

(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2005-515192
(P2005-515192A)

(43) 公表日 平成17年5月26日(2005.5.26)

(51) Int.Cl.⁷

A61K 39/00
A61K 35/12
A61K 35/14
A61K 35/28
A61K 35/52

F 1

A 61 K 39/00
A 61 K 35/12
A 61 K 35/14
A 61 K 35/28
A 61 K 35/52

H

テーマコード(参考)

4 C 08 5
4 C 08 7

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-546928 (P2003-546928)	(71) 出願人	504206632 ダンドリット バイオテック アクティー ゼルスカブ
(86) (22) 出願日	平成14年11月29日 (2002.11.29)		デンマーク国 デコ-2970 ヘアスホ ルム ウセレド コンエヴェイ 102
(85) 翻訳文提出日	平成16年7月28日 (2004.7.28)		シーオー ヘアスホルム シアフウス
(86) 國際出願番号	PCT/DK2002/000802	(74) 代理人	100060759 弁理士 竹沢 莊一
(87) 國際公開番号	W02003/045427	(74) 代理人	100087893 弁理士 中馬 典嗣
(87) 國際公開日	平成15年6月5日 (2003.6.5)	(72) 発明者	アレクセイ キルキン デンマーク国 デコ-2100 コペンハ ーゲン エ ストランドボウレヴァーデン 61 2・テ・ヴェ
(31) 優先権主張番号	PA 2001 01770		
(32) 優先日	平成13年11月29日 (2001.11.29)		
(33) 優先権主張国	デンマーク(DK)		
(31) 優先権主張番号	60/336,706		
(32) 優先日	平成13年12月7日 (2001.12.7)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト又は動物において免疫応答を誘導するための医薬組成物

(57) 【要約】

本発明は、ヒト又は動物において免疫応答を誘導するための医薬組成物であって、少なくとも5つの癌/精巣抗原を含有するが、系統特異的分化抗原を含まない又は実質的に含まない樹状細胞を含有してなる医薬組成物と共に、多数の癌/精巣抗原を発現するが、分化抗原を発現しない単離された細胞株、及び本発明の組成物を使用するヒト又は動物において免疫応答を誘導する方法に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

多数の癌 / 精巣抗原を提示する樹状細胞を含有してなる、ヒト又は動物において免疫応答を誘導するための医薬組成物において、

a) 樹状細胞によって、少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原は提示されるが、系統特異的分化抗原は提示されない又は実質的に提示されないこと、

b) 癌 / 精巣抗原が、少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも 1 つの癌細胞株から提供されること、及び

c) 癌 / 精巣抗原の負荷の間、樹状細胞は未成熟である (CD1a陽性、CD14陰性、及びCD83 10 陰性) こと、

を特徴とするヒト又は動物において免疫応答を誘導するための医薬組成物。

【請求項 2】

樹状細胞が、抗原の負荷後に、成熟因子の添加によって成熟されたものである請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 3】

樹状細胞が、初期生育段階において、サイトカインを含まない生育培地にてエクスピボ培養され、ついで、樹状細胞に少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原を負荷する前に、サイトカインを含有する培地にて第 2 生育段階を行ったものである請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 4】

樹状細胞が、自己樹状細胞である請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 5】

樹状細胞への負荷のために、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも 1 つの癌細胞株の全細胞溶解物を使用する請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 6】

樹状細胞における少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原の提示を、全細胞融合によって達成する請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 7】

少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原の提示を、エクソソームの使用によって達成する請求項 1 記載の医薬組成物。

【請求項 8】

癌細胞株が黒色腫細胞株であり、系統特異的分化抗原がメラノサイト分化抗原である請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 9】

メラノサイト分化抗原が、gp100、Melan A/Mart-1及びチロシナーゼを包含するものである請求項 3 記載の医薬組成物。

【請求項 10】

単球型の樹状細胞前駆体が、ヒト又は動物の末梢血から提供されたものである請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 11】

単球型の樹状細胞前駆体が、ヒト又は動物の骨髄から提供されたものである請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 12】

白血球搬出法生成物が、樹状細胞又は単球の源として含まれない請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 13】

樹状細胞が、CD14+単球に由来するものである請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 14】

