

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6985939号
(P6985939)

(45) 発行日 令和3年12月22日 (2021. 12. 22)

(24) 登録日 令和3年11月30日 (2021. 11. 30)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/0784 (2010. 01)
A 6 1 K 35/15 (2015. 01)
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)
A 6 1 P 37/04 (2006. 01)

C 1 2 N 5/0784
 A 6 1 K 35/15 A
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 43/00 1 O 7
 A 6 1 P 37/04

請求項の数 10 (全 22 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-567686 (P2017-567686)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月29日 (2016. 6. 29)
 (65) 公表番号 特表2018-523996 (P2018-523996A)
 (43) 公表日 平成30年8月30日 (2018. 8. 30)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/040134
 (87) 国際公開番号 WO2017/004230
 (87) 国際公開日 平成29年1月5日 (2017. 1. 5)
 審査請求日 令和1年6月28日 (2019. 6. 28)
 (31) 優先権主張番号 62/187, 086
 (32) 優先日 平成27年6月30日 (2015. 6. 30)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 500513619
 ノースウエスト バイオセラピューティク
 ス, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国 メリーランド, ベセス
 ダ, モンゴメリー レーン 4800,
 スイート 800
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善または増大した抗腫瘍免疫応答を誘導する最適に活性化された樹状細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

固形腫瘍に罹患する患者における腫瘍増殖の阻害の誘導に使用するための、単離され、部分的に成熟し、かつ活性化されたヒト樹状細胞を生成するための方法であって、該方法は、

i) ヒト P B M C を含む細胞集団を、ヒト単球性樹状細胞前駆体に関して富化する工程であって、ヒト P B M C を含む該細胞集団は末梢血から単離されている、工程；

i i) ヒト単球性樹状細胞前駆体に関して富化された該細胞集団を、有効量の樹状細胞分化薬剤を補充した組織培養培地とともに、該ヒト単球性樹状細胞前駆体を未成熟ヒト樹状細胞へと分化させるために十分な期間にわたって培養する工程；

i i i) 未成熟ヒト樹状細胞に関して富化された該細胞集団を、有効量の樹状細胞成熟化薬剤とともに培養して、該未成熟ヒト樹状細胞を 10 ~ 19 時間にわたって活性化する工程であって、ここで、該樹状細胞成熟化薬剤がカルメットグラノ桿菌 (B C G) とインターフェロン との組み合わせであり、該部分的に成熟した樹状細胞が抗原を取り込んでプロセッシングする、工程；ならびに

i v) 該活性化されたヒト樹状細胞を単離および洗浄する工程、
 を包含する方法。

【請求項 2】

単離され、部分的に成熟し、かつ活性化されたヒト樹状細胞を生成するための方法であって、該方法は、

10

20

i) ヒト単球性樹状細胞前駆体を含む細胞集団を、有効量の樹状細胞分化薬剤を補充した組織培養培地とともに、該ヒト単球性樹状細胞前駆体を未成熟ヒト樹状細胞へと分化させるために十分な期間にわたって培養する工程であって、ヒト単球性樹状細胞前駆体を含む該細胞集団は単離されている、工程；

ii) 未成熟ヒト樹状細胞に関して富化された該細胞集団を、有効量の樹状細胞成熟化薬剤とともに培養して、該未成熟ヒト樹状細胞を16時間にわたって活性化する工程であって、該樹状細胞成熟化薬剤がBCGおよびインターフェロンを含む、工程；ならびに

iii) 該活性化されたヒト樹状細胞を単離および洗浄する工程、
を包含する方法。

【請求項3】

10

前記単球性樹状細胞前駆体は、皮膚、脾臓、骨髓、胸腺、リンパ節、臍帯血、または末梢血から得られたものである、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記単球性樹状細胞前駆体細胞は、活性化されていない単球性樹状細胞前駆体である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記単球性樹状細胞前駆体は、処置される個々の被験体から得られたものである、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記単球性樹状細胞前駆体は、処置される個々の被験体にHLAマッチした健康な個々の被験体から得られたものである、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項7】

前記樹状細胞分化薬剤は、いかなる他のサイトカインもなしのGM-CSF、またはIL-4、IL-7、IL-13もしくはIL-15との組み合わせでのGM-CSFである、請求項1および2のいずれか1項に記載の方法。

【請求項8】

前記BCGは、全BCG、BCGの細胞壁構成要素、BCG由来リポアラビノマンナン、またはBCG成分を含むか、あるいは、該BCGは、不活性化全BCG、BCGの細胞壁構成要素、BCG由来リポアラビノマンナン、または、BCG成分を含む、請求項1に記載の方法。

30

【請求項9】

前記不活性化BCGは、熱不活性化BCG、ホルマリン処理BCG、または熱不活性化かつホルマリン処理BCGである、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記有効量のBCGは、約 $10^5 \sim 10^7$ cfu/ミリリットル 組織培養培地であり、前記有効量のIFNは、約100～約1,000ユニット/ミリリットル 組織培養培地である、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

40

背景

抗原提示細胞（APC）は、有効な免疫応答を誘起するにあたって重要である。それらは、抗原を抗原特異的T細胞レセプターとともにT細胞に提示するのみならず、T細胞活性化に必要なシグナルをも提供する。APCが抗原を提示しかつT細胞活性化のシグナルを送達する能力は、一般にアクセサリ細胞機能といわれる。単球およびB細胞は、免疫応答を起し得るAPCであることが示されたが、それらのインビトロでの抗原提示能力は、以前に感作されたT細胞の再活性化に限定されるようである。従って、単球およびB細胞は、機能的にナイーブまたは非感作T細胞集団を直接活性化することはできない。それらはまた、誘導された免疫応答、または誘導される場合の免疫応答を極性化し得るシグナルを送達できない。

50

【 0 0 0 2 】

樹状細胞（DC）は、ナイーブT細胞および記憶T細胞の両方を活性化し得ると考えられる、免疫系の専門抗原提示細胞である。樹状細胞は、免疫療法、特に、がんの免疫療法において使用するために、ますますエキソビボで調製されている。最適な免疫刺激特性を有する樹状細胞の調製は、これら細胞のエキソビボ培養に関する生物学の理解および活用を必要とする。これら細胞を培養するための種々のプロトコルは、各プロトコルに帰する種々の利点とともに、記載されてきた。

【 0 0 0 3 】

樹状細胞の活性化は、未成熟DC（これは、皮膚ランゲルハンス細胞に表現型が類似している）を、リンパ節へと移動し得る成熟した抗原提示細胞へと転換するプロセスを開始する。このプロセスは、未成熟樹状細胞を特徴付ける強力な抗原取り込み能の漸進的かつ連続的な喪失を、ならびに共刺激細胞表面分子および種々のサイトカインの発現のアップレギュレーションを生じる。種々の刺激が、DCの成熟化を開始し得る。このプロセスは複雑であり、少なくとも、単球性樹状細胞のインビトロでの完全成熟化は、使用される樹状細胞成熟化薬剤に依存して、完了するまでに48時間までかかり得る。成熟化の1つの他の転帰は、細胞のインビボ移動特性の変化である。例えば、未成熟樹状細胞成熟化の誘導は、いくつかのケモカインレセプター（CCR7が挙げられ、これは、成熟DCがクラスIおよびクラスIIのMHC分子の状況において、DC表面に提示された抗原に対してT細胞を活性化する場所である排出リンパ節のT細胞領域へと細胞を指向する）を誘導する。用語「活性化」および「成熟化」および「活性化された」および「成熟（した）」とは、未成熟DC（抗原を取り込む能力によって部分的に特徴付けられる）から成熟DC（新規にT細胞応答を有効に刺激し得る能力によって部分的に特徴付けられる）への移行を誘導しかつ完了させるプロセスを説明する。この用語は、代表的には、当該分野で交換可能に使用される。

【 0 0 0 4 】

公知の成熟化プロトコルは、抗原への曝露の間または後にDCが遭遇すると考えられるインビボ環境に基づく。このアプローチの初期の例は、細胞培養培地としての単球馴化培地（MCM）の使用である。MCMは、単球を培養することによってインビトロで生成され、成熟化因子の供給源として使用される（例えば、US 2002/0160430（本明細書に参考として援用される）を参照のこと）。成熟化を担うMCM中の主要成分は、炎症（促進）性サイトカインであるインターロイキン1（IL-1）、インターロイキン6（IL-6）および腫瘍壊死因子（TNF）であると報告されている。

【 0 0 0 5 】

DCの成熟化は、従って、多くのシグナル伝達経路を介して作用する多数の異なる因子によって引き金を引かれ得るかまたは開始され得る。結論として、単一の成熟化経路または転帰というものは存在しないが、多数の成熟DCステージというものは実際に存在し、各々、それら自体の別個の機能的特徴がある。概念として、これは意味のあることである。なぜなら免疫系が応答しなければならない身体への種々の脅威は、異なる攻撃ストラテジーを要求して、多種多様であるからである。例として、細菌感染は、特定の抗体が補充された活性化マクロファージによって最もよく一掃される一方で、ウイルス感染は、ウイルス感染細胞を有効に死滅させる細胞傷害性T細胞を介して最もよく攻撃される。がん細胞の死滅は、代表的には、細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラー細胞および抗体の組み合わせを要する。

