(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2004-526731
(P2004-526731A)
(43)公表日　平成16年9月2日(2004.9.2)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
A61K 35/12	A61K 35/12		4B065
A61K 48/00	A61K 48/00		4C084
A61P 35/00	A61P 35/00		4C087
C12N 5/10	C12N 5/00	B	

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 54 頁）

(21)出願番号　特願2002-573045(P2002-573045)
(86)(22)出願日　平成14年3月8日(2002.3.8)
(85)翻訳文提出日　平成15年9月16日(2003.9.16)
(86)国際出願番号　PCT/EP2002/002595
(87)国際公開番号　WO2002/074338
(87)国際公開日　平成14年9月26日(2002.9.26)
(31)優先権主張番号　101 12 851.7
(32)優先日　平成13年3月16日(2001.3.16)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)
(81)指定国　EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),JP,US

(71)出願人　597121382
ゲーエスエフ　フォーシュングスツェントラム　フュール　ウンヴェルト　ウント　ゲズントハイト　ゲーエムベーハー
ドイツ連邦共和国　Ｄ－８０８０７　ミュンヘン
(74)代理人　100068755
弁理士　恩田　博宣
(74)代理人　100105957
弁理士　恩田　誠
(72)発明者　シェンデル、ドロレス
ドイツ連邦共和国　８０４６９　ミュンヘン　ハンス－ザクス－シュトラーセ　１２　フィア

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞を含有する半同種異系抗腫瘍ワクチン

(57)【要約】
本発明は、腫瘍細胞内で過剰発現されるか、あるいは自己腫瘍細胞または様々な腫瘍細胞株から誘導されたタンパク質および／またはペプチド、あるいは前記タンパク質および／またはペプチドをコードするＲＮＡまたはＤＮＡまたはｃＤＮＡが導入された半同種異系抗原提示細胞に関する。本発明は、半同種異系の抗原提示細胞の製造方法、ならびに腫瘍疾病の治療のためのそれらの用途に関する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
腫瘍細胞内で過剰発現されるか、もしくは自己腫瘍細胞から誘導されたタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが、腫瘍疾病の治療のために導入されている半同種異系抗原提示細胞の用途。
【請求項２】
前記腫瘍細胞は、好ましくは卵巣、乳房および腎細胞癌腫のような癌腫の細胞、好ましくは白血病およびリンパ腫の細胞のような造血系の腫瘍細胞、好ましくは肉腫のような間葉性腫瘍の細胞、上皮腫瘍の細胞、好ましくは黒色腫のような外胚葉腫瘍の細胞、ならびに好ましくは芽球腫および奇形腫のような未分化組織からの胚芽腫の細胞を含むことを特徴とする請求項１に記載の用途。
【請求項３】
前記半同種異系抗原提示細胞は、好ましくは卵巣、乳房および腎細胞癌腫のような癌腫、好ましくは白血病およびリンパ腫のような造血系の腫瘍、好ましくは肉腫のような間葉性腫瘍、上皮腫瘍、好ましくは黒色腫のような外胚葉腫瘍、ならびに好ましくは芽球腫および奇形腫のような未分化組織からの胚芽腫を含む腫瘍の治療のために用いられることを特徴とする請求項２に記載の用途。
【請求項４】
２つの異なる半同種異系個体の半同種異系抗原提示細胞が用いられることを特徴とする請求項１～３のいずれか１項または複数項に記載の用途。
【請求項５】
自己腫瘍細胞からｃＤＮＡに逆転写し、該ｃＤＮＡをＰＣＲによって増幅した後に該ｃＤＮＡをＲＮＡに転写して得られたＲＮＡが用いられることを特徴とする請求項４に記載の用途。
【請求項６】
前記半同種異系抗原提示細胞は、静脈内、皮下または筋肉内経路によって投与されることを特徴とする請求項１～５のいずれか１項または複数項に記載の用途。
【請求項７】
腫瘍細胞内で過剰発現されるか、もしくは自己腫瘍細胞から誘導されたタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをそれぞれコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが、組換え技術により導入されている前記半同種異系抗原提示細胞の用途。
【請求項８】
腫瘍明示化抗原をコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが半同種異系抗原提示細胞に導入されていることを特徴とし、該腫瘍明示化抗原は、腫瘍細胞内で過剰発現される抗原であって、好ましくは、腫瘍遺伝子（好ましくはＨＥＲ２／ｎｅｕ）、腫瘍に増殖優位性を与えるか腫瘍の生存を保証するかの少なくともいずれかの作用を有するタンパク質（好ましくはＰＳＭＡ）、細胞周期調節タンパク質、転写因子（好ましくはＷＴ‐１）、ムチン（好ましくはＭＵＣ‐１）、細胞分裂の調節に関与するタンパク質（好ましくはテロメラーゼ）から選択される、請求項１～７のいずれか１項または複数項に記載の用途。
【請求項９】
前記抗原提示細胞は樹状細胞またはマクロファージであることを特徴とする請求項１～８のいずれか１項または複数項に記載の用途。
【請求項１０】
いくつかの異なる腫瘍細胞株由来のタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが、腫瘍疾病の治療のために導入されている半同種異系抗原提示細胞の用途。

【請求項１１】
２つまたは３つの異なる腫瘍細胞株からプールされたｃＲＮＡが導入されていることを特徴とする請求項１０に記載の用途。
【請求項１２】
腫瘍疾病の治療のための半同種異系抗原提示細胞の調製方法であって、腫瘍細胞内で過剰発現されるか、もしくは自己腫瘍細胞から誘導されたタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが、半同種異系抗原提示細胞に導入されることを特徴とする方法。
【請求項１３】
腫瘍疾病の治療のための半同種異系抗原提示細胞の調製方法であって、いくつかの異なる腫瘍細胞株由来のタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをそれぞれコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが、半同種異系抗原提示細胞に導入されることを特徴とする方法。
【請求項１４】
最初に腫瘍細胞由来のＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写し、該ｃＤＮＡをＰＣＲによって増幅し、続いて該ｃＤＮＡをＲＮＡに転写することを特徴とする請求項１２または１３に記載の方法。
【請求項１５】
２つの異なる半同種異系個体の抗原提示細胞が用いられることを特徴とする請求項１２～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
請求項１２～１５に記載の方法によって得ることのできる半同種異系抗原提示細胞。
【請求項１７】
腫瘍細胞内で過剰発現されるか、もしくは自己腫瘍細胞から誘導されたタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをそれぞれコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡを含有する半同種異系抗原提示細胞。
【請求項１８】
前記腫瘍細胞内で過剰発現されるか、もしくは自己腫瘍細胞から誘導されたタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡは、好ましくは卵巣、乳房および腎細胞癌腫のような癌腫、好ましくは白血病およびリンパ腫の細胞のような造血系の腫瘍、好ましくは肉腫のような間葉性腫瘍の細胞、上皮腫瘍の細胞、好ましくは黒色腫のような外胚葉腫瘍の細胞、ならびに好ましくは芽球腫および奇形腫のような未分化組織からの胚芽腫の細胞から選ばれることを特徴とする請求項１７に記載の半同種異系抗原提示細胞。
【請求項１９】
いくつかの異なる腫瘍細胞株由来のタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡを含有する半同種異系抗原提示細胞。
【請求項２０】
前記抗原提示細胞は、樹状細胞またはマクロファージであることを特徴とする請求項１６～１９に記載の半同種異系抗原提示細胞。
【請求項２１】
請求項１６～２０のいずれか１項に記載の半同種異系抗原提示細胞を含有する医薬組成物。
【請求項２２】
ワクチンであることを特徴とする請求項２１に記載の組成物。
【発明の詳細な説明】

【技術分野】
【０００１】
本発明は、腫瘍細胞内で過剰発現され、もしくは腫瘍細胞から誘導されたタンパク質およびペプチドの少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドの少なくともいずれかをコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが導入された半同種異系（Semi-allogene）抗原提示細胞に関する。さらに、本発明は、上記半同種異系抗原提示細胞を製造するための方法、ならびに腫瘍疾病の治療におけるそれらの用途に関する。
【背景技術】
【０００２】
細胞性免疫反応が、例えば転移性腎細胞癌（ｍＲＣＣ）などの腫瘍疾病の場合に、腫瘍負荷を顕著に減少させ、患者の生存を顕著に延ばすことがあることが、最近の３つの開発から示唆されている。臨床データは、すでにｍＲＣＣの場合での成功を実証しているが、同様の原理を他の腫瘍に転用することも検討されている。以下、本発明の手法の基礎をなす３つの開発について説明する。
Ｉ．転移性腎細胞癌の治療に対する同種異系骨髄移植
同種異系骨髄移植を受けた転移性腎細胞癌患者は、全ケースの５３％において完全または部分的に寛解を達成しうる（１）。平均余命は数ヶ月から数年へと顕著に増加しうる。重大な腫瘍負荷を取り除くことができる一方で、患者の５３％は対宿主性移植片病（ＧＶＤＨ）を発症し、ＧＶＤＨに関係する死亡率は５％である。
【０００３】
腫瘍退縮のメカニズムは、おそらく、同種異系の骨髄移植（ＢＭＴ）後の血液悪性腫瘍の除去に伴うメカニズムと類似している（２）。活性化されたＴリンパ球は、腫瘍細胞内で発現されるタンパク質から誘導されたペプチドと、ＭＨＣ分子（クラスＩとクラスＩＩ型の両方）とで構成されるリガンドを認識する。ＭＨＣタンパク質は３つの群に分類されるが、そのうちの２群、すなわちＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩタンパク質が本発明において特に重要である。ヒトにおいて、ＭＨＣクラスＩタンパク質はＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ、ＨＬＡ－Ｃと呼ばれている。これらは殆ど全ての体細胞の表面上に発現され、高度な多型性を示す強力な移植抗原を提示する。ヒトにおけるＭＨＣクラスＩＩタンパク質は、ＨＬＡ－ＤＰ、ＨＬＡ－ＤＱ、ＨＬＡ－ＤＲであり、例えば樹状細胞や刺激されたマクロファージ上で発現され、高度に多型の移植抗原を同様に提示する。
【０００４】
リガンド認識によって、様々なＴ細胞においてエフェクタ機能（例えば、サイトカイン分泌および細胞毒性）が活性化され、これにより腫瘍細胞の破壊が行われる。ＭＨＣと非腫瘍関連ペプチドとで構成されるリガンドを認識するＴ細胞の平行活性化（すなわち、アロ反応）が、それ自体が抗腫瘍反応を促進する炎症性サイトカインの分泌により、最適な免疫反応の一助となっているかもしれない。しかしながら、これらの細胞の反応もまたＧＶＨＤにおいて役割を果たす。
ＩＩ．自己腫瘍細胞と同種異系樹状細胞（ＤＣ）とを用いたハイブリッドワクチン
クグラー（Ｋｕｇｌｅｒ）ら（３，４）は、ｍＲＣＣ患者に対して、同種異系樹状細胞と非血縁者の自己腫瘍細胞とを融合して構成されるハイブリッドワクチンによる「ワクチン接種」ができることを示した。「ワクチン接種」後、患者は顕著な腫瘍負荷の減少を見せている。完全寛解を達成した患者は手法Ｉと比較して少なく、今のところ寿命の延長は認められていない。しかしながら、手法Ｉにおける処置とは対照的に、ハイブリッドワクチンの手法は全く毒性を示さないか、僅かな毒性しか示さない。ワクチン接種の終了後、何人かの腫瘍患者は、おそらくは長期間Ｔ細胞反応を持続できないために再発を起こす。連続ワクチン接種によってこの問題を克服することができるかもしれないが、ワクチン接種は同種異系樹状細胞との融合相手となる腫瘍細胞しか利用できないために限界がある。したがって、腫瘍細胞が衰退中であればこの処置を続けることができる。
ＩＩＩ．自己ＤＣに基づくワクチン製造のための腫瘍細胞から得たＲＮＡ
ギルボア（Ｇｉｌｂｏａ）とその共同研究者（５～８）は、自己ＭＨＣクラスＩおよびク

ラスＩＩ分子とともに提示するために、ＤＣによって取り込まれ、タンパク質に翻訳可能で、ペプチドにプロセッシング可能な、腫瘍細胞から調製した自己ＲＮＡによって、自己ＤＣをプライミングする戦略を開発している。ＤＣパルスのための無限の材料供給源を提供するために、腫瘍細胞由来のＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写する。このｃＤＮＡは、さらなるＲＮＡを得るためのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写のための鋳型として機能する。ＰＣＲ増幅により、無限量の材料を製造することが可能である。腫瘍細胞から得たＲＮＡを自己ＤＣ内で発現させることにより、腫瘍細胞表面上に発現したものに対応するＭＨＣ‐ペプチドリガンドをＤＣの表面上に発現させることができる。ＤＣとそれが生産するサイトカインの同時刺激性分子は、最適なＴ細胞反応の刺激を可能にする。これらのワクチンは僅かな毒性しか示さないものの、ＩおよびＩＩに匹敵するような寛解は現在のところ報告されていない。これは、自己系内では活性化されないアロ反応性Ｔ細胞が欠如していることに起因するかもしれない。

【０００５】

すなわち、従来の治療手法は、長期治療の成功を妨げるか、重大な望ましくない影響を伴うといった実質的な欠点を有していると結論づけてよいだろう。

したがって、すでに述べたように、手法Ｉは、全体の５３％で発生し、場合によっては致命的結果を伴うＧＶＨＤ発症のリスクを背負っている。

【０００６】

ＩＩに記載の手法（クグラー（Ｋｕｇｌｅｒ）ら）は、ＭＨＣ‐ペプチドリガンドを提供するために患者の生きた腫瘍細胞を必要とするという欠点があるため、この手法の適用期間は大きく限定される。

【０００７】

ギルボア（Ｇｉｌｂｏａ）と共同研究者による治療は、僅かな毒性しか示さなかったものの、現在のところ顕著な腫瘍寛解は全く報告されていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

したがって、本発明の目的は、上記欠点を回避する抗原提示細胞であって、従って腫瘍疾病の治療に有用な抗原提示細胞を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

上記目的は独立請求項に記載の特徴によって達成されている。好ましい実施形態は従属請求項に記載されている。

それぞれ腫瘍細胞中で過剰発現されるか、あるいは自己腫瘍細胞またはいくつかの異なる腫瘍細胞株から誘導されたタンパク質および／またはペプチド、あるいは前記タンパク質および／またはペプチドをコードするＲＮＡまたはＤＮＡまたはｃＤＮＡが導入された半同種異系抗原提示細胞を用いることにより、腫瘍疾病の治療に有益な免疫反応を達成することができる。

【００１０】

クグラー（Ｋｕｇｌｅｒ）らの手法とは異なり、これらの半同種異系抗原提示細胞の製造のための本発明の方法は、電気融合が必要でないという利点を有している。したがって、抗原提示細胞の機能が電気融合によって損なわれることがない。例えばＲＮＡを用いたトランスフェクションは、抗原提示細胞の当該分子を取込む天然の能力を利用しているために、電気融合を行わずにすむ。