樹状細胞が、CD34+細胞に由来するものである請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の医薬

10

20

30

40

50

組成物。

【請求項 1 5】

癌 / 精巣抗原が、MAGE-A、MAGE-B、MAGE-C、GAGE、LAGE、SSXサブファミリーから選ばれる抗原を包含するものである請求項1～14のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 6】

癌 / 精巣抗原が、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-B10、MAGE-B16、MAGE-B17、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、NY-ESO-1、LAGE、PAGE-1、PAGE-2、PAGE-3、PAGE-4、XAGE-1、XAGE-2、XAGE-3、SSX-1、SSX-2、SSX-3、SSX-4、SSX-5から選ばれる抗原を包含するものである請求項15記載の医薬組成物。
10

【請求項 1 7】

癌 / 精巣抗原が、SCP-1、TSP-50、TRAG-3、SAGE、IL-13R、CTp11から選ばれる抗原を包含するものである請求項1～14のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 1 8】

癌 / 精巣抗原が、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、及びNY-ESO-1から選ばれる抗原を包含してなる請求項16記載の医薬組成物。

【請求項 1 9】

少なくとも5つの癌 / 精巣抗原が、少なくとも2つの異質遺伝子型の黒色細胞株から提供されたものである請求項1～18のいずれかに記載の医薬組成物。
20

【請求項 2 0】

異質遺伝子型の黒色腫細胞株が、DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又はDDD-1.13 (ECACC 01112338) から選ばれるものである請求項19記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

少なくとも1つの癌細胞株における少なくとも5つの癌 / 精巣抗原の発現を、前記の少なくとも1つの癌細胞株の全細胞溶解物を付与する前に、さらに増大させる請求項5～20のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 2 2】

少なくとも1つの癌 / 精巣抗原の発現を、DNA脱メチル化によって増大させる請求項21記載の医薬組成物。
30

【請求項 2 3】

脱メチル化を、5-アザ-2'-デオキシシチジンでの処理によって行う請求項22記載の医薬組成物。

【請求項 2 4】

サイトカインが、IL-4、GM-CSF、IL-13、IFN-、Flt-31、SCF、TNF- でなる群から選ばれるものである請求項1～23のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

サイトカインが、IL-4及びGM-CSFを包含するものである請求項24記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

初期生育段階が、6～48時間、好ましくは12～34時間、さらに好ましくは20～28時間である請求項1～25のいずれかに記載の医薬組成物。
40

【請求項 2 7】

成熟因子が、IL-1、IL-6、TNF- 及びPGE2を包含するものである請求項2～26のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

少なくとも5つの癌 / 精巣抗原が負荷されているが、系統特異的分化抗原が負荷されていない又は実質的に負荷されていないヒト又は動物の自己樹状細胞を得る方法であって、a)少なくとも5つの癌 / 精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも1つの癌細胞株を準備し、
50

- b) 前記ヒト又は動物から自己単球 / 樹状細胞を準備し、
- c) 25cm²当たり細胞 $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 個の播種単球密度を使用し、
- d) 前記樹状細胞を、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養し、ついで、サイトカインを含有する培地にて第2生育段階を行い、及び
- e) 前記工程d) からの樹状細胞に、工程a) からの少なくとも1つの癌細胞株の全細胞溶解物から得られた癌 / 精巣抗原を負荷する、

ことを包含する自己樹状細胞を得る方法。

【請求項29】

少なくとも5つの癌 / 精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない単離黒色腫細胞株。

10

【請求項30】

細胞株 DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又は DDD-1.13 (ECACC 01112338) から選ばれる請求項29記載の単離黒色腫細胞株。

【請求項31】

請求項28又は29記載の単離細胞株に由来するエクソソーム。

【請求項32】

医薬組成物又はワクチンにおける抗原提示細胞としての樹状細胞の使用であって、前記樹状細胞は、該樹状細胞がCD1a陽性、CD14陰性、CD84陰性である未成熟状態において、抗原が負荷され、樹状細胞が、初期生育段階において、サイトカインを含まない生育培地にてエクスピボ培養され、ついで、樹状細胞に、少なくとも5つの癌 / 精巣抗原が負荷される前に、サイトカインを含む培地にて第2生育段階を行われたものである樹状細胞の使用。