【 0 0 0 6 】

DCのインビトロ成熟化は、従って、免疫応答の1タイプより別のタイプにとって好都合である免疫系を誘導するように、すなわち、免疫応答を極性化するように設計され得る。DCの指向的成熟化（directional maturation）は、成熟化プロセスの転帰が、成熟したDCでの処置から生じる結果として起こる免疫応答のタイプを必然的に決定するという概念を説明する。その最も単純な形態では、指向的成熟化は、Th1タイプまたはTh2タイプの免疫応答のいずれかに極性化されたT細胞応答を指向する

サイトカインを生成するDC集団を生じる。DCは、9種までの異なるToll様レセプター（TLR1～TLR9）を発現し、それらの各々は、成熟化の引き金を引くために使用され得る。驚くべきことではないものの、細菌生成物とTLR2およびTLR4との相互作用は、DCの指向的成熟化を生じ、細菌感染を扱うのに最も適した極性化した応答を生じる。結論として、TLR7またはTLR9を介して引き金を引かれた成熟化は、抗ウイルスタイプ応答をより生じるようである。さらなる例として、インターフェロン（IFN- γ ）を大部分の成熟化プロトコルに付加すると、成熟DCによるインターロイキン12の生成が生じ、これは、Th1タイプ免疫応答を必然的に決定する。逆に、プロスタグランジンE₂を含めると、反対の効果がある。

【0007】

10

完全に成熟した樹状細胞は、未成熟DCとは定性的にかつ定量的に異なる。一旦完全に成熟した後は、DCは、より高レベルのMHCクラスIおよびクラスII抗原、ならびにより高レベルのT細胞共刺激分子（例えば、CD80およびCD86）を発現する。これらの変化は、樹状細胞がT細胞を活性化する能力を増大させる。なぜならそれら樹状細胞は、細胞表面上の抗原密度を、ならびにT細胞上の共刺激分子（例えば、CD28など）の対応物を介して、T細胞活性化シグナルの大きさを増大させるからである。さらに、成熟DCは、多量のサイトカインを生成し、これは、T細胞応答を刺激しかつ極性化する。これらサイトカインとしては、Th1タイプ免疫応答と関連するインターロイキン12、ならびにTh2タイプ免疫応答と関連するインターロイキン-10およびインターロイキン-4が挙げられる。

20

【0008】

一般に、エキソピボでDCを生成するための方法は、被験体に由来するDC前駆体細胞に関して富化された細胞集団を得る工程、およびその後、そのDC前駆体細胞を、その被験体に導入して戻す前に、インビトロで完全に成熟したDCへと分化させる工程を包含する。代表的には、このプロセスの間に、成熟しつつあるDCは、DCが成熟していくときに、取り込みおよびプロセッシングのために抗原と接触する。DCは、最終的に分化されなければならないか、またはそれらが脱分化して単球/マクロファージへと戻り、それらの免疫強化能力のうちの大部分を失うと考える者もいる。単球から生成されるDCのエキソピボでの成熟化は、当該分野で周知の方法および薬剤で成功裡に達成されてきた。

【0009】

30

樹状細胞（DC）は、がんの積極的な免疫療法に関する選りすぐりのビヒクルとして認識されている。動物実験によって、マウスを腫瘍形成から防御することおよび確立された腫瘍を排除することの両方においてDCベースの免疫療法の潜在的可能性が示された。これらの成功は、小規模臨床試験においてヒトで少なくとも部分的に再現された。小規模な安全性または概念実証治験から、活性または効力が示され得るより大規模な治験への移行は、上記に記載されるとおりのDC調製の骨の折れるかつ扱いにくい性質によって妨げられてきた。結論として、このような製品の大きな潜在的治療価値にも拘わらず、僅かな会社しか、DCベースのがんワクチンの開発に興味を示してこなかった。

【0010】

DCの腫瘍内（IT）注射は、DCベースの免疫療法の特別な形態である。注射の際に、DCは、例えば、アポトーシス細胞もしくは死滅しつつある腫瘍細胞からインビボで抗原を取り込み、そしてリンパ節への移動後にその抗原をT細胞に提示する。実際に、動物モデルにおけるこのような処置の効力は、腫瘍におけるアポトーシスの程度と相関することが見出された（Candidoら, Cancer Res. 61:228-236, 2001）。これは、このアプローチが、DCの注射の前に化学療法剤または放射線での腫瘍の処置と完全に適合性であることを示唆する。さらに、いくつかのグループが、このような併用療法が確立された腫瘍に対して特に有効であることを示した（Nikitinaら, Int. J. Cancer 94:825-833, 2001; Tanakaら, Int. J. Cancer 101:265-269, 2002; Tongら, Cancer Res. 61:7530-7535, 2001）。

40

50

【0011】

インビボでの腫瘍細胞は、抗原の供給源であるので、IT注射は、腫瘍抗原の選択および製造の両方の必要性なしで済ませられる。なぜならIT注射は、大部分のインビトロでのDCベースの治療アプローチにおいて現在使用されているからである。腫瘍抗原の選択は、しばしば、会社が独占的な位置をもつ必要性によって活発になり、今日までに同定された数個の腫瘍抗原がなお、顕著な臨床上の利益を提供することを立証されなければならない。さらに、このような腫瘍抗原の使用はしばしば、一価ワクチンを生じ、これは、腫瘍細胞が免疫において使用される抗原の発現をダウンレギュレートする場合にその有効性を失い得る。当然のことながら、医薬品および医薬部外品の製造管理および品質管理の基準 (Good Manufacturing Practices) (GMP) の下で必要とされる条件下で腫瘍抗原を製造する必要性が、古典的なDCベースの免疫法にさらなるコストを加算する。

10

【0012】

DCのIT注射は、樹状細胞を免疫抑制性の腫瘍環境に置く。腫瘍は、DCを不活性化するかまたはT細胞応答をあまり有効でないTh2タイプ免疫応答に向かって曲げていく能力を有するサイトカインを生成することが公知である。いくつかのグループは、DCの遺伝的改変を使用して、これらの抑制効果を、特にサイトカインであるインターロイキン12の生成 (IL-12; Nishioka, Cancer Res. 59:4035-4041, 1999; Melero, Gene Therapy 6:1779-1784, 1999) またはCD40リガンドの発現 (Kikuchi, Blood 96:91-99, 2000) を通じて克服しようと試みた。これらのグループによって説明された有望な結果は、治療アプローチとしてのDCのIT注射の実現性をさらに示す。

20

【0013】

Trionzi (Cancer 89:2647-2654, 2000) は、転移性黒色腫または乳がんを有する患者におけるDCのIT注射を記載する。彼らは、黒色腫を有する4名の患者および乳がんを有する2名の患者において腫瘍退縮を得た。退縮しつつある病変の生検は、浸潤しているT細胞を示した。これは、DCが腫瘍細胞に対する免疫応答を実際に活性化したことを示唆する。全体としてこれらのデータは、DCのIT注射がヒトにおいて実現可能であり、顕著な臨床上の利益を提供し得ることを示した。しかし、注射されるDC上のMHCクラスII抗原のおよびB7-2共刺激分子の顕著なダウンレギュレーションが、観察された。これら重要な分子のダウンレギュレーションは、DCの免疫刺激可能性を低減すると予測される。

30

【0014】

このダウンレギュレーションを克服するための1つの方法は、WO 2004/053072 (本明細書に参考として援用される) に開示されている。そこでは、ダウンレギュレーションが投与する前にDCの部分的成熟化を通じて回避され得ることが見出された。この方法では、樹状細胞は、樹状細胞前駆体 (赤血球溶解後の骨髓細胞または単球性樹状細胞前駆体) を、インビトロで誘導して未成熟樹状細胞へと分化させ、その未成熟樹状細胞を誘導して、その細胞を、樹状細胞成熟化薬剤 (例えば、BCGおよびIFN)、リポポリサッカリド (LPS)、腫瘍壊死因子 (TNF)、イミダゾキノリン化合物、合成2本鎖ポリリボヌクレオチド、Toll様レセプター (TLR) のアゴニスト、DCの成熟化を誘導することが公知の非メチル化CpGモチーフを含む核酸の配列、またはこれらの任意の組み合わせとともに培養することによって、成熟化を開始した。その未成熟樹状細胞を、未成熟樹状細胞が完全に成熟することが以前に決定されたものより短い期間の間に成熟化を継続することを可能にした。樹状細胞をインビトロで完全に成熟させた場合には、その細胞を、患者への投与後に、抗原を取り込みかつプロセッシングすることは不可能であった。本発明者らは、樹状細胞が、部分的に成熟した樹状細胞の単離および患者への投与のための製剤化の前に、最適な活性化のために1~約10時間にわたって成熟せられるべきであることを開示した。

40

50

【 0 0 1 5 】

予測外なことに、樹状細胞成熟化薬剤（例えば、BCGおよびIFN ）と約10～約19時間にわたって接触させた未成熟樹状細胞が、インビボで抗原の取り込みおよびプロセッシング、ならびに被験体における抗腫瘍応答のその後の誘導に関して最適に活性化されることが決定された。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 6 】

【 特許文献 1 】 米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 1 6 0 4 3 0 号明細書

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 0 4 / 0 5 3 0 7 2 号

10

【 非特許文献 】

【 0 0 1 7 】

【 特許文献 1 】 C a n d i d o ら , C a n c e r R e s . 6 1 : 2 2 8 - 2 3 6 , 2 0 0 1

【 特許文献 2 】 N i k i t i n a ら , I n t . J . C a n c e r 9 4 : 8 2 5 - 8 3 3 , 2 0 0 1

