の程度の純度を有するI L－1 2を、任意選択の生理学的に許容される担体、賦形剤または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences、第16版、Osol, A.編、(1980)）と、混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態に調製される。許容される担体、賦形剤または安定化剤には、採用される投薬量および濃度において、レシピエントに対して無毒性であり、そして、リン酸、クエン酸および他の有機酸のような緩衝剤；アスコルビン酸をはじめとする抗酸化剤；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたはイムノグロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニンまたはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノースまたはデキストリンをはじめとするモノサッカライド、ジサッカライドおよび他の炭化水素；E D T A等のキレート剤；マンニトールまたはソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成性対イオン；ならびに／あるいはT w e e n（登録商標）、P l u r o n i c s（商標）またはポリエチレングリコール（P E G）等の非イオン性界面活性剤が含まれる。

20

【0108】

本明細書中で使用される際、用語「緩衝剤」は、医薬品のp Hを安定化する、薬学的に許容される賦形剤を示す。好適な緩衝剤は、本分野で周知であり、文献中に見いだされることができる。薬学的に許容される緩衝剤には、それらに限定されないが、ヒスチジン緩衝剤、クエン酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、アルギニン緩衝剤、またはその混合物が含まれる。上記緩衝剤は、一般に、約1 m M～約1 0 0 m M、約5 m M～約5 0 m M、および約1 0～2 0 m Mの量で使用される。緩衝液のp Hは、少なくとも4. 0、少なくとも4. 5、少なくとも5. 0、少なくとも5. 5または少なくとも6. 0とすることができる。緩衝液のp Hは、7. 5未満、7. 0未満または6. 5未満とすることができる。緩衝液のp Hは、本分野で公知の酸または塩基、例えば、塩酸、酢酸、リン酸、硫酸およびクエン酸、水酸化ナトリウムおよび水酸化カリウムによって、約4. 0～約7. 5、約5. 5～約7. 5、約5. 0～約6. 5、および約5. 5～約6. 5とすることができる。本明細書中で使用される際、p Hを記載する場合、「約」は、プラスまたはマイナス0. 2 p H単位を意味する。

30

【0109】

本明細書中で使用される際、用語「界面活性剤」は、攪拌および剪断頭の機械的ストレスに対してタンパク質製剤を保護するために使用される、薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。薬学的に許容される界面活性剤の例には、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（T w e e n）、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（B r i j）、アルキルフェニルポリオキシエチレンエーテル（T r i t o n－X）、ポリオキシエチレン－ポリオキシプロピレンコポリマー（P o l o x a m e r、P l u r o n i c）およびドデシル硫酸ナトリウム（S D S）が含まれる。好適な界面活性剤には、（商標T w e e n 2 0（登録商標）のもとに販売される）ポリソルベート2 0および（商標T w e e n 8 0（登録商標）のもとに販売される）ポリソルベート8 0等の、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルが含まれる。好適なポリエチレン－ポリプロピレンコポリマーは、

40

50

名称 Pluronic (登録商標) F68 または Poloxamer 188 (登録商標) のもとに販売されるものである。好適なポリオキシエチレンアルキルエーテルは、商標 Brij (登録商標) のもとに販売されるものである。好適なアルキルフェノールポリオキシエチレンエーテル (esters) は、商品名 Triton-X のもとに販売されている。ポリソルベート 20 (Tween 20 (登録商標)) およびポリソルベート 80 (Tween 80 (登録商標)) が使用される場合、それらは、一般に、約 0.001 ~ 約 1%、約 0.005 ~ 約 0.2%、および約 0.01% ~ 約 0.1% w/v (重量/体積) の濃度範囲内で使用される。

【0110】

本明細書中で使用される際、用語「安定化剤」は、製造、貯蔵および適用中、活性医薬成分および/または製剤を、化学的および/または物理的な劣化から保護する、薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。タンパク質医薬品の化学的および物理的な劣化経路は、Clellandら、Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst、70(4):307~77ページ(1993); Wang、Int. J. Pharm.、75(2):129~88ページ(1999); Wang、Int. J. Pharm.、203(1-2):1~60ページ(2000); および Chira、Pharm. Res.、20(9):1325~36ページ(2003) 中に、概説されている。安定化剤には、それらに限定されないが、糖、アミノ酸、ポリオール、シクロデキストリン、例えば、ヒドロキシプロピルーベーターシクロデキストリン、スルホブチルエチルーベーターシクロデキストリン、ベーターシクロデキストリン、ポリエチレングリコール、例えば、PEG 3000、PEG 3350、PEG 4000、PEG 6000、アルブミン、ヒト血清アルブミン(HSA)、ウシ血清アルブミン(BSA)、塩、例えば、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、キレート剤、例えば、以下に定義される EDTA が含まれる。上記のとおり、安定化剤は、製剤中に、約 10 ~ 約 500 mM の量、約 10 ~ 約 300 mM の量、または約 100 mM ~ 約 300 mM の量で存在することができる。いくつかの実施態様では、代表的な IL-12 を、その中では、それが安定である、適切な医薬製剤中に溶解させることができる。

【0111】

IL-12 を、例えば、コアセルベーション法あるいは界面重合法により調製されたマイクロカプセル(例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル)中、コロイド状薬物送達システム(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)中、あるいは、マクロエマルジョン中に、取り込ませることもできる。そのような技術は、上記の、Remington's Pharmaceutical Sciences 中に、開示されている。

【0112】

in vivo 投与に使用される IL-12 は、無菌でなければならない。これは、凍結乾燥および再構成に先立ちまたは引き続いて、除菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。通常、IL-12 は、凍結乾燥形態または溶液中に貯蔵される。治療用 IL-12 組成物は、一般に、無菌アクセスポートを有する容器、例えば、皮下注射針により突き刺し可能なストッパーを有する静脈注射用溶液のバッグまたはバイアル中に収納される。

【0113】

局所的に適用される場合、IL-12 は、担体および/または補助剤等の、他の成分と好適に組み合わせられる。生理学的に許容され、その意図される投与のために有効でなければならない、また、組成物の活性成分の活性を低下させる可能性がないことを除き、そのような他の成分の性質には制限がない。好適なビヒクルの例には、精製コラーゲンを含むかまたは含まない、軟膏、クリーム、ゲル、または懸濁液が含まれる。組成物は、経皮パッチ、プラスターおよび絆創膏にも、好ましくは、液体または半液体形態で含浸されることができる。

10

20

30

40

50

【0114】

ゲル製剤を得る目的で、局所な適用に適する粘度のゲルを形成するため、液体組成物に製剤化された I L - 1 2 を、水溶性ポリサッカライドまたは P E G のような合成ポリマーの有効量と混合することができる。使用することができる、ポリサッカライドには、例えば、アルキルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロースおよびアルキルヒドロキシアルキルセルロースをはじめとする、エーテル化セルロース誘導体等のセルロース誘導体、例えば、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースおよびヒドロキシプロピルセルロース；デンプンおよび分別デンプン（fractionated starch）；寒天；アルギン酸およびアルギン酸塩；アラブル ガム（gum arable）；プルラン（pullullan）；アガロース；カラギーナン；デキストラン；デキストリン；フルクタン；イヌリン；マンナン；キシラン；アラビナン；キトサン；グリコーゲン；グルカン；および合成バイオポリマー；ならびに、キサントガム；グアーガム；ローカストビーンガム；アラビアガム；トラガントガムおよびカラヤガム等のガム、ならびに、その誘導体および混合物が含まれる。その中でも好ましいゲル化剤は、生体系に対して不活性であり、無毒性で、調製が単純であり、そして、流れやす過ぎずまたは粘ちょう過ぎず、その中に閉じ込められている I L - 1 2 分子を不安定化することのないものである。

10

【0115】

好ましくは、ポリサッカライドは、エーテル化セルロース誘導体、より好ましくは、明確に定義され、精製され、U S P（米国薬局方）に列挙されたもの、例えば、メチルセルロースおよびヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースおよびヒドロキシプロピルメチルセルロース等のヒドロキシアルキルセルロース誘導体である。その中でも、最も好ましいのは、メチルセルロースである。

20

【0116】

ゲル化のために有用なポリエチレングリコールは、通常、適切な粘度を得るために、低分子量および高分子量 P E G の混合物である。例えば、分子量 4 0 0 ～ 6 0 0 の P E G と分子量 1 5 0 0 のものとの混合物は、ペーストを得ために適する比率で混合されている場合、この目的のために有効となりうる。

【0117】

ポリサッカライドおよび P E G に適用する際、用語「水溶性」は、コロイド状溶液および分散液を含むことを意図している。一般に、セルロース誘導体の溶解度は、エーテル基の置換度によって決定され、本明細書中で有用な、安定化させる誘導体は、セルロース鎖中のアンヒドログルコース単位当たり、該誘導体を水溶性とするために十分な量のエーテル基を有する必要がある。一般に、アンヒドログルコース単位当たり、少なくとも 0.35 個のエーテル基のエーテル置換度で十分である。さらに、セルロース誘導体は、アルカリ金属塩、例えば、L i、N a、K または C s 塩の形態であることができる。

30

【0118】

ゲル中に、メチルセルロースを採用する場合、それは、好ましくはゲルの約 2 ～ 5 %、より好ましくは約 3 % を構成し、そして、I L - 1 2 は、ゲル 1 m l 当たり、約 3 0 0 ～ 1 0 0 0 m g の量で存在する。

40

【0119】

治療的に採用される、I L - 1 2 の有効量は、例えば、治療対象、投与経路、および患者の状態に依存する。したがって、最適な治療効果を得るために、必要に応じて、セラピストが投薬量を評定し、投与経路を修正することが必要である。通常、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで、I L - 1 2 を投与する。全身的な処置のための、典型的な投薬量は、上述の要素に依存して、約 1 0 n g / k g から 2 0 0 0 n g / k g またはそれ以上までの範囲にわたることもある。いくつかの実施態様では、用量範囲は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 から、約 20 まで；約 30 まで；約 50 まで；約 100 まで；約 200 まで；約 300 まで；または約 500 n g / k g までの範囲にわたることができる。一形態で

50

は、用量は、 500 ng/kg 未満である。別の形態では、用量は、 300 ng/kg 未満である。別の形態では、用量は、約 200 ng/kg 未満である。別の形態では、用量は、約 100 ng/kg 未満である。別の形態では、用量は、約 50 ng/kg 未満である。他の形態では、用量は、約 $10\sim 300\text{ ng/kg}$ まで、 $20\sim 40\text{ ng/kg}$ 、 $25\sim 35\text{ ng/kg}$ 、 $50\sim 100\text{ ng/kg}$ の範囲に及ぶことができる。

【0120】

一形態では、本明細書に記載される、代表的な治療用組成物を、分割照射療法と組み合わせて投与することができる。一実施態様では、各画分に先立ち、治療有効用量が投与される。一実施態様では、治療有効用量が、各画分の投与とおよそ同時に投与される。一実施態様では、治療有効用量が、各画分の5、10、15、20、25、30、35、40、50もしくは60分前から；または、各画分の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12時間前；あるいは、各画分の1、2、3、4、5、6、7日前にわたって、各画分の前に投与することができる。一実施態様では、治療有効用量が、各画分の5、10、15、20、25、30、35、40、50もしくは60分後；または、各画分の2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12時間後；あるいは、各画分の1、2、3、4、5、6、7日後；または、放射線照射治療の間もしくはその後に、毎週、2週間ごとに、もしくは、2カ月に1回、2回、3回、4回、5回、6回、7回にわたって投与される。別の実施態様では、それぞれの放射線源を使用して、TBIまたは局所的に投与される、30日間までの、 $1\sim 10$ 線量/日の分割レジメンにおける、各放射線照射の約5、10、15、20、30、40、50、60分、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、前および後の両方において、1回またそれ以上の、IL-12の代表的用量（ $1\sim 100\text{ ng/kg}$ ）が投与される。

【0121】

代替りの一般的な提案として、IL-12受容体を製剤化した上で、有効であるが過度に毒性でない最大用量までで、組織中において、約 0.1 ng/cc より大きなIL-12レベルを確立することが可能な投薬量で、標的部位または組織に送達される。可能であれば、持続注入、徐放、局所適用または経験的に決定された頻度の注射によるものをはじめとする、投与レジームによって、この組織内濃度を、維持することが必要である。この治療法の進展は、従来のアッセイによって容易にモニターされる。

【0122】

「処置投与の時間の近辺」は、約1カ月、約3週間、約2週間、約1週間、数日、約120時間、約96時間、約72時間、約48時間、約24時間、約20時間、数時間、約1時間もしくは数分等の、処置投与の前および／または後のいずれかの、任意の合理的な時間における、IL-12の投与をさす。処置投与の時間の近辺は、同時またはほぼ同時、すなわち、数分から1日以内の、いずれかの、処置およびIL-12の投与を指すこともできる。

【0123】

「化学療法」は、医学分野において、現在公知のまたは今後開発される、天然または合成の作用剤を含む、任意の療法をさす。化学療法の例には、現在利用可能な多数の制がん薬が含まれる。しかしながら、化学療法には、疾患状態を治療することを意図されている、任意の天然または合成の薬物をも含まれる。本発明の特定の実施態様では、化学療法には、疾患状態を治療することが意図されている、数種の最先端の薬物の投与も含まれる。例には、頭部の局所的に進行した扁平上皮癌腫を有する患者のための、ドセタキセル、シスプラチンおよび5-フルオロウラシルを用いる併用化学療法（Tsukuda, M.ら、Int J Clin Oncol. 2004 June; 9 (3): 161~6ページ）、ならびに難治性または再発した低悪性度リンパ腫における、フルダラビンおよびベンダムスチン（Konigsmann Mら、Leuk Lymphoma. 2004; 45 (9): 1821~1827ページ）が含まれる。

【0124】

本明細書中で使用される際、代表的な治療用または偶発的な電離放射線源には、例えば、アルファ線、ベータ線、ガンマ線、X線および中性子線源が含まれる。

【0125】

「放射線療法」は、疾患状態を治療するために、任意の形態の放射線照射が使用されている、任意の療法をさす。放射線療法のための放射線を発生させる機器は、現在利用可能であるか、または、将来利用可能となるいずれかの機器である。

【0126】

「高線量処置モダリティ」は、亜致死的またはほぼ致死的に高い処置をさす。高線量処置モダリティは、治療エンドポイントを達成するために、増大した能力を有することを意図しているが、一般に、増大した付随する毒性を有する。さらに、一般に、高線量処置モダリティは、従来の処置モダリティと比較して、増大した造血損傷を示す。高線量処置モダリティのためのプロトコールは、現在使用されているか、または、将来的に使用されるものである。

【0127】

本明細書中で使用される際、放射線療法「処置モダリティ」は、電離および非電離放射線源を両方含むことができる。代表的な電離放射線処置モダリティには、例えば、外部ビーム照射療法；強度変調放射線療法（IMRT）；画像誘導放射線療法（IGRT）；X線照射（例えば、光子線療法）；電子ビーム（例えば、ベータ線照射）；プロトン照射；高形エネルギー付与（LET）粒子；定位放射線手術；ガンマナイフ；線形加速器媒介フレームレス定位放射線手術；ロボットアーム制御X線照射送達システム（robot arm controlled x irradiation delivery system）；臓器特異的またはがん細胞特異的取り込みのための放射性同位体放射線療法；腫瘍標的型放射線療法（または放射線免疫療法、RIT）のためのモノクローナル抗体に結合した放射性同位体；密封小線源療法（組織内または腔内）；高線量率放射線源移植（high dose rate radiation source implantation）；臓器特異的線量送達のための永久放射性シード移植が含まれる。

【0128】

一般に、「ドーズデンス治療レジメン（dose dense treatment regimen）」は、それによって、従来の治療レジメンと比較して、治療が連続して加速的に繰り返されて、所望の治療アウトカムを達成する、治療レジメンである。本発明の方法は、処置に付随する造血毒性を低減し、または寛解させることによって、ドーズデンス治療レジメンの使用を容易化し、それによって、ドーズデンス治療レジメンが利用され、特定の疾患状態を治療することにおける成功率を増大させることを可能にする（一般に、Hudis C A、Schmits N、Semin Oncol. 2004 June; 31 (3 Suppl 8) : 19~26ページ；Keith Bら、J Clin Oncol. 2004 Feb. 15; 22 (4) : 749ページ；author reply 751~3ページ；Maurel Jら、Cancer. 2004 Apr. 1; 100 (7) : 1498~506ページ；Atkins C D、J Clin Oncol. 2004 Feb. 15; 22 (4) : 749~50ページを参照されたい）。

【0129】

「化学防護または放射線防護」は、疾患状態を標的とすることを意図した処置に付随する造血毒性からの防護またはその明らかな低減をさす。

【0130】

本明細書中で使用される際、「（放射線毒性または放射線障害としても知られる）急性放射線症候群（ARS）」は、非常に短時間（例えば、ものの数分）、高線量の透過性放射線による、全身（または体のほとんど）の致死的または亜致死的な放射線照射を受容することによって引き起こされる、急性疾患により特徴付けられる。ARSを患う人の例は、広島および長崎原子爆弾の生存者、1986年のチェルノブイリ原子力発電所事故後に最初に対応した消防士、および滅菌放射線照射装置にうっかり曝露された人である。特定の実施態様では、急性放射線症候群に付随する放射線量は、通常、大きい（すなわち、0.7 Gray (Gy) または70 radを超える）。特定の実施態様では、0.3 Gy または30 radの低い線量でも、弱い症状が観察されうる。

【0131】

本明細書中で使用される際、「急性損傷効果」および「損傷効果」は、急性の致死のおよびほぼ致死な放射線量による放射線誘発損傷を含むことができる。

【0132】

「固形腫瘍」は、一般に、血液、骨髄またはリンパ系以外の体の組織のがんの存在をさす。

【0133】

「造血障害（がん）」は、一般に、造血系に起源を有するがん細胞の存在をさす。

【0134】

「欠損を寛解させる」は、造血欠損の低減、すなわち、欠損の改善または現在の臨床により定義された正常状態の部分的もしくは完全な回復をさす。よって、造血欠損の寛解は、全般的または特異的な造血の増大、刺激、亢進または促進をさす。造血欠損の寛解は、全般的、すなわち、2つ以上の造血細胞タイプもしくは系列を増加させること、または特異的、すなわち、1つの造血細胞タイプまたは系列を増加させることとして観察することができる。

10

【0135】

「骨髄細胞」は、一般に、哺乳動物の骨髄コンパートメント中に存在しおよび／または向かう細胞をさす。用語「骨髄細胞」に含まれるのは、それらに限定されないが、造血再増殖細胞、造血幹細胞および／または前駆細胞をはじめとする、造血系起源の細胞だけでなく、それに限定されないが、これらのおよび他の細胞タイプおよび系列に関連している幹細胞および／または前駆細胞をはじめとする、内皮細胞、間葉細胞、骨細胞、神経系細胞、支持細胞（間質細胞）等の、骨髄由来でありうる任意の細胞も含まれる。

20

【0136】

「造血細胞タイプ」は、一般に、多様なタイプの分化した造血細胞をさすが、幹細胞、前駆細胞、および、骨髄性細胞、リンパ球様細胞等の、多様な系列の細胞をはじめとする、血液細胞産生に関係する、すべての細胞タイプを指している、多様な芽細胞等の、特定の造血細胞タイプがそれに起源を有する、造血前駆細胞も含むことができる。

【0137】

「造血細胞系列」は、一般に、骨髄系またはリンパ系等の、分化した造血細胞の特定の系列をさすが、樹状細胞、赤血球等の、より分化した系列をもさしうる。

【0138】

細胞の「IL-12により促進された増殖」は、一般に、造血前駆細胞および／または幹細胞等の、さらに、骨髄ニッチの微小環境を構成する他の細胞も含む、哺乳動物の骨髄に存在するかまたは向かう細胞の拡大または増加に、少なくとも部分的に貢献する造血の増大、刺激または促進をさす。

30

【0139】

「造血の刺激または促進」は、一般に、1つまたは複数の造血細胞タイプまたは系列の増加をさし、特に、哺乳動物が1つまたは複数の造血細胞タイプまたは系列の欠乏を有する場合に、1つまたは複数の造血細胞タイプまたは系列の刺激または亢進に関する。

【0140】

「長期再増殖造血細胞」は、一般に、骨髄中の最も原始的な血液細胞であり、多様な血液細胞タイプおよび系列の生涯にわたる産生を提供することに関与する血液幹細胞である。

40

【0141】

「造血幹細胞」は、一般に、血液幹細胞であって；上で定義される「長期再増殖」、および、短期間（哺乳動物に依って、数週間、数カ月または、時に数年）の間、「前駆細胞」を産生することのできる「短期再増殖」の2つのタイプがある。

【0142】

「造血前駆細胞」は、一般に、血液幹細胞から分化する（すなわち、成熟する）最初の細胞であり；その後、多様な血液細胞タイプおよび系列に分化（成熟）する。

【0143】

50

「造血支持細胞」は、骨髄の非血液細胞であり；これらの細胞は、血液細胞産生のための「支持体」を提供する。これらの細胞は、骨髄間質細胞とも呼ばれる。

【0144】

「骨髄維持」は、放射線、化学療法、疾患または毒素によって損傷された骨髄が、それによって、その正常または正常に近い状態を維持されるプロセスを意味し；「骨髄回復」は、放射線、化学療法、疾患または毒素によって損傷された骨髄が、それによって、その正常または正常に近い状態に回復するか、または、骨髄機能の何らかの測定可能な改善が得られるプロセスを意味し；骨髄機能は、適切なレベルの多様な血液細胞タイプまたは系列が、それによって、造血（血液）幹細胞から産生されるプロセスである。

【0145】

「骨髄機能不全」は、放射線、化学療法、疾患または毒素によって損傷された骨髄を、正常まで、修復することができず、したがって、哺乳動物中において、適切な造血を維持するための十分な血液細胞の産生ができなくなる、病理学的プロセスである。