【００１１】

本発明に従う戦略、すなわち半同種異系ワクチンを使用することにより、ＭＨＣと腫瘍関連ペプチドとで構成されるリガンドを、より効率よく提示する能力が与えられる。クグラー（Ｋｕｇｌｅｒ）らの手法ではわずか約１０％のハイブリッド細胞しか生産されなかったのに対し、本発明によるとペプチドリガンドを発現した抗原提示細胞を明らかに高率で生産することができた。

【００１２】
この点に関して、例えば、自己腫瘍細胞由来のＲＮＡを逆転写し、ｃＤＮＡをＰＣＲによって増幅し、続いてｃＤＮＡをＲＮＡに転写することによる、腫瘍関連ＲＮＡを（無限に）生産するための好ましい実施形態に従って用いられる手法は、特に有益である。
【００１３】
本発明に従う上記手法は、すでに腫瘍細胞が少量になっていても、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ＲＮＡ転写のための無限のｃＤＮＡ供給源を形成するのに十分なＲＮＡを提供できるという利点を有している。ＲＮＡに基づいてパルスすることにより、腫瘍細胞の量が限られている場合に伴う欠点を回避することができる。ワクチン接種を長期間実施することができるために、例えばクグラー（Ｋｕｇｌｅｒ）らによる手法と比べて、反応速度が向上し、長期の実施が可能となる。
【００１４】
患者のＭＨＣ分子に対応しない半同種異系抗原提示細胞ＭＨＣ分子は、アロ反応に対する刺激を与える。したがって、半同種異系抗原提示細胞を用いることにより、自己細胞を用いた場合に比べて、免疫反応が強く誘発される。それにもかかわらず、本発明のワクチンの毒性は、これまでに記載された手法のものと比較してはるかに低い。
【００１５】
このように、本発明に従う半同種異系樹状細胞の使用は、ギルボア（Ｇｉｌｂｏａ）らの手法によって必要なＭＨＣマッチングを与えながらも、癌患者の進行した疾病によく見られる自己樹状細胞の機能が弱いという、自己樹状細胞の使用に伴う欠点を回避している。
【００１６】
本発明によれば、患者に対して半同種異系の個人から抗原提示細胞を調製する。これは、例えば父、母、兄弟、姉妹、または子孫などの血縁ドナーの抗原提示細胞のＭＨＣ分子が、患者のＭＨＣ分子と５０％の同一性を有している場合である。このことは以下のように模式的に示すことができる。もし患者のＨＬＡが対立遺伝子ａ＋ｃを有しているならば、ドナーとなりうる近親者は以下の対立遺伝子異型を有していなければならない。
両親：　　ＨＬＡ　ａｂまたはｃｄ
兄弟および姉妹：　ＨＬＡ　ａｄまたはｂｃ
子孫：　　ＨＬＡ　ａｅ，ａｆ，ｃｅ，ｃｆ
（母＝ＨＬＡ　ｅｆ）
上記の半同種異系抗原提示細胞は、患者の抗原提示細胞とＨＬＡハプロタイプが一致するので、ＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞と呼ぶこともできる。
【００１７】
ＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞は、１つの染色体のＨＬＡ－Ａ，ＨＬＡ－ＢおよびＨＬＡ－Ｃ対立遺伝子によってコードされる、患者と共通のクラスＩ（ＨＬＡ－Ａ，ＨＬＡ－ＢおよびＨＬＡ－Ｃ）分子を有するとともに、同じ染色体の対立遺伝子によってコードされる患者と共通のクラスＩＩ分子（ＨＬＡ－ＤＲ，ＨＬＡ－ＤＱおよびＨＬＡ－ＤＰ）も有している。
【００１８】
半同種異系抗原提示細胞の単離に続いて、自己腫瘍細胞から誘導されたタンパク質および／またはペプチド、あるいはそれぞれ前記タンパク質および／またはペプチドをコードするＲＮＡまたはＤＮＡまたはｃＤＮＡまたはｃＲＮＡを上記細胞に導入する。別の実施形態においては、腫瘍細胞中で過剰発現されるタンパク質および／またはペプチド、あるいは前記タンパク質および／ペプチドをコードするＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡまたはｃＲＮＡを導入する。これらは腫瘍明示化抗原（tumordefinierte Antigene）、すなわち腫瘍細胞に特異的な抗原であり、正常細胞よりも腫瘍細胞において、それぞれ高い発現または極めて高い発現を示す。好ましくは、このような腫瘍明示化抗原は、腫瘍遺伝子、例えばＨＥＲ２／ｎｅｕ、腫瘍に増殖優位性を与えるか腫瘍の生存を保証するかの少なくともいずれかの作用を有するタンパク質、例えばＰＳＭＡ、細胞周期調節タンパク質、転写因子、例えばＷＴ－１、ムチン、好ましくはＭＵＣ－１、細胞分裂の調節に関与するタンパク質

、好ましくはテロメラーゼから選択される。当然のことながら、本明細書中で用いるタンパク質、ペプチド、ＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡおよびｃＲＮＡは、組換え技術によって調製および使用することもできる。

【００１９】

この結果、抗原提示細胞は、ＭＨＣと腫瘍関連ペプチドとによって構成されるリガンドを提示し、該リガンドはＴ細胞によって認識されて、自己腫瘍に対する免疫反応を誘導する。

【００２０】

好ましい実施形態に従えば、半同種異系ＤＣによって提示されるＭＨＣが患者のすべての潜在的ＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩ分子を含むように、２つの異なる半同種異系ドナー（すなわち、例えば母と父）の抗原提示細胞を使用することが提供される。各ドナーの第２の染色体は、アロ反応を誘導しうる同種異系ＭＨＣ分子もさらにコードしている。

【００２１】

患者の腫瘍細胞のリガンドに相当するＭＨＣクラスＩおよびクラスＩＩペプチドリガンドを提供するために、ギルボア（Ｇｉｌｂｏａ）と共同研究者による既知の戦略を用いて、抗原提示細胞のパルスのための腫瘍由来ＲＮＡの無限供給源を提供する。同等の可能性としては、半同種異系抗原提示細胞を、ペプチドやタンパク質などの他の抗原供給源でパルスすることがある（９）。

【００２２】

本発明の１つの実施形態に従えば、腫瘍細胞中で過剰発現されるか、自己腫瘍細胞から誘導されるタンパク質および／またはペプチド、あるいは、それぞれ前記タンパク質および／ペプチドをコードするＲＮＡ、ＤＮＡ、ｃＤＮＡまたはｃＲＮＡを、それぞれ、腫瘍細胞、好ましくは自己腫瘍細胞から誘導するか、あるいは前記腫瘍細胞中で発現させ、前記腫瘍細胞としては、間葉性腫瘍の細胞、例えば肉腫、癌腫（好ましくは卵巣、乳房および腎細胞癌腫）の細胞、造血系の腫瘍細胞、好ましくは白血病およびリンパ腫の細胞、上皮腫瘍の細胞、外胚葉腫瘍（例えば黒色腫）細胞、および未分化組織からの胚芽腫（好ましくは芽球腫および奇形腫）の細胞が含まれる。本明細書中でさらに詳細に検討する腎細胞癌腫に対する具体例は、転移性腎細胞癌腫である。本発明の半同種異系抗原提示細胞は、腫瘍の治療において用いることができる。

【００２３】

すでに述べたように、抗原提示細胞へ取り込まれることを意図して自己腫瘍細胞より誘導されたＲＮＡを、無限の増幅のためにｃＤＮＡに逆転写してもよく、ｃＤＮＡをＰＣＲによって増幅してもよく、その後ｃＤＮＡをＲＮＡに転写してもよい。

【００２４】

本発明に従う抗原提示細胞の投与は、静脈内、皮下または筋肉内経路によって実施することができるが、皮下注射が好ましい。

本発明における用途のために、すべてのタイプの抗原提示細胞を用いることができる。これらには、特に単球／マクロファージおよび樹状細胞が含まれるが、後者の方が好ましい。

【００２５】

本発明の他の態様は、半同種異系抗原提示細胞に導入されるものとして、自己腫瘍細胞の成分の代わりに、いくつかの異なる腫瘍細胞株の成分のプールが使用される。これらは、腫瘍治療におけるワクチンとして用いることができる。このような「包括的（generische）」ワクチンを生産するために、例えば、すべての患者に使用することのできる３～５種の異なるＲＣＣからなる上述のｃＤＮＡのプールを調製すると有益である。すなわち、このようなプールでパルスされた抗原提示細胞に対してプライミングされた腫瘍特異的Ｔ細胞の殆どは、自己腫瘍細胞を認識することができると考えられる。というのも、これらの腫瘍特異的Ｔ細胞は、共通のペプチド‐ＭＨＣリガンドを有しているからである。これにより、ＧＭＰ（適正製造基準）条件下において、１つの製品（すなわち包括的ｃＤＮＡおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏで転写された対応するｃＲＮＡ）を生産するだけですむ。その後、

ワクチン治療の対象となる個々の患者に対して、本発明に従ってＧＭＰ条件下で、半同種異系樹状細胞だけを調製すればよい。

【００２６】

最終的に、本発明は、上述の半同種異系抗原提示細胞を含有する医薬組成物を含み、前記組成物は好ましくはワクチンの形態である。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２７】

以下、樹状細胞を例にとって、本発明の基本的原理を説明のための試験モデルとともにより詳細に説明する。

本手法の原理を確立するために２つのモデル系を用いる。第１の系では、黒色腫モデルからのよく特性が解析された試薬セットを使用し、第２の系では、腎細胞癌腫モデルからの試薬セットを使用する。黒色腫モデルは、試験クローン（ＴｙｒＦ８）のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）によって認識されるエピトープ（ＭＨＣ‐ペプチドリガンド）が明らかにされているという利点があり、これにより、樹状細胞などの抗原提示細胞による抗原提示の効率をより定量的に分析できるようになる。１つの腎細胞癌腫特異的Ｔ細胞クローン（ＴＩＬ‐２６）に対するエピトープはまだ同定されていないが、これらの細胞毒性Ｔリンパ球（ＣＴＬ）は高度に特徴的なＴＣＲを利用し、該ＴＣＲは、ＴＣＲのＣＤＲ３領域の分子配列に基づいたリアルタイムＲＴ‐ＰＣＲの方法を用いてｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて同定および定量することができる。Ｔ細胞を上記特徴的ＴＣＲ配列によって同定することにより、樹状細胞の機能的プライミング能力を調べることができる。上記２つのモデルを組み合わせて用いることにより、ＤＣの表面において腫瘍関連ペプチドを提示し、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおける特異的Ｔ細胞反応を活性化するためのこの系の特異性および効率を実証できる。本実験は、第１相／第２相臨床試験の開発に先立って原理を立証するために不可欠である。

（黒色腫系）

このモデル系に対する試薬は、ライデン大学のＰｅｔｅｒ Ｓｃｈｒｉｅｒ教授より得た。ＨＬＡ‐Ａ＊０２０１拘束性ＣＴＬクローン（ＴｙｒＦ８）を、進行した黒色腫を有した患者より単離した。同患者からの自己黒色腫瘍細胞株も確立した。特異的リガンド、すなわち腫瘍関連タンパク質から誘導されるペプチドは既知のものであり、該ペプチドは、健常なメラニン細胞中では正常なレベルで発現されるが黒色腫中では過剰発現される酵素であるチロシナーゼから誘導される。ＭＨＣ提示分子は、ＨＬＡ‐Ａ＊０２０１対立遺伝子によってコードされていることを確かめた。チロシナーゼに対するｃＤＮＡは入手可能であり、ＨＬＡ‐Ａ２分子のペプチド収容溝内に提示されるチロシナーゼタンパク質由来の正確な９アミノ酸ペプチドは既知であり、ＴｙｒＦ８Ｔ細胞クローンは入手可能である（１０）。

【００２８】

実験の一般的概要としては、まず黒色腫細胞株からＲＮＡを調製し、次に逆転写によってｃＤＮＡを調製する。次にこのｃＤＮＡを増幅して、ｉｎ ｖｉｔｒｏ転写ＲＮＡ（ｃＲＮＡ）を調製するための鋳型として用いる。このｃＲＮＡを用いてＨＬＡ‐Ａ２陽性樹状細胞をパルスする（１１，１２）。これらの樹状細胞はｃＲＮＡを取り込んでタンパク質に翻訳するが、該タンパク質の１つはチロシナーゼ酵素でなければならない。チロシンタンパク質は樹状細胞において細胞内プロセッシングを受けてペプチド断片となり、特異的な９アミノ酸のエピトープが、樹状細胞の小胞体内で新しく合成されたＨＬＡ‐Ａ２分子上に搭載される。これらのＭＨＣ‐ペプチド複合体は樹状細胞の細胞質膜に輸送され、ここでＴ細胞による認識が可能となる。ＤＣ表面上の適切なＭＨＣ‐ペプチド複合体を認識するＴｙｒＦ８細胞は、インターフェロンγを分泌して、細胞溶解機構を活性化することにより、これらが樹状細胞を殺傷可能となるように応答する。この活性化は、ＴｙｒＦ８クローンによるインターフェロンγ分泌のＥＬＩＳＡ検出によって、あるいは標準的なクロム放出検定を用い、樹状細胞を標的細胞として標識し、ＴｙｒＦ８細胞存在下におけるそれらの溶解を測定することにより評価することができる。ＴｙｒＦ８細胞の活性化は非

常に特異的であるので、チロシナーゼ以外のタンパク質から誘導されたペプチドを保持したＭＨＣ分子は、ＴｙｒＦ８細胞を活性化することができず、ＴｙｒＦ８細胞の活性を最適に刺激するためには、一定の閾値の上記特異的ＭＨＣチロシナーゼペプチド複合体がＤＣによって提示されなければならない。

【００２９】

樹状細胞に上記すべての工程を遂行させることのできる必要な出発物質を、元々のｃＲＮＡが提供できるのかどうか判定するために、ｃＲＮＡでパルスした樹状細胞を、ＴｙｒＦ８細胞を活性化するための刺激側細胞として用いる。黒色腫瘍細胞は様々な異なるＲＮＡを産生するので、チロシナーゼに対する転写物は、さらに大きなプールの中の１成分を表すにすぎない。この混合ｃＲＮＡプールが、チロシナーゼエピトープを与える能力は、単離チロシナーゼｃＤＮＡから作成したｃＲＮＡと同等であろう（すなわち、１つのＲＮＡ種のみ）。ＨＬＡ－Ａ２－チロシナーゼ－ペプチド複合体のレベルの相対評価は、樹状細胞を変化量の試験ｃＲＮＡでパルスし、該樹状細胞のもつ刺激能力を、チロシナーゼの９アミノ酸エピトープを提示する、既知変化量の合成ペプチドでパルスした樹状細胞と比較することによって決定することができる。ＴｙｒＦ８細胞がＭＨＣ‐ペプチド複合体を正確に検出できなくなる閾値レベルは、特異的ＥＬＩＳＡ検定を用いてＴｙｒＦ８細胞によって放出されるインターフェロンγの量を評価することによって決定することができる。