【 特許文献 3 】 T a n a k a ら , I n t . J . C a n c e r 1 0 1 : 2 6 5 - 2 6 9 , 2 0 0 2

【 特許文献 4 】 T o n g ら , C a n c e r R e s . 6 1 : 7 5 3 0 - 7 5 3 5 , 2 0 0 1

20

【 特許文献 5 】 N i s h i o k a ら , C a n c e r R e s . 5 9 : 4 0 3 5 - 4 0 4 1 , 1 9 9 9

【 特許文献 6 】 M e l e r o ら , G e n e T h e r a p y 6 : 1 7 7 9 - 1 7 8 4 , 1 9 9 9

【 特許文献 7 】 K i k u c h i ら , B l o o d 9 6 : 9 1 - 9 9 , 2 0 0 0

【 特許文献 8 】 T r i o z z i ら , C a n c e r 8 9 : 2 6 4 7 - 2 6 5 4 , 2 0 0 0

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 8 】

30

要旨

本開示は、単離され、活性化されたヒト樹状細胞を生成するための方法を提供し、上記方法は、i) ヒトPBMCを含む細胞集団を末梢血から単離する工程；ii) ヒトPBMCを含む上記細胞集団を、ヒト単球性樹状細胞前駆体に関して富化する工程；iii) ヒト単球性樹状細胞前駆体に関して富化された上記細胞集団を、有効量の樹状細胞分化薬剤を補充した組織培養培地とともに、上記ヒト単球性樹状細胞前駆体を未成熟ヒト樹状細胞へと分化させるために十分な期間にわたって培養する工程；iv) 未成熟ヒト樹状細胞に関して富化された上記細胞集団を、有効量の樹状細胞成熟化薬剤とともに培養して、上記未成熟ヒト樹状細胞を約10～約19時間にわたって活性化する工程；ならびにv) 上記活性化されたヒト樹状細胞を単離および洗浄する工程を包含する。

40

【 0 0 1 9 】

さらなる実施形態において、単離され、活性化されたヒト樹状細胞を生成するための方法が提供され、ここで上記方法は、i) ヒト単球性樹状細胞前駆体を含む細胞集団を単離する工程；ii) ヒト単球性樹状細胞前駆体に関して富化された上記細胞集団を、有効量の樹状細胞分化薬剤を補充した組織培養培地とともに、上記ヒト単球性樹状細胞前駆体を未成熟ヒト樹状細胞へと分化させるために十分な期間にわたって培養する工程；iii) 未成熟ヒト樹状細胞に関して富化された上記細胞集団を、有効量の樹状細胞成熟化薬剤とともに培養して、上記未成熟ヒト樹状細胞を約10～約19時間にわたって活性化する工程；ならびにiv) 上記活性化されたヒト樹状細胞を単離および洗浄する工程を包含する。

50

【 0 0 2 0 】

上記方法は、皮膚、脾臓、骨髓、胸腺、リンパ節、臍帯血、または末梢血から得られる単球性樹状細胞前駆体を使用し得る。さらに、上記単球性樹状細胞前駆体は、処置される個々の被験体から、または処置される個々の被験体に H L A マッチした健康な個々の被験体から得られる。

【 0 0 2 1 】

上述の方法において、上記樹状細胞分化薬剤は、他のサイトカインなしの G M - C S F のみ、またはインターロイキン 4 (I L - 4)、インターロイキン 7 (I L - 7)、インターロイキン - 1 3 (I L - 1 3) もしくはインターロイキン 1 5 (I L - 1 5) などとの組み合わせでの G M - C S F であり得る。G M - C S F が単独で使用される代表的実施形態において、活性化されていない単球性樹状細胞前駆体を使用され、上記組織培養培地にはまた、その活性化されていない単球性樹状細胞前駆体が組織培養基材に接着するのを妨げるために、少なくとも 1 % ヒトもしくは動物タンパク質が補充される。上記ヒトまたは動物タンパク質は、アルブミン、血清、血漿、ゼラチン、ポリアミノ酸などであり得る。

10

【 0 0 2 2 】

上記方法において、上記樹状細胞成熟化薬剤は、不活性化カルメットگران桿菌 (B C G)、インターフェロン (I F N)、リポポリサッカリド (L P S)、腫瘍壊死因子 (T N F)、イミダゾキノリン化合物、合成 2 本鎖ポリリボヌクレオチド (例えば、ポリ [I] : ポリ [C (1 2) U])、T o l l 様レセプター (T L R) のアゴニスト、樹状細胞の成熟化を誘導することが公知の非メチル化 C p G モチーフを含む核酸の配列、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。上記不活性化 B C G は、全 B C G、B C G の細胞壁構成要素、B C G 由来リポアラビノマンナン、または B C G 成分を含み得、上記不活性化 B C G は、熱不活性化、ホルマリン処理、熱不活性化かつホルマリン処理などであり得る。

20

【 0 0 2 3 】

上記方法のうちの 1 つにおいて使用される場合、有効量の B C G は、約 10^5 ~ 約 10^7 c f u / ミリリットル 組織培養培地であり、有効量の I F N は、約 1 0 0 ~ 約 1 , 0 0 0 ユニット / ミリリットル 組織培養培地である。上記の方法がイミダゾキノリン化合物を使用する場合、上記化合物は、イミダゾキノリン - 4 - アミン化合物、例えば、4 - アミノ - 2 - エトキシメチル - , - ジメチル - 1 H - イミダゾール [4 , 5 - c] キノリン - 1 - 5 エタノールまたは 1 - (2 - メチルプロピル) - 1 H - イミダゾ [4 , 5 - c] キノリン - 4 - アミン、またはこれらの誘導体であり得る。

30

【 0 0 2 4 】

部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞を含む組成物は、腫瘍へと直接；上記腫瘍の外科的除去もしくは切除の後に腫瘍床へと；上記腫瘍を取り囲む組織領域へと；腫瘍領域から直接排出するリンパ節へと；上記腫瘍もしくは腫瘍罹患器官へと血液もしくはリンパを送達する循環性血管もしくは脈管に直接；または上記腫瘍もしくは腫瘍罹患器官に上記細胞が送達されるように循環系へと投与され得る。

【 0 0 2 5 】

上記方法のうちのいずれか 1 つによって生成された、部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、放射線療法、化学療法、もしくはこれらの組み合わせに対する補助的手段として投与され得る。例えば、部分的に成熟し、最適に活性化された樹状細胞は、放射線療法、化学療法、もしくはこれらの組み合わせの前に、同時に、または後に投与され得る。

40

【 0 0 2 6 】

別の実施形態において、抗腫瘍免疫応答および / または臨床的応答を生成するための方法が提供され、上記方法は、ヒト樹状細胞成熟化薬剤で約 1 0 ~ 約 1 9 時間にわたってインビトロで部分的に成熟されかつ活性化されたヒト樹状細胞に関して富化された細胞集団および薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物を投与する工程を包含し；ここで上記組

50

成物は、このような処置の必要性のある個体において、腫瘍、腫瘍床もしくは腫瘍を取り囲む組織領域へと投与される。

【 0 0 2 7 】

さらに別の実施形態において、ヒト樹状細胞成熟化薬剤とともに約 1 0 ～ 約 1 9 時間にわたって培養することによって成熟を誘導された、部分的に成熟し、かつ最適に活性化されたヒト樹状細胞を含む組成物が提供され、ここで上記部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、炎症応答と関連するサイトカインを生成する。例えば、上記サイトカインは、腫瘍壊死因子 (T N F)、インターロイキン 6 (I L - 6)、および/またはインターロイキン 8 (I L - 8) を含み得る。

(項目 1)

単離され、部分的に成熟し、かつ最適に活性化されたヒト樹状細胞を生成するための方法であって、該方法は、

i) ヒト P B M C を含む細胞集団を末梢血から単離する工程；

i i) ヒト P B M C を含む該細胞集団を、ヒト単球性樹状細胞前駆体に関して富化する工程；

i i i) ヒト単球性樹状細胞前駆体に関して富化された該細胞集団を、有効量の樹状細胞分化薬剤を補充した組織培養培地とともに、該ヒト単球性樹状細胞前駆体を未成熟ヒト樹状細胞へと分化させるために十分な期間にわたって培養する工程；

i v) 未成熟ヒト樹状細胞に関して富化された該細胞集団を、有効量の樹状細胞成熟化薬剤とともに培養して、該未成熟ヒト樹状細胞を約 1 0 ～ 約 1 9 時間にわたって活性化する工程；ならびに

v) 該活性化されたヒト樹状細胞を単離および洗浄する工程、
を包含する方法。

(項目 2)

単離され、部分的に成熟し、かつ活性化されたヒト樹状細胞を生成するための方法であって、該方法は、

i) ヒト単球性樹状細胞前駆体を含む細胞集団を単離する工程；

i i) ヒト単球性樹状細胞前駆体に関して富化された該細胞集団を、有効量の樹状細胞分化薬剤を補充した組織培養培地とともに、該ヒト単球性樹状細胞前駆体を未成熟ヒト樹状細胞へと分化させるために十分な期間にわたって培養する工程；

i i i) 未成熟ヒト樹状細胞に関して富化された該細胞集団を、有効量の樹状細胞成熟化薬剤とともに培養して、該未成熟ヒト樹状細胞を約 1 0 ～ 約 1 9 時間にわたって活性化する工程；ならびに

i v) 該活性化されたヒト樹状細胞を単離および洗浄する工程、
を包含する方法。

(項目 3)