【実施例】

【0146】

例

ここでは、以下の例を参照して、本発明を説明する。これらの例は、例示の目的のみのために、提供されており、そして、本発明は、これらの例に限定されないが、本明細書に提供されている、教示の結果として、明らかになっている、全てのバリエーションを包含する。

【0147】

本明細書に記載される、実験よりも前には、H S C Tに引き続く、造血回復を改善することを可能にする、組換えヒトインターロイキン-12（I L-12）調製物をはじめとする、I L-12を含む組成物および方法に対する、公開されたプロトコールはない。

【0148】

本開示の形態および実施態様は、H S C T移植に引き続き、患者に投与した場合、特定のI L-12製剤は、驚くべき且つ予期しない、有用性および有効性を有しているという予期しない発見に、由来している。

【0149】

一例として、治療上有効なI L-12製剤を調製する方法が開発された。

【0150】

例1：

材料および方法

r M u I L-12、マウスB M C T、およびヒト骨髄C D 3 4⁺細胞

r M u I L-12（組換えマウスI L-12）は、P e p r o t e c h（カタログ番号210-12）、R o c k y H i l l、N J、U S A）、または、N e u m e d i c i n e s社に独占されている、S B H S c i e n c e s（L S#45（Q4））（N a t i c k、M A、U S A）から入手した。マウスおよびマウス由来骨髄細胞における試験には、r M u I L-12を利用した。正常C 5 7 / B L 6マウスの大腿骨および脛骨から、2 5 G 5 / 8針を使用して、P B Sを用いて、骨髄細胞をフラッシング・アウトすることにより、B M C Tを調製した。細胞を、40 μmのセルストレーナー（cell strainer）によって濾過し、10% F B Sを含有するR P M Iで洗浄し、そして、液体窒素中で凍結保存した。C D 3 4を発現するヒト骨髄細胞は、L o n z a G r o u p, L t d,（W a l k e r s v i l l e、M D）から購入した。

【0151】

マウス

雌（B M C T試験）または雄（骨髄試験）C 5 7 B L / 6マウスは、ジャクソン研究所（S a c r a m e n t o、C A）から入手した。マウス試験は、B A T T S研究所（N o r t h r i d g e、C A）で実施された。マウスは、試験の開始に先立ち、少なくとも一週間隔離して維持した。試験に使用されたマウスは、なんらの疾患の徴候を示していない

10

20

30

40

50

、8週齢～10週齢、体重はおよそ20gであった。全ての手順は、実験動物ケア評価認証協会（A A A L A C）およびアメリカ実験動物ケア学会によって公認されている、B A T T S 研究所動物実験委員会（I A C U C）によって、審査および承認された。試験の間、動物のケアおよび使用は、米国国立衛生研究所によって公開された、実験動物のケアと使用に関する指針（公開番号：85～23、1996年改訂）に概説された原理に従った。

【0152】

例2：

r M u I L - 1 2 および B M C T で治療した照射マウスの生存試験

0日目、雌 C 5 7 B L / 6 マウス (n = 40) を、放射線照射の均等な分布のため、照射器の中央にマウスを保持するために特別に構築した「パイ・ボックス (pie-box)」中で、¹³⁷Cs 線源で G a m m a c e l l (登録商標) 40 (T h e r a t r o n i c s , O n t a r i o , C a n a d a) を使用して、8.2 Gy の致死線量で T B I を施した。マウスは、T B I の 24 時間前 (n = 10)、または、T B I の 24 時間前および 3 日後 (n = 10) のいずれかに、ビヒクル (n = 10)、または 10 ng / マウスの用量の r M u I L - 1 2 の静脈内注射を受けた。マウスの 4 つ目の群 (n = 10) は、照射の 2 時間後、B M C T (1.1 × 10⁶ 個の細胞) を施された。マウスは、35 日目まで生存をモニターした。この期間、マウスは、滅菌食および酸性化した水を自由に摂取できる。群間における生存の差違を、カプラン・マイヤー生存解析で、続いて、生存時間についてマンテル・コックス検定、および、生存率について、ピアソンのカイ二乗検定により評価した。血液試料を、28 日目に各群の動物の半分から、ならびに 21 日目および 35 日目に他の半分から採取し、自動血液分析装置 (H e m a v e t ; D r e w S c i e n t i f i c I n c . , W a t e r b u r y C T) によって分析した。血球数の群間の差違を、分散分析 (A N O V A) によって分析した。

【0153】

例3：

マウス骨髄の免疫組織化学

雄 C 5 7 B L / 6 マウス (群当たり n = 2) は、8.0 Gy で T B I を施され、そして、引き続き、照射の 24 時間後の 1 回投与、あるいは、照射の 24 時間および 2 日後の 2 回投与のいずれかで、皮下に、ビヒクル、または r M u I L - 1 2 (20 ng / マウス) を受けた。マウスを照射の 12 日後に屠殺し、大腿骨を単離し、ホルマリン中で固定し、続いて、C y t o - P a t h o l o g y D i a g n o s t i c C e n t e r , I n c . (D u a r t e , C A , U S A) により、パラフィン包埋された組織切片に、調製された。

【0154】

キシレンを用いて、組織切片を脱パラフィンし、エタノールの濃度を減少させることにより再水和し、そして、加熱抗原賦活化法 (H I E R) を施して、抗原を回復した。内在性のペルオキシダーゼを 0.3% H₂O₂ で 30 分間阻害し (V W R ; S a n F r a n c i s c o , C A) 、そして、バックグラウンド染色を、B a c k g r o u n d S n i p e r (B i o c a r e M e d i c a l , L L C ; C o n c o r d , C A) を用いて、ブロッキングした。次いで、組織切片をウサギ抗マウス I L - 1 2 R β 2 (S i g m a ; S t L o u i s , M O) とインキュベートした。組織切片を洗浄し、ペルオキシダーゼコンジュゲート抗ウサギ I g G (I m m P R E S S ; V e c t o r L a b o r a t o r i e s ; B u r l i n g a m e , C A) とインキュベートした。A E C 基質 (I m m P A C T A E C ; V e c t o r L a b o r a t o r i e s ; B u r l i n g a m e , C A) とのインキュベーションに引き続き、ペルオキシダーゼ標識細胞はオレンジ色に発色した。C A T ヘマトキシリン (B i o c a r e M e d i c a l , C o n c o r d , C A) を用いて、組織を対比染色した。V e c t a m o u n t (V e c t o r L a b o r a t o r i e s ; B u r l i n g a m e , C A) 中に、組織切片を含浸させ、カバーガラスで被覆し、透明のマニキュア液で密封し、そして、O l y m p u s 複式顕微鏡 (O l y m p

us America, Inc.; Center Valley, PA) を使用して、 $20\times\sim 100\times$ の倍率で、可視化した。

【0155】

例4：

ヒトCD34⁺細胞上のIL-12R β 2の免疫細胞化学分析

Lanza Group, Ltd, (Walkersville, MD) から入手したヒト骨髓CD34⁺細胞を、 $5\mu\text{g}/\text{mL}$ のフィブロネクチンで処置したスライド上に播種し、冷メタノール中、 -20°C で10分間固定し、そして、Background Sniper (Biocare Medical; Concord, CA) で処置した後、IL-12R β 2に対するウサギポリクローナル抗体 (Sigma; St Louis, MO) で標識し、引き続き、ホースラディッシュペルオキシダーゼとカップリングした抗ウサギIgG (ImmPRESS試薬; Vector Laboratories; Burlingame, CA) とインキュベーションした。スライドを、InimPACT AECペルオキシダーゼ基質 (Vector Laboratories; Burlingame, CA) と30分間インキュベートし、そして、CATヘマトキシリン (Biocare Medical, LLC; Concord, CA) 中で対比染色した。陰性対照は、固定され、そして、ウサギポリクローナル一次抗体を含まない、同じ試薬で処置された細胞を含んでおり。写真は、Olympus 複式顕微鏡を使用して撮った。

【0156】

例5：

マウス造血Lin⁻およびLin⁻IL-12R β 2⁺細胞ならびにヒト造血Lin⁻細胞の調製

マウス骨髓は、Bioreclamation (Liverpool, NY) またはBATS研究所から入手した。細胞を、MACS緩衝液 (Miltenyi Biotec; Auburn, CA) で希釈し、そして、 $70\mu\text{m}$ のセルストレーナー (VWR; San Francisco, CA) を通して、濾過した。次いで、細胞をMACS緩衝液で洗浄し、そして、系統マーカー、すなわちCD3e、CD4、CD5、CD8b、CD8a、B220、CD11b、Gr1およびTer (80) (Miltenyi Biotec; Auburn, CA) に特異的なビオチンコンジュゲート・モノクローナル抗体とインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、そして、抗ビオチンマイクロビーズとインキュベートした。Lin⁺細胞は、QuadroMACSセパレータ (Miltenyi Biotec; Auburn, CA) の磁場中に配置される、MACSカラムに細胞を通すことによって、取り切った。未標識のLin⁻細胞は、流出物として収集される間、磁氣的に標識されたLin⁺細胞は、該カラム上に保持された。選別試験において、マウス骨髓Lin⁻細胞を、MoFlowセルソーター (Beckman Coulter; Indianapolis, IN) のフローサイトメトリーによってソートして、マウスIL-12受容体複合体の特有の β 2サブユニット (IL-12R β 2) と反応する、HAM10B9抗体 (BD Biosciences; San Jose, CA) を使用して、IL-12R β 2⁺細胞集団が収穫された。

【0157】

ヒト骨髓細胞は、Lonza Group, Ltd, (Walkersville, MD) から入手した。細胞を、MACS緩衝液 (Miltenyi Biotec; Auburn, CA) で希釈し、そして、 $70\mu\text{m}$ のセルストレーナー (VWR; San Francisco, CA) を通して、濾過した。骨髓単核細胞を、Ficoll-Paque (GE Lifesciences; Piscataway, NJ) を使用して、密度勾配遠心 (4°C 、 455g で35分間) により、分離した。200gでの10分間のさらなる遠心分離に引き続いて、単核細胞分画から、血小板を除去した。結果として得られる、細胞ペレットを、MACS緩衝液中に再懸濁し、系統マーカーCD2、CD3、CD11b、CD14、CD15、CD16、CD19、CD56、CD123およびCD235a (Glycophorin A) に特異的なビオチンコンジュゲート・モノクローナ

ル抗体 (Miltenyi Biotec; Auburn, CA) とインキュベートした。先に記述したように、磁気ビーズによる Lin^+ 細胞の除去に引き続いて、 Lin^- 細胞を収集した。

【0158】

例 6 :

マウスおよびヒト造血細胞のサイトメトリ分析の方法

マウスおよびヒト骨髓 Lin^- 細胞を、アロフィコシアニンコンジュゲート・抗ヒト/マウス IL-12R β 2、クローン番号 305719 (APC-IL-12R β 2) 抗体 (R&D systems; Minneapolis, MN) と、室温で 30 分間インキュベートした。未染色およびアイソタイプ対照が、含まれていた。選別試験において、ヒト骨髓 Lin^- 細胞および CD34 $^+$ 細胞を、APC-IL-12R β 2 抗体およびコンジュゲートモノクローナルフィコエリスリン (PE)-CD34 抗体、クローン番号 563 (BD Biosciences; San Jose, CA)、フルオレセインイソチオシアネート (FITC)-ckit、クローン番号 104D2 (Abcam; Cambridge, MA)、FITC-KDR、クローン番号 89106 (R&D systems; Minneapolis, MN)、PE-CD133、クローン番号 EMK08 (eBioscience; San Diego, CA)、PE-Flt-3、クローン番号 4G8 (BD Biosciences; San Jose, CA)、PE-CD150、クローン番号 A12 (BD Biosciences; San Jose, CA)、PE-CD34 抗体、クローン番号 309121 (R&D systems; Minneapolis, MN) でも、標識した。ヒト骨髓 CD34 $^+$ 細胞を、同様に、APC-IL-12R β 2 および PE-CD34 抗体とインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、DPBS 中に再懸濁し、MoFlow フローサイトメーター (Beckman Coulter; Brea, CA) を用いて、分析した。少なくとも、3 匹の異なるドナーが、各分析において、評価された。

【0159】

例 7 :

結果

rMuIL-12 は、致死的な照射マウスにおいて、BMCT と同様に効果的に、生存を増加させ、そして、血液細胞回復を促進する：

臨床の HSC 移植の状況における使用のための、rHuIL-12 の能力の実証を始めるため、致死的な照射マウスにおいて、35 日間にわたり、静脈内に 1 回 (TBI の 24 時間前) または 2 回 (TBI の 24 時間前および 3 日後) 投与された、rMuIL-12 (10 ng/マウス) の生存および造血促進効果と、TBI の 2 時間後に投与された、BMCT (1.1 $\times 10^6$ 個の全骨髓細胞) のものを、比較した。BMCT、ならびに、両方の投与スケジュールの rMuIL-12 は、照射による死亡を、本質的に同程度で低減させた (図 1a)。全体的な生存比率は、ビヒクル群では 0%、BMCT 群では 70%、1 回の rMuIL-12 群では 60%、および 2 回の rMuIL-12 群では 90% であった (図 1a)。生存率の群間の差は、ビヒクル群と比較した場合、有意であった ($P < 0.005$)。生存の群間の差は、BMCT と rMuIL-12 群については、統計的に有意ではなかった。

【0160】

照射マウスにおける血球数の分析は、BMCT および 1 回または 2 回の rMuIL-12 投与は、ともに、末梢血細胞数を同程度まで増加させたことを実証した (図 1b~d)。血球数の群間の差違は、BMCT と rMuIL-12 群については、統計的に有意ではなかった。しかし、回復においては、BMCT、rMuIL-12 の 1 回投与、および rMuIL-12 の 2 回投与群でわずかな差があった。特に、rMuIL-12 を 2 回投与した群における、血小板回復は、BMCT 群よりも早く、正常な血小板レベルに達していた (図 1d)。

【0161】

10

20

30

40

50

例 8 :

r M u I L - 1 2 は照射マウスの骨髓中での造血を促進する

I L - 1 2 の機能は、その受容体、I L - 1 2 R とのその相互作用によって駆動される ; そのベータ 2 サブユニット (I L - 1 2 R β 2) は、該受容体の特有の構成要素である。本発明者らは、致死的な照射マウスにおける、r M u I L - 1 2 の再生能力は、その受容体、造血幹細胞 (H S C) 上の m I L - 1 2 R の発現によって、駆動されているという、仮説を立てた。本発明者らは、r M u I L - 1 2 で治療された、致死的な照射マウス由来のマウス大腿骨骨髓切片の表現型分析によって、r M u I L - 1 2 の造血促進活性をさらに評価した。致死的な放射線照射後、1 2 日目および 3 0 日目の大腿骨骨髓を、T B I の 2 4 時間後および 3 日後に、r M u I L - 1 2 (2 0 n g / マウス) またはビヒクルで皮下に処置したマウスについて、I L - 1 2 R β 2 を染色した。照射され、r M u I L - 1 2 で治療されたマウス由来の骨髓は、I L - 1 2 R β 2 発現骨芽細胞、前駆細胞、細胞質の細い縁で囲われた分葉核を有する未成熟巨核球、分葉核および豊富な細胞質 (voluminous cytoplasm) を有する成熟巨核球の存在によって特徴付けられた (図 2 a) 。対照的に、照射され、ビヒクルで処置したマウス由来の骨髓は、造血再生の最小限の兆候、および、照射に引き続く、1 2 日目における、I L - 1 2 R β 2 発現細胞の完全な欠損によって特徴付けられた (図 2 b) 。骨髓系前駆細胞および骨芽細胞の細胞型は、それぞれ、S c a - 1 およびオステオカルシンマーカを使用する免疫組織化学分析によって分析した (データは示されていない) 。骨芽細胞は、同種異系の状況において、マウス中での造血細胞の生着を促進し (E I - B a d r i N S ら「Osteoblasts Promote Engraftment Of Allogeneic Hematopoietic Stem Cells」、Exp Hematol 1998; 26:110-116) 、そして、巨核球のホーミングおよび増殖において、役割を果たす (A h m e d N ら、「Cytokine-Induced Expansion of Human CD34+ Stem/Progenitor and CD34+CD41+ Early Megakaryocytic Marrow Cells Cultured on Normal Osteoblasts」、Stem Cells 1999;17:92-99 ; D o m i n i c i M ら、「Restoration and Reversible Expansion of the Osteoblastic Hematopoietic Stem Cell Niche after Marrow Radioablation」、Blood 2009;114:2333-2343) ことが示されている。これと一致して、本発明者らは、放射線照射の 2 4 時間後および 3 日後に、2 回投与された、r M u I L - 1 2 で治療されたマウスの骨髓中、骨内膜性の表面の傍に、I L - 1 2 R β 2 発現巨核球島を観察した (図 3) 。これは、巨核球が類洞周囲 (parasinusoidal) 部位を占める、正常、未治療マウスとは対照的である (D o m i n i c i M ら、上記を参照) 。本発明者らの結果を支持する、形態学的に同定された、H S C 上の I L - 1 2 R β 2 の発現を確かめるため、マウスの骨髓細胞中から、L i n ⁻ 細胞を免疫磁気的に選別した。系統枯渇細胞 (L i n ⁻) は、未分化幹細胞および成熟系統細胞マーカーを欠損する多能性前駆細胞から成る細胞の集団を表す。フローサイトメリー分析は、マウス L i n ⁻ 細胞のおよそ 0 . 5 ~ 7 % が I L - 1 2 R β 2 を発現していたことを実証した (図 4) 。

【 0 1 6 2 】

例 9 :

r M u I L - 1 2 による、マウスの i n v i v o 治療は、放射線照射の不在下で、骨髓 L i n ⁻ 細胞から単離される、I L - 1 2 R β 2 ⁺ 細胞の数を直接的に増加させる

マウス H S C 、巨核球、および骨芽細胞上の m I L - 1 2 R β 2 の発現、ならびに、致死的な照射マウスにおける、生存および造血回復をもたらす、B M C T に匹敵する、その能力によって実証された r M u I L - 1 2 の再生能力は、I L - 1 2 媒介性造血回復および再生が、m I L - 1 2 R β 2 発現細胞へのその直接作用によって引き起こされることを示唆している。次に、本発明者らは、i n v i v o において、マウス骨髓中における、I L 1 2 R β 2 発現細胞に対する、r M u I L - 1 2 の効果を評価した。C 5 7 B L / 6 マウスは尾静脈注射によって r M u I L - 1 2 (1 0 n g / マウス) で治療する、または治療しないかのいずれかであった。骨髓は、第 1 の実験では、r M u I L - 1 2 での治療の 2 1 時間後に、また、第 2 の実験では、I L - 1 2 での治療の 2 5 時間後に採取された。系統陰性細胞を各群から単離し、L i n ⁻ I L - 1 2 R β 2 ⁺ を収穫する、フローサイトメトリーソーティングによってさらに分画した。治療または未治療群中に存在している、

L i n⁺ I L-1 2 R β 2⁺細胞の相対的割合を表1に示す。r M u I L-1 2での治療は、骨髄コンパートメントの系統陰性細胞中の、L i n⁺ I L-1 2 R β 2⁺細胞の相対数の増加をもたらし、そして、21時間後には、I L-1 2 R β 2⁺細胞の3.5倍増加、25時間後には、I L-1 2 R β 2⁺細胞の5.4倍増加を引き起こしていた。

【0163】

例10：

ヒト骨髄L i n⁺細胞およびC D 3 4⁺細胞は、公知のH S Cマーカーと共に、I L-1 2 R β 2を発現している

r M u I L-1 2の造血再生機能、マウスL i n⁺細胞上のI L-1 2 R β 2の発現、およびマウスL i n⁺ I L-1 2 R β 2⁺細胞に対するr M u I L-1 2の増殖効果は、ヒト骨髄の再生において、r H u I L-1 2の潜在的な効果を示唆している。ヒトの移植におけるr H u I L-1 2の潜在的な役割を評価するため、本発明者らは、ヒト骨髄造血幹／前駆細胞上のI L-1 2 R β 2の発現を明らかにした。本発明者らは、I L-1 2 R β 2およびC D 3 4に対する抗体で標識したL i n⁺細胞およびC D 3 4⁺細胞のフローサイトメトリー分析によって、ヒト骨髄細胞上のI L-1 2 R β 2の発現を評価した。臨床状況での移植のための、造血幹細胞の精製の選択における、長く認められたマーカーであることから、C D 3 4細胞を選択した。L i n⁺細胞中、C D 3 4発現状態にかかわらず、およそ0.5%~4% (平均±SD: 1.89±1.21)の細胞がI L-1 2 R β 2⁺を発現していた(図5a)。しかし、C D 3 4⁺細胞中、I L-1 2 R β 2の発現は高度にドナー依存的であり、細胞の6%~57% (平均±SD: 19.59±17.52)で検出された(図5b)。フローサイトメトリー分析によって検出されたように、C D 3 4⁺細胞上のI L-1 2 R β 2の存在を、I L-1 2 R β 2に対する異なる抗体を使用するヒト骨髄C D 3 4⁺細胞の免疫細胞化学染色によってさらに実証した(図5c)。同じ試薬で、I L-1 2 R β 2に対する一次抗体とインキュベーションせずに調製された陰性対照は、染色を示さなかった(データは示さない)。