（腎細胞癌腫系）

これらの試薬は発明者によって確立されている。我々は腎細胞癌腫に対して特異的なＣＴＬ細胞株を腎細胞癌腫患者から単離し、このＴ細胞株からＴ細胞クローンを確立した（ＴＩＬ‐２６）。同じ患者から自己腫瘍細胞も得た（ＲＣＣ‐２６）。ＲＣＣ‐２６細胞によって示される腫瘍関連ペプチドを提示するＭＨＣ拘束分子は、ＨＬＡ‐Ａ＊０２０１によってコードされる分子であると同定されている。ＴＩＬ‐２６細胞を自己ＲＣＣ‐２６腫瘍細胞に暴露すると、該ＴＩＬ‐２６細胞は活性化されてインターフェロンγを分泌するとともに、自己ＲＣＣ‐２６腫瘍細胞を溶解できるようになった（１３）。

【００３０】

実験の一般的概要は、黒色腫系について記載したものと同様である。第１の段階では、ＲＣＣ‐２６細胞よりＲＮＡを作成し、逆転写によってｃＤＮＡを調製する。このｃＤＮＡはｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写によってｃＲＮＡを生成するための鋳型として働く。ｃＲＮＡを用いて樹状細胞をパルスし、これらの樹状細胞について、ＴＩＬ‐２６細胞を活性化してインターフェロンγを分泌させる能力を調べる。樹状細胞はＲＣＣ‐２６細胞由来のｃＲＮＡでパルスした後に、活性化ＴＩＬ‐２６細胞を用いた細胞毒性アッセイにおける標的細胞として評価される。樹状細胞の刺激の効率は、ＴＩＬ‐２６細胞によるインターフェロンγ分泌を測定するアッセイにおいて、ならびに、細胞毒性アッセイにおける標的細胞として、ＲＣＣ‐２６細胞の場合の効率と比較することもできる。

【００３１】

これらの２組の実験から、ｃＲＮＡでパルスした同種異系（ＨＬＡ‐Ａ＊０２０１）樹状細胞を用いてＭＨＣ‐ペプチド複合体を製造する方法は機能的であることが明確に実証された。

（ｃＲＮＡでパルスした同種異系樹状細胞によるＴ細胞反応の誘導）

ｃＲＮＡでパルスした樹状細胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏで同種異系Ｔ細胞をプライミングする能力を評価するために、２つの実験をｉｎ　ｖｉｔｒｏで実施する。最初に、ドナーＤＳ（ＤＳ＝匿名ドナー）から得たナイーブＴ細胞を、ＴＩＬ‐２６によって認識されるものと明らかに同一のエピトープを認識できるように、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてＲＣＣ‐２６腫瘍細胞でプライミングできることを証明した（１４）。ＴＩＬ‐２６細胞と同様に、ドナーＤＳ由来のＴ細胞は、ＴＩＬ‐２６細胞によって発現されるＴＣＲα鎖と高い相同性を有するＴＣＲα鎖を発現する（１５）。これらのＴ細胞のＴＣＲ配列は、ＲＮＡを試験試料から単離し、ＴＣＲ特異的プライマーを用いて、リアルタイムＲＴ‐ＰＣＲの方法を用いて試料中の転写物の量を分析することによって定量化することができる（１４）。まず、ドナーＤＳの末梢血リンパ球（ＰＢＬ）を反応側細胞として用いた混合リンパ球培

養物中で、ｃＲＮＡ（ＲＣＣ‐２６由来）でパルスした同種異系ＨＬＡ‐Ａ＊０２０１陽性樹状細胞を刺激側細胞として用いる。ＴＩＬ‐２６細胞によって認識される同一のエピトープを認識するマーカー（Ｖａ２０）Ｔ細胞の出現を、特徴的Ｖａ２０配列を有する転写物の増加を調べることによりモニターする。定量的評価は、未刺激ＰＢＬにおける上記転写物の頻度を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにてｃＲＮＡパルス樹状細胞で様々な回数再刺激した後のものと比較するリアルタイムＲＴ‐ＰＣＲを用いて行うことができる。ｃＲＮＡ（ＲＣＣ‐２６由来）でパルスしたドナーＤＳ由来の自己樹状細胞を標的細胞として用い、ｃＲＮＡパルス樹状細胞でプライミングしたＰＢＬ、無傷のＲＣＣ‐２６腫瘍細胞でプライミングしたＰＢＬを細胞毒性エフェクタ細胞として用いて、ＲＣＣ‐２６腫瘍細胞と直接比較する。

【００３２】

第２の試験系として、ＨＬＡ‐Ａ＊０２０１ドナー由来のＴ細胞を、リンパ球と樹状細胞との混合培養物中で、ｃＲＮＡ（黒色腫由来）でパルスしたＨＬＡ‐Ａ＊０２０１を発現しているドナー由来の樹状細胞で刺激する。チロシン特異的リガンドを認識するＴ細胞の発生を、ＨＬＡ‐Ａ２‐チロシナーゼペプチド特異的４量体を用いた標準的なフローサイトメトリーによって評価する（７）。

（混合ｃＲＮＡ試料による樹状細胞のパルス）

現時点では、複数のエピトープに対して生み出される免疫反応が、腫瘍細胞を排除し、腫瘍の再発から保護するための最良の可能性を与えると考えられている。このことは、個々のＭＨＣ‐ペプチドリガンドに対してｉｎ　ｖｉｖｏにおいてプライミングされたＣＴＬがＭＨＣ‐ペプチドリガンド特異的ＣＴＬの発生をもたらし、場合によっては、腫瘍の寛解をもたらすという知見に基づいている。けれども、ＭＨＣ分子をもはや発現しないか、あるいは、当該特異的ペプチドの誘導元のタンパク質をもはや発現しない腫瘍の変異体が出現することもある。多くの異なるＭＨＣ‐ペプチドリガンド特異性を有するＣＴＬを製造すれば、腫瘍変異体が出現する可能性が低くなると考えられる。というのも、多くの異なる特異性を有するＣＴＬによって検出されることを免れるためには、個々の腫瘍細胞が全てのＭＨＣ分子およびペプチド提供タンパク質において異なる変異体を発現する必要があると考えられるからである。

【００３３】

したがって、免疫攻撃のための多くの異なる腫瘍関連ペプチドを提供するために、いくつかの腫瘍細胞株由来のｃＲＮＡをプールすることが最適である。同様に、反応側Ｔ細胞と刺激側樹状細胞とによって共用されるいくつかの異なるＭＨＣ分子を有することがより好ましい。このことは、本明細書に記載の戦略に従って、以下に記載するように、Ｔ細胞のドナーの家族由来のＨＬＡハプロタイプ一致樹状細胞を用いることによって達成される。とはいえ、異なる腫瘍からのｃＲＮＡをプールした場合でも、１つの腫瘍細胞株の特異的エピトープに特徴的なＭＨＣ‐ペプチドリガンドに対する要求密度は維持されていなければならない。このことは、黒色腫細胞株からのｃＲＮＡを、ＲＣＣ‐２６細胞株からのｃＲＮＡと組み合わせることにより、実験的に取り組むことができる。このプールされたｃＲＮＡを用いて同種異系（ＨＬＡ‐Ａ＊０２０１陽性）樹状細胞をパルスして、これらの樹状細胞が、まだ黒色腫特異的ＣＴＬクローン、すなわちＴｙｒＦ８と、ＲＣＣ特異的クローン、すなわちＴＩＬ‐２６との両方を活性化することができるかどうかを調べる。プールされたｃＲＮＡ（２種の腫瘍ｃＲＮＡから１：１で混合）が、両方のＴ細胞クローンを活性化するように機能することがこの実験により証明されれば、２種のｃＲＮＡの様々な比率を用いて、単独のｃＲＮＡ試料をどの程度まで希釈可能か、ＤＣプロセッシングおよび提示における機能までも判定することができる。いくつかの異なる腫瘍細胞株（例えば、３つのＲＣＣ細胞株）からプールされたｃＲＮＡに基づいてワクチンを製造し、特異的ＣＴＬの潜在的標的分子である様々な腎細胞癌腫において発現される既知の遺伝子由来のｃＲＮＡをさらに添加する。ＨＥＲ２／ｎｅｕ、ＭＵＣ１、ＰＳＭＡ、ＷＴ‐１、テロメラーゼおよびいくつかの他の候補を含みうる（９）。これらの個々のｃＲＮＡ種の添加の影響は、当該ｃＲＮＡをＲＣＣ‐２６のｃＲＮＡに添加して、パルスされた樹状細胞の

ＴＩＬ‐２６細胞活性化能力を調べることによって評価することができる。
（抗原提示細胞としての、自己樹状細胞とＨＬＡハプロタイプ一致樹状細胞との比較）
上記の実験は、ＨＬＡ‐Ａ＊０２０１によってコードされる分子だけを反応側Ｔ細胞と共用する、非血縁ドナーから得たｃＲＮＡパルス同種異系樹状細胞の使用を確立するために計画された。次の段階では、ＨＬＡハプロタイプ一致樹状細胞が、ｃＲＮＡによって樹状細胞に転移された腫瘍関連エピトープに対してＴ細胞をプライミングできることを実証する。ＨＬＡハプロタイプ一致ＤＣが、３つのクラスＩ対立遺伝子（ＨＬＡ‐Ａ，ＨＬＡ‐ＢおよびＨＬＡ‐Ｃ）および３つのクラスＩＩ対立遺伝子（ＨＬＡ‐ＤＲ，ＨＬＡ‐ＤＱおよびＨＬＡ‐ＤＰ）をＴ細胞と共用しているという理由からこの戦略を選ぶ。異なるクラスＩ分子は、それぞれ唯一のペプチド組と結合し、異なるＣＤ８＋ＣＴＬをプライミングし、３つのクラスＩＩによってコードされる分子もまたそれぞれ、クラスＩ分子のものとは明確に区別される異なるペプチド組に結合する。これらのクラスＩＩ‐ペプチドリガンドは、免疫反応の最適な進展を補助するか、もしくはエフェクタ細胞として直接機能するサイトカインを提供することのできる別のタイプのＴリンパ球であるＣＤ４細胞を活性化する（１１）。
【００３４】
ＨＬＡハプロタイプ一致樹状細胞の役割を解析する実験は、正常な対照ドナー（ドナー＃１）から調製した自己樹状細胞と、選択されたＨＬＡ型の家族（ドナー＃２）（すなわち、一方のＨＬＡハプロタイプがドナー１と共通で、第２のＨＬＡハプロタイプが一致しない親または兄弟姉妹を選択：図２を参照）から調製したＨＬＡハプロタイプ一致樹状細胞とを比較することにより実施する。いずれのドナーから調製したＤＣもＲＣＣ‐２６または黒色腫細胞株のｃＲＮＡでパルスする。得られたＤＣについて、まず上述のようにして、ＴｙｒＦ８およびＴＩＬ‐２６細胞からのインターフェロンγ分泌を刺激する能力について調べる。次の段階では、ドナー＃１由来のＰＢＬを、ｃＲＮＡでパルスした自己樹状細胞またはドナー２のＨＬＡハプロタイプ一致樹状細胞によってｉｎ　ｖｉｔｒｏで刺激する。２回以上刺激した後、異なるＭＨＣ分子（クラスＩおよびクラスＩＩの両方）によって提示されるエピトープを認識するＴ細胞が存在するかどうかを評価する。この評価は、特異的モノクローナル抗体の存在または非存在下、ｃＲＮＡでパルスした自己樹状細胞による刺激を行った後に、該Ｔ細胞のインターフェロンγ分泌を測定することにより実施する。ＭＨＣクラスＩ特異的モノクローナル抗体（Ｗ６／３２）は、ＣＤ８＋ＣＴＬと樹状細胞との間の相互作用を阻止する。ＨＬＡ‐Ａ、ＨＬＡ‐ＢまたはＨＬＡ‐Ｃ分子に特異的なモノクローナル抗体の存在下でのインターフェロンγ分泌の減少は、異なるクラスＩ分子と共同してそれらのペプチドを認識するＣＴＬがどの程度存在するかを証明するものである。クラスＩＩ拘束性ＣＤ４＋細胞の存在は、ＨＬＡ‐ＤＲ，ＨＬＡ‐ＤＱおよびＨＬＡ‐ＤＰ分子と反応するクラスＩＩ特異的モノクローナル抗体を用いることを除いては同様の手法で解明することができる（１７）。
【００３５】
本発明に従うｃＲＮＡの製造を、以下のフローチャートによって説明する。
（ｃＲＮＡ調製のためのフローチャート）
１）腫瘍細胞をｉｎ　ｖｉｔｒｏで培養（例えば、黒色腫細胞株９３０４．Ａ１２および腎細胞癌腫細胞株、ＲＣＣ－２６）
２）腫瘍細胞株からＲＮＡを抽出（例えば、キアゲン（Ｑｕｉｇｅｎ）社の「ＲＮＡＥａｓｙ」キット＃７５４１２を用いて）
３）第１のｃＤＮＡ鎖の合成を実施（例えば、クロンテック（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）社の「Ｓｍａｒｔ　ＰＣＲ」ｃＤＮＡ合成キット＃Ｋ１０５２を用いて）
４）ｃＤＮＡ増幅を実施（例えば、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社の“Ｓｍａｒｔ　ＰＣＲ”ｃＤＮＡ合成キット＃Ｋ１０５２を用いて）
５）ｃＤＮＡのｉｎ　ｖｉｔｒｏ転写を実施（例えば、アンビオン（Ａｍｂｉｏｎ）社の「ｍＭｅｓｓａｇｅ－ｍＭａｃｈｉｎｅ」キット＃１３４４を用いて）
６）ｃＲＮＡを精製（例えば、Ｑｕｉｇｅｎ社の「ＲＮＡＥａｓｙ」キット＃７５１４２

を用いて）
７）ｃＲＮＡの完全性を試験（例えば、パーキンエルマー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）社の「Ｏｎｅ　ＳｔｅｐＲＴ／ＰＣＲ」キット＃Ｐ／Ｎ４３０８２０６を用いて）
【００３６】
【表１】

参照文献：

1. Childs, R.W. Chernoff, A., Contentin, N., Bahceci, E., Schrump, D., Leitman, S., Read, E.J., Tisdale, J., Dunbar, C., Linehan, W.M., Young, N.S. and Barrett, A.J. 2000. Regression of metastiatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplanation. N. Engl. J. Med. 14:750-758.