前記単球性樹状細胞前駆体は、皮膚、脾臓、骨髓、胸腺、リンパ節、臍帯血、または末梢血から得られる、項目 2 に記載の方法。

(項目 4)

前記単球性樹状細胞前駆体細胞は、活性化されていない単球性樹状細胞前駆体である、項目 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 5)

前記単球性樹状細胞前駆体は、処置される個々の被験体から得られる、項目 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 6)

前記単球性樹状細胞前駆体は、前記処置される個々の被験体に H L A マッチした健康な個々の被験体から得られる、項目 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 7)

前記樹状細胞分化薬剤は、いかなる他のサイトカインもなしの G M - C S F、または I L - 4、I L - 7、I L - 1 3 もしくは I L - 1 5 との組み合わせでの G M - C S F であ

10

20

30

40

50

る、項目 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 8)

前記樹状細胞成熟化薬剤は、不活性化カルメットゲラン桿菌 (BCG)、インターフェロン (IFN)、リポポリサッカリド (LPS)、腫瘍壊死因子 (TNF)、イミダゾキノリン化合物、合成 2 本鎖ポリリボヌクレオチド、Toll 様レセプター (TLR) のアゴニスト、樹状細胞の成熟化を誘導することが公知の非メチル化 CpG モチーフを含む核酸の配列、またはこれらの任意の組み合わせである、項目 1 および 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 9)

前記不活性化 BCG は、全 BCG、BCG の細胞壁構成要素、BCG 由来リポアラビノマンナン、または BCG 成分を含む、項目 8 に記載の方法。

10

(項目 10)

前記不活性化 BCG は、熱不活性化 BCG、ホルマリン処理 BCG、または熱不活性化かつホルマリン処理 BCG である、項目 9 に記載の方法。

(項目 11)

前記有効量の BCG は、約 $10^5 \sim 10^7$ cfu / ミリリットル 組織培養培地であり、前記有効量の IFN は、約 100 ~ 約 1,000 ユニット / ミリリットル 組織培養培地である、項目 8 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 12)

前記イミダゾキノリン化合物は、イミダゾキノリン - 4 - アミン化合物である、項目 8 に記載の方法。

20

(項目 13)

前記イミダゾキノリン - 4 - アミン化合物は、4 - アミノ - 2 - エトキシメチル - , - ジメチル - 1 H - イミダゾール [4, 5 - c] キノリン - 1 - 5 エタノールまたは 1 - (2 - メチルプロピル) - 1 H - イミダゾ [4, 5 - c] キノリン - 4 - アミン、またはこれらの誘導体である、項目 12 に記載の方法。

(項目 14)

前記合成 2 本鎖ポリリボヌクレオチドは、ポリ [I] : ポリ [C (12) U] である、項目 8 に記載の方法。

(項目 15)

前記部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、腫瘍へと直接、該腫瘍の外科的除去または切除の後に腫瘍床へと、該腫瘍を取り囲む組織領域に、腫瘍領域から直接排出するリンパ節へと、該腫瘍もしくは腫瘍罹患器官へと血液もしくはリンパを送達する循環性脈管に直接、または該腫瘍もしくは腫瘍罹患器官に該細胞が送達されるように循環系へと投与される、項目 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

(項目 16)

前記部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、放射線療法、化学療法、もしくはこれらの組み合わせに対する補助的手段として投与される、項目 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

(項目 17)

前記活性化された樹状細胞は、放射線療法、化学療法、もしくはこれらの組み合わせの前に、同時に、または後に投与される、項目 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

(項目 18)

抗腫瘍免疫応答を生成するための方法であって、該方法は、ヒト樹状細胞成熟化薬剤とともに約 10 ~ 約 19 時間にわたってインビトロで部分的に成熟させかつ最適に活性化させたヒト樹状細胞に関して富化した細胞集団および薬学的に受容可能なキャリアを含む組成物を投与する工程を包含し；ここで該組成物は、このような処置の必要性のある個体において、腫瘍、腫瘍床もしくは腫瘍を取り囲む組織領域へと投与される、方法。

(項目 19)

未成熟樹状細胞をヒト樹状細胞成熟化薬剤とともに約 10 ~ 約 19 時間にわたって培養

50

することによって成熟を誘導された、部分的に成熟し、かつ最適に活性化されたヒト樹状細胞を含む組成物であって、ここで該部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、炎症応答と関連するサイトカインを生成する、組成物。

(項目20)

前記サイトカインは、腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン6 (IL-6)、および/またはインターロイキン8 (IL-8)である、項目19に記載の組成物。

【図面の簡単な説明】

【0028】

図面の説明

本明細書で記載される方法および組成物の前述の局面および付随する利点のうちの多くは、以下の詳細な説明を添付の図面とともに参照することによって、よりよく理解されるようになるにつれてより容易に認識される。

【0029】

【図1】図1は、各処置方法の生存プロットを示す。データ点は、月単位で測定した種々の期間で生存し続けている個体の割合を表す。

【発明を実施するための形態】

【0030】

詳細な説明

樹状細胞は、種々のリンパ性組織および非リンパ性組織で見出される抗原提示細胞の多様な集団である (Liu, Cell 106:259-262 (2001); Steinman, Ann. Rev. Immunol. 9:271-296 (1991)) を参照のこと)。樹状細胞としては、脾臓のリンパ性樹状細胞、表皮のランゲルハンス細胞、および血液循環中のペール細胞が挙げられる。まとめると、樹状細胞は、それらの形態、高レベルの表面MHCクラスII発現、ならびにT細胞、B細胞、単球、およびナチュラルキラー細胞上で発現されるある特定の他の表面マーカーの非存在に基づく群として分類される。特に、単球由来樹状細胞 (単球性樹状細胞ともいわれる) は、通常、CD11c、CD80、CD86を発現し、HLA-DR⁺であるが、CD14⁻である。

【0031】

対照的に、単球性樹状細胞前駆体 (代表的には、単球) は、通常は、CD14⁺である。単球性樹状細胞前駆体は、それらが存在する場所である任意の組織、特に、リンパ性組織 (例えば、脾臓、骨髄、リンパ節および胸腺) から得られ得る。単球性樹状細胞前駆体はまた、循環系から単離され得る。

【0032】

末梢血は、単球性樹状細胞前駆体の容易にアクセス可能な供給源である。臍帯血は、単球性樹状細胞前駆体の他の供給源である。単球性樹状細胞前駆体は、免疫応答が誘起され得る種々の生物から単離され得る。このような生物としては、動物 (例えば、ヒトおよび非ヒト動物 (例えば、霊長類、哺乳動物 (イヌ、ネコ、マウス、およびラットが挙げられる))、鳥類 (ニワトリが挙げられる))、ならびにこれらのトランスジェニックの種が挙げられる) が挙げられる。

【0033】

ある特定の実施形態において、単球性樹状細胞前駆体および/または未成熟樹状細胞は、健康な被験体から、または免疫刺激の必要性のある被験体 (例えば、がん患者または細胞性の免疫刺激が有益であり得るかもしくは望ましいことであり得る他の被験体 (すなわち、細菌感染もしくはウイルス感染、または過形成状態を有する被験体など) のような) から単離され得る。樹状細胞前駆体および/または未成熟樹状細胞はまた、部分的活性化および免疫刺激の必要性のあるHLAマッチした被験体への投与のために、HLAマッチした健康な個体から単離され得る。

【0034】

樹状細胞前駆体および未成熟樹状細胞

樹状細胞前駆体（例えば、活性化されていない樹状細胞前駆体、および種々の供給源（血液および骨髄が挙げられる）に由来する未成熟樹状細胞）に関して富化された細胞集団を単離するための方法は、当該分野で公知である。例えば、樹状細胞前駆体および未成熟樹状細胞は、ヘパリン添加血液を集めることによって、アフエレーシスもしくは白血球アフエレーシス（leukapheresis）によって、パフィーコートの調製、ロゼット形成、遠心分離、密度勾配遠心分離（例えば、Ficoll（登録商標）（例えば、FICOLL-PAQUE（登録商標））、PERCOLL（登録商標）（透析不能ポリビニルピロリドン（PVP）で被覆されたコロイド性シリカ粒子（15～30nm直径））、スクロースなどを使用）、細胞の差次的溶解、濾過などによって、単離され得る。ある特定の実施形態において、白血球集団は、例えば、被験体から血液を集め、線維素除去して、血小板を除去し、赤血球を溶解することによって、調製され得る。樹状細胞前駆体および未成熟樹状細胞は、必要に応じて、例えば、PERCOLL（登録商標）勾配を介する遠心分離、抗体パニングなどによって、単球性樹状細胞前駆体に関して富化され得る。用語「富化される」とは、本明細書で使用される場合、その細胞集団中の単球性樹状細胞前駆体、未成熟樹状細胞、または部分的に成熟した樹状細胞が、その集団中の細胞の総数のうちの少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくともその細胞集団中の細胞の総数のうちの90%すらを構成することを意味する。代表的には、上記富化された細胞は、その集団中の細胞の総数のうちの少なくとも約50%を構成する。ある特定の実施形態において、その富化された細胞は、細胞集団中の細胞の総数のうちの少なくとも約90%および約100%までを構成する。