【0164】

I L-1 2 R β 2とH S Cの他の細胞表面マーカーの共発現も、ヒト骨髄におけるフローサイトメトリー分析によって評価した。L i n⁺細胞およびC D 3 4⁺細胞を、それぞれ、未分化骨髄細胞の別々の集団上に発現することが公知のI L-1 2 R β 2およびC D 3 4、c-k i t、K D R、C D 1 3 3、F l t-3、C D 1 5 0またはC D C P Iに対する抗体で共標識した。これらの分析は、およそ50%のL i n⁺ I L-1 2 R β 2⁺細胞が、C D 3 4 (平均±SD: 53±5)またはc-K i t (平均±SD: 51±7)、35% K D R (平均±SD: 35±6)、および25% C D 1 5 0 (平均±SD: 23±21)を共発現しており(図6a)、L i n⁺細胞と同様に、およそ70%のC D 3 4⁺ I L-1 2 R β 2⁺細胞が、c-k i t (平均±SD: 68±0.2)、80% C D C P I、および15% K D R (平均±SD: 13±9)を共発現していた(図6b)ことを明らかにした。

【0165】

本明細書に提供する例は、例示的なI L-1 2調製物、H e m a M a x I L-1 2がH S C T移植に引き続く、造血回復を効果的に改善したことを明らかに実証した。

【0166】

考察

H S C Tは、骨髄破壊的化学療法および／または様々な血液系悪性腫瘍の放射線治療に引き続く、がん患者を治療するために使用されている。H S C T生着の成功に影響を及ぼす主な要因は、がんの種類およびステージ、移植用の調製レジメン、C D 3 4⁺細胞の質および量、ならびに増殖因子の移植後の使用である(Ninan MJら、「Posttransplant Thrombopoiesis Predicts Survival in Patients Undergoing Autologous Hematopoietic Progenitor Cell Transplantation」、Biol Blood Marrow Transplant 2007;13:895-904; Bensinger WIら「Peripheral Blood Stem Cells (PBSCs) Collected After Recombinant Granulocyte Colony Stimulating Factor (rhG-CSF): an Analysis of Factors Correlati

10

20

30

40

50

ng with the Tempo of Engraftment After Transplantation」、Br J Haematol 1994; 87:825-831; Klumpp TRら「Phase II Study of High-Dose Cyclophosphamide, Etoposide, and Carboplatin (CEC) Followed by Autologous Hematopoietic Stem Cell Rescue In Women With Metastatic or High-Risk Non-Metastatic Breast Cancer: Multivariate Analysis of Factors Affecting Survival and Engraftment」、Bone Marrow Transplant 1997; 20:273-281)。ミエロイドおよびエリスロイド増殖因子の投与は、移植後の好中球減少症および貧血症を治療するために使用されている。(Held TKら「Pharmacodynamic Effects of Hematopoietic Cytokines: the View of a Clinical Oncologist」、Basic Clin Pharmacol Toxicol 2010; 106:210-214)しかし、その薬剤は血小板再生に影響しない。血小板減少症を克服するため、患者は、早期の移植後血小板輸血に頼っている。(Wandt Hら、「New Strategies for Prophylactic Platelet Transfusion in Patients with Hematologic Diseases」、Oncologist 2001; 6:446-450)。最初の回復後、がん患者の17%もが、引き続き、二次的な移植後血小板減少症を経験しており、このことは、高い致死率と有意に関係している。(Ninan, MJら、上記を参照、895-904)突発性移植後血小板減少症および低い血小板数は、短期および長期の再増殖するCD34⁺細胞を伴う弱い生着を付随しており、そして、疾患の再発による死亡のリスクの増加を予示している。(同上)したがって、生着のためのCD34⁺細胞の数を改善し、そして、移植に引き続く、造血の回復を増加することが可能な薬物が必要である。現在、全体的な生存の減少の前兆となる、移植後血小板減少症を軽減するために利用可能な薬剤もない。

【0167】

非ヒト霊長類における、rHuIL-12、またはマウスにおける、rMuIL-12は、TBIのモデルにおいて、生存を増加させることが示されている。(Basile LAおよびEllefson Dら「HemaMaxTM, a Recombinant Human Interleukin-12, is a Potent Mitigator of Acute Radiation Injury in Mice and Non-Human Primates, PLoS ONE」、Submitted 2011; Basile LAおよびGallagher TKら「Multilineage Hematopoietic Recovery with Concomitant Antitumor Effects Using Low Dose Interleukin-12 in Myelosuppressed Tumor-Bearing Mice」、J Transl Med 2008; 6:26; Chen Tら、「IL-12 Facilitates Both the Recovery of Endogenous Hematopoiesis and the Engraftment of Stem Cells after Ionizing Radiation」、Exp Hematol 2007; 35:203-213)。いくつかの一連の証拠は骨髄造血の刺激が、rHuIL-12の生存促進性活性において重要な役割を果たし得ることを示している。(Basile LAおよびEllefson Dら、上記を参照)。in vivoで試験した場合、BMCTと同様に、rMuIL-12は、致死的な照射マウスにおいて、末梢血液細胞回復、および生存を増加した。興味深いことに、BMCTを投与されたマウスよりも、IL-12で治療されたマウスにおいて、血小板の回復は、より早いと見えた。これらの知見は、それぞれ、マウスならびにアカゲザルにおける、rMuIL-12ならびにrHuIL-12の造血促進および生存促進性活性を実証する本発明者らの先の報告と、矛盾していない。(Basile LAおよびEllefson Dら、上記を参照; Basile LAおよびGallagher TKら、上記を参照、Chen T.ら、上記を参照)。これらの造血回復効果は、担腫瘍マウスにおいても観察された。ルイス肺およびEL4リンパ腫モデルの双方において、rMuIL-12は、亜致死性のTBIに引き続く、好中球、赤血球、血小板の初期の回復をもたらした。さらに、リンパ腫および肺がんマウスモデルの双方において、放射線照射または化学療法と相乗的に、IL-12は、腫瘍量を減少させた。(Basile LAおよびGallagher TKら、上記を参照)。本発明者らの知見と矛盾することなく、免疫療法として施されたrHuIL-12の投与は、血液系悪性腫瘍を有する患者において、末梢造血幹細胞移植に引き続く、主なリンパ球サブセットのin vivoでの増殖を引き起こす。(Pelloso Dら「Immunological Consequences of Interleukin 12 Administration After Autologous Stem Cell Transplantation」、Clin Cancer Res 2004;10:1935-1942)。

【0168】

この試験において、注目すべきは、致死的な照射動物中での、血液細胞回復および生存の増加における、rMuIL-12およびBMCTの同様の有効性であった。さらに、い

ずれかの単独の治療では、致死的な照射動物を救うことはできないが、低用量のBMCTと、最適以下のrMuIL-12用量との組合せは、相乗的に生存を増加しており、rMuIL-12の造血促進活性は、BMCTの活性を補完しているように見える。(Chen Tら、上記を参照)。この試験では、BMCTと比較して、rMuIL-12治療マウスにおいて。血小板回復はより強固であった。rMuIL-12およびBMCTの、匹敵する有効性および相補的な活性は、rHuIL-12が、HSCの生着能および造血回復、特に、血小板数の回復を促進するための、HSCへの付加オプションとすることができることを示唆している。

【0169】

rMuIL-12のマウス骨髄造血を増加させる能力は、IL-12と結合した際、骨髄再生を開始させる事象を誘発する、未分化な、残存している造血細胞上の機能的なIL-12受容体(IL-12R)の存在を示している。この仮説の裏付けとして、本発明者らは、rMuIL-12治療マウスの骨髄は、IL-12Rβ2-発現幹/前駆細胞、巨核球、および骨芽細胞の存在によって特徴付けられ、HSCおよびニッチ細胞の両方がrHuIL-12の標的である可能性をしていることを、明らかにした。骨芽細胞の活性化は、造血幹細胞および巨核球の生存、増殖、ならびにホーミングに、極めて重要である。

(Ahmed Nら、上記を参照、de Barros APら、「Osteoblasts and Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Control Hematopoietic Stem Cell Migration and Proliferation in 3D in vitro Model」、PLoS One 2010; 5:e9093; Hamada T, Mohle R, Hesselgesser Jら「Transendothelial Migration of Megakaryocytes in Response to Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF-1) Enhances Platelet Formation」、J Exp Med 1998; 188:539-548; Hodohara Kら「Stromal Cell-Derived Factor-1 (SDF-1) Acts Together with Thrombopoietin to Enhance the Development of Megakaryocytic Progenitor Cells」、(CFU-MK). Blood 2000; 95:769-775; Kiel MJら、「Maintaining Hematopoietic Stem Cells in the Vascular Niche」、Immunity 2006; 25:862-864; Wang JFら、「The Alpha-chemokine Receptor CXCR4 is Expressed on the Megakaryocytic Lineage from Progenitor to Platelets and Modulates Migration and Adhesion」、Blood 1998; 92:756-764)。

致死線量の放射線への曝露は、骨芽細胞系ニッチ増殖をもたらし、それによって、骨内膜骨領域付近に、放射線抵抗性骨芽前駆細胞の生存プールが増殖することが示されている。(Domici M, Rasini Vら、上記を参照)。本試験においても、生存する巨核球は、それらの正常な類洞周囲部位中よりは、海綿骨骨内膜表面付近に観察されている。巨核球は、骨芽細胞性ニッチの増殖を刺激する因子を放出する。(同上)これらの知見と一致して、本発明者らの試験における免疫組織化学試験は、骨付近の骨芽細胞ニッチ、巨核球、および造血幹細胞から成る細胞の島を示す、マウス骨髄中の細胞配置を明らかにした。まとめると、これらの知見は、rHuIL-12がIL-12受容体を介して直接作用して、HSCおよびニッチ細胞の活性を調整し、そして、造血を刺激することができることを示唆している。この見解と一致して、IL-12は、アクセサリーヒトCD34⁺細胞の存在下、5-フルオロウラシル治療ヒト末梢血CD34⁺細胞のコロニー形成を促進することが報告されている。(Grafte Sら、IL-12 「Indirectly Enhances Proliferation of 5-FU-Treated Human Hematopoietic Peripheral Blood CD34⁺ Cells」 Am J Hematol 1998; 58:183-188)。

【0170】

rMuIL-12で治療された照射マウス由来の骨髄中でのIL-12β2発現の存在は、未治療の照射マウス由来の骨髄中でのその不在とは対照的に、rMuIL-12は、骨髄中におけるIL-12受容体発現を増加させ、そして、直接、HSCおよびニッチ細胞上のIL-12受容体を介して、その造血促進活性を発揮することができることを示唆している。この仮説と矛盾することなく、放射線照射の不在下においては、外因性のrMuIL-12による治療は、骨髄コンパートメントの系統陰性細胞中のLin⁻IL-12Rβ2⁺細胞の相対数の増加をもたらし、そして、骨髄を採取した、2つの異なる時点において、IL-12Rβ2⁺細胞の平均4.5倍の増大が生じていた。これらのデータ

は、治療の21時間後、未治療マウス（7.5%）と比較して、IL-12治療マウスの全骨髄中のBrdU陽性細胞の増加（16.5%）を示した、放射線照射の不在下での、本発明者らのBrdU取り込みアッセイとも矛盾していない（データは示さない）。これらのデータから、本発明者らは、rMuIL-12リガンドによるin vivoでの治療に引き続く、骨髄から単離および選別されたLin⁺IL-12Rβ²細胞において観察された増加は、IL-12受容体を持つ娘HSCの数の増加をもたらす、IL-12リガンド/IL-12受容体システムを介した、直接のHSC増殖に起因していると結論を出している。

【0171】

本開示は、IL-12Rβ²が、造血幹および前駆細胞を包含する、骨髄細胞の2つのプール、マウスおよびヒトLin⁺細胞ならびにヒトCD34⁺細胞上で発現していることを実証する初めての報告である。ヒトCD34⁺細胞上でのIL-12Rβ²の発現も、免疫細胞化学染色によって確認された。総合的に、これらの試験は、1~4%のヒトLin⁺細胞および6~50%のヒトCD34⁺細胞が、IL-12Rβ²を発現していたことを証明した。かなりの数のLin⁺IL-12Rβ²細胞（20%~50%）およびCD34⁺IL-12Rβ²細胞（15%~80%）は、HSCの他の潜在的なマーカー、主にc-kit、KDR、CD150、またはCD34⁺CD133⁺細胞も共発現していた（Hawley RGら、「Hematopoietic Stem Cells」、Methods Enzymol 2006; 419:149-179; Conze Tら「CD34⁺CD133⁺ Hematopoietic Stem Cells Cultured with Growth Factors Including Angpt15 Efficiently Engraft Adult NOD-SCID Il2rgamma^{-/-} (NSG) Mice」、PLoS One 2011; 6:e18382; Ziegler BLら「KDR Receptor: a Key Marker Defining Hematopoietic Stem Cells」、Science 1999; 285:1553-1558）。注目すべきは、in vitroでのマウス中では、rMuIL-12によって、その造血刺激性が劇的に（7倍）増加された、幹細胞因子（SCF）の受容体、c-KITであった。（Jacobsen SEら、「Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor (Interleukin 12) is a Synergistic Growth Factor for Hematopoietic Stem Cells」、J Exp Med 1993; 178:413-418）。受容体c-kitは、in vivoでの、HSCの自己再生および維持に重要な役割を果たすことが示されている。（Porrata LFら、「Early Lymphocyte Recovery Predicts Superior Survival After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma or Non-Hodgkin Lymphoma」、Blood 2001; 98:579-585）。c-kit/SCF複合体は、骨髄中における、その微小環境への幹細胞の接着およびHSCホーミングにおいて、重要な役割を果たしている。IL-12およびSCFは、in vitroでの、リンパ球未分化造血前駆細胞の増殖を相乗的に支援していることが示されている。（Hirayama Fら、「Synergistic Interaction Between Interleukin-12 and Steel Factor in Support of Proliferation of Murine Lymphohematopoietic Progenitors in Culture」、Blood 1994; 83:92-98）。これらの予期しない、および驚くべき、IL-12Rβ²とc-kitとの相乗効果ならびに共発現は、造血再生および回復における、IL-12の役割をさらに明らかにした。先の報告と一致して、CD150発現は、主にLin⁺細胞に制限されるが、CD34⁺CD133⁺細胞に限定される。（Conze T、Lammersら、上記を参照; Sintès Jら、「Differential Expression of CD150 (SLAM) Family Receptors by Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells」、Exp Hematol 2008; 36:1199-1204）。CD150発現Lin⁺細胞は、長期間再構築するHSCのサブセットを代表していることが示されている。（Buhring HJら、「CD34⁺CD133⁺ Identifies a Broad Spectrum of Normal and Malignant Stem/Progenitor Cell subsets of Hematopoietic and Nonhematopoietic Origin」、Stem Cells 2004; 22:334-343）。CD34⁺CD133⁺反応性モノクローナル抗体による、CD34⁺細胞の刺激は、赤血球コロニー形成単位の増加をもたらした。CD34⁺CD133⁺発現は、間葉系細胞と類似する細胞型上でも観察された。（同上）Lin⁺細胞およびCD34⁺細胞の両方がKDRを発現しており、先の報告と一致している。（Ziegler BLら、上記を参照）。HSCニッチは、CD34⁺KDR⁺表現型

によって特徴付けられる、間葉系幹細胞から成ることが示されており、組織再生において、役割を果たしていることは公知であり、そして、続いて、KDR⁺細胞は、再構築機能を保持していることが示されている。KDRとIL-12Rβ2との共発現は、さらに、HSCまたは骨髄ニッチ細胞上に発現される、IL-12Rβ2が、造血回復において、重要な役割を果たす可能性を示唆している。まとめると、これらの知見は、IL-12/IL-12受容体経路は、ヒト骨髄造血に関与しており、そして、IL-12Rβ2がrHuIL-12によって外因的に刺激されて増殖し、そして、それにより、骨髄破壊に引き続き、造血組織を再構築することができる、造血幹および前駆細胞ならびに骨髄ニッチ細胞の新規のプールを描写しているマーカーを代表している可能性を示唆している。

【0172】

IL-12の有効性は、がん患者におけるその抗腫瘍活性に関して、いくつかの研究の対象となってきた。強い関心にもかかわらず、IL-12は、その中程度の臨床活性、ならびに、高用量（300 ng/Kg～600 ng/Kg）、反復投与レジメン（反復レジメンでの1週間当たり5回投与）における、有意な毒性のため、薬として抜きんではなく、また、食品医薬品局（FDA）の認可も受けていない。（Atkins MBら、「Phase I Evaluation of Intravenous Recombinant Human Interleukin 12 in Patients with Advanced Malignancies」、Clin Cancer Res 1997; 3:409-417; Bajetta E、Del VM、Mortarini Rら、「Pilot Study of Subcutaneous Recombinant Human Interleukin 12 in Metastatic Melanoma」、Clin Cancer Res 1998;4:75-85; Gollob JAら、「Phase I Trial of Twice-Weekly Intravenous Interleukin 12 in Patients with Metastatic Renal Cell Cancer or Malignant Melanoma: Ability to Maintain IFN-Gamma Induction Is Associated With Clinical Response」、Clin Cancer Res 2000; 6:1678-1692; Gollob JAら、「Phase I Trial of Concurrent Twice-Weekly Recombinant Human Interleukin-12 Plus Low-Dose IL-2 in Patients with Melanoma or Renal Cell Carcinoma」、J Clin Oncol 2003; 21:2564-2573; Lenzi Rら、「Phase I Study of Intraperitoneal Recombinant Human Interleukin 12 in Patients with Mullerian Carcinoma, Gastrointestinal Primary Malignancies, and Mesothelioma」、Clin Cancer Res 2002; 8:3686-3695; Little RFら、「Phase 2 Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin in Combination with Interleukin-12 for AIDS-Related Kaposi Sarcoma」、Blood 2007; 110:4165-4171; Motzer RJら、「Phase I Trial of Subcutaneous Recombinant Human Interleukin-12 in Patients with Advanced Renal Cell Carcinoma」、Clin Cancer Res 1998; 4:1183-1191; Ohno Rら、「A Dose-Escalation and Pharmacokinetic Study of Subcutaneously Administered Recombinant Human Interleukin 12 and its Biological Effects in Japanese Patients with Advanced Malignancies」、Clin Cancer Res 2000; 6:2661-2669; Portielje JEら、「Phase I Study of Subcutaneously Administered Recombinant Human Interleukin 12 in Patients with Advanced Renal Cell Cancer」、Clin Cancer Res 1999; 5:3983-3989; Robertson MJら、「Interleukin 12 immunotherapy After Autologous Stem Cell Transplantation for Hematological Malignancies」、Clin Cancer Res 2002; 8:3383-3393; van Herpen CMら、「Intratatumoral Administration of Recombinant Human Interleukin 12 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients Elicits a T-Helper 1 Profile in the Locoregional Lymph Nodes」、Clin Cancer Res 2004;10:2626-2635）。比較的少ない用量においては、外因性IL-12による治療は、末梢血幹細胞移植のおよそ2カ月後に、1回、続いて、2週間後、反復レジメンにおける5日間毎日の投与で施される、30 ng/Kg～250 ng/Kgの範囲の用量では、血液系悪性腫瘍を有する患者においては、十分に許容された。（Robertson MJら、上記を参照）。

【0173】

対照的に、本発明者らは、rHuIL-12が、本発明者らのマウスおよびアカゲザル試験の両方において、1回のみまたは2回投与された、ヒト用量の100 ng/Kg未満と等価である、動物にキログラム当たり少ないナノグラム用量において、その造血促進性を発揮することを見出した。さらに、本発明者らの毒性試験において、本発明者らが占

10

20

30

40

50

有している、 $rHuIL-12$ は、明白な毒性の兆候なく、約 300 ng/Kg のヒト用量と等価な、 1000 ng/Kg の最大7回投与後、アカゲザルにおいては、良好な耐容性であった（データは示さない）。これらの知見は、造血再生のための $rHuIL-12$ 用量は、がん患者においてこれまで使用された、 $IL-12$ 用量よりも実質的に少なくでき、HSC移植患者における、 $rHuIL-12$ に対し、より好ましい安全性プロファイルを示唆している。

【0174】

本発明者らの知見は、 $rHuIL-12$ は、末梢血細胞数の多系列の回復を刺激することによって、さらなる治療効果を潜在的に提供することができることを実証する。 $IL-12$ の抗腫瘍および免疫刺激効果は、がん患者におけるその治療効果にさらに加える。したがって、 $IL-12/IL-12R$ は、外因性の $IL-12$ の投与によって導入されて、HSC移植を受けた患者の緩解を増加することができる、生存可能な経路を代表している結論

BMCTと同様に効果的に、例示的な方法および $rMuIL-12$ を含む組成物は、致死的な照射マウスにおいて、造血を促進し、そして、末梢血細胞の回復および生存を増加させており、 $rHuIL-12$ 療法は、HSCに引き続く、HSC生着を増加することができることを示している。本発明者らは、 $IL-12$ の潜在的な標的である、照射マウス骨髄中の、 $IL-12R\beta 2$ 発現細胞を同定した。 $rMuIL-12$ の投与は、マウス骨髄中の、 $IL-12R\beta 2$ 発現 Lin^- 細胞の数を増加させており、骨髄HSCおよびニッチ細胞が $rMuIL-12$ の直接的標的であり、そして、 $rMuIL-12$ の造血促進活性は、HSC上の $IL-12$ 受容体によって媒介されることを示している。最後に、本発明者らは、ヒト骨髄 Lin^- および $CD34^+$ 細胞上での $IL-12R\beta 2$ の発現を明らかにし、ヒトの移植における $IL-12$ の潜在的な役割を示している。

【0175】

例：

【0176】

【表1】

表1. ビヒクルまたは $rMuIL-12$ で処置したマウスにおける骨髄 $Lin^-IL-12R\beta 2^+$ 細胞の割合。外因性 $IL-12$ は、骨髄コンパートメントの系列陰性細胞中の $IL-12R\beta 2^+$ 細胞の相対数を増加させており、そして、 $IL-12R\beta 2^+$ 細胞の平均4.5倍の増大をもたらしている。

	ビヒクル	$rMuIL-12$	増加 倍
$IL-12R\beta 2^+$ の割合			
実験1（21時間後）	0.6	2.1	3.5
実験2（25時間後）	0.5	2.7	5.4