2. Kolb, H.-J., Schattenberg., A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieder, D., van Rhee, F., Mittermüller, J., de Witte, T., Holler, E. and Ansara, H. for the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. 1995. Graft-versus-leukemia effect of Spender lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. Blood 86: 2041-2050.

3. Kugler A., Stuhler, G., Walden, P., Zöller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Müller, C.A., Becker, V., Gross, A.J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Müller, G.A., and Ringert, R.-H. 2000. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. Nature Med. 6: 332-336.

4. Kufe, D. 2000. Smallpox. polio and now a cancer vaccine? Nature Med. 6: 252-253.

5. Boczkowski, D., Nair, s.K., Nam, J.H., Lyerly, H.K. and Golboa, E. 2000. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. Cancer Res. 60: 1028-1034.

6. Heiser, A., Dahm, P., Yancey, D., Maurice, M.A., Boczkowski, D., Nair, S.K., Gilboa, E. and Vieweg, J. 2000. Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. J. Immunol. 164: 5508-5014.

7. Nair, S.K., Boczkowski, D., Morse, M., Cumming, R.I., Lyerly, H.K. and Gilboa, E. 1998. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. Nat. Biotechnol 16: 364-369.

8. Nair, SK. Hull, S., Coleman, D., Gilboa, E., Lyerly, H.K. and Morse, M.A. 1999. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. Int. J. Cancer 82: 121-124.

9. Dannull, J., Cerny, T., Ackermann, D.K. and Groettrup, M. 2000. Current status of dendritic cell-based tumor vaccination. Onkologie 23:544-551.

10. Visseren, M.J., van Elsas, A., van der Voort. E.I.H., Ressing, M.E., Käst. W.M., Schrier, P.I. and C.J.M. Melief. 1995. CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy Spender blood to lyse melanoma cells. J. Immunol. 154:3991-3998.

【００３７】

【表２】

11. Su, Z., Peluso. M.V.. Raffegerst, S.H,, Schendel, D.J,, and M.A. Roskrow. 2001. LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with relapsed EBV-positive Hodgkin disease. Eur. J. Immunol. 31:947-958.

12. Su, Z., Peluso, M.V., Raffergerst, S.U., Schendel, D.J. and Roskrow, M. Antigen presenting cells transfected with LMP2a RNA induce CD4+ LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes which kill via a Fas-independent mechanism (submitted).

13. Schendel. D.J., Gansbacher. B , Oberneder. R., Kriegmair, M., Hofstetter, A., Riethmüller, G. and O.G. Segurado. 1993. Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes.l. HLA-A2 restricted lysis of autologous and aliogeneic tumor lines. J. Immunol, 151:4209-4220.

14. Schendel, D J., Frankenberger, B., Jantzer, P , Cayeux, S., Nößner, E., Willimsky, G., Maget, B., Pohla. H., and Th. Blankenstein. 2000. Expression of B7.1 (CD80) in a renal cell carcinoma line allows expansion of tumor-associated cytotoxic T lymphocytes in the presence of an alloresponse. Gene Therapy 7: 2007-2014.

15. Jantzer, P. and D.J. Schendel. 1998. Human renal cell carcinoma antigen-specific cytotoxic T lymphocytes: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo. Cancer Res. 58: 3078-3086.

16. Altman. J.D., Moss. P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Willliams, M.G., Bell, J. l., McMichael. A.J. and Davis, M.M. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T Lymphocytes. Science 274: 94-96.

17. Gong, J., Nikrui, N., Chen, D., Koido, S., Wu, Z., Tanaka, Y., Cannistra, S., Avigan, D. and Kufe, D. 2000. Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. J. Immunol.165: 1705-1711.

【図面の簡単な説明】

【００３８】

【図１】自己腫瘍細胞と非血縁者の同種異系樹状細胞とが融合された、クグラー（Ｋｕｇｌｅｒ）らによる同種異系腫瘍ワクチンの生産の原理を示す図。

【図２】ＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞を用いることによって半同種異系ワクチンを生産する本発明の手法を示す図。

【００３９】

ハプロタイプ特異的ワクチンは以下の特徴を示す。

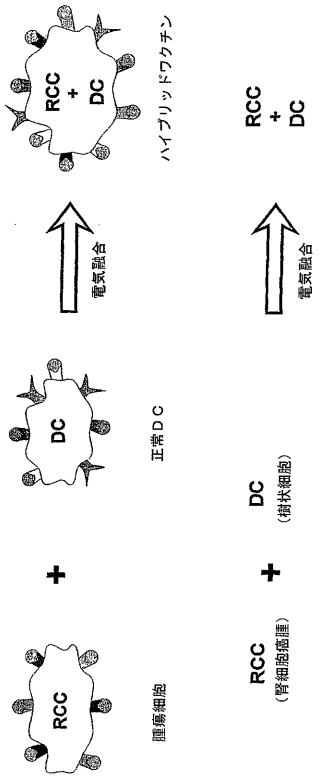
－ＭＨＣとＴＡＡ（腫瘍関連抗原）ペプチドとで構成される、患者の対立遺伝子の半分に対するリガンド。

－２つのハプロタイプ一致ＤＣ調製物により、すべての対立遺伝子を一致させてもよい。

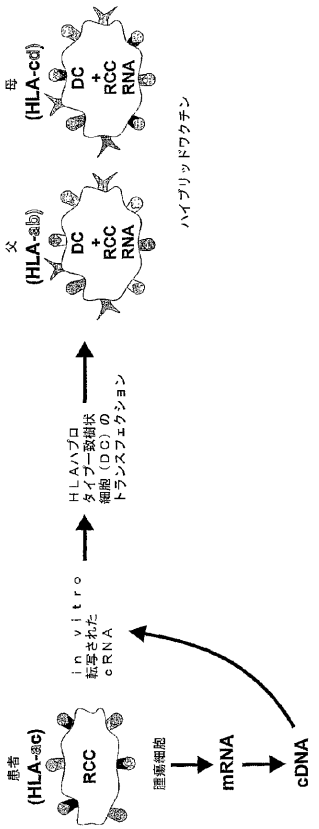
－アロ反応およびヘルパーＴ細胞刺激のためのＨＬＡ不一致ＭＨＣ－ペプチドリガンド。

－免疫反応の最適な促進のための、ＤＣから誘導された同時刺激分子とサイトカイン（図中では「Ｙ字形」で示す）。

【図１】


RCC
腫瘍細胞
＋
DC
正常ＤＣ
電気融合
RCC
＋
DC
ハイブリッドワクチン
RCC
（腎細胞癌腫瘍）
＋
DC
（樹状細胞）
電気融合
RCC
＋
DC

【図２】


患者
(HLA-abc)
RCC
腫瘍細胞
mRNA
cDNA
in vitro
転写された
cRNA
HLAハプロ
タイプ一致樹状
細胞（DC）の
トランスフェクション
父
(HLA-abd)
DC
＋
RCC
RNA
母
(HLA-acf)
DC
＋
RCC
RNA
ハイブリッドワクチン

【国際公開パンフレット】

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
26. September 2002 (26.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/074338 A1

(51) Internationale Patentklassifikation[7]: A61K 39/44, 48/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02595

(22) Internationales Anmeldedatum: 8. März 2002 (08.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 12 851.7 16. März 2001 (16.03.2001) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US)*: **GSF-FORSCHUNGSGESELLSCHAFT FÜR UMWELT UND GESUNDHEIT GMBH** [DE/DE]; Ingolstädter Landstrasse 1, 85764 Oberschleissheim (DE).

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: **SCHENDEL, Dolores** [US/DE]; Hans-Sachs-Str. 12 IV, 80469 München (DE).

WANK, Rudolf [DE/DE]; Hans-Sachs-Str. 12 IV, 80469 München (DE).

(74) Anwalt: **BEHNISCH, Werner**; Reinhard Skuhra Weise & Partner GbR, Friedrichstr. 31, 80801 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten *(national)*: JP, US.

(84) Bestimmungsstaaten *(regional)*: europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Erklärung gemäß Regel 4.17:
— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:
mit internationalem Recherchenbericht
vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SEMI-ALLOGENIC ANTI-TUMOUR VACCINE WITH HLA HAPLO-IDENTICAL ANTIGEN-PRESENTING CELLS

(54) Bezeichnung: SEMI-ALLOGENE ANTITUMOR-VAKZINE MIT HLA-HAPLO-IDENTISCHEN ANTIGEN-PRÄSENTIERENDEN ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to semi-allogenic antigen-presenting cells, in which are introduced proteins and/or peptides, or RNA or DNA or cDNA, coding for said proteins, which are over-expressed in tumour cells, or are derived from autologous tumour cells or various tumour cell lines. The invention relates to methods for generation of semi-allogenic, antigen-presenting cells and use thereof for treatment of tumour diseases.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen, in welche Proteine und/oder Peptide oder RNA bzw. DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus autologen Tumorzellen stammen oder unterschiedlichen Tumorzell-Linien stammen, eingebracht sind. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Erzeugung dieser semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen sowie deren Verwendung zur Behandlung von Tumorerkrankungen.Die vorliegende Erfindung betrifft semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen, in welche Proteine und/oder Peptide oder RNA bzw. DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus autologen Tumorzellen stammen oder unterschiedlichen Tumorzell-Linien stammen, eingebracht sind. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Erzeugung dieser semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen sowie deren Verwendung zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

WO 02/074338 A1

Semi-allogene Antitumor-Vakzine mit HLA-haplo-identischen Antigen-präsentierenden Zellen

Die vorliegende Erfindung betrifft semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen, in welche Proteine und/oder Peptide oder RNA bzw. DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus Tumorzellen stammen, eingebracht sind. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Erzeugung dieser semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen sowie deren Verwendung zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

Drei kürzlich erfolgte Entwicklungen legen nahe, daß zellvermittelte Immunreaktionen zu einer beträchtlichen Verminderung der Tumorbelastung und zu einer ebenso beträchtlichen Verlängerung der Überlebenszeit der Patienten bei Tumorerkrankungen, wie beispielsweise einem metastasierenden Nierenzellkarzinom (Metastatic Renal Cell Carcinoma = mRCC), führen können. Klinische Daten haben bereits Erfolge für mRCC gezeigt, jedoch ist auch eine Übertragung derselben Prinzipien auf andere Tumoren denkbar. Im Folgenden werden drei Entwicklungen beschrieben, die den Ausgangspunkt für den erfindungsgemäßen Ansatz bilden.

I. Allogene Knochenmarkstransplantation zur Behandlung des metastasierenden Nierenzellkarzinoms

Nierenzellkarzinom-Patienten, die einer allogenen Knochenmarkstransplantation unterworfen werden, können in 53 % der Fälle eine Voll- oder Teil-Remission erreichen (1). Die Lebenserwartung kann beträchtlich von einigen Monaten auf mehrere Jahre erhöht werden. Während bedeutende Tumorbelastungen beseitigt werden können, entwickeln 53 % der Patienten die Graft-versus-host-Krankheit (GVHD), die mit einer GVHD-assoziierten Sterblichkeit von 5 % verbunden ist.

Der Mechanismus der Tumorrückbildung ist vermutlich mit dem vergleichbar, der mit der Eliminierung hämatologischer Malignome im Anschluß an eine allogene Knochenmarkstransplantation (BMT) verbunden ist (2). Aktivierte T-Lymphozyten erkennen Liganden, die aus Peptiden, die von einem in Tumorzellen exprimierten Protein abstammen, und MHC-Molekülen (sowohl des Klasse I- als auch des Klasse II-Typs) bestehen. Die MHC-Proteine werden in drei Gruppen eingeteilt, von denen zwei Gruppen, nämlich die MHC-Proteine der Klasse I und II, in der vorliegenden Erfindung von besonderer Bedeutung sind. Bei Menschen werden die MHC-Klasse I-Proteine als HLA-A, -B, -C bezeichnet. Sie werden auf fast allen Körperzellen exprimiert und stellen starke Transplantationsantigene mit hochgradigem Polymorphismus dar. Die MHC-Klasse II-Proteine beim Menschen sind HLA-DP, -DQ, -DR und werden beispielsweise auf dendritischen Zellen und stimulierten Makrophagen exprimiert und stellen ebenfalls Transplantationsantigene mit hochgradigem Polymorphismus dar.

Die Erkennung der Liganden aktiviert in verschiedenen T-Zellen Effektorfunktionen (beispielsweise Cytokin-Sezernierung und Zytotoxizität), wodurch eine Zerstörung von Tumorzellen erfolgt. Die parallele Aktivierung von T-Zellen, die Liganden aus MHC und nicht Tumor-assoziierten Peptiden erkennen (d.h. Alloreaktionen), kann durch Sezernierung von Entzündungs-Cytokinen, die wiederum Antitumor-Reaktionen unterstützen, zu einer optimalen Immunreaktion beitragen. Die Reaktionen dieser Zellen spielen jedoch ebenfalls eine Rolle bei der GVHD.

II. Hybrid-Vakzine unter Verwendung von autologen Tumorzellen und allogenen dendritischen Zellen (DC)

Kugler et al. (3, 4) haben gezeigt, daß mRCC-Patienten mit Hybrid-Vakzinen "vakziniert" werden können, die aus fusionierten allogenen dendritischen Zellen und autologen Tumor-Zellen von nichtverwandten Individuen bestehen. Im Anschluß an die "Vakzinierung" zeigen die Patienten eine deutliche Abnahme der Tumorbelastung. Weniger Patienten erreichen eine vollständige Remission im Vergleich zu Ansatz I, eine gesteigerte Lebenserwartung wurde bis jetzt nicht festgestellt. Im Gegensatz zur Behandlung bei Ansatz I zeigt

der Hybrid-Vakzin-Ansatz jedoch keine oder nur geringe Toxizität. Einige Tumor-Patienten erlitten nach dem Ende der Vakzinierung einen Rückfall, der vermutlich auf die fehlende Aufrechterhaltung von Langzeit-T-Zell-Reaktionen zurückzuführen ist. Dieses Problem kann durch kontinuierliche Vakzinierung eventuell überwunden werden, jedoch ist die Vakzinierung durch die Verfügbarkeit von Tumorzellen beschränkt, die als Fusionspartner für die allogenen dendritischen Zellen dienen. Somit ist keine weitere Behandlung möglich, wenn die Tumorzellen zur Neige gehen.