20

【請求項33】

樹状細胞が、自己樹状細胞である請求項32記載の使用。

【請求項34】

自己樹状細胞が、新たに採取した血液から提供されたものである請求項33記載の使用。

【請求項35】

医薬組成物又はワクチンの処方における請求項29又は30記載の単離癌細胞株から得られる多数の癌 / 精巣抗原の使用。

30

【請求項36】

単離癌細胞株が、請求項30記載の細胞株の少なくとも1つである請求項35記載の使用。

【請求項37】

癌治療用の医薬組成物を製造するための単離細胞株 DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又は DDD-1.13 (ECACC 01112338) 。

40

【請求項38】

ヒト又は動物において免疫応答を誘導する方法であって、

- a) 少なくとも5つの癌 / 精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも1つの癌細胞株を準備し、
- b) 前記ヒト又は動物から自己樹状細胞を準備し、
- c) 前記樹状細胞を、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養し、ついで、サイトカインを含有する新たな培地にて第2生育段階を行い、
- d) 前記工程c) からの樹状細胞に、工程a) からの少なくとも1つの癌細胞株の全細胞溶解物から得られた癌 / 精巣抗原を負荷し、及び
- e) 前記工程d) からの負荷樹状細胞を前記ヒト又は動物に投与する、

ことを包含する免疫応答の誘導法。

【請求項39】

癌 / 精巣抗原を負荷した後の樹状細胞を、樹状細胞をヒト又は動物に投与する前に、IL-1、IL-6、TNF- 及びPGE2の如き成熟因子の添加によって成熟させる請求項38記載の

50

方法。

【請求項 4 0】

免疫応答が、ヒト又は動物における細胞傷害性Tリンパ球の生産を促進する請求項38又は39記載の方法。

【請求項 4 1】

少なくとも1つの癌細胞株が黒色腫細胞株であり、系統特異的分化抗原がメラノサイト分化抗原である請求項38～40のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 2】

メラノサイト分化抗原が、gp100、Melan A/Mart-1及びチロシナーゼを包含するものである請求項41記載の方法。

【請求項 4 3】

自己樹状細胞が、ヒト又は動物の末梢血から提供されたものである請求項38～42のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 4】

自己樹状細胞が、ヒト又は動物の骨髄から提供されたものである請求項38～42のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 5】

自己樹状細胞が、CD14+単球に由来するものである請求項43記載の方法。

【請求項 4 6】

自己樹状細胞が、CD34+細胞に由来するものである請求項43又は44記載の方法。

【請求項 4 7】

癌／精巣抗原が、MAGE-A、MAGE-B、MAGE-C、GAGE、LAGE、SSXサブファミリーから選ばれる抗原を包含するものである請求項38～46のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 8】

癌／精巣抗原が、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-B10、MAGE-B16、MAGE-B17、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、NY-ESO-1、LAGE、PAGE-1、PAGE-2、PAGE-3、PAGE-4、XAGE-1、XAGE-2、XAGE-3、SSX-1、SSX-2、SSX-3、SSX-4、SSX-5から選ばれる抗原を包含するものである請求項38～47のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 9】

癌／精巣抗原が、SCP-1、TSP-50、TRAG-3、SAGE、IL-13R、CTp11から選ばれる抗原を包含するものである請求項38～46のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 0】

癌／精巣抗原が、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、及びNY-ESO-1から選ばれる抗原を包含するものである請求項38～48のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

少なくとも1つの癌細胞株における少なくとも5つの癌／精巣抗原の発現を、溶解前に、さらに増大させる請求項38～50のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 2】

少なくとも5つの癌／精巣抗原の発現を、DNA脱メチル化によって増大させる請求項51記載の方法。

【請求項 5 3】

脱メチル化を、5-アザ-2'-デオキシシチジンでの処理によって行う請求項52記載の方法。

【請求項 5 4】

工程a)において、少なくとも2つの異質遺伝子型の癌細胞株を準備する請求項38～53のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 5 5】

異質遺伝子型の黒色腫細胞株が、DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又はDDD-1.13 (ECACC 01112338) から選ばれるものである請求項 3 8 ~ 5 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 6】

サイトカインが、IL-4、GM-CSF、IL-13、IFN- 、Flt-31、SCF、TNF- でなる群から選ばれるものである請求項 3 8 ~ 5 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 7】