【0177】

例11

有効性の実証：単回、低用量 $rHuIL-12$ は、造血を回復し、そして、致死的な放射線に曝露されたアカゲザルの生存を増加させる

単一薬剤として、単回、低用量の $rHuIL-12$ は、致死的な放射線に曝露された非ヒト霊長類において、プラセボに比して、生存を著しく増加させており、支持療法を使用することなく、 $rHuIL-12$ は、敗血症および重症の好中球減少症／血小板減少症の比率を低減しており、そして、プラセボに比して、骨髄再生を増加させた。

【0178】

致死的な全身照射（TBI）に曝露されたヒトにおいて、急性放射線症候群の造血症候群（HSARS）は、死へとつながる。組換えヒトインターロイキン-12（rHuIL-12）は、有効性は、適切な動物モデル（例えば、非ヒト霊長類）において検証にされ、そして、安全性は、ヒトにおいて実証される、FDAのアニマル・ルールに基づいて、HSARSの軽減のために開発されている。アカゲザル（9匹の動物／性別／投与群）が無作為化されて、TBI（700cGy）の24～25時間後に、抗生物質、輸液または輸血なしで、rHuIL-12（0〔プラセボ〕、50、100、250、または500ng/kg）の単回の皮下注射を施した。60日目の生存率は、プラセボ、50、100、250、および500ng/kg rHuIL-12投与群で、それぞれ11%、33%、39%、および50%であった（各投与対プラセボで、ログ・ランク検定 $p < 0.05$ ）。rHuIL-12は、重症好中球減少症、重症血小板減少症、および敗血症の発生率も著しく低減させた。さらに、TBIに引き続く、骨髄再生は、rHuIL-12で治療したサルにおいて、対照よりも著しく高かった。これらのデータは、TBIの1日後に投与されたrHuIL-12の単回注射が、生存を著しく増加させ、そして、放射線誘導性造血毒性および感染症を著しく低減することができることを実証する。したがって、rHuIL-12は、放射線曝露の致死的な効果に対して効果のある、単品型の医学的対抗手段として、有効である。

10

【0179】

急性放射線症候群（ARS）は、核事故または核攻撃の場合に起こるような、短期間に、 $>1\text{ Gy}$ の放射線量への全身または重要な身体の一部の曝露によって引き起こされる生命を脅かす疾病である。ARSの病態生理学はよく理解されており、全ての哺乳動物にわたって類似しており、造血、胃腸、中枢神経、および皮膚系に対して有害な効果を伴っている。ARSの造血器官症候群（HSARS）において、毒性は急性骨髄消失に因っており、汎血球減少症をもたらす。HSARSは、最終的には、放射線曝露のレベルに応じて、2週間～2カ月の範囲にわたる、感染および／または出血に因って、死をもたらす。

20

【0180】

大規模な緊急被爆事故における、放射線被爆の医療対策（R-MCM）の有効性は、生命を救うために重要であるが、現在、米国食品医薬品局（FDA）により認可されている治療はない。HSARSのための典型的な治療ガイドラインは、曝露レベルに応じて、短期または長期のサイトカイン投与が含まれている。入手可能なサイトカイン製品は、いくつかの個々の細胞型（好中球に対する、G-CSFなど）の成長を支援する¹が、それらの使用の報告は、TBI後の総合的な死亡率において、一貫した減少を示しておらず、そして、それらのサイトカインは、HSARSへの適応については、FDAによって認可されていない。原子力災害または事故に起因する、HSARSに対する最適なR-MCMは、骨髄コンパートメントの全ての系統を再生することができ、そして、予期されるロジスティック障害がある際には、好ましくは単一投与として、そして、集中的な支持療法がない状態で、曝露後数時間～数日間のうちに投与した際、有効である必要がある。これらの要件は、顆粒球形成の系統にのみ影響を及ぼし、複数回の毎日の投与を必要とし、そして、集中的な支持療法と組み合わせることでのみ、生存を改善することが示されている、G-CSFでは、満たされない⁹。さらに、放射線曝露に関して、G-CSFは、長年にわたる単一性の血小板減少症¹⁰、ならびに、肺毒性¹⁸および繊維症（Aeolus referenceを参照）を伴う、遅延型の副作用とも関連すると、報告されている。

30

40

【0181】

本発明者らは、抗生物質、体液、または血液製剤の不在下、照射後24～25時間で投与された、組換えヒトIL-12（rHuIL-12）の単回投与は、マウスHSARSモデル、ならびに、非ヒト霊長類（NHP）の実証実験の、非盲検の、雄限定試験の双方において、生存を改善したことを以前に報告し⁸。これらの知見は、有効性は、適切な動物モデル（例えば、非ヒト霊長類）において検証し、そして、安全性は、ヒトにおいて実証される、FDAのアニマル・ルールに基づく、HSARSのためのR-MCMとして、

50

rHuIL-12のさらなる開発を支持している。以下に、本発明者らは、雄および雌のアカゲザルの大きな群における、rHuIL-12の放射線対策効果の、無作為化、盲検、極めて重要なフェーズ有効性試験の結果を記載する。このフェーズ2試験は、アニマル・ルールに基づく認可に向けて、rHuIL-12を前進させる。

【0182】

方法

動物

アカゲザル (*Macaca mulatta*) は、Yongfu County Xingui Wild Animals Raising Ltd.、Chinaから入手した。サル（治療の開始時に、3～5歳齢、3.0～5.7kg）を、別々に飼育し、照射前5週間以上順化させた。Harlan Teklad Certified Hi-Fiber Primate Diet #7195C (Harlan Laboratories, Indianapolis, Indiana) を1日2回与えた。

【0183】

無作為化および盲検

主試験において、雄および雌の動物（各45匹；投与群当たり、性別当たり、9匹）を無作為化し、体重によって層別化して、以下の用量のrHuIL-12：ビヒクル；50ng/kg、100ng/kg、250ng/kg、または500ng/kgを、SC注射により投与した（群1～5）。試験チームリーダーおよび照射に関与する者以外の病理学者および研究スタッフには、知らされていない。12日目の骨髄の評価は、rHuIL-12の同じ用量について無作為化されている、別々の動物を使用して、盲検法によって、実施した（群当たり、性別当たり、2匹）。

【0184】

全身照射

700cGyの線量 (Theratron 1000 Co60 source [Best Theratronics; Ottawa, Ontario, Canada] の60cGy/分) は、CiToxLAB North Americaから入手可能な、稼働履歴データに基づいた。TBIを、先に記載したように、垂直位の動物に施した。均質な線量分布とするため、第1の半線量を体軸方向に施し、第2の半線量を前後方向に施した。各動物の前および後ろに配置してある、ナノドットチップ (Landauer, Inc., Glenwood, Illinois, USA) を使用して、線量測定値が、処方された線量の10%以内に入っていることの確認を行った。

【0185】

rHuIL-12投与

医薬品グレードのrHuIL-12またはビヒクルを、TBIに引き続き、およそ24～25時間後に、SC注射によって、肩甲骨の間に投与した。各投与サンプル中の試験品目の濃度は、Quantikine（登録商標）Human IL-12 ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) を使用して、intertek Pharmaceutical Services (San Diego, CA) によって検証された。

【0186】

アセスメント

臨床徴候を1日2回記録した。食欲（食物摂取に基づく）および身体活動の低下を毎日記録し、以下のようにスコア化した：1＝わずか；2＝中程度；および3＝重度。詳細な身体検査を、rHuIL-12投与前およびその後週2回実施した。体温（耳）を照射の前、ならびに3～10日、12日、14日、16日、18日、30日、45日、および60日目、あるいは、臨床的に正当化される場合に、測った。末梢血球数測定用の血液採取（0.5mL）を、照射の前、ならびに5日、10日、12日、14日、16日、18日、30日、45日、および60日目に実施した。発熱性好中球減少症（直腸体温 $\geq 104^{\circ}\text{F}$ / 40.0°C と共に、好中球絶対数 $< 0.05 \times 10^9/\text{L}$ ）の場合と剖検の際、血

液培養のために血液を採取した。

【0187】

終末手順

以下の基準のいずれかが観察された場合、60日目の前に動物を安楽死させた：呼吸困難；3日間の完全な食欲不振；3日間で初期体重の $>20\%$ 減少；活動レベルの重度の低下（全観察期間の間横たわるまたは触れても無反応）；推定血液量の $>20\%$ の急激な喪失；全身性の発作活動；異常な生命徴候に付随する、異常外観（姿勢、粗い被毛、低頭位、目および鼻の周りの滲出物、青白さ、しわの寄った腹部および臨床外観）：低体温を伴う重度の脱水症状（直腸温度が $<34.6^{\circ}\text{C}$ まで低下、および重度に低下した活動レベル）または高体温（温度 $>40.1^{\circ}\text{C}$ および重度に低下した活動レベル）。安楽死の決定は、動物群の評価について知らされていない、技術者および獣医のチームによってなされた。生存する動物は、TBIに引き続く、60日目に安楽死させた。

10

【0188】

剖検は、外側の肉眼検査、詳細な解剖、臓器重量および肉眼所見の評価、ならびに病理組織学のための組織の採取を含んでいる。出血の存在を、主な臓器に関して以下のようにスコア化した：0 = ない；1 = 最少；2 = わずか；3 = 中程度；4 = 明らか；5 = 重度。組織学的検査のため、組織をパラフィンに包埋し、切片化し、ヘマトキシリンおよびエオシン・フロキシシン（H & E）によって染色した。

【0189】

微生物学的分析を、脳、心臓、腎臓、肝臓、両肺、および脾臓で実施した。細菌増殖を各臓器についてスコア化した（0～4）。各動物について、全スコアを合計した；平均スコアは、各治療群について算出されたスコアであった。

20

【0190】

骨髄病理組織学

骨髄評価群の動物は、TBI後12日目に安楽死させた。1匹の動物は、11日目に予定外の安楽死術を受けた；全ての動物を、分析に含めた。各動物について、2つのH & E切片を、Olympus BX41複式顕微鏡上で詳細に観察した。各大腿骨切片をその全体中に包含している、およそ 40° 視野の画像を、 $10\times$ の倍率でInfinity Analyze software v5.0で得た。各切片における各視野内の、骨髄再生島の数、視覚的定量化によって決定した。骨髄再生の延べ面積は、ImageJソフトウェア、バージョン1.46を使用して決定した。動物当たり2つの切片からの、再生島の平均数および再生の平均面積を、統計分析に使用した。各大腿骨切片内の、巨核球の数は、視覚的に決定した。

30

【0191】

統計分析

全ての統計比較は、性別の依存性について、ならびに、全試験集団について、実施した。生存機能は、1日ごとに適用される、カプラン・マイヤー法を使用して見積もった。対照群は、マンテルログ・ランク検定を使用して、他の治療群のそれぞれと比較された。GLP分析は、CitoxLABで実施された。

【0192】

重症好中球減少症（好中球数 $<0.05\times 10^9/\text{L}$ として定義される）、重症血小板減少症（血小板数 $<10\times 10^9/\text{L}$ として定義される）、および血液培養陽性の発生率について、群間の比較を、フィッシャーの正確確率検定を使用して実施した。総合比較が有意（ $P\leq 0.05$ ）である場合、対照群と各投与群との間のペアワイズ比較をフィッシャーの正確確率検定を使用して行った。

40

【0193】

骨髄再生データ（再生島の数および面積）の群平均は、統計ソフトウェアプログラムPrismバージョン6（GraphPad、San Diego、CA）を使用して、片側t検定によって比較した。 $p<0.05$ である差は、有意であると考えた。

【0194】

50

結果 生存

生存データを図1に示す。投与した放射線量は、この実験の条件下で（抗生物質、輸液、または輸血なし）、およそLD_{90/60}（未治療群において、2/18匹生存）に相当した。59匹中、58匹の死亡は9日目と24日目との間に起こり、アカゲザルにおいて先に観察されたHSARSによる死亡率および死亡時期と一致しており、そして、1匹の死亡は33日目に起きた。最も高い死亡割合は、11日目と21日目との間に起こり、14日目が、対照群およびrHuIL-12治療群両方の死亡のピーク日（peak day）であった。死亡頻度は、雄と雌で同等であった。全ての死亡を、原因にかかわらず、有効性の統計分析に含めた。各rHuIL-12治療群は、ビヒクルよりも生存において統計的に有意な増加を示した（ログ・ランク検定 $p < 0.05$ ）。ビヒクル群においては、18匹中2匹が生存したが（11%、両方とも雄）、rHuIL-12治療群2～5では、それぞれ33%（雄3匹および雌3匹）、39%（雄4匹および雌3匹）、39%（雄4匹および雌3匹）、ならびに50%（雄5匹および雌4匹）が生存した。rHuIL-12治療群間のペアワイズ比較では、有意な差は示されなかった。

10

【0195】

60日目より前の予定外の死亡の可能な原因は、主に感染であった。また、出血の巨視的および微視的証拠は、様々な臓器で観察された。

【0196】

血液学

血小板の平均容量、血小板、好中球、リンパ球、および網状赤血球の血球数を、それぞれ、図2A～Eに示す。血液学的測定は、基底レベルに相当する、放射線照射前の時点、ならびに、その後、HSARSモデルにおいて見られる、重症血球減少症の期間に相当する、照射後5、10、12、14、16、および18日の時点で行い、そして、生存する動物においては、基底レベルへの回復を評価するため、30、45、および60日目にも行った。

20

【0197】

血小板

血小板最下点（nadir）は、投与群に依存して、12日目または14日目に生じた。明白な血小板減少症（ $< 50 \times 10^9 / L$ ）は、10～15日間隔で現れた。対照群の最下点平均は、 10.1×10^9 個の血小板/Lであり、rHuIL-12治療群2～5においては、それぞれ、12.1、15.5、12.7、および18.6 $\times 10^9$ 個の血小板/Lである、各治療群の最下点平均よりも低かった。全ての群の生存動物においては、30日目の完全な回復ともなう、最初の回復が、18日目までに、観察された。10日目と18日目との間の重症血小板減少症（血小板 $< 10 \times 10^9 / L$ ）を有する血液試料の割合は、対照群では33%、そして、rHuIL-12治療群2～5では、それぞれ34%、20%、22%、および12%であった。対照とのペアワイズ比較は、500 ng/kg群に関して有意であった（フィッシャーの正確確率検定 $p = 0.0073$ ）。平均血小板容量は、14日目と18日目との間で増加しており、回復する骨髓からの若い血小板の放出に相当する。平均ピーク値は、rHuIL-12治療群2～5での、それぞれ9.21、9.13、9.56、および9.17 fLと比較して、対照群では、8.64 fLであった。

30

40

【0198】

好中球

好中球最下点は、投与群に依存して、10日目と14日目との間に生じた。重症好中球減少症（ $< 50 \times 10^6 / L$ ）は、対照群では100%の動物で生じ、そして、rHuIL-12治療群2～5では、それぞれ、88.9%、77.8%、83.3%、および72.2%の動物で生じた。対照群の最下点平均は、 $26 \times 10^6 / L$ であり、50、100、250、および500 ng/kgの用量でrHuIL-12により治療した群においては、それぞれ、34、54、39、および78 $\times 10^6 / L$ である、各治療群の最下点

50

平均よりも低かった。好中球の回復は、18日目までに、開始され、そして、30日目までに完了した。10日目～18日目に重症好中球減少症を提示する血液試料の割合は、50、100、250、および500 ng/kgの用量における、それぞれ、46%、35%、46%、および31%と比較して、対照群では、67%であった ($p = 0.0196$ 、0.0005、0.0278、および<0.0001、フィッシャーの正確確率検定)。

【0199】

リンパ球

リンパ球最下点は、投与群に依存して、10日目と16日目との間に生じた。全ての群は、放射線照射前のレベルの7～10%まで減少する重症リンパ球減少症を示した。対照群における、リンパ球の最下点平均は、 $0.143 \times 10^9/L$ であり、各治療群の最下点平均よりも低かった(50、100、250、および500 ng/kgの用量において、それぞれ 0.163 、 0.213 、 0.220 、 $0.239 \times 10^9/L$)。18日目に、全ての群において、最下点からの最初の回復が観察された。30日目までは、群平均レベルは、放射線照射前のレベルの30%～ほぼ60%の範囲であったが、45および60日目には、リンパ球数は正常な範囲であるが、依然として、ベースラインレベルよりもわずかに低かった。雄と雌を合わせると、統計的な有意さには達しなかったが、対照と rHuIL-12 で治療した動物との間のリンパ球最下点の差は、50、250、および500 ng/kg 用量レベルで治療した雌においては、統計的に有意であった (Sidak 調製 t 検定、それぞれ、 $p = 0.0443$ 、 0.0103 、および 0.0211)。

【0200】

赤血球および網状赤血球

赤血球最下点は、全ての群において18日目に生じ、ベースラインから37%の減少を示した。赤血球最下点は、全ての群で類似していた(データは示さない)。網状赤血球最下点は、対照群では、 $7.1 \times 10^9/L$ であり、50、100、250、および500 ng/kg の rHuIL-12 群では、それぞれ、 $8.7 \times 10^9/L$ 、 $12.1 \times 10^9/L$ 、 $9.1 \times 10^9/L$ 、および $9.8 \times 10^9/L$ であり、赤血球生成に対する、rHuIL-12 の刺激効果を示唆している。しかし、その差違は、統計的な有意さには達していなかった。

【0201】

発熱性好中球減少症

合計15匹(雄8匹;雌7匹)が、発熱性好中球減少症を有すると報告され、そして、ほとんど(10/15)は、rHuIL-12 の2つの最高用量レベルで治療されていた。15匹のうち10匹が、陽性血液培養を有しており、そして、最も一般的な細菌は大腸菌 (*Escherichia coli*) および黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) であった。発熱性好中球減少症の期間は、全ての動物において、1日間であり、そして、12匹では、同じまたは次の日に死亡した。15匹のうち3匹は、60日目まで生存した(1匹は、250 ng/kg 群、2匹は500 ng/kg 群)。特に、3匹の生存する動物のうち、2匹は陰性血液培養を有した。

【0202】

骨髄

TBIに関連した、骨髄低細胞性が、30日より前に死亡した全ての動物で観察された。これらの動物由来の骨髄塗抹標本は、全ての治療群において、類似の骨髄抑制効果を示した。上腕骨骨髄における明らかな造血低細胞性の痕跡を有していたが、他の骨髄部位では、正常である、1匹の動物(500 ng/kg 群)を除き、生存した動物においては、低細胞性は、全てにおいて、60日目までに完全に回復した。

【0203】

随伴試験においては、動物の別々のコホート(群当たり、性別当たり、2匹)を、生存試験と同様の放射線レベルに曝露し、同じ用量レベルの rHuIL-12 で治療した。全ての動物を、血球数の最下点のタイミングに基づき、最大の骨髄抑制が推定される日を代表している、12日目に屠殺した。骨髄の組織学的分析は、再生の空洞を伴っている、重

症低細胞性を示した（図3A）。各動物における、再生島の数、再生島の延べ面積、ならびに巨核球の数の定量を、盲検分析で実施した。再生島の数および面積の両方とも、対照と比較して、rHuIL-12治療群で高く、全ての治療群が、増加した値は、類似の範囲を示した（図3B～C）。両パラメーターに関して、差違は、500ng/kg群、ならびに、プールした比較（全ての治療群対対照群）において、統計的な有意さに達した（再生の島の数および面積に関して、それぞれ、 $p=0.0272$ および $p=0.0311$ ）。重要なことに、巨核球数は、対照に対して、全てのrHuIL-12治療群において高いが、その差違は、統計的に有意ではなかった（図3D）。

【0204】

微生物学および病理学

10

感染

rHuIL-12治療群2～5における、それぞれ、65%、65%、47%、および44%と比較して、対照群では、血液培養陽性は86%であった。該差違は、2つの最高用量については、統計的に有意であった（各群について、 $p=0.0072$ ）。感染の有病率の低下が、グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌の両方において、見られた。心臓、腎臓、肝臓、両肺、脳および脾臓の細菌学分析を、全ての動物の剖検において実施した。対照と比較して、rHuIL-12治療動物において、平均細菌増殖スコアの減少が見られた（表1）。

【0205】

大腸菌および黄色ブドウ球菌が、臓器および血液培養からの、最も頻度の高い培養菌であった。予定外に安楽死させた16匹の対照動物のうち、12匹（75%）は、rHuIL-12治療群2～5における、それぞれ、66.7%、63.6%、72.7%、および55.6%と比較して、臓器培養において、大腸菌について、陽性であった。予定外に安楽死させた16匹の対照動物のうち、10匹（62.5%）は、rHuIL-12治療群2～5における、それぞれ、50.0%、54.5%、54.5%、および44.4%と比較して、臓器培養において、黄色ブドウ球菌について、陽性であった。

20

【0206】

出血

全ての臓器における、群全体の平均出血スコア、ならびに、胃腸系における、別々のスコアを表1に示す。平均スコアは、全てのrHuIL-12治療群よりも、対照群が高いが、その差違は、統計的有意性には達しておらず、臓器毎、ならびに、動物毎の相当の変動性に起因しているようである。特に、少なくとも1つの臓器において、 ≥ 4 の出血スコアを有する動物の割合は、rHuIL-12で治療した群よりも対照群が高く、そして、脳出血は、対照群の動物（2匹の動物）のみで見出された。

30

【0207】

考察

この試験で使用したアカゲザルモデルにおける、TBIの血液学的効果、および、その結果生じる、感染および出血の発生は、ヒトに関して報告されたもの⁹、¹⁰と類似しているため、該試験で使用したアカゲザルモデルは、ヒトHSARSの確立されたモデルである。この無作為化、盲検、プラセボ対照試験からのデータは、HSARSの該アカゲザルモデルにおける、致死的なTBI（700cGy；LD_{90/60}）に引き続く、生存に対する、10倍の用量範囲にわたる、単回のrHuIL-12の皮下注射の陽性且つ有意な効果を実証している。特に、この効果は、支持療法を使用することなく、達成されている。これらの結果は、NHPにおける本発明者らの概念実証試験において見出された、生存に対するrHuIL-12の有益な効果⁸と一致した。