10

20

【0035】

樹状細胞前駆体および未成熟樹状細胞は必要に応じて、閉鎖無菌系の中で調製され得る。本明細書で使用される場合、用語「閉鎖無菌系」または「閉鎖系」とは、非滅菌の、周囲の、もしくは循環する空気または他の非滅菌条件への曝露が最小限にされるかまたは排除される系をいう。樹状細胞前駆体および未成熟樹状細胞を単離するための閉鎖系は、一般に、オープントップチューブ中での密度勾配遠心分離、細胞のオープンエア移動、組織培養プレートもしくはシールされていないフラスコ中での細胞の培養などを排除する。代表的実施形態において、閉鎖系は、樹状細胞前駆体および未成熟樹状細胞を最初の収容器からシール可能な組織培養容器への無菌的移動を、非滅菌空気への曝露なしに可能にする。

30

【0036】

樹状細胞前駆体を単離するための別の報告された方法は、商業的に処理されたプラスチック基材（例えば、ビーズもしくは磁性ビーズ）を使用して、接着性の単球および他の「非樹状細胞前駆体」を選択的に除去することである（例えば、米国特許第5,994,126号および同第5,851,756号を参照のこと）。接着性の単球および非樹状細胞前駆体は、その非接着性細胞がエキソピボ培養および成熟化のために保持される間に捨てられる。別の方法では、アフエレーシス細胞は、プラスチック培養バッグ（これに、プラスチック（すなわち、ポリスチレンもしくはスチレン）のマイクロキャリアビーズがバッグの表面積を増大させるために添加された）中で培養された。

40

【0037】

細胞は、ある特定の細胞が上記ビーズに接着するために十分な期間にわたって培養され、その非接着性の細胞は、バッグから洗い流された（Maffei,ら, Transfusion 40:1419-1420 (2000); WO 02/44338（本明細書に参考として援用される））。ある特定の他の実施形態において、単球性樹状細胞前駆体は、WO 03/010292（その開示は、本明細書に参考として援用される）で開示されるように、単球結合基材への緩い接着によって単離される。例えば、白血球の集団（例えば、白血球アフエレーシスによって単離）は、単球性樹状細胞前駆体接着基材と接触させられ得る。白血球の集団がその基材と接触させられる場合、その白血球集団中の単球性樹状細胞前駆体は、その基材に優先的に接着するが、分化または成熟するように

50

は活性化されない。他の白血球（他の潜在的樹状細胞前駆体を含む）は、その基材に対する低下した結合親和性を示し、それによって、単球性樹状細胞前駆体が基材の表面上で優先的に富化されることを可能にする。

【0038】

適切な基材としては、例えば、大きな表面積 対 容積比を有するものが挙げられる。その基材は、例えば、粒状または線維性の基材であり得る。適切な粒状基材としては、例えば、ガラス粒子、プラスチック粒子、ガラス被覆プラスチック粒子、ガラス被覆ポリスチレン粒子、およびタンパク質吸着に適した他のビーズが挙げられる。本発明の方法における使用に適した線維性基材としては、マイクロキャピラリーチューブおよび微絨毛膜（microvillous membrane）などが挙げられる。粒状または線維性の基材は、代表的には、その接着した単球性樹状細胞前駆体の生存性を実質的に低減することなく、その接着した細胞が溶離されることを可能にする。粒状または線維性の基材は、単球性樹状細胞前駆体または樹状細胞の基材からの溶離を促進するために実質的に非多孔性であり得る。「実質的に非多孔性」の基材は、少なくとも、その基材に存在する孔のうちの大部分が、その基材中に細胞が捕捉されるのを最小限にするために、その細胞より小さい基材である。

【0039】

基材への単球性樹状細胞前駆体の接着は、結合媒体の添加によって必要に応じて増強され得る。適切な結合媒体としては、個々にまたは任意の組み合わせで、例えば、サイトカイン（例えば、顆粒球/マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、またはインターロイキン4（IL-4）、インターロイキン15（IL-15）、もしくはインターロイキン13（IL-13）との組み合わせでのGM-CSF）、血漿、血清（例えば、ヒト血清（例えば、自己血清もしくは同種異系血清））、精製タンパク質（例えば、血清アルブミン）、二価カチオン（例えば、カルシウムおよび/またはマグネシウムイオン）ならびに基材への単球性樹状細胞前駆体の特異的接着を補助するかもしくは基材への非単球性樹状細胞前駆体の接着を妨げる他の分子を補充した、例えば、単球性樹状細胞前駆体培養培地（例えば、AIM-V（登録商標）、RPMI 1640、DMEM、XVIVO 15（登録商標）など）が挙げられる。ある特定の実施形態において、血漿もしくは血清は、熱不活性化され得る。熱不活性化血漿は、その白血球に対して自己または異種であり得る。

【0040】

基材への単球性樹状細胞前駆体の接着の後に、接着していない白血球は、単球性樹状細胞前駆体/基材複合体から分離される。任意の適切な手段は、その接着していない細胞を複合体から分離するために使用され得る。例えば、接着していない白血球および複合体の混合物は、沈殿させられ得、その接着していない白血球および培地は、捨てられるかまたは排出され得る。あるいは、その混合物は遠心分離され得、その接着していない白血球を含む上清は、ペレット化した複合体から捨てられるかまたは排出され得る。基材への単球性樹状細胞前駆体の接着は、さらなる刺激なしで未成熟樹状細胞、成熟樹状細胞またはマクロファージへと活性化および分化するかまたは成熟化するために、単球性樹状細胞前駆体を誘導しないことに注意すべきである。

【0041】

別の方法において、活性化されていない単球性樹状細胞前駆体は、国際特許出願公開番号WO 2004/000444（2003年6月19日出願、現在は米国特許第7,695,627号（ともに本明細書に参考として援用される））に記載されるとおりの接線流濾過デバイスの使用によって調製される白血球が富化された細胞集団から単離され得る。単球性樹状細胞前駆体が富化された細胞集団の単離に有用な接線流濾過デバイスは、クロスフローチャンバ、濾液チャンバおよびその間に配置された濾材を有する除去ユニットを含み得る。その濾材は、一側の保持表面でそのクロスフローチャンバと、および他側の濾液表面でその濾液チャンバと流体連絡した状態にある。そのクロスフローチャンバは、白血球を含む血液構成要素のサンプルを、そのクロスフローチャンバへと、およびその濾

10

20

30

40

50

材の保持表面に対して平行に導入するように適合された入り口を有する。出口は、その濾材の保持表面の反対側のチャンバの一部において中心に配置されたクロスフローチャンバの中に提供される。接線流濾過デバイスにおける使用に適した濾材は、代表的には、約1～約10ミクロンの範囲に及ぶ平均孔サイズを有する。その濾材は、平均孔サイズ約3～約7ミクロンを有し得る。クロスフローチャンバの入り口への所定のサンプル投入速度を提供するための手段およびその濾材を通して濾液チャンバへの濾液の濾過速度を制御するための手段がまた、含まれ得る。その濾過速度制御手段は、その濾材に関する妨害のない(unopposed)濾過速度未満へと濾過速度を制限する。血液構成要素を含むサンプルは、供給源デバイス(例えば、白血球アフェレーションデバイスまたは白血球アフェレーションデバイスから収集したサンプルを含む容器)によって提供され得る。

10

【0042】

単球性樹状細胞前駆体およびこの前駆体に関して富化された細胞集団は、分化、ならびに部分的成熟化および/または拡大のためにエキソピボでまたはインピトロで培養され得る。本明細書で使用される場合、「単離された未成熟樹状細胞」、「樹状細胞前駆体」、および他の「細胞」とは、人の手によって、それらの天然の環境から離れて存在する、および従って、天然生成物ではない細胞をいう。単離された細胞は、精製された形態で、半精製された形態で、および/または非天然の環境で存在し得る。簡潔には、インピトロおよび/またはエキソピボでの樹状細胞分化は、代表的には、単球性樹状細胞前駆体、または樹状細胞前駆体を有する細胞集団を、1もしくはこれより多くの樹状細胞分化薬剤の存在下で培養する工程を要する。適切な分化薬剤としては、例えば、細胞増殖因子(例えば、(GM-CSF)のようなサイトカイン、またはGM-CSFおよびインターロイキン4(IL-4)、インターロイキン13(IL-13)、もしくはインターロイキン15(IL-15)、またはインターロイキン7(IL-7)の組み合わせ))が挙げられ得る。ある特定の実施形態において、単球性樹状細胞前駆体は、単球由来未成熟樹状細胞を形成するために分化される。

20

【0043】

樹状細胞前駆体は、適切なインピトロ培養条件において培養および分化され得る。適切な樹状細胞組織培養培地としては、AIM-V(登録商標)、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15(登録商標)などが挙げられるが、これらに限定されない。組織培養培地には、細胞の分化を促進するために、血清、血漿、アミノ酸、ビタミン、サイトカイン(例えば、GM-CSFおよび/またはIL-4、IL-7、IL-13、IL-15)、二価カチオンなどが補充され得る。ある特定の実施形態において、樹状細胞前駆体は、無血清培地中で培養され得る。培養条件は、いかなる動物由来生成物をも必要に応じて排除し得る。樹状細胞培養培地とともに使用される代表的なサイトカイン組み合わせは、約500ユニット/mLの、GM-CSFと、IL-4、IL-7、IL-15またはIL-13との各々を含む。活性化されていない樹状細胞前駆体を使用される代表的実施形態において、代表的な樹状細胞組織培養培地には、GM-CSFが、ある特定の条件下でいかなる他のサイトカインもなしに補充され得る。例えば、GM-CSFが単独で使用される場合、その組織培養培地にはまた、組織培養基材への活性化されていない単球性樹状細胞前駆体の接着を妨げるために、高濃度のヒトもしくは動物タンパク質が代表的には補充され、それによって、樹状細胞前駆体の成熟化が活性化される。代表的には、ヒトまたは動物タンパク質は、1%より高い濃度で添加され、代表的には、10%もしくはこれ未満の濃度で使用される。そのヒトまたは動物タンパク質は、アルブミン(例えば、ヒト血清アルブミン)、血清、血漿、ゼラチン、ポリアミノ酸などであり得る。