III. Aus Tumorzellen gewonnene RNA zur Erzeugung von Vakzinen auf Grundlage von autologen DC's

Gilboa und Mitarbeiter (5-8) haben eine Strategie zum Primen von autologen DCs mit autologer, aus Tumorzellen gewonnener RNA entwickelt, die von DCs aufgenommen, in ein Protein translatiert und zu Peptiden zur Präsentation mit autologen MHC Klasse I und Klasse *II*-Molekülen verarbeitet werden kann. Um eine unbegrenzte Quelle an Material zum DC-Pulsen bereitzustellen, wird RNA aus Tumorzellen zu cDNA rücktranskribiert, die dann als eine Matrize zur in vitro-Transkription weiterer RNA dient. Eine PCR-Amplifizierung ermöglicht die Erzeugung von unbeschränktem Material. Die Expression von aus Tumoren gewonnener RNA in autologen DCs ermöglicht, daß MHC-Peptid-Liganden an der DC-Zelloberfläche exprimiert werden, die denjenigen entsprechen, die auf der Tumorzell-Oberfläche zu finden sind. Die co-stimulatorischen Moleküle der DC und die Cytokine, die sie produziert, ermöglichen eine optimale Stimulierung von T-Zell-Reaktionen. Diese Vakzine zeigen keine oder nur geringe Toxizität, jedoch wurde bis zum heutigen Tage keine mit I und II vergleichbare Rückbildung publiziert. Dies kann auf das Fehlen von allo-responsiven T-Zellen zurückzuführen sein, die in einem autologen System nicht aktiviert sind.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, daß die konventionellen Therapieansätze unter beträchtlichen Nachteilen leiden, die einen dauerhaften therapeutischen Erfolg verhindern oder schwerwiegende unerwünschte Wirkungen mit sich bringen.

So leidet, wie bereits oben dargelegt, der Ansatz I unter dem Risiko der Entstehung der GVHD, die in 53 % der Fälle auftritt und teilweise mit einem tödlichem Ausgang verbunden ist.

Der unter II beschriebene Ansatz (Kugler et al.) weist den Nachteil auf, daß lebensfähige Tumorzellen des Patienten benötigt werden, um die MHC-Peptid-Liganden bereitzustellen und ist somit in seiner Anwendungsdauer stark eingeschränkt.

Die Therapie von Gilboa und Mitarbeiter weist zwar nur geringe Toxizität auf, es wurde jedoch bis jetzt keine nennenswerte Tumorrückbildung publiziert.

Es ist daher die Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Antigen-präsentierende Zellen bereit zu stellen, die die vorstehenden Nachteile vermeiden und so in der Therapie von Tumorerkrankungen verwendbar sind.

Diese Aufgabe wird durch die in den unabhängigen Ansprüchen dargelegten Merkmale gelöst. Bevorzugte Ausführungsformen sind in den abhängigen Ansprüchen angegeben.

Durch Einsatz von semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen, in die Proteine und/oder Peptide oder RNA bzw. DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus autologen Tumorzellen oder aus mehreren unterschiedlichen Tumorzell-Linien stammen, eingebracht wurden, kann eine für die Behandlung von Tumorerkrankungen vorteilhafte Immunreaktion erreicht werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Erzeugung dieser semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen weist, anders als der Ansatz von Kugler et al., den Vorteil auf, daß keine Elektrofusion erforderlich ist. Die Funktion der Antigen-präsentierenden Zellen wird daher nicht durch Elektrofusion gestört. Eine Elektrofusion kann deswegen vermieden werden, weil die Transfektion beispielsweise mit RNA die natürliche Fähigkeit von Antigen-präsentierenden Zellen ausnutzt, derartige Moleküle aufzunehmen.

Die erfindungsgemäße Strategie, d.h. der Einsatz einer semi-allogenen Vakzine, bringt eine erhöhte Effizienz der Präsentation von Liganden bestehend aus MHC und Tumor-assoziiertem Peptid mit sich. Nur ungefähr 10% Hybridzellen werden bei dem Ansatz von Kugler et al. erzeugt, wohingegen erfindungsgemäß ein wesentlich höherer Prozentsatz an Antigen-präsentierenden Zellen, die Peptid-Liganden exprimieren, erzeugt werden kann.

Dabei ist der gemäß einer bevorzugten Ausführungsform zur (unbegrenzten) Erzeugung von Tumor-assoziierter RNA verwendete Ansatz besonders vorteilhaft, mit dem z. B. RNA aus autologen Tumorzellen in cDNA rücktranskribiert, die cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert und anschließend die cDNA in RNA transkribiert wird.
Dieser erfindungsgemäße Ansatz weist den Vorteil auf, daß bereits kleine Mengen von Tumorzellen ausreichend RNA liefern können, um eine unbegrenzte cDNA-Quelle für die in vitro RNA-Transkription zu bilden. Ein Pulsen auf RNA-Grundlage ermöglicht es daher, die mit der beschränkten Anzahl von Tumorzellen einhergehenden Nachteile zu vermeiden. Dauerhafte Möglichkeiten, Vakzinierungen durchzuführen, verbessern die Reaktionsgeschwindigkeiten und deren Langlebigkeit im Vergleich mit beispielsweise dem Ansatz von Kugler et al.

Die den MHC-Molekülen der Patienten nicht entsprechenden MHC-Moleküle von semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen stellen einen Stimulus für Allo-Reaktionen dar. Durch Einsatz semi-allogener Antigen-präsentierender Zellen wird daher im Vergleich zur Verwendung autologer Zellen eine verstärkte Immunreaktion hervorgerufen. Trotzdem ist die Toxizität der erfindungsgemäßen Vakzine weit geringer als bei den bisher beschriebenen Ansätzen.

Die erfindungsgemäße Verwendung von semi-allogenen dendritischen Zellen stellt so das notwendige MHC-Matching des Ansatzes von Gilboa et al. bereit, vermeidet jedoch den mit dem Einsatz von autologen dendritischen Zellen einhergehenden Nachteil einer schwachen Funktion der autologen dendritischen Zellen, die oftmals mit einer fortgeschrittenen Erkrankung bei Krebspatienten verbunden ist.

Erfindungsgemäß werden Antigen-präsentierende Zellen aus Individuen präpariert, die bezüglich des Patienten semi-allogen sind. Dies ist dann der Fall, wenn die MHC-

Moleküle von Antigen-präsentierenden Zellen eines verwandten Spenders, beispielsweise von Vater, Mutter, Geschwistern oder Kindern, den MHC-Molekülen des Patienten zu 50% entsprechen. Dies kann schematisch wie folgt dargestellt werden: Wenn das Patienten-HLA die Allele a+c aufweist, müssen Familienangehörige als potentielle Spender folgende Allel-Varianten aufweisen:

Eltern:	HLA-ab oder cd
Geschwister:	HLA-ad oder bc
Kinder:	HLA-ae, af, ce, cf
	(Mutter = HLA-ef)

Die vorgenannten semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen sind insofern bezüglich denjenigen des Patienten HLA-haploidentisch und können deswegen auch als HLA-haploidentische Antigen-präsentierende Zellen bezeichnet werden.

HLA-haploidentische Antigen-präsentierende Zellen teilen Klasse I-(HLA-A, B und C) Moleküle mit dem Patienten, die von den HLA-A, B und C-Allelen eines Chromosoms codiert werden. Sie teilen ebenfalls Klasse II-Moleküle (HLA-DR, DQ und DP) mit dem Patienten, die durch die entsprechenden Allele desselben Chromosoms codiert werden.

Nach der Isolierung der semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen werden in diese Proteine und/oder Peptide oder RNA bzw. DNA oder cDNA oder cRNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, aus autologen Tumorzellen eingebracht. In einer weiteren Ausführungsform werden Proteine und/oder Peptide oder RNA, DNA, cDNA oder cRNA, die für diese Proteine und/oder Peptide kodieren, eingebracht, die in Tumorzellen überexprimiert werden. Dabei handelt es sich um tumordefinierte Antigene, d. h. Antigene, die für Tumorzellen spezifisch sind und in den Tumorzellen stärker exprimiert werden bzw. deutlich stärker exprimiert werden als in Normalzellen. Bevorzugt werden derartige tumordefinierte Antigene ausgewählt aus Onkogenen, beispielsweise HER2/neu, Proteinen, die dem Tumor einen Wachstumsvorteil verschaffen und/oder sein Überleben sichern, z. B. PSMA, Zellzyklusregulationsproteinen, Transkriptionsfaktoren, z. B. WT-1, Muci

nen, bevorzugt MUC1, Proteinen, die in der Regulation der Zellteilung involviert sind, bevorzugt Telomerase. Es versteht sich von selbst, daß die hier genannten Proteine, Peptide, RNA, DNA, cDNA und cRNA auch rekombinant herstellbar und einsetzbar sind.

Als Folge präsentieren die Antigen-präsentierenden Zellen einen Liganden aus MHC und Tumor-assoziiertem Peptid, der von T-Zellen erkannt wird und daher eine gegen den autologen Tumor gerichtete Immunreaktion auslöst.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform ist die Verwendung von Antigen-präsentierenden Zellen zweier unterschiedlicher semi-allogener Spender (d.h. beispielsweise Mutter und Vater) vorgesehen, so daß die durch die semi-allogenen DC's präsentierten MHC's alle potentiellen MHC Klasse I und Klasse II-Moleküle des Patienten umfassen. Das zweite Chromosom jedes Spenders codiert zusätzlich allogene MHC-Moleküle, die zur Induktion von Allo-Reaktionen dienen können.

Um MHC Klasse I und Klasse II-Peptid-Liganden bereitzustellen, die denjenigen der Patienten-Tumorzellen entsprechen, wird die bereits bekannte Strategie von Gilboa und Mitarbeiter angewendet, um eine unbegrenzte Quelle von aus Tumoren gewonnener RNA zum Pulsen Antigen-präsentierender Zellen herzustellen. Eine gleichwertige Möglichkeit besteht darin, die semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen mit anderen Antigen-Quellen, wie beispielsweise Peptiden und Proteinen, zu pulsen (9).

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung stammen die Proteine und/oder Peptide oder RNA bzw. DNA, cDNA oder cRNA die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus autologen Tumorzellen stammen, aus Tumorzellen, bevorzugt autologen Tumorzellen bzw. werden in diesen Tumorzellen überexprimiert, wobei die Tumorzellen umfassen: Zellen aus mesenchymalen Tumoren, z. B. Zellen aus Sarkomen, Karzinomen, bevorzugt Ovarial-, Mamma- und Nierenzellkarzinomen, Tumorzellen des blutbildenden Systems, bevorzugt Zellen aus Leukämien und Lymphomen, Zellen aus epithelealen Tumoren, Zellen aus ektodermalen Tumoren, z. B. Melanome, und Zellen aus embryonalen Tumoren aus undifferenziertem Gewebe, bevorzugt Blastome und Teratome. Ein Beispiel ist das hier näher untersuchte Nierenzellkarzi-

nom, insbesondere das metastatische Nierenzellkarzinom. Die semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen der Erfindung können dann zur Behandlung der Tumoren eingesetzt werden.

Wie bereits oben angesprochen, kann die zur Aufnahme in die Antigen-präsentierenden Zellen vorgesehene RNA aus autologen Tumorzellen zur unbegrenzten Vermehrung in cDNA rücktranskribiert, die cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert und anschließend die cDNA in RNA transkribiert wird.

Die Verabreichung der erfindungsgemäßen Antigen-präsentierenden Zellen erfolgt intravenös, subkutan oder intramuskulär, wobei eine subkutane Injektion bevorzugt wird.

Zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind alle Arten von Antigen-präsentierenden Zellen einsetzbar. Diese schließen insbesondere Monocyten/Makrophagen und dendritische Zellen ein, wobei Letztere bevorzugt werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung besteht darin, anstatt der Bestandteile autologer Tumorzellen einen Pool von Bestandteilen mehrerer unterschiedlicher Tumorzell-Linien einzusetzen, der in die semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen eingebracht wird. Diese können dann als Vakzine in der Tumorbehandlung eingesetzt werden. Um eine derartige "generische" Vakzine zu bilden ist es vorteilhaft, beispielsweise einen Pool von cDNA, wie oben beschrieben, von 3-5 unterschiedlichen RCCs herzustellen, der dann für alle Patienten verwendet werden kann. Denn es ist davon auszugehen, daß die meisten tumorspezifischen T-Zellen, die gegen derartige Pool-gepulste Antigen-präsentierende Zellen geprimed werden, autologe Tumorzellen aufgrund der Tatsache erkennen können, daß sie gemeinsame Peptid-MHC-Liganden aufweisen. Dies bedeutet, daß es ausreicht, ein einziges Produkt (d.h. eine generische cDNA und ihre entsprechende in vitro transkribierte cRNA) unter GMP-Bedingungen (GMP = Good Manufacturing Practice) zu erzeugen. Dann müßen nur noch die semi-allogenen dendritischen Zellen für jeden Patienten, der mit der erfindungsgemäßen Vakzin-Therapie behandelt werden soll, unter GMP-Bedingungen präpariert werden.

Die vorliegende Erfindung umfasst zuletzt eine pharmazeutische Zusammensetzung, die die oben beschriebenen semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen enthält, wobei die Zusammensetzung vorzugsweise in Form einer Vakzine vorliegt.
In den Abbildungen zeigen:

Abb.1 das Prinzip der Erzeugung einer allogenen Tumorvakzine nach Kugler et al., bei dem eine autologe Tumorzelle und eine allogene dendritische Zelle von nichtverwandten Individuen fusioniert werden,

Abb.2 den erfindungsgemäßen Ansatz, bei dem eine semi-allogene Vakzine unter Verwendung von HLA-haploidentischen Antigen-präsentierenden Zellen erzeugt wird.

Die haploidentische Vakzine weist Folgendes auf:

- Liganden aus MHC und TAA-(Tumor-assoziiertem Antigen-) Peptid für die Hälfte der Patienten-Allele.
  Alle Allele können unter Verwendung von zwei haploidentischen DC-Zubereitungen gematcht werden
- HLA-misgematchte MHC-Peptid-Liganden zur Stimulierung von Alloreaktionen und von T-Helferzellen
- Von DC's stammende co-stimulatorische Moleküle und Cytokine zur optimalen Unterstützung der Immunreaktionen (diese sind in der Abb. als „Y" wiedergegeben)

Im Folgenden werden die Grundgedanken der Erfindung sowie Testmodelle zu deren Veranschaulichung am Beispiel von dendritischen Zellen ausführlicher beschrieben.

Es werden zwei Modellsysteme verwendet, um die Prinzipien dieses Ansatzes zu verdeutlichen. Das erste verwendet einen gut charakterisierten Satz an Reagenzien aus einem Melanom-Modell, das zweite einen Satz an Reagenzien aus einem Nierenzellkarzinom-Modell. Das Melanommodell weist den Vorteil auf, daß das vom T-Zellrezeptor (TCR) erkannte Epitop (MHC-Peptid Ligand) des Testklones (Tyr-F8) identifiziert wurde; dies macht es möglich, die Effizienz der Antigen-Präsentation durch Antigen-präsentierende Zellen, wie beispielsweise dendritische Zellen, in einer quantitativeren Weise zu untersu-

chen. Das Epitop für einen Nierenzellkarzinom-spezifischen T-Zell-Klon (TIL-26) wurde bis jetzt nicht identifiziert, jedoch verwenden diese zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) hochcharakteristische TCR, die identifiziert und in vitro mit dem Verfahren der Echtzeit RT-PCR auf Grundlage der Molekularsequenz der TCR CDR3-Region quantifiziert werden können. Dies ermöglicht es, die funktionelle Priming-Kapazität der dendritischen Zellen zu identifizieren, indem die T-Zellen durch diese charakteristischen TCR-Sequenzen identifiziert werden. In Kombination können diese beiden Modelle verwendet werden, um die Spezifität und die Effizienz dieses Systems zum Präsentieren von tumorassoziierten Peptiden auf der Oberfläche von beispielsweise dendritischen Zellen und zur Aktivierung von spezifischen T-Zell-Reaktionen in vitro zu demonstrieren. Diese essentiellen Experimente beweisen noch vor Einleitung der klinischen Phase I/II das Funktionieren des der Erfindung zu Grunde liegenden Prinzips.