40

【0208】

今回の試験では、通常、TBIから生じる臨床徴候（嘔吐、下痢、および体重）は、全ての治療群の間で、および性別間で類似していた（補足を参照）。血球数最下点、ならびに、感染、出血および死亡の最も高い割合の期間に生じる、活動および食欲の低下は、対照群で最も高く、そして、rHuIL-12で治療した群では、より低かった。

50

【0209】

放射線誘導骨髄抑制は、rHuIL-12によって軽減された：rHuIL-12で治療された動物群は、リンパ球、好中球、血小板、および網状赤血球に関する、弱まった最下点、ならびに、重症好中球減少症および重症血小板減少症の発生における、統計的に有意な低減を示した。平均血小板容量もまた、対照に対して、rHuIL-12で治療した動物において増加し、新しく形成された血小板の骨髄からの放出を示している。随伴試験における、骨髄再生ポケットの定量分析は、rHuIL-12のみが、骨髄の再生および主な血液細胞成分の回復を可能にする、造血に対する刺激効果を有するという結論を支持している。特に、巨核球数も、対照に対して、rHuIL-12治療群では高かった。この試験に示されるように、rHuIL-12によるin vivoでの複数の造血系統の刺激は、IL-12がin vitroで造血幹細胞および前駆細胞の増殖を刺激するという先の報告（4～6）、および担腫瘍マウスにおける本発明者らの先の試験¹¹と一致している。

10

【0210】

重症好中球減少症の低減と一致して、感染に関する血液培養陽性の発生率は、対照群の86%から、250または500ng/kgの用量でrHuIL-12を投与された群では、それぞれ、47%および44%へと著しく減少している。これらのデータは、TBIの24時間後に投与されたHuIL-12が、抗生物質がない場合、広範な細菌の感染性を低減したことを実証している。

【0211】

重症好中球減少症の低減、ならびに感染症および敗血症の減少の本発明者らの知見を支持して、IL-12は、おそらくは感染の発生率の低減に寄与する、自然および獲得免疫に対する複数の刺激効果を有することが知られている。照射に引き続く初期の段階では、Th1機能は、抗原提示細胞からの内在性IL-12の分泌抑制によって低下する¹²、¹³。照射後に投与されたIL-12は、生存するNK細胞、マクロファージ、および樹状細胞の増殖ならびに活性化を促進する¹⁴、¹⁵。NK、マクロファージ、および樹状細胞間の3方向のクロストークは、それらの成熟をさらに促進し、TBIに引き続く、Th1機能の回復および初期免疫能の確立をもたらす。さらに、病原体活性化樹状細胞からの内在性IL-12の継続的な産生は、ポジティブ・フィードバック・ループとして機能し、そして、外因性IL-12への初期応答の維持に重要な役割を果たす¹⁷。総合すると、これらのIL-12が引き起こす、免疫媒介効果は、この試験において観察されたポジティブな生存利益に対して、主に関与することができ、それらは、恐らくは、IL-12の抗感染性に由来している。

20

30

【0212】

重症血小板減少症の低減と一致して、この試験におけるrHuIL-12治療は、予定期間前に死亡した、または安楽死させた動物の出血の低い重症度と関連していた。重症血小板減少症および出血の低減の本発明者らの知見を支持して、本発明者らは、近年、骨髄における、IL-12シグナル伝達に最も特異的な、IL-12受容体のβ2サブユニット（IL-12Rβ2）の発現が、造血幹細胞、巨核球、および骨芽細胞上で見出されたことを報告した。これらの重要な骨髄細胞上のIL-12Rβ2受容体の存在は、その受容体を介して、rHuIL-12が、放射線曝露に引き続く、生存する幹細胞および巨核球の増殖および分化を促進し、血小板再生を増強し、重症血小板減少症を低減し得ることを示唆している。現状、がん患者において骨髄抑制療法後に血小板回復を促進することができる、入手可能な薬剤がないため、rHuIL-12の血小板再生を促進する能力は、HSARS軽減以外の適応において、臨床的に重要であることができる。

40

【0213】

白血球増殖因子は、放射線照射の犠牲者における使用が推奨されるが、この適応について、FDAによって認可はされていない。強力な、トリガーベースの医療管理（抗生物質、静脈内輸血、静脈内液置換）と組み合わせて、rHuG-CSF-対対照NHPにおける生存の改善を実証する公開された研究が1つだけある⁹。本発明者らは、近年、支持療

50

法がなされていない、NH Pモデルにおいて、r H u I L - 1 2 またはビヒクルの単回注射と、r H u G - C S F の 1 8 回の注射と比較する、無作為化盲検試験を完了した。予備解析は、ビヒクルおよび対 G - C S F 治療群と比較して、r H u I L - 1 2 治療群における、優れた生存を確認しているが、G - C S F は、ビヒクルと比較して、生存を増加しなかった（投稿準備中）。動物有効性試験と並行して、r H u I L - 1 2 の安全性および耐容性を、アニマル・ルールにより、通常の健常な患者において、決定した。ファーストインーヒューマン（F I H）試験を実施して、用量の段階的増大（2 ～ 2 0 μ g の範囲の用量で）を介して、r H u I L - 1 2 の安全で良好な耐容性の用量を決定し、1 2 μ g の F I H 試験からの最も安全で良好な耐容性の用量において、フェーズ 1 b 拡大試験を続けた（Gokhaleら、準備中）。7 0 k g の成人に対する 1 2 μ g 単位のヒト用量は、体重ベースの変換を使用して、1 7 1 n g / k g のアカゲザル用量へと変換でき、そして、この用量は、本発明者らのアカゲザル試験において決定された有効な用量範囲内である。

10

【 0 2 1 4 】

要約すると、この無作為化、プラセボ対照、盲検試験は、支持抗生物質、体液または血液製品を用いることなく、放射線曝露の 2 4 時間後に、単回、低用量で投与された場合、r H u I L - 1 2 は、生存を増加し、造血系を再生するため、理想的な最先端の放射線緩和剤となることを実証している。動物モデルからヒトへの有効で安全な用量の置き換えは、アニマル・ルールに基づく、任意の薬物開発プログラムのための重要な挑戦である。したがって、NH Pモデルにおいて、生存の統計学的に有意な増加が、r H u I L - 1 2 の 1 0 倍の有効な用量範囲にわたって、達成できるという、本発明者らの知見は、最適なヒト用量選択に、明解な利点を提供する。

20

【 0 2 1 5 】

表

【 0 2 1 6 】

【表 2】

表 1. 動物当たりの肉眼による臓器出血スコアおよび臓器感染スコア（平均±S E M）

用量 (ng/kg)	全出血スコア ^a	胃腸管出血スコア ^b	全感染スコア ^c
0	8.4 ± 1.6	5.6 ± 1.1.4	12.8 ± 2.2
50	5.1 ± 0.63	3.2 ± 0.75	12.3 ± 3.4
100	6.6 ± 0.73	4.5 ± 0.90	10.6 ± 3.7
250	5.0 ± 1.0	3.1 ± 0.78	8.8 ± 3.1
500	5.8 ± 1.1	3.7 ± 0.70	8.2 ± 3.3

^a 以下の組織を、この表に提示された平均出血スコアの計算に含めた：胃、回腸、空腸、十二指腸、大腸、盲腸、直腸、心臓、脳、腎臓、肝臓、肺、膀胱）。出血スコアは以下のように定義した：0 = 出血の不在；1 = 最小限の出血；2 = わずかな出血；3 = 中程度の出血；4 = 明らかな出血；および 5 = 重度の出血。各動物において、全ての臓器のスコアを合計し、次いで各治療群の平均スコアを計算した。

^b 以下の組織を、胃腸管出血スコアの計算に含めた：胃、回腸、空腸、十二指腸、大腸、盲腸。

^c 感染スコアの決定のため、脳、心臓、腎臓、肝臓、両肺、および脾臓を含む臓器試料を剖検で採取し、培養した（死亡した動物は分析から除外した）。各臓器について、細菌増殖をスコア化した（0～4）。各動物において、全ての臓器のスコアを合計し、次いで各治療群の平均スコアを計算した。

【0 2 1 7】

例 1 2：

マウスにおける致死的主照射後の造血回復のための、組換えインターロイキン-12 対骨髄移植、ならびに潜在的な細胞性標的の評価 30

特徴がはっきりしている免疫調節効果に加えて、インターロイキン-12（IL-12）は、照射によって損傷した骨髄において、造血回復に役割を果たす。本発明者らは、支持療法を用いることなく、組換えマウス IL-12（rMuIL-12）が、単独で、致死的主照射マウスの生存を増加させたことを、以前に報告した。本明細書において、本発明者らは、致死的主照射に曝露されたマウスの救出のための、骨髄移植（BMT）に対する、rMuIL-12 の 2 つの投与スケジュールを比較した。群当たり 10 匹が、以下の 1 つを投与された：ビヒクル；全身照射（TBI）の 24 時間前における、10 ng の rMuIL-12 の投与；TBI の 24 時間前および 3 日後における、10 ng の rMuIL-12 の投与；あるいは、TBI の 2 時間後における、ドナー骨髄（ 1.1×10^6 細胞）の注入。結果は、rMuIL-12 で治療した動物における生存率は、BMT に匹敵することを示した。さらに、両治療における、好中球、赤血球、および血小板の造血回復も、また同等であった。マウスの *in vivo* 実験において、ビヒクルに対して、rMuIL-12 は、骨髄由来の系統陰性（Lin⁻）細胞、造血幹／前駆細胞からなる細胞のサブセット上の IL-12 受容体 $\beta 2$ サブユニット（IL-12 $\beta 2$ ）の発現を増加させた。本発明者らは、ヒト造血幹／前駆細胞（HSC）のサブセット上の IL-12 R $\beta 2$ の発現をさらに調査した。ヒト骨髄由来の CD34⁺HSC は、IL-12 R $\beta 2$ を発現し、そして、IL-12 R $\beta 2$ は、ヒト HSC の他のマーカーと共発現していた。これらの知見は、造血回復における、IL-12 の機能が、骨髄中の IL-12 R $\beta 2$ 発現幹細胞との相互作用により、駆動されることを示唆している。これらのデータは、様々な臨床現 40 50

場における、骨髄除去に引き続く、造血回復を増強するためのアジュバント、組換えヒト I L-12 の研究を動機づける。

【0218】

放射線誘導性造血症候群の緩和のための理想的な薬物は、放射線曝露の犠牲者の間における、HSC 移植の効果（複数の骨髄細胞系統の増殖の促進、疾病率の減少、および生存率の改善）を模倣して、そして、健常な患者に投与した場合、安全であり、全ての犠牲者に単一の用量レベルで投与することができる。本発明者らは、候補として、炎症誘発性サイトカインであるインターロイキン12（I L-12）を以前に提案した[1]。免疫におけるそのよく確立された役割[2]に加え、I L-12は、損傷した骨髄において、造血能力の保存にも基本的な役割を果たすようである。初期の *in vitro* 研究は、I L-12がコロニー刺激因子（CSF）[3]またはI L-3のいずれか、および造血幹細胞因子（SF；幹細胞因子[SCF]とも呼ぶ）[4、5、6]と共に、ミエロイド幹細胞および前駆細胞[6]、 $L i n^{-}/S c a-1^{+}$ 細胞[3]、リンパ球造血系の前駆細胞[5]、または混合、エリスロイド、ならびにミエロイドコロニー[4]の増殖を誘導できることを実証した。Netaら[7]による *in vivo* での研究は、I L-12のみ（ $1 \mu g$ /マウス）が、マウスの骨髄を致死的な照射の効果から保護したが、しかし、胃腸系の放射線感受性を増加したことを実証した。続いて、Chenら[8]は、 $100 ng$ /マウスのI L-12用量が、胃腸系の放射線感受性を増加することなく、致死的な照射からの骨髄の保護に有効であったことを報告した。本発明者らは、近年、プラセボに対して、致死敵な照射の24時間後にマウスに投与した $10 \sim 40 ng$ の用量の組換えマウスI L-12（rMu I L-12）が、骨髄細胞におけるI L-12受容体 $\beta 2$ サブユニットの発現の誘導によって示されるように、生存を増加し、造血を促進したことを報告した[1]。さらに、致死的なTBIに曝露した非ヒト霊長類において、組換えヒトI L-12（rHu I L-12）による治療は、プラセボ治療動物と比較すると、生存の有意な増加をもたらし、そして、リンパ球および血小板に関して最下点を減弱させた[1]。

【0219】

今回の試験では、本発明者らは、致死的な照射マウスにおいて、造血回復および生存促進の誘導における、rMu I L-12の能力を、従来のBMTのものと比較した。さらに、I L-12の潜在的な細胞標的をさらにはっきりさせるために、本発明者らは、ヒト骨髄由来FISCにおけるI L-12受容体の $\beta 2$ サブユニット（I L-12R $\beta 2$ ）の発現を評価した。

【0220】

材料および方法

組換えI L-12

rMu I L-12は、Pepr o t e c h（カタログ番号210-12；Rocky Hill、NJ、USA）またはSBH Sciences（LS#45[Q4]；Natick、MA、USA）から入手した。各動物実験において報告されている用量は、ELISA（mouse I L-12（p70）ELISA MAX（商標）Deluxe kit（Biolegend；San Diego、CA））によって決定された用量である。

【0221】

in vivo 動物試験

C57BL/6マウスは、ジャクソン研究所（Sacramento、CA）またはハーラン研究所（Indianapolis、IN）から入手した。試験の開始時に、マウスは、8～10週齢、体重およそ20gであり、疾患の徴候はなかった。全ての手順は、（実験動物ケア評価認証協会およびアメリカ実験動物ケア学会によって認証されている）BALB'S（Northridge CA）研究所動物実験委員会によって審査および承認され、そして、国立衛生研究所の指針に従っている。

【0222】

致死的な照射に曝露されたマウスの生存に対する、rMu I L-12およびBMTの効

果の比較

生存に対する、rMuIL-12およびBMTの効果を、致死的なTBIに曝露した40匹の雌のマウスにおいて、比較した。それぞれ10匹のマウスを、以下の静脈内治療の1つに割り当てた：TBIの24時間前にビヒクル（リン酸緩衝液[PBS]；100μl）を投与した；TBIの24時間前に10ngのrMuIL-12を投与した（以降、単回投与rMuIL-12と呼ぶ）；TBIの24時間前および3日後に10ngのrMuIL-12を投与した（以降、反復投与rMuIL-12と呼ぶ）；またはTBIの2時間後に投与したドナー骨髄（ 1.1×10^6 細胞）。移植のためのドナー骨髄細胞は、大腿骨および脛骨を、25ゲージ 5/8インチ針を使用して、PBSでフラッシングすることにより、正常な雌のC57BL/6マウスから単離した。細胞を、40μmのセルストレーナーを通して、濾過し、10%ウシ胎仔血清を含有するRPMI培地で洗浄し、液体窒素中で凍結保存した。0日目、マウスを、Gammacell（登録商標）40（137Cs）（Theratronics、Ontario、Canada）を使用して、8.2Gy（LD₉₀を目標とした[1]）の線量でTBIに曝露した。放射線量分布のため、「パイ・ボックス」を使用して、マウスを照射装置の中心に置いた。TBI後、マウスは滅菌食および酸性化した水を自由に取れるようにし、35日目まで生存をモニターした。血液を、各群の5匹から、21日目、28日目、および35日目に採取した。血球数をHemavet（登録商標）850（Drew Scientific Inc.；Waterbury、CT）によって決定した。

【0223】

健常な雌のC57BL/6マウスにおける、Lin⁺細胞上のIL-12Rβ2受容体ベータ2サブユニット（IL-12Rβ2）発現に対する、rMuIL-12のin vivoでの効果のフローサイトメトリー分析

マウス（治療群当たり6匹）は、尾静脈注射により、rMuIL-12（10ng）またはビヒクル（PBS）を投与された。骨髄を、rMuIL-12治療の21時間後に回収した。大腿骨および脛骨からフラッシュした骨髄を、MACS緩衝液（Miltenyi Biotec；Auburn、CA）で希釈し、70μmのセルストレーナー（VWR；San Francisco、CA）に通して、濾過した。細胞を洗浄し、以下のマウス系統マーカー（Lin⁺）：CD3e、CD4、CD5、CD8b、CD8a、B220、CD11b、Gr1およびTer（80）（Miltenyi Biotec；Auburn、CA）に対するビオチンコンジュゲート・モノクローナル抗体とインキュベートした。細胞を、抗ビオチン標識磁気ビーズとインキュベートし、QuadromACS分離機（Miltenyi Biotec；Auburn、CA）の磁場中に置いたMACSカラムに通した。未標識のLin⁺細胞を、流出物として回収し、そして、抗マウスIL-12Rβ2抗体（HAM10B9、BD Biosciences；San Jose、CA）と、室温で30分間インキュベートした。細胞を、未染色およびアイソタイプ対照と共にMoFlowセルサイトメーター（Beckman Coulter；Indianapolis、IN）で分析した。実験は、rMuIL-12の25時間後に回収した骨髄で反復し、そして、先に述べたように、IL-12Rβ2の発現について、Lin⁺細胞を分析した。

【0224】

ヒト骨髄CD34⁺細胞におけるIL-12Rβ2の免疫細胞化学検出

ヒト骨髄由来CD34⁺細胞は、All Cell（Emeryville、CA）から購入した。細胞を5μg/mLフィブロネクチン・スライド上に播種し、そして、冷メタノール中、20℃で10分間固定した。固定した細胞を0.3% H₂O₂で30分間処理して、内在性ペルオキシダーゼ染色を排除し、次いで、Background Sniper（Biocare Medical；Concord、CA）で20分処理して、非特異的な染色を排除した。処理した細胞を、ヒトIL-12Rβ2に対するウサギポリクローナル抗体（Sigma；St Louis、MO）で標識後、引き続き、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（ImmPRESS試薬；Vector Laborator

ies; Burlingame, CA) とカップリングした抗ウサギ IgG とインキュベーションした。スライドを ImmPACT AEC ペルオキシダーゼ基質 (Vector Laboratories; Burlingame, CA) と 30 分間インキュベートし、CAT ヘマトキシリン (Biocare Medical, LLC; Concord, CA) で対比染色した。陰性対照は、一次抗体を用いることなく、ホースラディッシュ ペルオキシダーゼ とカップリングした抗ウサギ IgG で標識した細胞を含んでいた。画像を、Olympus BX41 複式顕微鏡 (Olympus, America, Inc; Center Valley, CA) および Infinity Analyze Software v5.0 を使用して得た。分析は 3 匹の個々のドナー由来の CD34⁺ 細胞で 3 回実施した。

10

【0225】

ヒト骨髄由来幹／前駆細胞上の IL-12R β 2 の発現のフローサイトメトリー分析

ヒト骨髄由来 CD34⁺ 細胞は上記のように購入した。CD34⁺ 細胞を洗浄し、室温で 30 分間、生存マーカーである LIVE/DEAD Fixable dead cell stain (Invitrogen; Grand Island, NY) とインキュベートした。細胞を洗浄し、以下の各造血幹細胞マーカーに対する抗体とインキュベートした：フルオレセインイソチオシアネート (FITC) - コンジュゲート cKit / CD117 (クローン番号 YB5.B8; BD Bioscience; San Jose, CA)、フィコエリスリン (PE) - コンジュゲート CD133 (クローン番号 293C3; BD Biosciences)、PE-Flt-3 / CD135 (クローン番号 4G8; BD Biosciences)、PE-Slam / CD150 (クローン番号 A12; BD Biosciences)、PE-Vegfr2 / KDR (クローン番号 89106; R&D systems; Minneapolis, MN)、PE-CD31 / CD318 (クローン番号 309121; R&D systems)、FITC-CD34 (クローン番号 AC136; Miltenyi Biotec; Auburn, CA)。上に列挙した各抗体のアイソタイプ対照対照を並行して分析して、バックグラウンド蛍光を決定した。細胞を洗浄および固定し、そして、BD Cytomix / Cytoperm fixation / permeabilization kit (BD Biosciences; San Jose, CA) を使用して透過処理を施した。細胞内の IL-12R β 2 は、ヒト IL-12R β 2 (クローン番号 305719; R&D systems; Minneapolis, MN) に対するアロフィコシアニンコンジュゲート (APC) 抗体を使用して決定した。IL-12R β 2 抗体のアイソタイプ対照対照を並行して分析した。細胞を、University of Southern California Health Science Campus の Broad CIRM Center にある、3 つの高出力固体レーザー (488 nm、635 nm、および UV 付近の波長) を装備する、Special Order Research Product (SORP) BD (商標) LSRII デジタルフローサイトメーター (BD Bioscience; San Jose, CA; ライセンス番号 H47300022) を使用して分析した。このサイトメーターは、最大 10 個の蛍光パラメーターによるデータの獲得用に特化されている。データを、FlowJo バージョン 9.5.2 (Tree Star, Ashland, USA) を使用して分析した。ゲーティング手順は以下の通りであった：CD34 細胞を選択するための前方対側方散乱のプロット、死細胞除外のための側方散乱対生／死細胞染色、対を除外するための高さ対面積散乱 (データは示さない)、および IL-12R β 2 対幹細胞マーカー。各象限分画用ゲートを、アイソタイプ対照抗体対照に基づいて設定した。分析は 3 個体のドナー由来の CD34⁺ 細胞で 3 回行った。

20

30

40

【0226】

統計分析

全ての治療群の生存曲線を、コックス・マンテル検定を使用して統計的に比較した。全ての群の血液細胞回復をスチューデント T 検定で分析した。適用可能な場合、標準偏差と