サイトカインが、IL-4及びGM-CSFを包含するものである請求項 5 6 記載の方法。

【請求項 5 8】

初期生育段階が、6 ~ 48 時間、好ましくは 12 ~ 34 時間、さらに好ましくは 20 ~ 1028 時間である請求項 3 8 ~ 5 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 9】

工程 b) の前に、さらに、CD14+単球の動員を誘導する物質をヒト又は動物に投与する工程を包含する請求項 3 8 ~ 5 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 0】

CD14+単球の動員を誘導する物質が、G-CFS及び / 又はGM-CSFを包含するものである請求項 5 9 記載の方法。

【請求項 6 1】

工程 e) の後に、さらに、Tリンパ球の活性化を誘導する物質をヒト又は動物に投与する工程を包含する請求項 3 8 ~ 6 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 2】

Tリンパ球の活性化を誘導する物質が、IL-2又はIL-12を包含するものである請求項 6 1 記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、ヒト又は動物において免疫応答を誘導するための医薬組成物に関する。他の態様では、本発明は、少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原を含有するが、系統特異的分化抗原を含まない又は実質的に含まない自己樹状細胞を得る方法に関する。他の態様では、本発明は、単離された黒色腫細胞株に関する。さらに他の態様では、本発明は、免疫療法ワクチンとしての上記組成物の使用及び医薬組成物又はワクチンにおける抗原提示細胞としての自己樹状細胞の使用に関する。さらに他の態様では、本発明は、ヒト又は動物において免疫応答を誘導する方法に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

進行癌は、ヒトの死の主原因の 1 つである。今まで、効果的な治療法は提示されていない。癌の免疫療法は、免疫的機序によって腫瘍細胞を破壊することを目標とするものである。外科的治療、放射線治療、及び化学療法のような従来の癌治療法に匹敵する免疫療法は、毒性がかなり低いものであり、今までのところ、重大な合併症は開示されていない。加えて、免疫療法は、疾患の各種段階において効力を有する。初期段階では、免疫療法は、播種性疾患の進展を防止することを目的として、原発腫瘍の外科的切除に対する良好な補助的治療法である。疾患の進行した段階では、免疫療法は、従来の方法がしばしば無効であるため、唯一の治療手段である。

【0 0 0 3】

免疫系の主な機能は、生命体に侵入した異物（抗原）を認識し、破壊することにある。免疫系は、「非自己」から「自己」を識別でき、正常な状態でのみ、外来又は「非自己」抗原に対して免疫応答を発現できる。癌細胞が生命体自体の細胞を起源とする場合であっても、癌細胞は、自然免疫系によって異物として処理される。しかし、この自然免疫応答は、腫瘍の発生及び生長の阻止については、充分に強力なものではない。免疫療法の役割は、腫瘍細胞を認識し、腫瘍排除の効果的な機序を発現する免疫系の能力を増大すること

10

20

30

40

50

にある。いずれの特異的免疫療法においても、どの抗原をターゲットとするか、及び、どの抗原に、免疫系に対する最適抗原提示を見出すかの主要な2つの問題点がある。

【0004】

細胞傷害性Tリンパ球(CTL)によって認識される腫瘍関連抗原(TAA)は、抗腫瘍免疫における公知の有効な機序の中で、ターゲットとされる最も効率的な成分である。TAAの2つの主要なタイプ：非常に少数の腫瘍においてのみ存在し、従って、一般的なターゲットとしては有用ではないユニークな抗原、及び、多くの腫瘍において存在する共通又は一般的抗原が存在する。共通抗原の主要な3つのグループは、現在、免疫療法用の有望なターゲットとみなされており、いずれも、細胞傷害性Tリンパ球の発生を誘導することが証明されている。3つのグループは、癌/精巣抗原(CT抗原)、腫瘍過剰発現抗原、及び系統特異的分化抗原である。

【0005】

CT抗原は、癌又は生殖細胞特異性遺伝子(共通腫瘍関連抗原の最大グループの1つを代表する)によってコード化される。元々、CT抗原は黒色腫において発見されたが、多くの他のヒト悪性腫瘍においても見出されている。正常な組織では、CT抗原は精巣においてのみ、いくつかのケースでは、胎盤において発見される。これらの抗原を発見する正常細胞は、MHC分子の発現に乏しく、従って、これらの抗原は、通常、Tリンパ球による認識に関しては利用されない。