Melanomsystem

Die Reagenzien für dieses Modellsystem wurden von Professor Peter Schrier (Universität Leiden) bezogen. Ein HLA-A*0201-restringierter CTL-Klon (Tyr F8) wurde von einem Patienten mit fortgeschrittenem Melanom isoliert. Eine autologe Melanom-Tumorzell-Linie wurde ebenfalls von dem Patienten isoliert. Der spezifische Ligand, d.h. das aus einem Tumor-assoziierten Protein gewonnene Peptid, ist bekannt; es wird aus Tyrosinase, einem Enzym, das in gesunden Melanozyten in normalem Spiegel exprimiert wird, das jedoch in Melanom-Zellen überexprimiert wird, gewonnen. Das präsentierende MHC-Molekül wurde als von dem HLA-A*0201-Allel codiert identifiziert. Die cDNA für Tyrosinase ist verfügbar; das exakte, aus dem Tyrosinase-Protein gewonnene neun-Aminosäure-Peptid, das auf der Peptid-Bindungs-Rille des HLA-A2-Moleküls vorliegt, ist bekannt und der Tyr F8 T-Zell-Klon ist verfügbar (10).

Der allgemeine Ansatz des Experiments besteht zunächst darin, RNA aus der Melanom-Linie zu präparieren und dann cDNA durch reverse Transkription herzustellen. Diese cDNA wird dann amplifiziert und als eine Matrize zur Herstellung von in vitro transkribierter RNA (cRNA) verwendet. Die cRNA wird zum Pulsen von HLA-A2-positiven dendritischen Zellen (11, 12) verwendet. Diese dendritischen Zellen werden die cRNA

aufnehmen, und sie dann in Proteine translatieren, wovon ein Protein das Tyrosinase-Enzym sein sollte. Das Tyrosin-Protein wird intrazellulär in den dendritischen Zellen zu Peptid-Bruchstücken verarbeitet und das spezifische neun-Aminosäure-Epitop wird im endoplasmatischen Retikulum der dendritischen Zellen auf neu synthetisierte HLA-A2-Moleküle aufgeladen. Diese MHC-Peptid-Komplexe werden dann zur Plasmamembran der dendritischen Zelle transportiert, wo sie durch T-Zellen erkannt werden können. Tyr F8-Zellen, die den geeigneten MHC-Peptid-Komplex auf der DC-Oberfläche erkennen, reagieren durch Sezernieren von Interferon-Gamma und durch Aktivieren des zytolytischen Mechanismus, der es ihnen ermöglicht, die dendritische Zelle abzutöten. Diese Aktivierung kann durch eine ELISA-Detektion der Interferon-Gamma-Sezernierung durch den Tyr F8-Klon oder durch Verwendung eines Standard-Chrom-Freisetzung-Assay bestimmt werden, indem die dendritischen Zellen als Zielzellen markiert werden und indem ihre Lysis in Gegenwart von Tyr F8-Zellen gemessen wird. Die Aktivierung der Tyr F8-Zellen ist sehr spezifisch, so daß MHC-Moleküle, die von anderen Proteinen als Tyrosinase gewonnene Peptide tragen, die Tyr F8-Zellen nicht aktivieren können und ein bestimmter Grenzwert dieser spezifischen MHC-Tyrosinase-Peptid-Komplexe muß durch die DC präsentiert werden, um die Tyr F8-Zellen optimal zu stimulieren.

Um zu bestimmen, ob die originale cRNA das notwendige Startmaterial bereitstellen kann, um der dendritischen Zelle die Ausführung all dieser Schritte zu ermöglichen, werden cRNA gepulste dendritische Zellen als stimulierende Zellen zur Aktivierung der Tyr F8-Zellen verwendet. Weil die Melanomtumorzellen eine Vielzahl unterschiedlicher RNAs liefern, repräsentieren Transkripte für Tyrosinase nur einen Bestandteil eines viel größeren Pools. Die Fähigkeit dieses gemischten cRNA-Pools zur Bereitstellung des Tyrosinase-Epitops kann mit cRNA verglichen werden, die aus der isolierten Tyrosinase cDNA (d.h. nur eine RNA-Spezies) hergestellt wurde. Eine relative Beurteilung des Spiegels an HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-Komplexen kann durch Pulsen von dendritischen Zellen mit variierenden Mengen an Test-cRNA und durch einen Vergleich derer stimulatorischen Fähigkeiten mit dendritischen Zellen erfolgen, die mit unterschiedlichen bekannten Mengen eines synthetischen Peptids gepulst wurde, das das neun-Aminosäure-Epitop von Tyrosinase darstellt. Der Grenzwert, bei dem die Tyr F8-Zellen nicht mehr länger den korrekten MHC-Peptid-Komplex nachweisen können, kann durch Bestimmung der von Tyr F8-

Zellen freigesetzten Menge an Interferon-Gamma unter Verwendung eines spezifischen ELISA-Assays nachgewiesen werden.

Nierenzellkarzinom-System

Diese Reagenzien wurden von den Erfindern erzeugt. Eine Nierenzellkarzinom-spezifische CTL-Linie wurde von einem Nierenzellkarzinom-Patienten isoliert und T-Zell-Klone wurden aus dieser T-Zell-Linie gewonnen (TIL-26). Autologe Tumorzellen wurden ebenfalls von diesem Patienten gewonnen (RCC-26). Das MHC-Restriktionsmolekül, das ein Tumor-assoziiertes Peptid präsentiert und das von RCC-26-Zellen dargeboten wurde, wurde als das von HLA-A*0201-codierte Molekül identifiziert. Wenn die TIL-26-Zellen den autologen RCC-26 Tumorzellen ausgesetzt wurden, wurden sie zum Sezernieren von Interferon-Gamma aktiviert und sie waren dazu in der Lage, die autologen RCC-26 Tumorzellen zu lysieren (13).

Der allgemeine Entwurf dieses Experiments ist dem für das Melanom-System beschriebenen ähnlich. Im ersten Schritt wird RNA aus RCC-26 Zellen hergestellt und cDNA wird durch reverse Transkription hergestellt. Diese dient als die Matrize zur Erzeugung von cRNA durch in vitro Transkription. Die cRNA wird zum Pulsen der dendritischen Zellen verwendet und diese dendritischen Zellen werden auf ihre Fähigkeit hin überprüft, die TIL-26-Zellen zur Sekretion von Interferon-Gamma zu aktivieren. Die dendritischen Zellen werden ebenfalls im Anschluß an das Pulsen mit cRNA, die von RCC-26 Zellen stammte, in zytotoxischen Assays unter Verwendung von aktivierten TIL-26 Zellen als Zielzellen beurteilt. Die Effizienz der Stimulierung der dendritischen Zellen kann mit derjenigen der RCC-26 Zellen bei Assays verglichen werden, die die Interferon-Gamma-Sekretion durch die TIL-26 Zellen messen und als Zielzellen in Zytotoxizitäts-Assays.

Diese beiden Experimentreihen zeigen deutlich, daß die Verfahren zur Erzeugung von MHC-Peptid-Komplexen unter Verwendung einer cRNA-gepulsten allogenen (HLA-A*0201) dendritischen Zelle funktionieren.

Induktion von T-Zell-Reaktionen durch cRNA-gepulste allogene dendritische Zellen:

Um die Fähigkeit der cRNA-gepulsten dendritischen Zellen zum Primen von allogenen T-Zellen zu beurteilen, werden zwei Experimente in vitro durchgeführt. Zuerst wurde gezeigt, daß naive T-Zellen aus Spender DS (DS = anonymer Spender) in vitro mit RCC-26 Tumorzellen geprimed werden können, um ein Epitop zu erkennen, das offensichtlich dasselbe ist, wie das von TIL-26 (14) erkannte Epitop. Wie TIL-26 Zellen exprimieren die T-Zellen von Spender DS TCRα-Ketten, die zu den von TIL-26 Zellen exprimierten (15) hochgradig homolog sind. Die TCR-Sequenz dieser T-Zellen kann durch Isolierung von RNA aus einer Testprobe und unter Verwendung von TCR-spezifischen Primern zur Analyse der Transkriptmenge in der Probe unter Verwendung des Verfahrens der Echtzeit RT-PCR (14) quantifiziert werden. Zuerst werden allogene HLA-A*0201-positive dendritische Zellen, die mit cRNA (aus RCC-26 gewonnen) gepulst werden, als stimulierende Zellen in gemischten Lymphozyten-Kulturen unter Verwendung peripherer Blut-Lymphozyten (PBL) von Spender DS als reagierende Zellen verwendet. Das Auftreten der Marker (Va20) T-Zellen, die das auch von TIL-26 Zellen erkannte Epitop erkennen, wird überwacht, indem nach Zunahmen von Transkripten mit charakteristischen Va20-Sequenzen gesucht wird. Eine quantitative Bestimmung kann unter Verwendung einer Echtzeit RT-PCR durchgeführt werden, die die Häufigkeit derartiger Transkripte in den unstimulierten PBL und im Anschluß an eine Stimulierung mit den cRNA-gepulsten dendritischen Zellen in vitro nach verschiedenen Umläufen der Restimulation vergleicht. Autologe dendritische Zellen, die aus Spender DS gewonnen wurden, die mit cRNA (RCC-26-gewonnen) gepulst sind, werden als Zielzellen verwendet und direkt mit RCC-26 Tumorzellen verglichen, indem als zytotoxische Effektorzellen die mit cRNA-gepulsten dendritischen Zellen geprimten PBL versus mit intakten RCC-26 Tumorzellen geprimte PBL verwendet werden.

Als zweites Testsystem werden T-Zellen von einem HLA-A*0201-Spender mit cRNA-gepulsten (aus einem Melanom gewonnenen) dendritischen Zellen stimuliert, die von einem Spender gewonnen wurden, der HLA-A*0201 in gemischten Lymphozyten-dendritischen Zell-Kulturen exprimiert. Die Entwicklung von T-Zellen, die den Tyrosin-

spezifischen Liganden erkennen, wird durch Standarddurchflußzytometrie unter Verwendung von HLA-A2-Tyrosinase-Peptid-spezifischen Tetrameren (16) beurteilt.

Pulsen von dendritischen Zellen mit gemischten cRNA-Proben:

Es wird gegenwärtig angenommen, daß Immunreaktionen, die gegen multiple Epitope erzeugt werden, die beste Möglichkeit zur Eliminierung von Tumorzellen und zum Schutz gegen einen Tumor-Rückfall darstellen. Dies basiert auf der Beobachtungen, daß in vivo gegen individuelle MHC-Peptid-Liganden geprimte CTL zur Erzeugung von CTL geführt haben, die für den MHC-Peptid-Liganden spezifisch sind und in einigen Fällen zur Tumor-Rückentwicklung geführt haben. Es können jedoch Tumorvarianten entstehen, die nicht mehr länger die MHC-Moleküle exprimieren und nicht mehr länger das Protein exprimieren, aus dem das spezifische Peptid gewonnen wird. Wenn CTL's mit Spezifitäten für viele unterschiedliche MHC-Peptid-Liganden erzeugt werden, dann ist die Entstehung von Tumorvarianten in geringerem Maße möglich, weil individuelle Tumorzellen unterschiedliche Mutationen in allen MHC-Molekülen und Proteinen, die Peptide bereitstellen, exprimieren müßten, um der Erkennung durch CTL mit vielen unterschiedlichen Spezifitäten zu entgehen.

Es ist deswegen optimal, cRNA aus mehreren Tumorzell-Linien zu poolen, um viele unterschiedliche Tumor-assoziierte Peptide für einen Immunangriff bereitzustellen. Ähnlich ist es auch besser, mehrere unterschiedliche MHC-Moleküle zu verwenden, die von den reagierenden T-Zellen und den stimulierenden dendritischen Zellen geteilt werden. Dies wird in der hier beschriebenen Strategie erreicht, indem HLA-haplo-identische dendritische Zellen, die von Familienmitgliedern des Spenders der T-Zellen gewonnen werden, wie unten beschrieben verwendet werden. Dabei muß jedoch sichergestellt werden, daß durch Poolen von cRNA aus unterschiedlichen Tumoren die erforderliche Dichte an MHC-Peptid-Liganden, die für spezielle Epitope auf einer Tumorzell-Linie charakteristisch sind, noch erhalten bleibt. Dies kann experimentell erreicht werden, indem cRNA aus der Melanomlinie mit cRNA aus der RCC-26 Linie kombiniert wird. Diese gepoolte cRNA wird dann zum Pulsen von allogenen (HLA-A*0201-positiven) dendritischen Zellen und zur Beurteilung verwendet, ob diese dendritischen Zellen noch zur Aktivierung sowohl des

Melanom-spezifischen CTL-Klones, nämlich Tyr F8, als auch des RCC-spezifischen Klones, nämlich TIL-26, in der Lage sind. Wenn dieses Experiment zeigt, daß gepoolte cRNA (in einem Verhältnis von 1:1 aus den beiden Tumor-cRNAs gemischt) zur Aktivierung beider T-Zell-Klone funktioniert, dann können Variationen im Verhältnis der beiden cRNAs verwendet werden, um den Grad zu bestimmen, in dem eine einzelne cRNA-Probe verdünnt werden kann und noch zur DC-Prozessierung bzw. –Verarbeitung und Präsentation funktioniert. Auf Grundlage gepoolter cRNA aus mehreren unterschiedlichen Tumorlinien (beispielsweise drei RCC-Linien) wird dann eine Vakzine erzeugt und diesem Pool wird zusätzliche cRNAs zugesetzt, die aus bekannten, in verschiedenen Nierenzellkarzinomen exprimierten Genen gewonnen werden, die ebenfalls potentielle Zielmoleküle für spezifische CTL's darstellen. Diese könnten HER2/neu, MUC1, PSMA, WT-1, Telomerase und mehrere weitere Kandidaten einschließen (9). Der Einfluß des Zusatzes dieser individuellen cRNA-Spezies kann überprüft werden, indem sie der cRNA von RCC-26 zugesetzt wird und indem die Fähigkeit der gepulsten dendritischen Zellen beurteilt wird, TIL-26-Zellen zu aktivieren.