50

ともに平均を報告した。

【0227】

結果

rMuIL-12は、致死的な照射に曝露された健常なマウスにおいて、BMTと同程度に、効果的に、生存ならびに血液細胞回復を増加させる

ビヒクルと比較して、BMTならびにrMuIL-12の単回または反復投与は、致死的なTBIに曝露されたC57BL/6マウスにおいて、生存を増加する同等の能力を示し(図1)、35日目の全生存(OS)は、ビヒクル群では0%、BMT群では70%、単回投与rMuIL-12群では60%、および反復投与rMuIL-12群では90%であった。rMuIL-12によるOSは、BMTによるOSと同等であった。各rMuIL-12群およびBMT群におけるOSは、コックス・マンテル検定を使用して、ビヒクル群より優位に高かった(各比較について、 $P < 0.005$)。21日目では、BMT群における好中球レベルは、単回投与rMuIL-12よりも有意に高かった($P < 0.05$) (図2A)。反復投与rMuIL-12群における好中球レベルは、BMT群と統計的には、差違はなかった。28日目および35日目においては、全ての治療群における好中球レベルは、統計的に同等であった。BMT群におけるRBCレベルは、21日目の両rMuIL-12群よりも有意に高かった($p < 0.005$) (図2B)。全ての治療群のRBCレベルは、28日目および35日目においては、同等であった。血小板レベルは、21日目においては、単回投与のrMuIL-12($p < 0.005$)およびBMT($p < 0.05$)と比較して、反復投与rMuIL-12群で有意に高かった(図2C)。28日目および35日目においては、全ての治療群の血小板レベルは統計的に同等であった。エラーバーは、平均±SDを表す。総合的に、rMuIL-12による35日目までの好中球、血小板、および赤血球(RBC)の回復は、BMTと同等であった。

【0228】

rMuIL-12によるin vivoでの治療は、骨髓由来系統枯渇(Lin⁻)細胞上でのIL-12受容体、ベータ2サブユニット(IL-12Rベータ2)の発現を増加する

マウス骨髓におけるIL-12Rベータ2の発現を評価するため、本発明者らは、健常な雌のC57BL/6マウスを、尾静脈注射による、単回、静脈内、10ng用量のrMuIL-12($n=6$)またはビヒクル($n=6$)によって治療し、骨髓から単離したLin⁻細胞におけるIL-12Rベータ2の発現を調べた。2つの実験からの結果は、rMuIL-12が、治療の21~25時間後のLin⁻細胞上でのIL-12Rβ2の発現(表1)において、3.5倍~5.4倍の増加を誘導することを示した(平均(±SD)-4.45±1.3)。Lin⁻細胞は、造血幹/前駆細胞からなり、成熟造血細胞および関与する先駆細胞の枯渇した細胞集団を表す。本発明者らのデータは、IL-12がマウス骨髓においてLin⁻細胞上でのIL-12Rベータ2発現を増加することを示す。IL-12の造血回復機能を含むこのデータは、IL-12Rベータ2が、HSC上で発現されることを示す。

【0229】

ヒト骨髓CD34⁺細胞はIL-12Rβ2を発現する

次に、本発明者らは、ヒト骨髓CD34⁺発現HSC上でのIL-12Rベータ2発現を明らかにした。第一に、免疫細胞化学染色を使用して、本発明者らは、市販のヒト骨髓CD34⁺細胞上でのIL-12Rβ2の存在を実証した(図3A)。第二に、本発明者らは、フローサイトメトリーによって、ヒトCD34⁺細胞上でのIL-12Rβ2の発現を定量した。試験した3個体のドナー由来のCD34⁺細胞中、IL-12Rβ2を発現する平均(±SD)割合は89±2であった(図3B)。

【0230】

ヒト骨髓CD34⁺細胞は、IL-12Rβ2および他の公知の造血幹/前駆細胞(USC)マーカーを共発現する

次に、本発明者らは、IL-12Rβ2のHSCマーカー、CD117、CD133、

CD 1 3 5、およびCD 3 1 8との共発現を調べて、CD 3 4⁺細胞上でのIL-1 2 R β 2の発現の本発明者らの観察をさらに裏付けることを考えた。これらのマーカーは、生着能力を有するHSC集団を表すことが示されているため選択した[18、23、24、25、26、27]。IL-1 2 R β 2は、ヒト骨髄CD 3 4⁺細胞上のCD 1 1 7、CD 1 3 3、CD 1 3 5、およびCD 3 1 8と共発現した。IL-1 2 R β 2とCD 1 1 7、CD 1 3 3、CD 1 3 5、およびCD 3 1 8とを共発現するCD 3 4⁺細胞の平均割合は、それぞれ、70±11%、63±7%、57±4%、および61±9%であった(表2および図4A~4D)。特に、CD 1 1 7、CD 1 3 3、CD 1 3 5、およびCD 3 1 8発現CD 3 4⁺細胞の大多数は、IL-1 2 R β 2の発現を示した。これらの結果は、骨髄におけるHSC集団に因る、IL-1 2 媒介性の造血回復における、IL-1 2 R β 2の潜在的な役割を示している。

10

【0231】

考察

今回の試験は、健常な照射マウスにおける、rMuIL-1 2またはBMTを用いた治療によりもたらされる、in vivoでの造血活性および生存の利点を比較した。結果は、ビヒクル対照と比較して、BMT、または、1回もしくは2回のいずれかの10ng用量のrMuIL-1 2で治療した照射マウスが、生存を有意に増加させていることを実証している。3つの有効な治療群の間では、生存曲線は互いに有意な差はなかった。好中球、RBC、および血小板における同等の回復が、35日目までに、3つの有効な治療群全てにおいて観察された。反復投与rMuIL-1 2における血小板レベルは、BMTと比較して、21日目の早い時点では、有意に高く、血小板回復におけるIL-1 2/IL-1 2 Rの役割を裏付けている。これらのデータは、本研究所[1]および他の研究者ら[7、8]の先のデータを確証し、そして、拡大する。本発明者らは、ルイス肺およびEL4リンパ腫を保有する重致死的照射マウスにおいて、血液細胞回復に対する、rMuIL-1 2の同様の効果も観察した[10]。

20

【0232】

照射されたマウス骨髄において、生存および血液細胞回復を促進するrMuIL-1 2の能力は、機能的なIL-1 2受容体(IL-1 2 R)が骨髄細胞上に存在することを示唆している。IL-1 2受容体は、IL-2 3受容体複合体[11]およびIL-1 2受容体特異的ベータ2サブユニット(IL-1 2 Rベータ2)[2]と同じく、β1サブユニット(IL-1 2 R β1)から構成されるヘテロダイマー型の膜貫通タンパク質である。免疫組織化学分析を使用して、本発明者らは、IL-1 2 Rベータ2がマウスの骨髄細胞上で発現されていることを、以前に報告した[1]。マウスの骨髄免疫組織化学データは、IL-1 2治療が造血骨髄細胞の増殖および分化を促進することを示したため、今回の論文では、本発明者らは正常なマウスにおけるrMuIL-1 2治療が、造血幹/前駆細胞の集団を表す、Lin⁻集団におけるIL-1 2 Rベータ2発現に影響するかどうかを調べた。結果は、対照のマウスと比較して、rMuIL-1 2で治療したものは、骨髄由来Lin⁻細胞上でのIL-1 2 Rベータ2の発現は、3~5倍の増加を示すことを、示している。

30

【0233】

本発明者らは、さらに、IL-1 2 Rベータ2がヒト骨髄で発現されているか、否かを決定しようと考えた。免疫細胞化学は、ヒト骨髄由来CD 3 4⁺細胞においてIL-1 2 Rベータ2の存在を示し、フローサイトメトリー分析は、CD 3 4⁺細胞がIL-1 2 Rベータ2を発現していることを解明した。今回の試験は、初めて、骨髄中における、造血幹および前駆細胞の混合集団を代表している、ヒトCD 3 4⁺細胞上に、IL-1 2 Rベータ2が発現していることを示した。本発明者らは、長期間の再構築の可能性を保有する細胞の集団を代表し、そして、臨床現場において、骨髄移植のために使用される[12、13、14]、正常なヒト骨髄由来CD 3 4⁺細胞の87~90%でIL-1 2 R β 2の発現を同定した。さらに、マーカーCD 1 1 7(c-Kit)、CD 1 3 3、CD 1 3 5(Flt3)、およびCD 3 1 8(CDCP1)を発現している、CD 3 4細胞の亜集団の全て

40

50

を、HSC集団、共発現したIL-12R β 2を同定するために、使用された。CD117は、HSCの増殖に関与する、造血増殖因子として機能し[15]、HSCの動員に関係することが示されたSCFの受容体である[5、15]。興味深いことに、IL-12およびSCFは、リンパ球造血系の増殖を相乗的に支援することが示されている[5]。CD133は、神経および造血幹／前駆細胞に発現することが報告されており[16]、CD34⁺/CD133⁺細胞は、NOD/SCIDマウスに生着することができる[17]。受容体チロシンキナーゼファミリーのメンバーであるCD135は、造血恒常性の維持に重要な役割を果たし、造血前駆細胞の拡大に関与する[18]。Flt3-リガンドは、骨髄HSCの増殖において、IL-12および他のサイトカインおよび増殖因子と協力することが示されている[19]。CD318⁺細胞は、NOD/SCIDマウスに生着した場合、多系統分化能を保有することが示されている[20]。総合すると、マウスおよびヒト骨髄からのIL-12R β 2発現データは、IL-12R β 2発現HSCがIL-12の造血活性の潜在的な標的である可能性があることを示す。

【0234】

致死的な損傷骨髄を有する動物の造血を刺激し、生存を促進するIL-12の明らかな能力は、移植前レジメンの一部として、臨床的に誘導された、または、放射線事故もしくは災害の結果による、損傷した骨髄の状況において、IL-12が有用な治療でありえることを示唆している。HemaMax（商標）（Neumedicines Inc. ; Pasadena, CA）、組換えヒトインターロイキン-12調製（rHuIL-12）は、FDAのアニマル・ルールに基づいて、急性放射線症候群の造血症候群（HSARS）の治療のために開発されている。本発明者らは、近年、致死的な照射への曝露の24時間後に投与された、単回、低用量（100 ng/kgまたは250 ng/kg）のHemaMax（商標）が、骨髄を再構築し、非ヒト霊長類（NHP）の生存を増加することを報告した[1]。さらに、本発明者らのデータは、rHuIL-12が致死的な照射NHPにおける白血球および血小板の最下点を減弱させることを示した。

【0235】

がん治療の現場における、BMTに関して、IL-12の造血特性は、アジュバント治療として、応用可能である可能性がある。骨髄幹細胞動員における技術の改善、それらの回収のためのアフエレーシス手法の開発、ならびに、毒性を減少するための新しい方策の利用は、HSC移植の治療効果を改善し、がん患者の幅広い集団へのその治療価値を拡大した[21、22、23]。にもかかわらず、HSC移植の成功は、造血系の長期の再構築に必要な細胞の数によって大きく制限される。従来の移植は、G-CSFなどの増殖因子を用いた動員によって単離される、CD34⁺細胞の使用を採用しているが、十分な量のCD34⁺細胞を単離するための、G-CSF治療の複数回の繰り返しの必要性は、免疫抑制性である可能性がある[24、25]。ミエロイドおよびエリスロイド増殖因子は、移植後の好中球減少症および貧血症の治療に使用されるが[26]、血小板再生には影響を及ぼさない。したがって、がんを有する患者の17%もの多くで生じ、そして、死亡のリスクを著しく増加しする可能性がある[27]、移植後の血小板減少症を克服するため、患者は、移植後早期の血小板輸血に頼らなければならない[28]。今回の試験、ならびに本発明者らの以前の研究において観察されたように[1、10]、致死的な照射に曝露したマウスにおける、IL-12治療後に観察された血小板のレベルの増加は、IL-12が、ヒトにおいて、移植後の血小板回復を促進するのに有効である可能性があることを示唆している。

【0236】

多くの臨床試験が、がん患者における抗腫瘍剤としてIL-12を評価してきたが、該薬剤は、その中程度の臨床活性、ならびに、反復高用量（300 ng/kg～600 ng/kg）レジメン（週当たり5回投与）で投与した際の著しい毒性のため、治療薬として前進していない[29、30、31、32、33、34、35、36、37]。対照的に、末梢血幹細胞移植のおよそ2カ月後、次いで2週間後の5連続日に単回投与として与えた30～250 ng/kgのIL-12用量は、ハイリスクな血液系悪性腫瘍を有する患

10

20

30

40

50

者において許容可能な耐容性を示した〔37〕。先に述べたように、rHuIL-12は、そのマウスの対応物と同様に、致死的なTBIに曝露されたアカゲザルに1回だけまたは2回投与した場合、100～250 ng/kgの用量でその造血促進活性を発揮した〔1〕。これらの用量は、100 ng/kgより少ないヒト用量と等価である。本発明者らの今回のフェーズ1ヒト安全性試験において、rHuIL-12は良好な耐容性であり、安全性の問題は同定されていない（Neumedicines, Inc.、未発表データ）。これらの知見は、造血再生に必要なrHuIL-12の用量が、がん患者において先に使用したIL-12の用量よりも実質的に少ないことを示し、がんのためのARSおよびHSC移植両方の治療現場において、rHuIL-12のより好ましい安全性プロファイルをもたらすであろう。

10

【0237】

結論

本発明者らは、rMuIL-12が、致死的な放射線に曝露されたマウスにおいて造血回復および生存の促進に対して、BMTと等価であること、ならびに、rMuIL-12治療が、正常マウスから単離したLin⁻細胞におけるIL-12Rβ2発現レベルを増加したことを実証した。さらに、正常ヒト骨髓由来のCD34⁺細胞は、IL-12Rβ2を発現することが見出された。IL-12Rβ2は、他の公知のHSCマーカーと共発現することも観察された。これらの知見は、幹細胞生物学および再生医療へのIL-12/IL-12R系の重要性に光をあて始め、そして、この経路が、HSC移植を受けた、または、原子力災害において、致死的な放射線曝露の効果を被った、患者の緩解および生存の増加のための治療標的を表すことを示唆している。したがって、臨床試験は、これらの状況における、アジュバントrHuIL-12療法の安全性および有効性の評価を保証する。

20

【0238】

【表3】

表1. マウス骨髓から単離されたLin⁻細胞のIL-12Rβ2の発現に対するrMuIL-12の効果

実験	IL12-2β2を発現するLin ⁻ 細胞の割合		
	ビヒクル (N=6)*	10 ng rMuIL-12 (N=6)*	増加 倍
1	0.6	2.1	3.5
2	0.5	2.7	5.4

30

注：フローサイトメトリー分析は、それぞれ実験1および2におけるrMuIL-12での治療の21時間または25時間後に回収された骨髓Lin細胞で実施した。

*データは、実験当たりの治療群当たり6匹のマウスの平均を表す。

40

【0239】

【表 4】

表 2. IL-12R β 2 および他の造血幹細胞マーカーを共発現しているヒト骨髄-CD34⁺細胞の割合

細胞集団／CDマーカー	IL-12R β 2 および指示したマーカーを発現しているCD34 ⁺ 細胞の割合
	平均 $\pm$ SD
CD34 ⁺	
IL-12R β 2 ⁺ /CD 117(c-kit) ⁺	70 $\pm$ 11
IL-12R β 2 ⁺ /CD 133 ⁺	63 $\pm$ 7
IL-12R β 2 ⁺ /CD135(Flt3) ⁺	57 $\pm$ 4
IL-12R β 2 ⁺ /CD318(CDCP1) ⁺	61 $\pm$ 9

注: データは、3 匹の異なる健常な生物学的ドナー由来の細胞に基づく要約統計量を表す

【0240】

本発明は、特定の実施態様を参照して開示してきたが、他の実施態様および本発明のバリエーションは、本発明の目的および範囲を逸脱することなく当業者によって変更されうることは明らかである。添付の特許請求の範囲は、すべてのそのような実施態様および等価なバリエーションを含む。

本明細書において、参照および述べた、すべての特許、論文、科学記事、ウェブサイト、ならびに他の文献および資料は、本発明が属する技術分野の当業者の技術レベルを示しており、そして、そのような参照した文献および資料の夫々は、参照によりその全体を個別に組み込む、または、その全体を本明細書において明らかにするように同程度まで参照により本明細書に組み込まれる。出願者は、任意のそのような特許、論文、科学記事、ウェブサイト、電子的に入手可能な情報、および他の参照した資料または文献からの任意のおよびすべての資料および情報を、本明細書に物理的に組み込む権利を保持している。

本明細書に記載の特定の方法および組成物は、好ましい実施態様の代表例であり、例示的であり、本発明の技術的範囲を制限することを意図していない。他の対象、形態、および実施態様は、本明細書を考慮する際、当業者には思い浮かべることができ、そして、請求の範囲によって規定される、本発明の技術思想内に包含される。本発明の技術的範囲および技術思想を逸脱することなく、本明細書に開示されている本発明に対して、様々な置換および変更を施すことができることは、当業者には容易に判るであろう。本明細書に例示的に記載されている発明は、必須であるとして本明細書中において具体的に開示されていない、任意の要素または要素群、または制限または制限群の不在下において、適宜、実施することもできる。したがって、例えば、本明細書内の事例中、本発明の実施態様または例示において、用語：「含む (comprising)」、「本質的に～からなる (consisting essentially of)」、「および「～からなる (consisting of)」は、本明細書における他の 2 つの用語のいずれかと置き換えることもできる。また、用語：「含む (comprising)」、「包含する (including)」、「含有する (containing)」等は、限定がなされてなく、開放的に読まれる。本明細書に例示的に記載されている方法およびプロセスは、異なるステップの順番において、適宜、実施することもでき、従って、それらは、本明細書または特許請求の範囲に記載されている、ステップの順番に、必ずしも限定されてはいない。本明細書において、および添付の特許請求の範囲において使用される際、単数形「1 つの (a)」、「1 つの (an)」および「その (the)」は、文脈が、明確に特段の規定をおこなっていない限り、複数の参照も含む。いかなる状況下でも、該特許は、本明細書中に具体的に開示されている、具体的な例または実施態様または方法に限定されていると解釈されることはない。いかなる状況下でも、該特許は、出願者による返答文書中において、具体的に、かつ、なんらの条件あるいは制限を付すことなく、明示的に、該記述を承認されていない限り、特許商標局の任意の審査官または任意の他の係官もしくは職員によってなさ

れる任意の記述によって、限定がなされていると解釈されることはない。採用されている用語および表現は、限定ではなく、記述の表現法として使用され、そして、そのような用語および表現の使用において、示されたおよび記載された特徴またはその一部の任意の等価物を除外する意図はなく、また、特許請求されている、本発明の技術的範囲内における、様々な改変が可能であると認識される。したがって、本発明は、好ましい実施態様および任意選択の特徴によって具体的に開示されているが、本明細書に開示されている、概念の改変およびバリエーションは、当業者により講じられることができ、そして、そのような改変およびバリエーションは、添付の特許請求の範囲によって定義される、本発明の技術的範囲内であると理解される。

【0241】

本発明は、本明細書において、概括的に、かつ属として、記載される。属の開示内に入る、各より狭い種ならびに下位概念の群類も、また、本発明の一部を形成している。これには、排除された事項が本明細書において具体的に記載されるか否かにかかわらず、条件付きで、または属の任意の対象事項を除く否定的な限定付きの、発明の属の記載も含まれる。

【0242】

他の実施態様は以下の特許請求の範囲内である。さらに、本発明の特徴または形態が、マーカッシュ・グループの表記法で記載されている場合、当業者は、本発明がそれによりマーカッシュ・グループの任意の個々のメンバーまたはメンバーのサブグループの表記法でも記載されることを認識するであろう。

参考文献

1. Waselenko JK, MacVittie TJ, Blakely WF, et al. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. *Ann intern Med.* 2004;140:1037-1051.
2. DiCarlo AL, Maher C, Hick JL, et al. Radiation injury after a nuclear detonation: medical consequences and the need for scarce resources allocation. *Disaster Med Public Health Prep.* 2011;5 Suppl 1:S32-44.
3. Dainiak N, Waselenko JK, Armitage JO, MacVittie TJ, Farese AM. The hematologist and radiation casualties. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2003:473 - 496.
4. Bellone G, Trinchieri G. Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory factor/IL-12 on human hematopoiesis. *J Immunol.* 1994;153:930-937.
5. Dybedal I, Larsen S, Jacobsen SE. IL-12 directly enhances in vitro murine erythropoiesis in combination with IL-4 and stem cell factor. *J Immunol.* 1995;154:4950-4955.
6. Jacobsen SE, Veiby OP, Smeland EB. Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 1993;178:413-418.
7. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol.* 1998;70:83-243.
8. Basile LA, Ellefson D, Gluzman-Poltorak Z, et al. HemaMax, a Recombinant Human Interleukin-12, Is a Potent Mitigator of Acute Radiation Injury in Mice and Non-Human Primates. *PLoS One.* 2012;7:e30434.
9. Farese AM, Cohen MV, Katz BP, et al. Filgrastim improves survival in lethally irradiated nonhuman primates. *Radiat Res.* 2013;179:89-100.
10. Friesecke I, Beyrer K, Fliedner TM. How to cope with radiation accidents: the medical management. *Br J Radiol.* 2001;74:121-122.
11. Basile LA, Gallaher TK, Shibata D, Miller JD, Douer D. Multilineage hematopoietic recovery with concomitant antitumor effects using low dose Interleukin-

12 in myelosuppressed tumor-bearing mice. *J Transl Med*. 2008;6:26.

12. Park HR, Jo SK, Paik SG. Factors effecting the Th2-like immune response after gamma-irradiation: low production of IL-12 heterodimer in antigen-presenting cells and small expression of the IL-12 receptor in T cells. *Int J Radiat Biol*. 2005;81:221-231.