30

40

【0044】

樹状細胞前駆体は、未成熟樹状細胞を形成するために分化される場合、皮膚ランゲルハンス細胞に表現型が類似である。未成熟樹状細胞は、代表的には、CD14⁺およびCD11c⁺であり、低レベルのCD86およびCD83を発現し、特化したエンドサイトーシスを介して可溶性抗原を捕捉し得る。

【0045】

50

樹状細胞成熟化薬剤としては、例えば、BCG、IFN、LPS、TNF、イミダゾキノリン化合物、例えば、イミダゾキノリン-4-アミン化合物（例えば、4-アミノ-2-エトキシメチル-、-ジメチル-1H-イミダゾール[4,5-c]キノリン-1-エタノール（R848と称される）または1-（2-メチルプロピル）-1H-イミダゾ[4,5-c]キノリン-4-アミン、およびこれらの誘導体（例えば、WO2000/47719（その全体において本明細書に参考として援用される）を参照のこと）、合成2本鎖ポリリボヌクレオチド（例えば、ポリ[I]：ポリ[C(12)U]など、Toll様レセプター（TLR）のアゴニスト（例えば、TLR-3、TLR-4、TLR-7および/またはTLR-9）、DCの成熟化を誘導することが公知の非メチル化CpGモチーフを含む核酸の配列など、あるいはこれらの任意の組み合わせが挙げられ得るが、これらに限定されない。有効量のBCGは、代表的には、不活性化前に、約 $10^5 \sim 10^7$ cfu/ミリリットル 組織培養培地に等価な範囲に及ぶ。有効量のIFNは代表的には、約100～約1000 U/ミリリットル 組織培養培地の範囲に及ぶ。

【0046】

カルメットゲラン桿菌（BCG）は、*Mycobacterium bovis*の無毒性（avirulent）株である。本明細書で使用される場合、BCGとは、全BCGならびに細胞壁構成要素、BCG由来リボアラビノマンナン、および他のBCG成分をいう。BCGは、必要に応じて不活性化される（例えば、熱不活性化BCG、ホルマリン処理BCG、または熱および他の不活性化方法の組み合わせによるものなど）。有効量のイミダゾキノリン化合物、例えば、イミダゾキノリン-4-アミン化合物（例えば、4-アミノ-2-エトキシメチル-、-ジメチル-1H-イミダゾール[4,5-c]キノリン-1-エタノール（R848と称される））は、約1～約50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培養培地であり得、より代表的には、5～約10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 培養培地が使用される。イミダゾキノリン化合物は、単独で使用され得るか、あるいは例えば、BCGおよび/またはIFN、またはさらなるTLRアゴニストと併用され得る。

【0047】

未成熟DCは、代表的には、成熟化を誘導しそして最適に活性化するが、樹状細胞を完全には成熟させないように、有効量の樹状細胞成熟化薬剤（例えば、BCGおよびIFN）と約10時間～約19時間にわたって接触させられる。代表的には、少なくとも24時間のインキュベーション期間は、BCGおよびIFNが樹状細胞を成熟させるために使用される場合、完全な成熟化のために必要とされ得、そして使用される樹状細胞成熟化薬剤に依存して、約48～約72時間の代表的なインキュベーション期間は、完全な成熟化のために必要とされ得る。ある特定の実施形態において、その期間は、約10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、および約19時間までであり得る。より代表的な実施形態において、樹状細胞の部分的成熟化および最適な活性化のためのその期間は、約15～約18時間、約15～約17時間、または特定の実施形態では、約16時間であり得る。その未成熟樹状細胞は、適切な成熟化培養培地中で、培養され得、部分的に成熟、および最適に活性化され得る。適切な組織培養培地としては、AIM-V（登録商標）、RPMI 1640、DMEM、X-VIVO 15（登録商標）などが挙げられるが、これらに限定されない。組織培養培地には、細胞の成熟化の誘導を促進するために、アミノ酸；ビタミン；サイトカイン（例えば、GM-CSF単独（例えば、米国特許第8,389,278号（その全体において本明細書に参考として援用される）を参照のこと）またはIL-4、IL-7、IL-13、もしくはIL-15との組み合わせでのGM-CSF）；二価カチオンなどが補充され得る。代表的なサイトカインは、GM-CSF単独と高濃度のヒトもしくは動物タンパク質であり得るか、または組み合わせで使用される場合のGM-CSFは、約500ユニット/ml～約1000ユニット/mlのGM-CSFの濃度で使用され、100 ng/mlのIL-4、IL-13、もしくはIL-15が使用される。

【0048】

未成熟樹状細胞の部分的成熟化および最適な活性化は、樹状細胞に関して当該分野で公

10

20

30

40

50

知の方法によってモニターされ得る。細胞表面マーカーは、当該分野でよく知られたアッセイ（例えば、フローサイトメトリー、免疫組織化学など）で検出され得る。その細胞はまた、サイトカイン生成に関して（例えば、ELISA、別の免疫アッセイによって、またはオリゴヌクレオチドアッセイの使用によって）モニターされ得る。樹状細胞成熟化薬剤（例えば、BCGおよびINFが挙げられるが、これらに限定されない）の存在下で本記載に従って培養され、および部分的に成熟し、かつ最適に活性化されたDCでは、未成熟樹状細胞と比較した場合に増大したレベルのリン酸化JAK2（*janus activated kinase 2*）が、当該分野で周知の方法によって成熟化の開始を示すために測定され得る。細胞表面マーカーおよびサイトカインの発現の誘導、ならびにシグナル伝達分子（例えば、*jak2*）のリン酸化はまた、樹状細胞が一旦個体に投与された後に、樹状細胞がインビボでの抗原の取り込みおよび免疫応答の誘導に関して調節される指標として公知である。

【0049】

本発明の方法は、未成熟樹状細胞の成熟化を開始する、および樹状細胞を部分的に成熟させ、そして最適に活性化するために必要な期間にわたってのみ、未成熟樹状細胞を成熟化条件に供する工程を包含する。有効量のBCGおよび有効量のINFとともに約10～19時間というインキュベーション期間が、被験体に投与するために、薬学的に受容可能なキャリアと組み合わされた場合に組成物として使用するための樹状細胞を部分的に成熟させ、最適に活性化することが見出された。完全に成熟したDCは、抗原を取り込み、共刺激細胞表面分子および種々のサイトカインのアップレギュレートされた発現を示す能力を失う。具体的には、成熟したDCは、未成熟樹状細胞より高いレベルのMHCクラスIおよびIIの抗原を発現し、そして成熟した樹状細胞は一般に、CD80⁺、CD83⁺、CD86⁺、およびCD14⁺であると同定される。より高いMHC発現は、DC表面上での抗原密度の増大をもたらす一方で、共刺激分子であるCD80およびCD86のアップレギュレーションは、共刺激分子の対応物（例えば、T細胞上のCD28）を介してT細胞活性化シグナルを強化する。本開示で使用されるとおりの部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、代表的には、樹状細胞成熟化薬剤へと一旦曝露された後、未成熟樹状細胞と比較した場合に、細胞表面上の共刺激分子の発現においてアップレギュレーションを示すそれら樹状細胞を含む。これらの共刺激分子としては、CD80、CD86および/またはCD54が挙げられるが、これらに限定されない。上記細胞は、CD83を発現し得るか、または発現しなくてもよいが、上記細胞は、樹状細胞の表面での提示のために抗原を取り込んでプロセッシングする能力を維持する。本出願の方法のうちの一実施形態において、部分的に成熟した樹状細胞は、投与後に抗原に曝される。さらに、部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、未成熟樹状細胞によって顕著な量では代表的には生成されない、TNF- α 、IL-6、IL-8、IL-10および/またはIL-12のうちの1種もしくはこれより多くを生じ得る。1つの特定の実施形態において、有効濃度のBCGおよびINFの両方と約16時間接触させた部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、24時間の期間で149 ng / 100万個 樹状細胞を生成した。その同じ濃度のBCGおよびINFと接触した未成熟樹状細胞は、24時間で50 ng / 100万個 細胞のみを生成した。

【0050】

完全に成熟した樹状細胞は、本発明の方法および組成物に関して好ましくない。なぜならそれらが一旦完全に成熟した後は、その細胞はもはや効率的に抗原をプロセッシングしないからである。さらに、成熟化を始めるように誘導されなかった先行技術の方法で使用されるとおりの未成熟樹状細胞は、望ましくない。なぜなら腫瘍内で、または腫瘍を取り囲む組織中で代表的には見出される免疫抑制環境は、未成熟樹状細胞による抗原のプロセッシングを妨げることが公知のサイトカインの実質的な濃度を含むからである。本開示において、未成熟樹状細胞の部分的成熟化および最適な活性化は、細胞の表面上のサイトカインレセプターをダウンレギュレートして、腫瘍内空間、または取り囲む組織に存在するサイトカインの任意の免疫抑制効果にあまり感受性でないようにするまたは応答性でないよう