Vergleich von autologen versus HLA-haplo-identische dendritische Zellen als Antigen präsentierende Zellen:

Die vorstehend beschriebenen Experimente wurden dargelegt, um die Verwendung von von nicht verwandten Spendern gewonnenen cRNA-gepulsten allogenen dendritischen Zellen zu etablieren, die nur HLA-A*0201-codierte Moleküle mit den reagierenden T-Zellen teilen. Danach besteht der nächste Schritt darin zu zeigen, daß HLA-haplo-identische dendritische Zellen T-Zellen gegen Tumor-assoziierte Epitope primen können, die durch cRNA in die dendritischen Zellen übertragen wurden. Diese Strategie wird gewählt, weil HLA-haplo-identische DC drei Klasse I-Allele (HLA-A, B und C) und drei Klasse II-Allele (HLA-DR, DQ und DP) mit den T-Zellen teilen. Die unterschiedlichen Klasse I-Moleküle können jeweils einen einzigartigen Peptidsatz binden und unterschiedliche CD8+ CTL primen und die drei Klasse II-codierten Moleküle binden ebenfalls jeweils unterschiedliche Peptidsätze, die sich von denjenigen der Klasse I-Moleküle unterscheiden. Diese Klasse II-Peptid-Liganden aktivieren eine andere Art von T-Lymphozyten, die CD4-

Zellen, die Zytokine bereitstellen können, die die optimale Entwicklung einer Immunreaktion unterstützen oder direkt als Effektorzellen fungieren (11).

Die Experimente zur Untersuchung der Rolle von HLA-haplo-identischen dendritischen Zellen werden durch Vergleich von autologen dendritischen Zellen, die von normalen Kontroll-Spendern (Spender Nr. 1) präpariert wurden und von HLA-haplo-identischen dendritischen Zellen, die von einem ausgewählten HLA-typisierten Familienmitglied (Spender 2) präpariert wurden, verglichen (d.h. ein Elternteil oder Geschwister wird so ausgewählt, daß er einen HLA-Haplotyp aufweist, den er mit dem Spender 1 teilt und der zweite HLA-Haplotyp diesem nicht entspricht; siehe Abb. 2). Von beiden Spendern präparierte DC's werden mit cRNA von RCC-26 oder der Melanom-Linie gepulst. Die sich ergebenden DC's werden zuerst auf ihre Fähigkeit hin getestet, die Interferon-Gamma Sekretion von Tyr F8 und TIL-26-Zellen wie vorstehend beschrieben zu stimulieren. Im nächsten Schritt werden PBL von Spender Nr. 1 in vitro mit cRNA-gepulsten autologen dendritischen Zellen oder den HLA-haplo-identischen dendritischen Zellen von Spender 2 stimuliert. Im Anschluß an zwei oder mehrere Runden der Restimulation wird das Vorhandensein von T-Zellen, die durch unterschiedliche MHC-Moleküle (sowohl Klasse I als auch Klasse II) präsentierte Epitope erkennen, durch Messen ihrer Interferon-Gamma-Sekretion im Anschluß an die Stimulierung mit cRNA-gepulsten autologen dendritischen Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit spezifischer monoklonaler Antikörper bestimmt. Die anti-MHC Klasse I-spezifischen monoklonalen Antikörper (W6/32) werden Wechselwirkungen von $CD8^+$ CTL mit den dendritischen Stellenzellen blockieren. Eine verminderte Interferon-Gamma-Sekretion in Gegenwart monoklonaler Antikörper, die für HLA-A, B oder C Moleküle spezifisch sind, zeigt den Grad an, in dem CTL's, die ihre Peptide in Verbindung mit unterschiedlichen Klasse I-Molekülen erkennen, vorliegen. Das Vorliegen von Klasse II-restringierten $CD4^+$-Zellen kann durch denselben Ansatz beleuchtet werden, indem Klasse II-spezifische monoklonale Antikörper verwendet werden, die mit HLA-DR, DQ und DP-Moleklülen reagieren (17).

Die erfindungsgemäße Erzeugung von cRNA wird durch das nachfolgende Flußdiagramm veranschaulicht:

Flußdiagramm zur Herstellung von cRNA

1. Züchten von Tumorzell-Linien in vitro (beispielsweise Melanomlinie 9304.A12 und Nierenzellkarzinomlinie, RCC-26)

2. Extrahieren von RNA aus den Tumorzell-Linien (beispielsweise unter Verwendung von Quigen "RNAEasy" Kit Nr. 75412)

3. Durchführung einer Erststrang-cDNA-Synthese (beispielsweise unter Verwendung von Clontech "Smart PCR" cDNA-Synthese Kit Nr. K1052)

4. Durchführung einer cDNA Amplifikation (beispielsweise unter Verwendung von Clontech "Smart PCR" cDNA-Synthese Kit Nr. K1052)

5. Durchführung einer in vitro Transkription von cDNA (beispielsweise unter Verwendung des "mMessage-mMachine" Kit Nr. 1344 von Ambion)

6. Reinigen von cRNA (beispielsweise unter Verwendung des Quigen "RNAEasy" Kit Nr. 75142)

7. Testen der Integrität der cRNA (beispielsweise unter Verwendung eines Perkin Elmer "One Step RT/PCR" Kits Nr. P/N 4308206)

Literatur:

1. Childs, R.W. Chernoff, A., Contentin, N., Bahceci, E., Schrump, D., Leitman, S., Read, E.J., Tisdale, J., Dunbar, C., Linehan, W.M., Young, N.S. and Barrett, A.J. 2000. Regression of metastiatic renal-cell carcinoma after nonmyeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplanation. N. Engl. J. Med. 14:750-758.

2. Kolb, H.-J., Schattenberg., A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieder, D., van Rhee, F., Mittermüller, J., de Witte, T., Holler, E. and Ansara, H. for the European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. 1995. Graft-versus-leukemia effect of Spender lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. Blood 86: 2041-2050.

3. Kugler A., Stuhler, G., Walden, P., Zöller, G., Zobywalski, A., Brossart, P., Trefzer, U., Ullrich, S., Müller, C.A., Becker, V., Gross, A.J., Hemmerlein, B., Kanz, L., Müller, G.A., and Ringert, R.-H. 2000. Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. Nature Med. 6: 332-336.

4. Kufe, D. 2000. Smallpox. polio and now a cancer vaccine? Nature Med. 6: 252-253.

5. Boczkowski, D., Nair, s.K., Nam, J.H., Lyerly, H.K. and Golboa, E. 2000. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. Cancer Res. 60: 1028-1034.

6. Heiser, A., Dahm, P., Yancey, D., Maurice, M.A., Boczkowski, D., Nair, S.K., Gilboa, E. and Vieweg, J. 2000. Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. J. Immunol. 164: 5508-5014.

7. Nair, S.K., Boczkowski, D., Morse, M., Cumming, R.I., Lyerly, H.K. and Gilboa, E. 1998. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. Nat. Biotechnol 16: 364-369.

8. Nair, SK. Hull, S., Coleman, D., Gilboa, E., Lyerly, H.K. and Morse, M.A. 1999. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. Int. J. Cancer 82: 121-124.

9. Dannull, J., Cerny, T., Ackermann, D.K. and Groettrup, M. 2000. Current status of dendritic cell-based tumor vaccination. Onkologie 23:544-551.

10. Visseren, M.J., van Elsas, A., van der Voort. E.I.H., Ressing, M.E., Käst. W.M., Schrier, P.I. and C.J.M. Melief. 1995. CTL specific for the tyrosinase autoantigen can be induced from healthy Spender blood to lyse melanoma cells. J. Immunol. 154:3991-3998.

11. Su, Z., Peluso. M.V.. Raffegerst, S.H,, Schendel, D.J,, and M.A. Roskrow. 2001. LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with relapsed EBV-positive Hodgkin disease. Eur. J. Immunol. 31:947-958.

12. Su, Z., Peluso, M.V., Raffergerst, S.U., Schendel, D.J. and Roskrow, M. Antigen presenting cells transfected with LMP2a RNA induce CD4+ LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes which kill via a Fas-independent mechanism (submitted).

13. Schendel. D.J., Gansbacher. B , Oberneder. R., Kriegmair, M., Hofstetter, A., Riethmüller, G. and O.G. Segurado. 1993. Tumor-specific lysis of human renal cell carcinomas by tumor-infiltrating lymphocytes.l. HLA-A2 restricted lysis of autologous and aliogeneic tumor lines. J. Immunol, 151:4209-4220.

14. Schendel, D J., Frankenberger, B., Jantzer, P , Cayeux, S., Nößner, E., Willimsky, G., Maget, B., Pohla. H., and Th. Blankenstein. 2000. Expression of B7.1 (CD80) in a renal cell carcinoma line allows expansion of tumor-associated cytotoxic T lymphocytes in the presence of an alloresponse. Gene Therapy 7: 2007-2014.

15. Jantzer, P. and D.J. Schendel. 1998. Human renal cell carcinoma antigen-specific cytotoxic T lymphocytes: antigen-driven selection and long-term persistence in vivo. Cancer Res. 58: 3078-3086.

16. Altman. J.D., Moss. P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J. l., McMichael. A.J. and Davis, M.M. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T Lymphocytes. Science 274: 94-96.

17. Gong, J., Nikrui, N., Chen, D., Koido, S., Wu, Z., Tanaka, Y., Cannistra, S., Avigan, D. and Kufe, D. 2000. Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity. J. Immunol.165: 1705-1711.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung semi-allogener Antigen-präsentierender Zellen, in welche Proteine und/oder Peptide oder RNA oder DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus autologen Tumorzellen stammen, eingebracht sind, zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

2. Verwendung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Tumorzellen umfassen: Zellen aus Karzinomen, bevorzugt Ovarial-, Mamma- und Nierenzellkarzinomen, Tumorzellen des blutbildenden Systems, bevorzugt Zellen aus Leukämien und Lymphomen, Zellen aus mesenchymalen Tumoren, bevorzugt Sarkomen, Zellen aus epithelealen Tumoren, Zellen aus ektodermalen Tumoren, bevorzugt Melanomen, und Zellen aus embryonalen Tumoren aus undifferenziertem Gewebe, bevorzugt Blastomen und Teratomen.

3. Verwendung nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen zur Behandlung von Tumoren eingesetzt werden, umfassend: Karzinome, bevorzugt Ovarial-, Mamma- und Nierenzellkarzinome, Tumore des blutbildenden Systems, bevorzugt Leukämien und Lymphome, mesenchymale Tumore, bevorzugt Sarkome, epitheleale Tumore, ektodermale Tumore, bevorzugt Melanome, und embryonale Tumore aus undifferenziertem Gewebe, bevorzugt Blastome und Teratome.

4. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen von zwei unterschiedlichen semi-allogenen Individuen eingesetzt werden.

5. Verwendung nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß RNA eingesetzt wird, die aus autologen Tumorzellen in cDNA rücktranskribiert, diese cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert und anschließend die cDNA in RNA transkribiert wurde.

6. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen intravenös, subkutan oder intramuskulär appliziert werden.

7. Verwendung von semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen, in welchen Proteine und/oder Peptide oder RNA bzw. DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus autologen Tumorzellen stammen, in rekombinanter Form eingebracht sind.

8. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß RNA oder DNA oder cDNA in die semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen eingebracht ist, die für tumordefinierte Antigene codiert,
die tumordefinierten Antigene in den Tumorzellen überexprimierte Antigene sind,
und bevorzugt ausgewählt werden aus Onkogenen, bevorzugt HER2/neu, Proteinen, die dem Tumor einen Wachstumsvorteil verschaffen und/oder sein Überleben sichern, bevorzugt PSMA, Zellzyklusregulationsproteinen, Transkriptionsfaktoren, bevorzugt WT-1, Mucinen, bevorzugt MUC1, Proteinen, die in der Regulation der Zellteilung involviert sind, bevorzugt Telomerase.

9. Verwendung nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Antigen-präsentierenden Zellen dendritische Zellen oder Makrophagen sind.

10. Verwendung semi-allogener Antigen-präsentierender Zellen, in welche Proteine und/oder Peptide oder RNA oder DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, aus mehreren unterschiedlichen Tumorzell-Linien eingebracht sind, zur Behandlung von Tumorerkrankungen.

11. Verwendung nach Anspruch 10, bei der gepoolte cRNA aus zwei oder drei unterschiedlichen Tumorzelllinien eingebracht wird.

12. Verfahren zur Erzeugung von semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen zur Behandlung von Tumorerkrankungen, bei dem Proteine und/oder Peptide oder RNA oder DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus autologen Tumorzellen stammen, in die semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen eingebracht werden.

13. Verfahren zur Erzeugung von semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen zur Behandlung von Tumorerkrankungen, bei dem Proteine und/oder Peptide oder RNA bzw. DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, aus mehreren unterschiedlichen Tumorzell-Linien in die semi-allogenen Antigen-präsentierenden Zellen eingebracht werden.

14. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, daß zunächst RNA aus Tumorzellen in cDNA rücktranskribiert, die cDNA mit Hilfe der PCR amplifiziert und anschließend die cDNA in RNA transkribiert wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12-14, bei dem Antigen-präsentierende Zellen von zwei unterschiedlichen semi-allogenen Individuen eingesetzt werden.

16. Semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen, die durch eines der Verfahren nach Anspruch 12 - 15 gewinnbar sind.

17. Semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen, die Proteine und/oder Peptide oder RNA bzw. DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die

in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus autologen Tumorzellen stammen, enthalten.

18. Semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Proteine und/oder Peptide oder RNA oder DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, die in Tumorzellen überexprimiert werden oder die aus autologen Tumorzellen stammen, ausgewählt werden aus folgenden Tumorzellen: Karzinomen, bevorzugt Ovarial-, Mamma- und Nierenzellkarzinomen, Tumorzellen des blutbildenden Systems, bevorzugt Zellen aus Leukämien und Lymphomen, Zellen aus mesenchymalen Tumoren, bevorzugt Sarkomen, Zellen aus epithelealen Tumoren, Zellen aus ektodermalen Tumoren, bevorzugt Melanomen, und Zellen aus embryonalen Tumoren aus undifferenziertem Gewebe, bevorzugt Blastomen und Teratomen.

19. Semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen, die Proteine und/oder Peptide oder RNA oder DNA oder cDNA, die für diese Proteine und/oder Peptide codieren, aus mehreren unterschiedlichen Tumorzell-Linien enthalten.

20. Semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen nach Anspruch 16 - 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Antigen-präsentierenden Zellen dendritische Zellen oder Makrophagen sind.

21. Pharmazeutische Zusammensetzung, enthaltend semi-allogene Antigen-präsentierende Zellen nach einem der Ansprüche 16 - 20.