13. Park HR, Jo SK, Paik SG. The NK1.1+T cells alive in irradiated mice play an important role in a Th1/Th2 balance. *Int J Radiat Biol*. 2006;82:161-170.

14. Colombo MP, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2002;13:155-168.

15. Williams JP, Brown SL, Georges GE, et al. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. *Radiat Res*. 2010;173:557-578. 10

16. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;195:327-333.

17. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:133-146.

18. Azoulay, E. , Attalah, H., Harf, A., Schlemmer, B., and Delclaux C. 2001. Granulocyte colony-stimulating factor or neutrophil-induced pulmonary toxicity: myth or reality? *Chest* 120:1695-1701.

1. Basile LA, Ellefson D, Gluzman-Poltorak Z et al. (2012) HemaMax, a Recombinant Human Interleukin-12, Is a Potent Mitigator of Acute Radiation Injury in Mice and Non-Human Primates. *PLoS One* 7: e30434. 20

2. Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, et al. (1998) The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 495-521.

3. Jacobsen SE, Veiby OP, Smel and EB (1993) Cytotoxic lymphocyte maturation factor (interleukin 12) is a synergistic growth factor for hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 178: 413-418.

4. Bellone G, Trinchieri G (1994) Dual stimulatory and inhibitory effect of NK cell stimulatory factor/IL-12 on human hematopoiesis. *J Immunol* 153: 930-937. 30

5. Hirayama F, Katayama N, Neben S, Donaldson D, Nickbarg EB, et al. (1994) Synergistic interaction between interleukin-12 and steel factor in support of proliferation of murine lymphohematopoietic progenitors in culture. *Blood* 83: 92-98.

6. Ploemacher RE, van Soest PL, Boudewijn A, Neben S (1993) Interleukin-12 enhances interleukin-3 dependent multilineage hematopoietic colony formation stimulated by interleukin-11 or steel factor. *Leukemia* 7: 1374-1380.

7. Neta R, Stiefel SM, Finkelman F, Herrmann S, Ali N (1994) IL-12 protects bone marrow from and sensitizes intestinal tract to ionizing radiation. *J Immunol* 153: 4230-4237. 40

8. Chen T, Burke KA, Zhan Y, Wang X, Shibata D, et al. (2007) IL-12 facilitates both the recovery of endogenous hematopoiesis and the engraftment of stem cells after ionizing radiation. *Exp Hematol* 35: 203-213.

9. (1996) US Food and Drug Administration, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. US National Institutes of Health.

10. Basile LA, Gallaher TK, Shibata D, Miller JD, Douer D (2008) Multilineage hematopoietic recovery with concomitant antitumor effects using low dose Interleukin-12 in myelosuppressed tumor-bearing mice. *J Transl Med* 6: 26.

11. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA (2003) The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19: 50

641- 644.

12. Civin CI, Almeida-Porada G, Lee MJ, Olweus J, Terstappen LW, et al. (1996) Sustained, retransplantable, multilineage engraftment of highly purified adult human bone marrow stem cells in vivo. *Blood* 88: 4102-4109.
13. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR (1991) Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood* 77: 1218-1227.
14. Moog R (2008) Management strategies for poor peripheral blood stem cell mobilization. *Transfus Apher Sci* 38: 229-236.
15. Bodine DM, Seidel NE, Zsebo KM, Orlic D (1993) In vivo administration of stem cell factor to mice increases the absolute number of pluripotent hematopoietic stem cells. *Blood* 82: 445-455. 10
16. Florek M, Haase M, Marzeseo AM, Freund D, Ehninger G, et al. (2005) Prominin-1/CD133, a neural and hematopoietic stem cell marker, is expressed in adult human differentiated cells and certain types of kidney cancer. *Cell Tissue Res* 319: 15-26.
17. Drake AC, Khoury M, Leskov I, Iliopoulou BP, Fragoso M, et al. (2011) Human CD34+ CD133+ hematopoietic stem cells cultured with growth factors including Angptl5 efficiently engraft adult NOD-SOD Il2rgamma-/- (NSG) mice. *PLoS One* 6: e18382. 20
18. Kikushige Y, Yoshimoto G, Miyamoto T, Iino T, Mori Y, et al. (2008) Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J Immunol* 180: 7358-7367.
19. Jacobsen SEW, Okkenhaug C, Myklebust J, Veiby OP and Lyman SD (1995) The Flt3 ligand potently and directly stimulates the growth and expansion of primitive murine bone marrow progenitor cells in vitro: Synergistic interactions with Interleukin (IL) 11, IL-12 and other hematopoietic growth factors. *J Exp Med* 181: 1357-1363
20. Takeda H, Fujimori Y, Kai S, Ogawa H, Nakano T (2010) CD318/CUB-domain-containing protein 1 expression on cord blood hematopoietic progenitors. *Exp Ther Med* 1: 497-501. 30
21. Bakanay SM, Demirer T (2011) Novel agents and approaches for stem cell mobilization in normal donors and patients. *Bone Marrow Transplant*.
22. Gyurkocza B, Rezvani A, Storb RF (2010) Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. *Expert Rev Hematol* 3: 285-299.
23. Hill-Kayser CE, Plastaras JP, Tochner Z, Glatstein E (2011) TBI during BM and SCT: review of the past, discussion of the present and consideration of future directions. *Bone Marrow Transplant* 46: 475-484.
24. Anderlini P, Przepiorka D, Seong D, Champlin R, Korblyng M (1996) Transient neutropenia in normal donors after G-CSF mobilization and stem cell apheresis. *Br J Haematol* 94: 155-158. 40
25. Stroncek DF, Clay ME, Smith J, Ilstrup S, Oldham F, et al. (1996) Changes in blood counts after the administration of granulocyte-colony-stimulating factor and the collection of peripheral blood stem cells from healthy donors. *Transfusion* 36: 596-600.
26. Held TK, Gundert-Remy U (2010) Pharmacodynamic effects of haematopoietic cytokines: the view of a clinical oncologist. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 106: 210-214.
27. Ninan MJ, Flowers CR, Roback JD, Arellano ML, Waller EK (2007) Posttransplant thrombopoiesis predicts survival in patients undergoing autologous hematopo 50

ietic progenitor cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 13: 895-904.

28. Wandt H, Ehninger G, Gallmeier WM (2001) New strategies for prophylactic platelet transfusion in patients with hematologic diseases. Oncologist 6: 446-450.

29. Atkins MB, Robertson MJ, Gordon M, Lotze MT, DeCoste M, et al. (1997) Phase I evaluation of intravenous recombinant human interleukin 12 in patients with advanced malignancies. Clin Cancer Res 3: 409-417.

30. Bajetta E, Del Vecchio M, Mortarini R, Nadeau R, Rakhit A, et al. (1998) Pilot study of subcutaneous recombinant human interleukin 12 in metastatic melanoma. Clin Cancer Res 4: 75-85.

31. Gollob JA, Veenstra KG, Parker RA, Mier JW, McDermott DF, et al. (2003) Phase I trial of concurrent twice-weekly recombinant human interleukin-12 plus low-dose IL-2 in patients with melanoma or renal cell carcinoma. J Clin Oncol 21: 2564-2573.

32. Lenzi R, Rosenblum M, Verschraegen C, Kudelka AP, Kavanagh JJ, et al. (2002) Phase I study of intraperitoneal recombinant human interleukin 12 in patients with Mullerian carcinoma, gastrointestinal primary malignancies, and mesothelioma. Clin Cancer Res 8: 3686-3695.

33. Little RF, Aleman K, Kumar P, Wyvill KM, Pluda JM, et al. (2007) Phase 2 study of pegylated liposomal doxorubicin in combination with interleukin-12 for AIDS-related Kaposi sarcoma. Blood 110: 4165-4171.

34. Motzer RJ, Rakhit A, Schwartz LH, Olencki T, Malone TM, et al. (1998) Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-12 in patients with advanced renal cell carcinoma. Clin Cancer Res 4: 1183-1191.

35. Ohno R, Yamaguchi Y, Toge T, Kinouchi T, Kotake T, et al. (2000) A dose-escalation and pharmacokinetic study of subcutaneously administered recombinant human interleukin 12 and its biological effects in Japanese patients with advanced malignancies. Clin Cancer Res 6: 2661-2669.

36. Portielje JE, Kruit WH, Schuler M, Beck J, Lamers CH, et al. (1999) Phase 1 study of subcutaneously administered recombinant human interleukin 12 in patients with advanced renal cell cancer. Clin Cancer Res 5: 3983-3989.

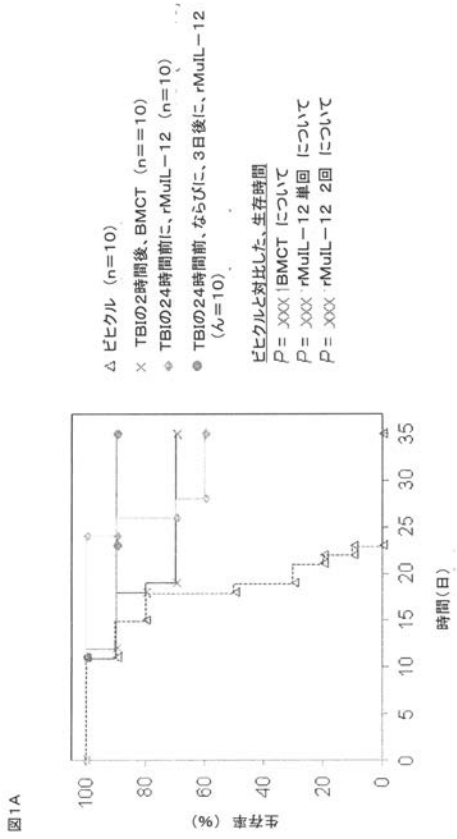
37. Robertson MJ, Pelloso D, Abonour R, Hromas RA, Nelson RP, Jr., et al. (2002) Interleukin 12 immunotherapy after autologous stem cell transplantation for hematological malignancies. Clin Cancer Res 8: 3383-3393.