10

20

30

40

50

にし、そして腫瘍内空間もしくは取り囲む組織内に存在する抗原を効率的に取り込みかつプロセッシングし得る細胞を提供する。その樹状細胞は、腫瘍内空間内でもしくは取り囲む組織中に見出されるアポトーシス細胞および死滅しつつある腫瘍細胞に由来する実質的な量の腫瘍抗原を取り込み、プロセッシングする。その投与した部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞が一旦、例えば、ケモカインレセプターCCR7の発現によって測定されるように腫瘍内空間内で有効に成熟された後、その樹状細胞は、抗原を提示している樹状細胞がT細胞、特に、ナイーブT細胞と接触して、当該樹状細胞によって提示される任意の腫瘍抗原に対する免疫応答をアップレギュレートする場所であるリンパ節へと移動する。

【0051】

本説明のさらに別の局面によれば、本開示の種々のDCは、例えば、単球性樹状細胞前駆体、成熟化の前の未成熟樹状細胞として低温保存によって、または薬学的に受容可能なキャリアとの組み合わせにおいてまたはそのキャリアなしのいずれかで部分的成熟化後に、保存され得る。使用され得る低温保存薬剤としては、ジメチルスルホキシド(DMSO)、グリセロール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、アルブミン、デキストラン、スクロース、エチレングリコール、i-エリスリトール、D-リビトール、D-マンニトール、D-ソルビトール、イノシトール、D-ラクトース、コリンクロリド、アミノ酸、メタノール、アセトアミド、グリセロールモノアセテート、および無機酸が挙げられるが、これらに限定されない。コントロールされ、ゆっくりとした冷却速度が、重要であり得る。種々の低温保護剤および種々の細胞タイプは、代表的には、種々の最適な冷却速度を有する。

【0052】

水が氷へと変化する融合相の熱は、代表的には、最小であるべきである。冷却手順は、例えば、プログラム可能な冷凍デバイスまたはメタノールバス手順の使用によって行われ得る。プログラム可能な凍結装置は、最適な冷却速度の決定を可能にし、標準的な再現可能な冷却を容易にする。プログラム可能な、制御された速度の冷凍庫(例えば、Cryomed(登録商標)またはPlanar(登録商標))は、凍結レジメンを所望の冷却速度曲線に調節することを可能にする。

【0053】

完全な凍結の後に、薬学的に受容可能なキャリアありまたはなしのいずれかでの単球性前駆体細胞、未成熟DCまたは部分的に成熟したDCは、長期低温貯蔵容器へと迅速に移され得る。代表的実施形態において、サンプルは、液体窒素(-196)またはその蒸気(-165)中で低温貯蔵され得る。造血幹細胞(特に、骨髄または末梢血に由来)の操作、低温貯蔵、および長期貯蔵に関する考慮事項および手順は、本説明の細胞にたいして適用可能である。このような考察は、例えば、以下の参考文献(本明細書に参考として援用される)に見出され得る: Taylorら, Cryobiology 27: 269-78 (1990); Gorin, Clinics in Haematology 15: 19-48 (1986); Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, Jul. 22-26, 1968, International Atomic Energy Agency, Vienna, pp. 107-186。

【0054】

凍結した細胞は、好ましくは、迅速に融解され(例えば、37~41で維持したウォーターバス中で)、融解したら直ぐに冷却される。融解した際に細胞凝集化を妨げるために細胞を処理することは、望ましいことであり得る。凝集化を妨げるために、種々の手順が使用され得る(DNase(Spitzerら, Cancer 45: 3075-85 (1980)、低分子量デキストランおよびシトレート、ヒドロキシエチルデンプン(Stiffら, Cryobiology 20: 17-24 (1983))などの凍結の前および/または後の添加が挙げられるが、これらに限定されない)。低温

10

20

30

40

50

保護剤は、ヒトにおいて毒性である場合には、その融解した部分的に成熟したDCの治療的使用の前に除去されるべきである。低温保護剤を除去する一方法は、微々たる濃度へと希釈することによる。凍結された単球性樹状細胞前駆体、未成熟樹状細胞、または部分的に成熟したDCが、一旦融解および回復された後、それらは、次いで、製剤化された薬学的生成物を生成するためのさらなる方法において使用され得る。その製剤化された部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、凍結されていない部分的に成熟し、かつ最適に活性化されたDCに関して本明細書で記載されるように投与され得る。

【0055】

部分的に成熟した樹状細胞のインビボ投与

部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞、またはこのような細胞を富化して含む細胞集団を、例えば、がんまたは腫瘍を有する被験体に投与するための方法および組成物が、提供される。ある特定の実施形態において、このような方法は、樹状細胞前駆体または未成熟樹状細胞を得、樹状細胞成熟化薬剤（例えば、BCGおよびIFN）または任意の他の樹状細胞成熟化薬剤（例えば、上記で列挙されるもの）の存在下でそれら細胞を分化および部分的に成熟させることによって行われる。その部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、生理学的に受容可能なキャリア、賦形剤、緩衝液および/または希釈剤とともに、当業者に周知の方法および組成物を使用して製剤化され得る。その部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、免疫刺激の必要性のある被験体へと直接投与され得る。代表的には、約 10^2 ~ 約 10^{10} 細胞が、薬学的に受容可能なキャリア中に懸濁される。その細胞は、腫瘍へと直接、あるいは、腫瘍もしくは腫瘍床の近くの領域、腫瘍もしくは腫瘍床と隣接する領域、または腫瘍もしくは腫瘍床との循環性もしくはリンパ性の接触にある領域へのいずれかに注射され、その細胞ががんもしくは腫瘍抗原へのアクセスを有することが担保される。

【0056】

例えば、限定ではなく、その細胞は、腫瘍へと直接、その腫瘍の外科的除去または切除後に腫瘍床へと、腫瘍周囲空間へと、その腫瘍と直接接触した状態にある排出リンパ節へと、腫瘍もしくはその腫瘍に罹患した器官へと繋がるまたはその腫瘍もしくは器官に供給する血管またはリンパ管（例えば、門脈または肺静脈もしくは肺動脈など）へと、投与され得る。本開示の部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞の投与は、腫瘍のための他の処置（例えば、化学療法または放射線療法）と同時またはその後のいずれかであり得る。さらに、本開示の部分的に成熟した樹状細胞は、別の薬剤と共投与され得、その薬剤は、樹状細胞の成熟化および/あるいは腫瘍内またはその腫瘍付近もしくは隣接した領域の抗原のプロセッシングの補助的手段として作用し得る。さらに、その樹状細胞はまた、腫瘍もしくは腫瘍床の中またはその周りの領域へと埋め込むための徐放性マトリクスへと製剤化または配合され得、その結果、その細胞が、腫瘍抗原との接触のために、腫瘍または腫瘍床へとゆっくりと放出される。

【0057】

本開示で使用される場合、腫瘍としては、固形腫瘍（例示であって限定ではないが、肉腫；脾臓腫瘍；結腸直腸腫瘍；黒色腫；肺腫瘍；乳房腫瘍；卵巣腫瘍；頭頸部腫瘍；胃の腫瘍；前立腺腫瘍；食道腫瘍；子宮頸部もしくは膣の腫瘍；脳腫瘍（例えば、膠芽腫、星状細胞腫、髄膜腫、または髄芽腫）などが挙げられる。さらなる固形腫瘍もまた、本明細書で開示される組成物または方法を使用する処置の対象である。

【0058】

本開示の部分的に成熟し、かつ最適に活性化された樹状細胞は、製剤および投与様式に対して適切な任意の手段によって投与され得る。例えば、細胞は、薬学的に受容可能なキャリアと合わせられ得、シリンジ、カテーテル、カニューレなどで投与され得る。上記のように、その細胞は、徐放性マトリクスの中で製剤化され得る。この様式で投与される場合、その製剤は、使用されるマトリクスに適した手段によって投与され得る。本説明に適用可能な他の方法および投与様式は、当業者に周知である。

【0059】

10

20

30

40

50

本説明の組成物は、個体の処置において単独で使用され得る。さらに、その組成物は、がんまたは腫瘍を処置するために任意の他の方法と組み合わせて使用され得る。例えば、本記載の方法は、腫瘍の外科的切除、化学療法（細胞傷害性薬物、アポトーシス性薬剤、抗体など）、放射線療法、凍結療法、小線源療法、免疫療法（抗原特異的成熟活性化樹状細胞、NK細胞、がん細胞または腫瘍抗原に特異的な抗体の投与など）などと組み合わせて使用され得る。これらの方法のうちのいずれかおよび全ては、任意の組み合わせでも使用され得る。併用処置は、同時または逐次的であり得、処置する臨床医によって決定されるとおりの任意の順序で投与され得る。

【0060】

別の実施形態において、樹状細胞およびレシピエント被験体は、同じMHC（HLA）ハプロタイプを有する。被験体のHLAハプロタイプを決定するための方法は、当該分野で公知である。関連実施形態において、部分的に成熟した樹状細胞は、レシピエント被験体に対して同種異系である。その同種異系細胞は、代表的には、少なくとも1つのMHC対立遺伝子（例えば、少なくとも1つを共有するが、全てのMHC対立遺伝子を共有するわけではない）に関して適合される。それほど代表的ではない実施形態では、その樹状細胞およびレシピエント被験体は、互いに対して全て同種異系であるが、全てが少なくとも1つのMHC対立遺伝子を共通して有する。