【0006】

このため、CT抗原は、特異的な癌免疫療法用のターゲットとして、非常に興味深いものとなる。最近の臨床試験では、1つの特異的CT抗原のターゲティングによって、顕著な数の黒色腫及び膀胱癌の患者において、腫瘍の退行が示されている(Nishiyamaら, 2001, Clin. Cancer Res., v.7, pp.23-31; Thirnerら, 1999, J. Exp. Med., v.190, pp.1669-1678)。T細胞によるCT抗原の認識は、いくつかのCT抗原及び決定された対応するペプチドエピトープについてのみ報告されている。しかし、すべてのCT抗原が免疫療法に関する有望なターゲットと認められる。MAGE-A抗原の発現と腫瘍の進行との相関が、多くの悪性腫瘍において見出されている(Brasseurら, 1995, Int. J. Cancer, v.63, pp.375-380; Euraら, 1995, Int. J. Cancer, v.64, pp.304-308; Katanoら, 1997, J. Surg. Oncol., v.64, pp.195-201; Patardら, 1995, Int. J. Cancer, v.64, pp.60-64)。CT抗原の他のグループであるMAGE-B抗原は、MAGE-A抗原よりも明らかに低い腫瘍特異的発現を示す。さらに、第3のグループであるMAGE-C抗原は、MAGE-A抗原のパターンに似た発現パターンを示す。MAGE-C抗原に対するCTL応答は、今のところ、全く報告されていない。

【0007】

CT抗原の特性を持ついくつかの非MAGEタンパク質が記載されている。その1つであるNY-ESO-1は、これまでに同定された最も免疫原性の腫瘍抗原の1つである。黒色腫患者のペプチド免疫付与による臨床試験では、病状の安定化及び幾人かの患者におけるいくつかの転移腫の退行が示された(Jagerら, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v.97, pp.12198-12203)。

【0008】

CT抗原とは対照的に、腫瘍過剰発現抗原は、その発現が、精巣以外のいくつかの正常細胞タイプにおいて、非常に低いレベルで検出されるため、完全に腫瘍特異的発現に欠けている。これらの抗原のいくつかに関する免疫療法の開発は、癌患者にとって有益であり、現在、CEA、p53、HER-2/Neu、MUC-1及び β -フェトプロテインのような抗原が、臨床試験における可能なターゲットとして集中的に調査されている。腫瘍過剰発現抗体のグループは、最近になって、臨床試験におけるターゲットとして使用されるようになったばかりであり、治療のための免疫応答の誘導の有効性に関するデータは存在しない。

【0009】

系統特異的抗原(メラノサイト分化抗原及び前立腺関連抗原)は、これまでのところ、2つのタイプのヒト癌：黒色腫及び前立腺癌についてのみ記載されている。このグループ

10

20

30

40

50

の抗原は、正常な分化組織及び2つのタイプのヒト癌の両方で発現される。正常な分化組織では、これらの抗原は非常に希にしか免疫応答を誘導しないが、これらのタンパク質は、癌細胞において免疫原性になり、黒色腫のケースでは、メラノサイト分化抗原に対して反応性のTキラー細胞を検知することが可能である。黒色腫及び前立腺癌を目標とする臨床試験の大多数は、分化抗原のターゲティングを使用する。

【0010】

腫瘍関連抗原のグループの中でも、免疫療法用のターゲットとしてTAAを使用する最も有望なデータは、MAGEタンパク質のいくつかによって得られている。しかし、特に黒色腫のケースでは、治療効果が不安定であり、いくつかの転移腫は生長を続けていた。これらの転移腫は、免疫付与のために使用されたMAGE抗原の発現に関しては、通常、マイナスであった(Thrnerら, 1999, *J. Exp. Med.*, v.190, pp.1669-1678)。