10

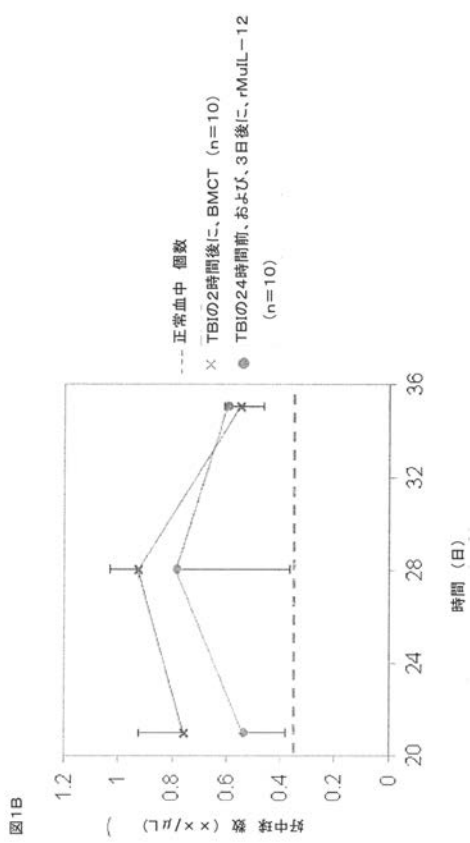
20

30

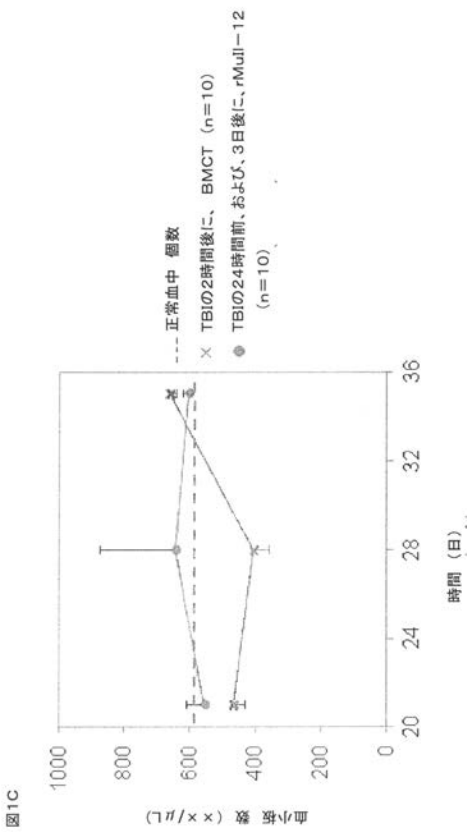
【図 1 A】



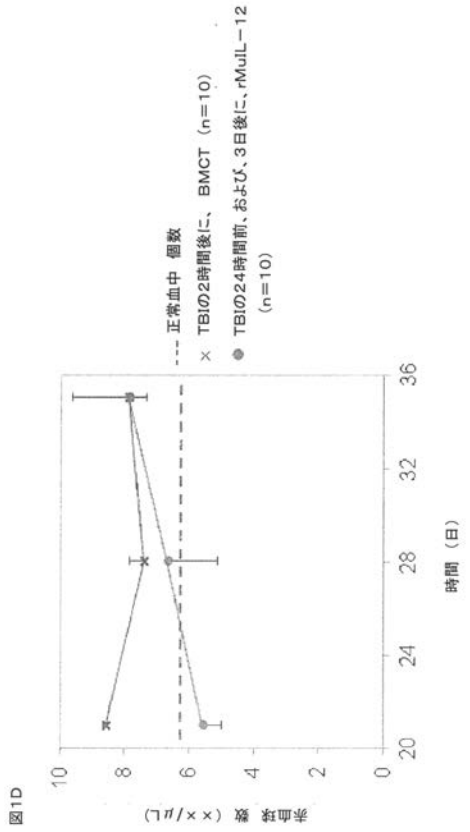
【図 1 B】



【図 1 C】

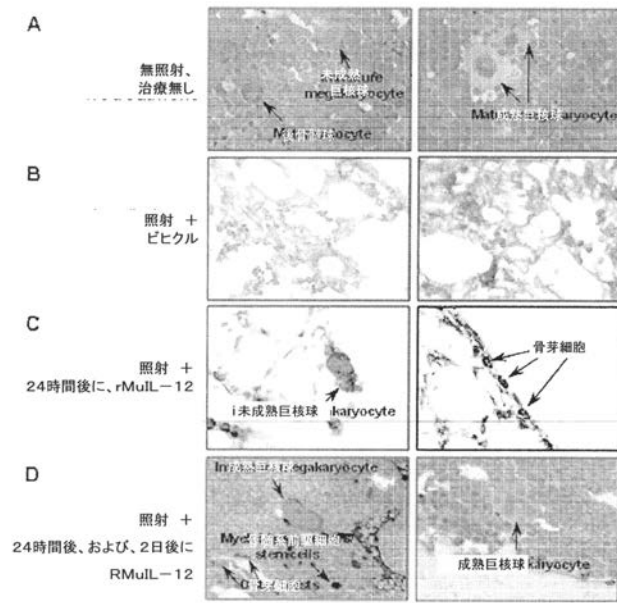


【図 1 D】



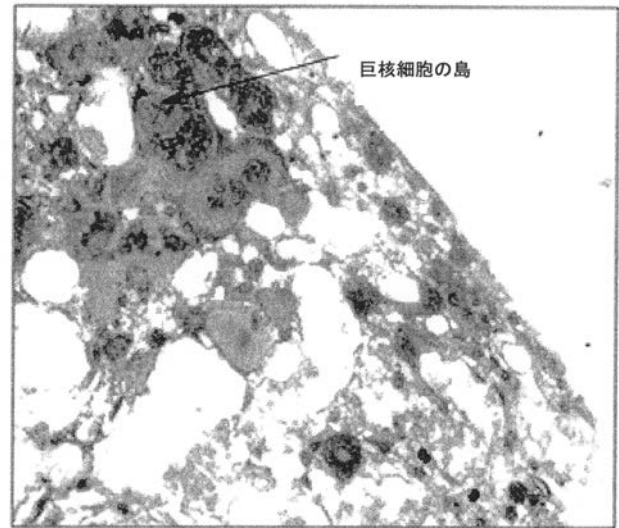
【図 2】

図2 A-D



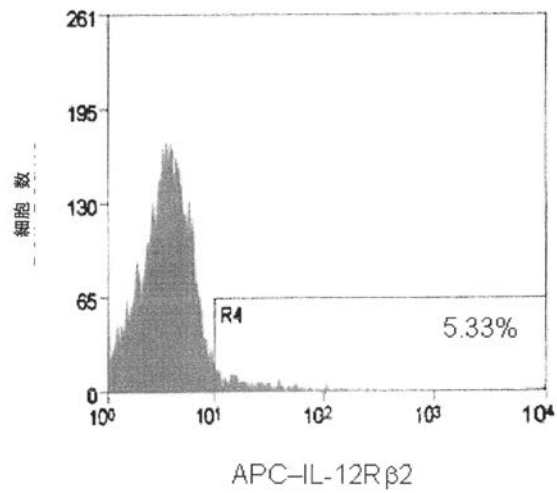
【図 3】

図3



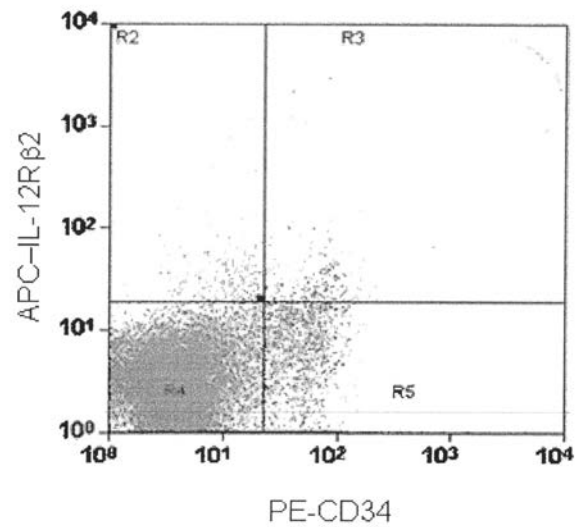
【図 4】

図4



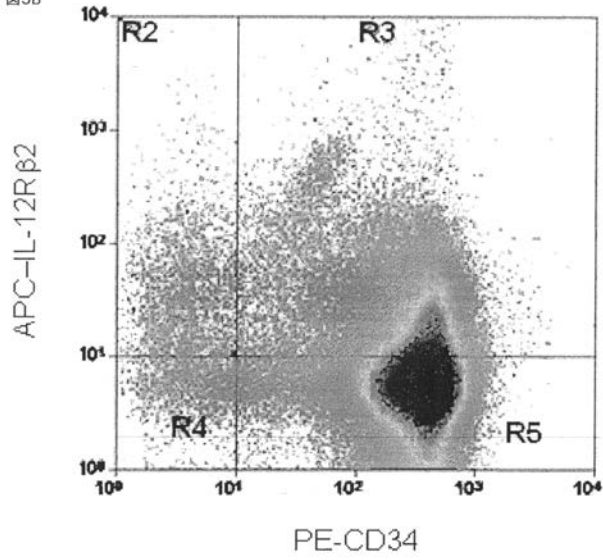
【図 5 A】

図5A



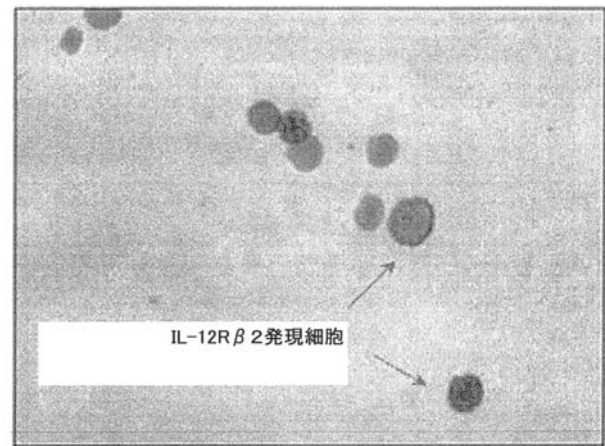
【図 5 B】

図5B



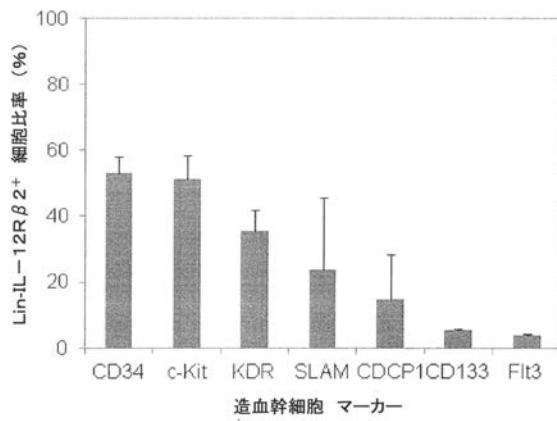
【図 5 C】

図5C



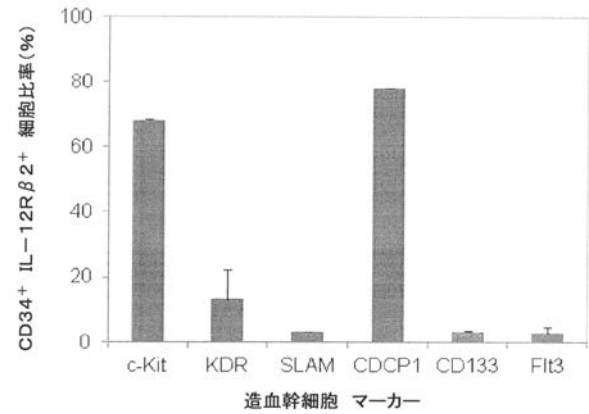
【図 6 A】

図6A



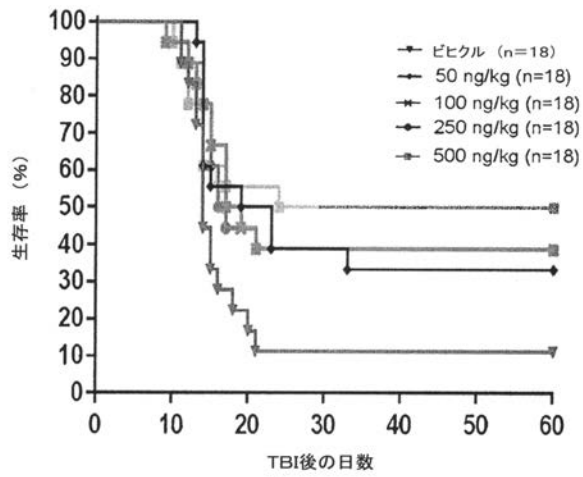
【図 6 B】

図6B

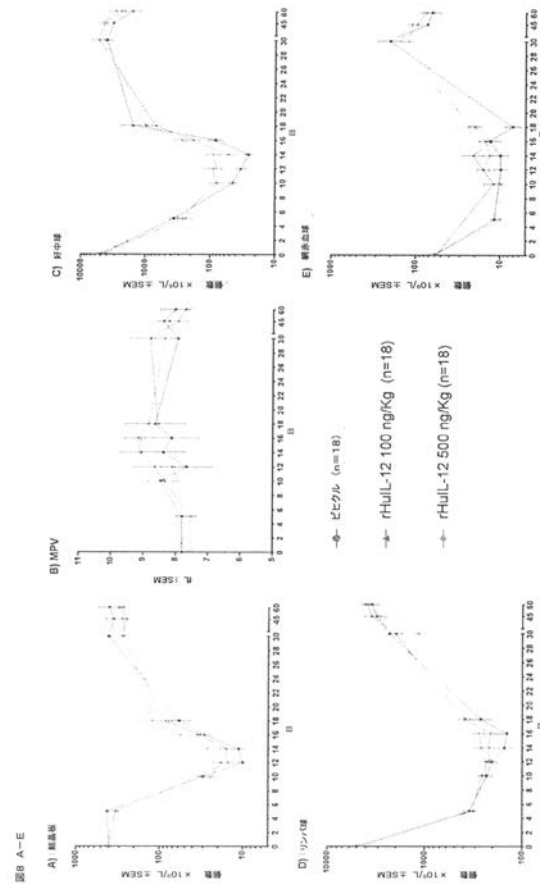


【図 7】

図 7



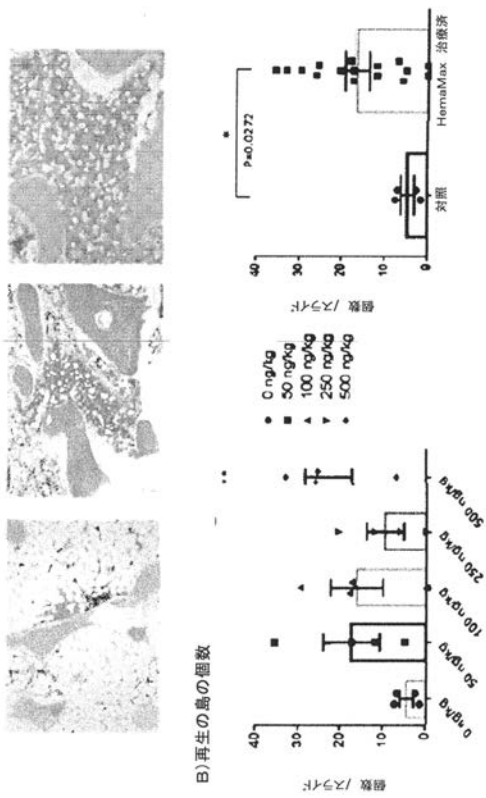
【図 8】



【図 9 - 1】

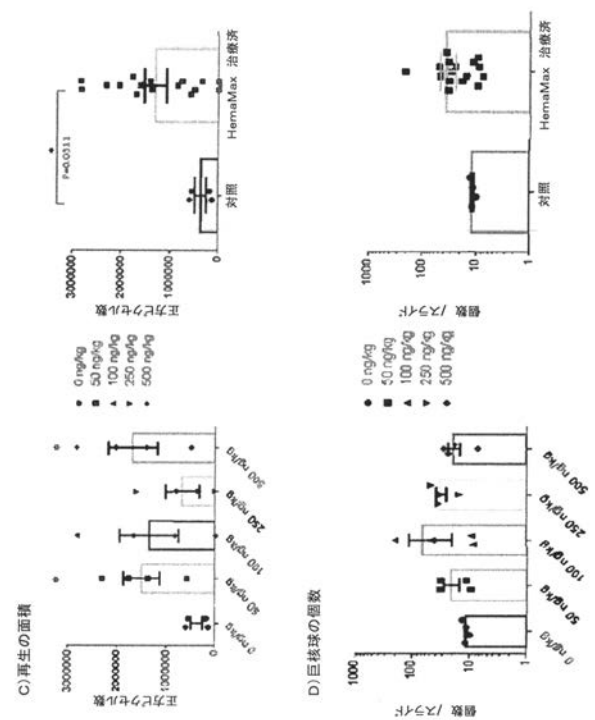
図 9 A-B

A) 再生骨髄の組織学的同定

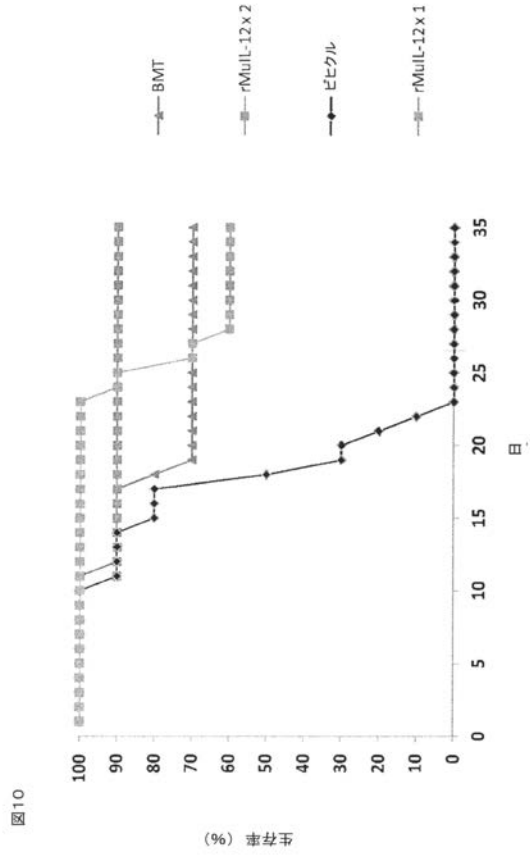


【図 9 - 2】

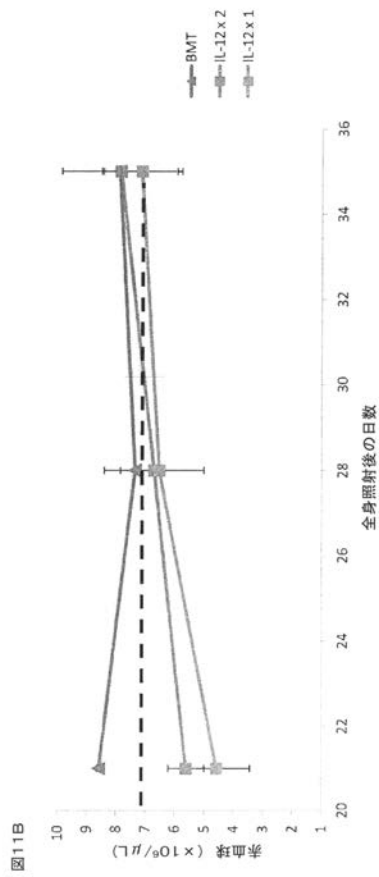
図 9 C-D



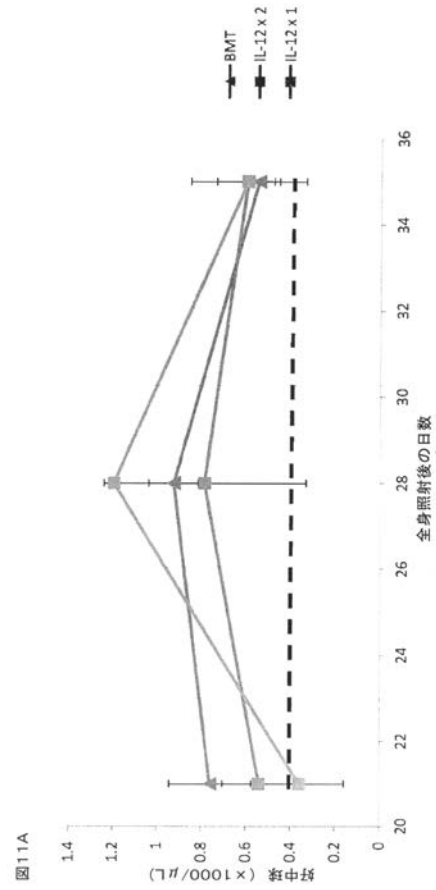
【図 1 0】



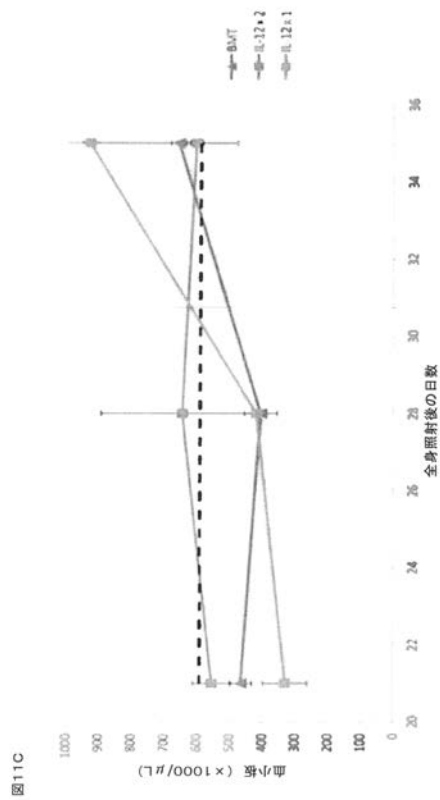
【図 1 1 B】



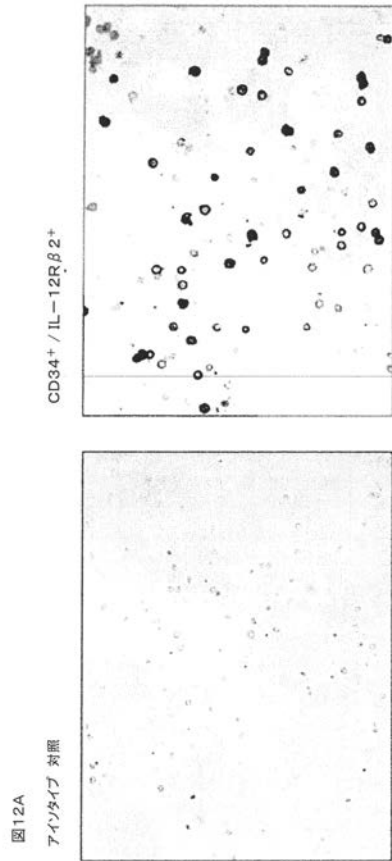
【図 1 1 A】



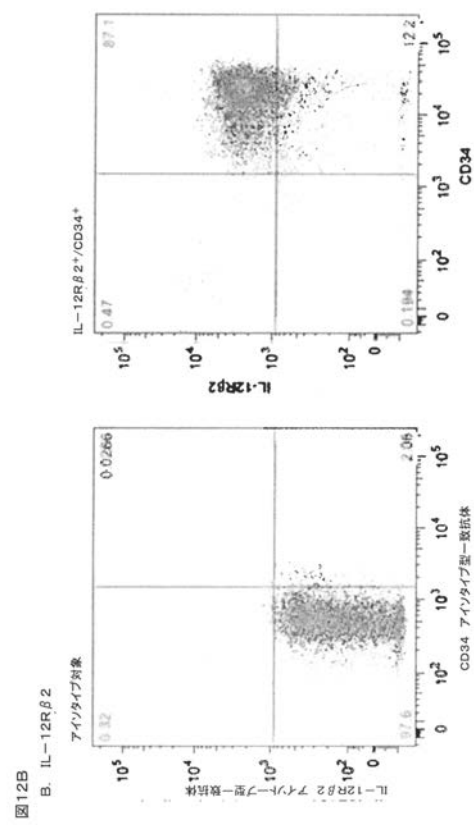
【図 1 1 C】



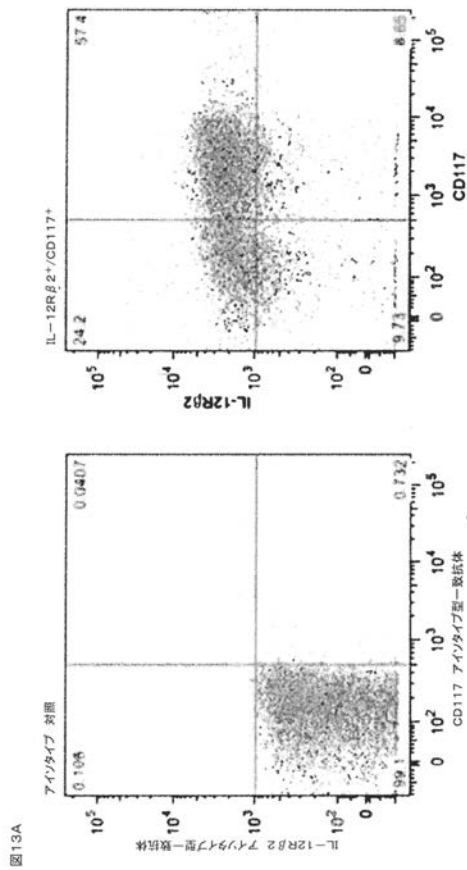
【図 1 2 A】



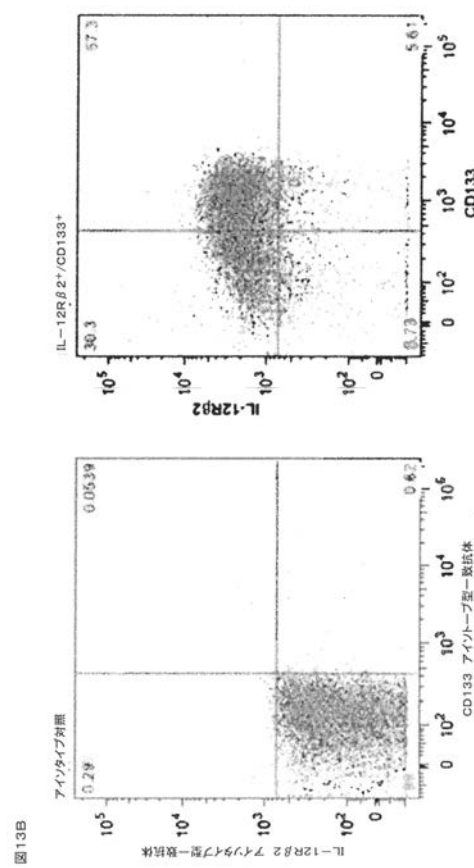
【図 1 2 B】



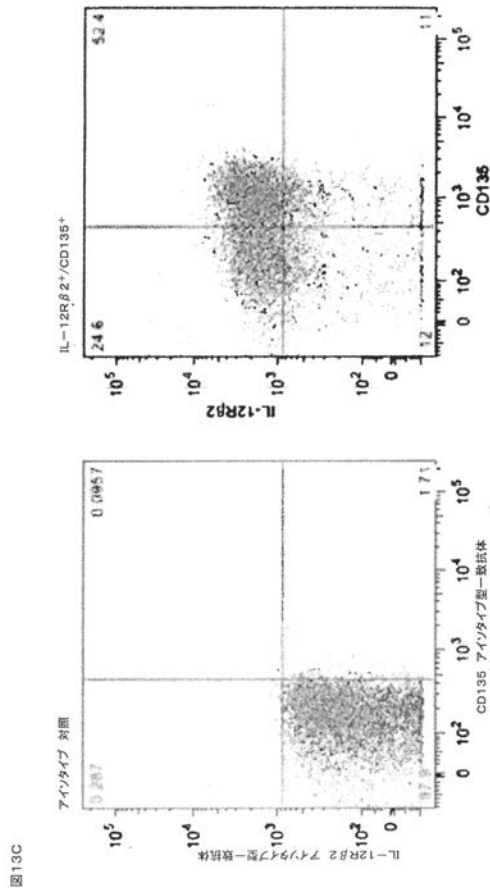
【図 1 3 A】



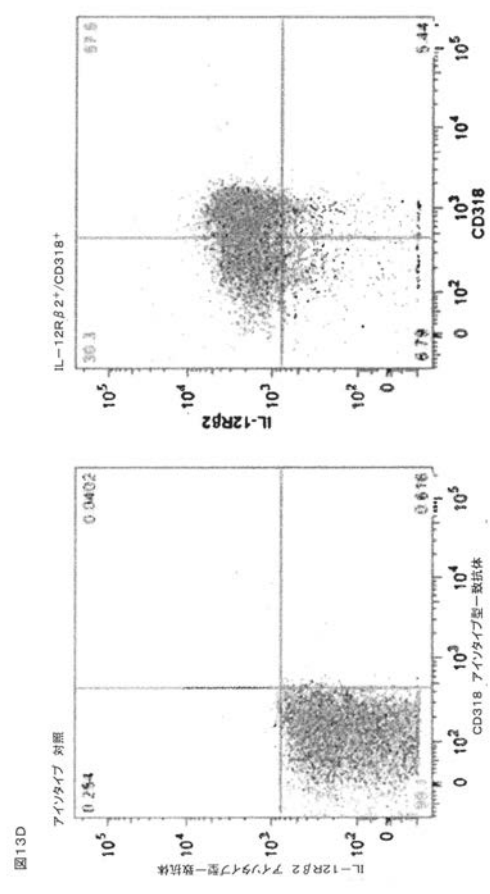
【図 1 3 B】



【図 1 3 C】



【図 1 3 D】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2015/058355
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 38/20(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61P 35/02(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i		
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) A61K 38/20; A61K 39/395; C07K 14/52; A61K 38/19; A61P 37/04; A61P 19/08; A61K 38/17; A61P 35/02; A61P 35/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) cKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: IL-12, recovery, hematopoiesis, infection, radiation therapy, chemotherapy		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7939058 B2 (CHEN et al.) 10 May 2011 See abstract; columns 16, 17; and claims 1-15	1-5, 23-27
X	WO 2014-160318 A1 (NEUMEDICINES, INC.) 02 October 2014 See abstract; paragraph [0004]; and claims 1-2.	1-5, 23-27
X	US 2013-0243722 A1 (NEUMEDICINES, INC.) 19 September 2013 See abstract; and claims 1, 2, 37, 44 and 45.	2-5, 23-27
X	US 2009-0047241 A1 (ZHAO et al.) 19 February 2009 See abstract; and claims 1-5.	2-5, 23-27
X	WO 2011-146574 A1 (NEUMEDICINES, INC.) 24 November 2011 See abstract; and claims 9-18.	2-5, 23-27
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 05 February 2016 (05.02.2016)		Date of mailing of the international search report 05 February 2016 (05.02.2016)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. +82-42-481-3371

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/058355

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.: 8,14,16,21
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:
Claims 8, 14, 16 and 21 are unclear, since they refer to one of claims which are not drafted in accordance with PCT Rule 6.4(a) (PCT Article 6).

3. ☒ Claims Nos.: 6,7,9-13,15,17-20,22,28
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2015/058355

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 7939058 B2	10/05/2011	EP 1641431 A2 EP 1641431 A4 JP 2008-500948 A JP 2012-025765 A JP 2015-038083 A JP 5517394 B2 US 2005-0136034 A1 US 2010-0278777 A1 US 2010-0278778 A1 US 2011-0206635 A1 US 2012-190909 A1 US 2015-209409 A1 US 8920790 B2 US 9023337 B2 WO 2005-007093 A2 WO 2005-007093 A3	05/04/2006 29/10/2008 17/01/2008 09/02/2012 26/02/2015 11/06/2014 23/06/2005 04/11/2010 04/11/2010 25/08/2011 26/07/2012 30/07/2015 30/12/2014 05/05/2015 27/01/2005 02/02/2006
WO 2014-160318 A1	02/10/2014	None	
US 2013-0243722 A1	19/09/2013	EP 2804620 A2 JP 2015-505326 A US 2014-369958 A1 WO 2013-154647 A2 WO 2013-154647 A3	26/11/2014 19/02/2015 18/12/2014 17/10/2013 12/12/2013
US 2009-0047241 A1	19/02/2009	None	
WO 2011-146574 A1	24/11/2011	EP 2571516 A1 JP 2013-526574 A US 2013-129674 A1	27/03/2013 24/06/2013 23/05/2013

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/02 (2006.01) A 6 1 P 35/02

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,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,RS,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,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NL,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

(72)発明者 バジーレ、 レーナ エイ。
アメリカ合衆国 9 1 1 0 7 カリフォルニア州 パサディナ # 3 1 0 アルタディナ ドライ
ヴ 1 3 3 エヌ。 ニューメディシンズ、 インコーポレイテッド内
Fターム(参考) 4C084 AA01 AA02 BA44 CA53 DA12 MA13 MA16 MA22 MA23 MA24
MA28 MA31 MA35 MA37 MA38 MA52 MA56 MA59 MA60 MA63
MA66 MA67 NA14 ZA511 ZA512 ZB261 ZB262 ZB321 ZB322 ZC411
ZC412

【要約の続き】

る、 I L - 1 2 の可能性のある役割を示している。