22. Zusammensetzung nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine Vakzine handelt.

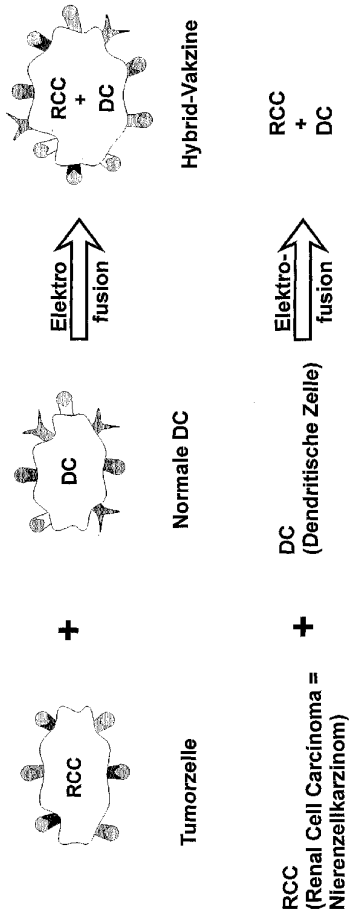

RCC
+
DC
Hybrid-Vakzine
RCC
+
DC
Elektro
fusion
Elektro-
fusion
DC
Normale DC
DC
(Dendritische Zelle)
+
+
RCC
Tumorzelle
RCC
(Renal Cell Carcinoma =
Nierenzellkarzinom)

FIG. 1

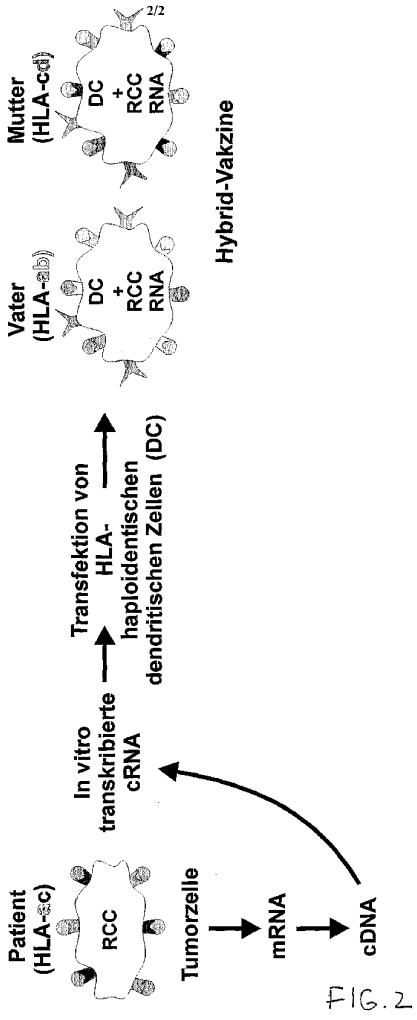

Mutter (HLA-cd)
DC + RCC RNA
Vater (HLA-ab)
DC + RCC RNA
Hybrid-Vakzine
Transfektion von HLA-haploidentischen dendritischen Zellen (DC)
In vitro transkribierte cRNA
Patient (HLA-cc)
RCC
Tumorzelle
mRNA
cDNA

FIG.2

【手続補正書】
【提出日】平成15年3月5日(2003.3.5)
【手続補正１】
【補正対象書類名】特許請求の範囲
【補正対象項目名】全文
【補正方法】変更
【補正の内容】
【特許請求の範囲】
【請求項１】
患者における腫瘍疾病の治療のためのＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞の製造方法であって、
ドナーから、患者の抗原提示細胞に対してＨＬＡハプロタイプが一致する抗原提示細胞を提供する工程と、
腫瘍細胞内で過剰発現されるか、もしくは自己腫瘍細胞から誘導されたタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡを、ＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞に導入する工程とを含む方法。
【請求項２】
いくつかの異なる腫瘍細胞株由来のタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをそれぞれコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが、ＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞に導入されることを特徴とする請求項１に記載の方法。
【請求項３】
最初に腫瘍細胞由来のＲＮＡをｃＤＮＡに逆転写し、該ｃＤＮＡをＰＣＲによって増幅し、続いて該ｃＤＮＡをＲＮＡに転写することを特徴とする請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
２人の異なるＨＬＡハプロタイプ一致個体の抗原提示細胞が用いられることを特徴とする請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
請求項１～４に記載の方法によって得ることのできるＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞。
【請求項６】
前記腫瘍細胞内で過剰発現されるか、もしくは自己腫瘍細胞から誘導されたタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡは、以下の腫瘍細胞、すなわち、好ましくは卵巣、乳房および腎細胞癌腫のような癌腫、好ましくは白血病およびリンパ腫の細胞のような造血系の腫瘍細胞、好ましくは肉腫のような間葉性腫瘍の細胞、上皮腫瘍の細胞、好ましくは黒色腫のような外胚葉腫瘍の細胞、ならびに好ましくは芽球腫および奇形腫のような未分化組織からの胚芽腫の細胞から選ばれることを特徴とする請求項５に記載のＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞。
【請求項７】
いくつかの異なる腫瘍細胞株由来のタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡを含有する請求項５または６に記載のＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞。
【請求項８】
前記抗原提示細胞は、樹状細胞またはマクロファージであることを特徴とする請求項５～７に記載のＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞。
【請求項９】

請求項５～８のいずれか１項に記載のＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞を含有する医薬組成物。
【請求項１０】
ワクチンであることを特徴とする請求項９に記載の組成物。
【請求項１１】
患者における腫瘍疾病の治療のための、請求項５～８のいずれか１項に記載のＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞の用途。
【請求項１２】
前記腫瘍細胞は、好ましくは卵巣、乳房および腎細胞癌腫のような癌腫の細胞、好ましくは白血病およびリンパ腫の細胞のような造血系の腫瘍細胞、好ましくは肉腫のような間葉性腫瘍の細胞、上皮腫瘍の細胞、好ましくは黒色腫のような外胚葉腫瘍の細胞、ならびに好ましくは芽球腫および奇形腫のような未分化組織からの胚芽腫の細胞を含むことを特徴とする請求項１１に記載の用途。
【請求項１３】
前記ＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞は、好ましくは卵巣、乳房および腎細胞癌腫のような癌腫、好ましくは白血病およびリンパ腫のような造血系の腫瘍、好ましくは肉腫のような間葉性腫瘍、上皮腫瘍、好ましくは黒色腫のような外胚葉腫瘍、ならびに好ましくは芽球腫および奇形腫のような未分化組織からの胚芽腫を含む腫瘍の治療のために用いられることを特徴とする請求項１２に記載の用途。
【請求項１４】
２人の異なるＨＬＡハプロタイプ一致個体のＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞が用いられることを特徴とする請求項１１～１３のいずれか１項または複数項に記載の用途。
【請求項１５】
自己腫瘍細胞からｃＤＮＡに逆転写し、該ｃＤＮＡをＰＣＲによって増幅した後に該ｃＤＮＡをＲＮＡに転写して得られたＲＮＡが用いられることを特徴とする請求項１４に記載の用途。
【請求項１６】
前記ＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞は、静脈内、皮下または筋肉内経路によって投与されることを特徴とする請求項１１～１５のいずれか１項または複数項に記載の用途。
【請求項１７】
腫瘍細胞内で過剰発現されるか、あるいは自己腫瘍細胞から誘導されたタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをそれぞれコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが、組換え技術により導入されている請求項１１～１６のいずれか１項に記載のＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞の用途。
【請求項１８】
腫瘍明示化抗原をコードするＲＮＡもしくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡがＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞に導入されていることを特徴とし、該腫瘍明示化抗原は、腫瘍細胞内で過剰発現される抗原であって、好ましくは、腫瘍遺伝子（好ましくはＨＥＲ２／ｎｅｕ）、腫瘍に増殖優位性を与えるか腫瘍の生存を保証するかの少なくともいずれかの作用を有するタンパク質（好ましくはＰＳＭＡ）、細胞周期調節タンパク質、転写因子（好ましくはＷＴ‐１）、ムチン（好ましくはＭＵＣ‐１）、細胞分裂の調節に関与するタンパク質（好ましくはテロメラーゼ）から選択される、請求項１１～１７のいずれか１項または複数項に記載の用途。
【請求項１９】
前記抗原提示細胞は樹状細胞またはマクロファージであることを特徴とする請求項１１～１８のいずれか１項または複数項に記載の用途。
【請求項２０】
いくつかの異なる腫瘍細胞株由来のタンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれか、または前記タンパク質およびペプチドのうち少なくともいずれかをコードするＲＮＡも

しくはＤＮＡもしくはｃＤＮＡが、患者における腫瘍疾病の治療のために導入されている請求項１１～１９のいずれか１項または複数項に記載のＨＬＡハプロタイプ一致抗原提示細胞の用途。

【請求項２１】

２つまたは３つの異なる腫瘍細胞株からプールされたｃＲＮＡが導入されていることを特徴とする請求項２０に記載の用途。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interna l Application No
PCT/EP 02/02595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/44 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 33527 A (COHEN EDWARD P) 6 August 1998 (1998-08-06) *siehe Zusammenfassung, Seite 6, letzter Absatz, Seite 7, Absatz 2 bis Seitenende, Seite 8, Zeilen 3-23, Seite 9, letzter Absatz, Seite 18, Absatz 2, Seite 37, Absatz 2, Ansprüche 1-10*	1-22
Y	US 6 063 375 A (NEWTON III DANFORTH A ET AL) 16 May 2000 (2000-05-16) *siehe Spalte 2, Zeilen 23-30, Zeilen 60-67, Spalte 3, Zeilen 53-58, Spalte 4, Zeilen 22-38*	1-22

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in 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 document 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	Date of mailing of the international search report
12 July 2002	22/07/2002

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL – 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Stoltner, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/EP 02/02595

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00 76537 A (NEWTON DANFORTH A ;UNIV SOUTH CAROLINA (US); BROWN EDWIN A (US); G) 21 December 2000 (2000-12-21) *siehe Zusammenfassung, Seite 4, Absatz 2, Seite 23, Zeilen 19-27, Seite 25, Zeilen 10-16*	1-22

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/EP02/02595

ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210

Continuation of box I.2

Claims No: 1(partly),7,8,18

In view of the large number and also the content of the relevant patent claims, which make it difficult, if not impossible, to determine the extent of the protection sought by the claims, the above patent application fails to meet the requirements of PCT Article 6(c.f. also PCT Rule 6.1(a)) to such a degree that a meaningful search is impossible to conduct. For this reason, the search was directed at those sections of the patent claims which can be regarded as clear, supported and disclosed in the above sense, namely those sections relating to the compounds/products/methods defined in claims 2/3.

The applicant is reminded that claims, or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). EPO policy, when acting as an International Preliminary Examining Authority, is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case, irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report (Article 19 PCT) or during any Chapter II procedure whereby the applicant provides new claims.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

Interna Application No
PCT/EP 02/02595

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9833527	A	06-08-1998	EP	1012240 A2	28-06-2000
			JP	2001522226 T	13-11-2001
			US	6187307 B1	13-02-2001
			WO	9833527 A2	06-08-1998
US 6063375	A	16-05-2000	AU	735083 B2	28-06-2001
			AU	4338297 A	02-04-1998
			EP	0927244 A1	07-07-1999
			JP	2001500731 T	23-01-2001
			WO	9811202 A1	19-03-1998
WO 0076537	A	21-12-2000	AU	4801600 A	02-01-2001
			WO	0076537 A2	21-12-2000
			AU	735083 B2	28-06-2001
			AU	4338297 A	02-04-1998
			EP	0927244 A1	07-07-1999
			JP	2001500731 T	23-01-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern es Aktenzeichen
PCT/EP 02/02595

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K39/44 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 33527 A (COHEN EDWARD P) 6. August 1998 (1998-08-06) *siehe Zusammenfassung, Seite 6, letzter Absatz, Seite 7, Absatz 2 bis Seitenende, Seite 8, Zeilen 3-23, Seite 9, letzter Absatz, Seite 18, Absatz 2, Seite 37, Absatz 2, Ansprüche 1-10* ---	1-22
Y	US 6 063 375 A (NEWTON III DANFORTH A ET AL) 16. Mai 2000 (2000-05-16) *siehe Spalte 2, Zeilen 23-30, Zeilen 60-67, Spalte 3, Zeilen 53-58, Spalte 4, Zeilen 22-38* --- -/--	1-22

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
12. Juli 2002	22/07/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Stoltner, A

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internes Aktenzeichen
PCT/EP 02/02595

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 00 76537 A (NEWTON DANFORTH A ;UNIV SOUTH CAROLINA (US); BROWN EDWIN A (US); G) 21. Dezember 2000 (2000-12-21) *siehe Zusammenfassung, Seite 4, Absatz 2, Seite 23, Zeilen 19-27, Seite 25, Zeilen 10-16*	1-22

Formblatt PCT/ISA/210 (Fortsetzung von Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 02/02595

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. ☒ Ansprüche Nr. 1(part), 7,8,18
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210

3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/EP 02 02595

WEITERE ANGABEN PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 1(part), 7,8,18

Angesichts der großen Zahl wie auch des Wortlauts der geltenden Patentansprüche, welche es damit erschweren wenn nicht gar unmöglich machen, den durch sie erstrebten Schutzumfang zu bestimmen, entspricht die vorliegende Patentanmeldung den Anforderungen des Artikels 6 PCT (vgl. auch Regel 6.1(a) PCT) in einem Maße nicht, daß eine sinnvolle Recherche undurchführbar ist. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Verbindungen/Produkte/Verfahren gemäss Ansprüche 2/3.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Interne _ les Aktenzeichen
PCT/EP 02/02595

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9833527	A	06-08-1998	EP 1012240	A2	28-06-2000
			JP 2001522226	T	13-11-2001
			US 6187307	B1	13-02-2001
			WO 9833527	A2	06-08-1998
US 6063375	A	16-05-2000	AU 735083	B2	28-06-2001
			AU 4338297	A	02-04-1998
			EP 0927244	A1	07-07-1999
			JP 2001500731	T	23-01-2001
			WO 9811202	A1	19-03-1998
WO 0076537	A	21-12-2000	AU 4801600	A	02-01-2001
			WO 0076537	A2	21-12-2000
			AU 735083	B2	28-06-2001
			AU 4338297	A	02-04-1998
			EP 0927244	A1	07-07-1999
			JP 2001500731	T	23-01-2001

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1998)

フロントページの続き

(72)発明者　ヴァンク、ルドルフ
ドイツ連邦共和国　８０４６９　ミュンヘン　ハンスーザクスーシュトラーセ　１２　フィア

Ｆターム(参考) 4B065 AA90X AA93X AA93Y AB01 BA01 CA44
4C084 AA13 NA14 ZB262
4C087 AA01 AA02 AA03 BB63 BB64 BB65 CA12 NA14 ZB26