10

【0061】

抗腫瘍免疫応答は、任意の1つもしくはこれより多くの周知の方法によって測定され得る。例えば、抗腫瘍応答は、腫瘍のサイズの縮小、腫瘍細胞死もしくは腫瘍細胞壊死の誘導、腫瘍細胞増殖の低減によって、または腫瘍抗原特異的T細胞（TIL）の浸潤などによって測定され得る。

20

【実施例】

【0062】

以下の実施例は、本説明の種々の局面の例証として提供されるに過ぎず、本明細書で開示される方法および組成物を限定するとは如何様にも解釈されるべきではない。その方法の好ましい実施形態および/または方法は、例証されかつ記載されてきたが、種々の変更が本説明の趣旨および範囲から逸脱することなくそこで行われ得ることは認識される。

【0063】

本実施例では、血液サンプルから得られる未成熟樹状細胞を、がん（例えば、固形組織腫瘍である腫瘍（例えば、肉腫、脾臓腫瘍、結腸直腸腫瘍、黒色腫、乳房腫瘍；肺腫瘍；および卵巣腫瘍などが挙げられるが、これらに限定されない）を有する患者から単離し、未成熟樹状細胞を、GM-CSF単独を補充した樹状細胞培養培地中で培養し、不活性化BCGおよびIFNで16時間または20時間のいずれかにわたって成熟を誘導し、その後収集して患者への投与のために調製した。約16時間にわたって部分的に成熟し、活性化した樹状細胞は、BCGおよびIFNと約20時間にわたって接触させた樹状細胞より患者において実質的により良好な臨床応答を誘導することが見出された。

30

【0064】

患者を白血球アフエーシスに供し、およそ10リットルまたは2血液容積を収集の間に加工処理した。血漿率を調節して、白血球アフエーシス生成物に対しておよそ2%の目標ヘマトクリットを得た。その白血球アフエーシス生成物を、接線流濾過（TFF）によって、単球の単離および精製のために加工処理した。白血球アフエーシスサンプル、代表的には、血液バッグを、TFF装置に連結し、そのサンプルを加工処理し、富化された単球性樹状細胞前駆体生成物を、培養培地（フェノールレッド非含有RPMI-1640）中に懸濁し、組織培養バッグ中で得た。

40

【0065】

組換えヒトGM-CSF（500 U/ml）を補充した培養培地を、その富化された活性化されていない単球性樹状細胞前駆体生成物に添加し、その細胞を、5日間の培養のためにインキュベーター中に置いた。5日間の培養の間に、その単球性樹状細胞前駆体は、未成熟樹状細胞へと転換した。このインキュベーションの後に、熱で死滅させたBCG

50

(1:300 希釈 v/v またはおよそ 1 (1) 個の BCG 粒子 / 生きている樹状細胞) および インターフェロン (500 ~ 1,000 U/ml) を、その未成熟樹状細胞に添加し、そのバッグを、樹状細胞活性化のために、さらに 16 ~ 20 時間にわたってインキュベーターへと戻した。この期間は、未成熟樹状細胞を成熟した樹状細胞へと完全に転換するには不十分であった。

【0066】

樹状細胞活性化の後、その組織培養バッグを攪拌し、その内容物を 250 ml のコニカル遠心チューブへと捨てた。冷 dPBS をそのバッグに添加し、任意に残っている接着性の細胞を、そのバッグを手動で揉むことによって移動させた。この洗浄物を、最初の細胞懸濁物とともにプールし、その細胞を、550 x g での遠心分離によってペレット化した。その活性化した樹状細胞を、少量の RPMI - 1640、40% ヒト血清アルブミン および 10% DMSO 中に再懸濁した。その活性化した樹状細胞を、 3×10^6 、 8×10^6 、 1.7×10^6 の生きている樹状細胞 / バイアルのアリコートにして 1.0 ml / バイアルで凍結した。注射容積 / バッチを、1 回の注射あたり合計 200 万個、600 万個または 1500 万個の生きている樹状細胞を送達するために必要であれば調節した。注射のためのアリコートを調製するために、バイアルを気相液体窒素貯蔵から移し、20 ~ 25 で 5 ~ 10 分間置いた。これは、その内容物の完全な融解には十分な時間である。そのバイアルを開け、1 ml の生成物を、シリンジを使用して無菌的に移した。シリンジの中に空気を吸引して、針が空であり、その後針が外されることを担保した。適切な注射針を、次いで、そのシリンジに取り付けた。その生成物を注射針へと押し戻した。次いで、リアルタイム超音波もしくは断続的なガイダンスの下で (MRI または CT)、またはマルチモード組み合わせを使用して腫瘍に接近した。生成物投与の間に、1 本の針を、腫瘍の周縁部内にあるように画像化の下でガイドした。一旦配置が確認された後に、所定の容積の最初の注射 (例えば、0.2 ml 各注射) を、4 回の注射が使用される場合に、腫瘍内に注射した。

【0067】

40 名の患者を、本研究に登録した。大部分の患者は、例えば、活発に進行している癌を有して、他の治療に失敗したときに参加した。患者を、各投与後 2 時間にわたって急性毒性に関して、ならびに最後の免疫後 30 日間にわたって毒性および自己免疫の臨床上的および実験的徴候に関して観察した。インビトロでの免疫学的評価を、免疫応答を評価するために行った。疾患進行を、身体検査の測定値、X線撮影手段および腫瘍生検によって測定して、腫瘍応答および再発を評価した。よって、腫瘍増殖の安定化は、プラス方向の転帰と考えられた。

【0068】

第 1 の免疫を、白血球アフェレーシスのおよそ 3 ~ 4 週間後に与えた。最初の 3 回の注射を、1 週間の間隔で (すなわち、0 日目、1 週間目、2 週間目) で与え、次いで、8 週間目、16 週間目および 32 週間目に、または生成物が利用可能である限り、および注射可能な腫瘍塊が同じ部位に存在する限りに関しては、与えた。元の注射部位において十分な腫瘍塊があった場合は、異なる位置での腫瘍塊を使用した。患者には、16 時間 (方法 B) または 20 時間 (方法 A) にわたって活性化した樹状細胞のいずれかを提供した。各通院時に 1 個の腫瘍に注射し、患者を、腫瘍増殖、生存、腫瘍細胞死滅 (壊死) および免疫細胞の浸潤に関してモニターした。各時点で生きている個体の割合を、図に提供する。腫瘍増殖を、標準的な画像化技術 (CT または MRI のいずれか) を使用して測定した。

【表 1】

表1. 腫瘍増殖の測定

	全体	方法A	方法B
SD ¹ 8週目	20	4	16

1) SD: 安定な疾患

患者数は、欠けているデータが原因で40名まで追加しない。疾患安定化は、この集団において良好な転帰である。

【表 2】

表2. 生存の測定

	全体	方法A	方法B
生存	24	5	19

ステージ4のがんは、生命を脅かす状態であり、生存は重要なエンドポイントである。

【表 3】

表3. 腫瘍壊死を示す患者数

全体	方法A	方法B
16 患者	4 患者	12 患者

【0069】

腫瘍壊死を、標準的なヘマトキシリン/エオシン染色を使用して腫瘍生検に関して評価した。

【0070】

方法B(16時間処理)によって調製した樹状細胞は、次善の方法で調製した樹状細胞より多くのTNFを生成する: 平均149 ng / 100万 DC / 24時間 対 50 ng / 100万 DC / 24時間。TNFは、翻って、8週間目での安定な疾患(SD)と関連する(上記の表1を参照のこと)。SDは、より良好な生存の推定因子である(上記の表2を参照のこと)。

【0071】

データは、16時間処理(方法B)が、がん免疫療法における腫瘍内注射のための部分的に成熟したDCの活性化に最適であることを示す。

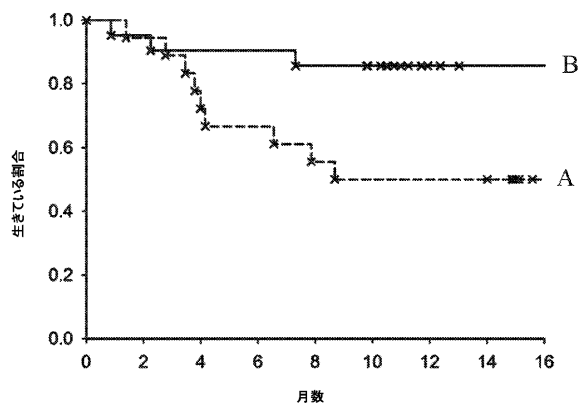
排他的所有権もしくは権利が特許請求される本発明の実施形態は、以下のとおり規定される:

10

20

30

【図 1】

**FIG. 1**

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/0786 (2010.01) C 1 2 N 5/0786

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ボッシュ, マーニックス エル.
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 0 3 9 , メディナ, ノースイースト 1 4 ティーエイチ
ストリート 7 8 1 4

審査官 西垣 歩美

(56)参考文献 特表 2 0 0 2 - 5 3 6 0 1 3 (J P , A)
特開 2 0 1 5 - 1 0 7 1 3 3 (J P , A)
特表 2 0 0 6 - 5 1 9 0 2 1 (J P , A)
特表 2 0 0 6 - 5 1 0 6 6 7 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 4 / 1 4 9 8 7 1 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8

A 6 1 K 3 5 / 1 5

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 4 3 / 0 0

A 6 1 P 3 7 / 0 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)