【0011】

多価免疫応答を誘導する1つの可能性は、全腫瘍細胞又は全腫瘍細胞に由来する物質を使用することである。国際公開第9003183号、米国特許第5,840,317号及び米国特許第6,187,306号には、いくつかの黒色腫細胞基材ワクチン製剤が開示されている。また、米国特許第4,108,983号には、ワクチンウイルスによって溶解された黒色腫細胞から誘導された第1世代黒色腫ワクチンが開示されている。

【0012】

米国特許第5,635,188号及び米国特許第5,030,621号には、黒色腫細胞からの細胞表面抗原のワクチン(黒色腫細胞を培地中に入れ、その後、抗黒色腫ワクチンとして使用する)が開示されている。同様に、米国特許第5,484,596号には、照射済み癌細胞をワクチンとして患者(ヒト)に注射する癌の治療法が開示されている。さらに、米国特許第6,187,306号は、共通のイムノドミナント黒色腫抗原を発現する黒色腫細胞株及びその使用法に関する。

【0013】

各種ワクチン治療の重要な点は、ワクチンの投与方法である。近年では、T細胞、特にナイーブT細胞への抗原のデリバリーの最も有効な方法が、樹状細胞によって実現されている。樹状細胞(DC)は、最も効果的な抗原提示細胞であり、DC系免疫療法は、癌治療のため、種々の設定で既に使用されており(Kuglerら, 2000, *Nat. Med.*, v.6, pp.332-336; Nestleら, 1998, *Nature(Med.)*, v.4, pp.328-332; Thurnerら, 1999, *J. Exp. Med.*, v.190, pp.1669-1678)、この免疫付与法の高い有効性が示されている。

【0014】

DCのユニークな特性の1つは、エンドサイトーシスによる外来タンパク質を取り込む能力にあり、このタンパク質は処理され、MHCクラスI抗原と共に、その表面においてペプチドエピトープとして提示される。抗原提示樹状細胞は、細胞傷害性T細胞によって認識される。この特性は、腫瘍細胞抗原が、腫瘍溶解物又は外因的に添加されたアポトーシスを起こした細胞体(apoptotic bodies)の形で付与される際に、極めて重要である。高いエンドサイティック(endocytic)活性は、未成熟及び成熟DCの対比に基づくDC分化の未成熟部位に関連するものと考えられる(Sallustoら, 1995, *J. Exp. Med.*, v.182, pp.389-400)。未成熟DCの中にエンドサイティック活性の差異が存在する可能性は、これまで考慮されていなかった。

【0015】

国際公開第0127245号には、標準的な白血球搬出、浮遊密度グラディエント遠心分離、及び外因的に添加されるサイトカインの不存在下、40時間の血清フリー培地における細胞のエクスピボ培養によって、末梢血から樹状前駆細胞を得る方法が開示されている。

【0016】

国際公開第0146389号は、非ヒトタンパク質を含有しない培養培地を使用することによって、閉鎖系において、白血球搬出生成物から樹状細胞を生成する方法に関する。培養培地では、臨床用等級のサイトカイン(IL-4及びGM-CSF)が使用され、CDの負荷のため、TAAが添加される。

10

20

30

40

50

【0017】

文献、Thurnerら、J. of Immunological Methods, 223: 1-15は、サイトカインを第1日目以後に添加する2段階法による、CD14+単球から多数の成熟DCを生成する再現可能な方法に関するものである。

【0018】

樹状細胞とTAAとの組合せは国際公開第0128583号に開示されており、この国際公開された出願は、少なくとも1つの免疫促進分子をコード化する組み換えワクシニアウイルスにて感染された癌細胞の細胞膜を含む分裂細胞調製物によってパルス化されている、免疫療法ワクチンを提供する抗原提示細胞に関する。IL-2をコード化する組み換えワクシニアウイルスにて感染された黒色腫細胞株からの抗原混合物を提示する自己DCも含有される。国際公開第0129192号には、患者において腫瘍特異的免疫応答を誘導する方法であって、患者からの抗原提示細胞を、少なくとも1つの腫瘍抗原を有する死滅細胞タンパク質と共にインキュベートし、得られた抗原提示細胞を患者に投与する腫瘍特異的免疫応答の誘導法が開示されている。

10

【0019】

癌を治療するための免疫療法ワクチンは近年改良されてはいるが、癌の免疫療法における使用にとって、より安全であり、より効果的である組成物に関する要求がなお存在する。このようなワクチンは、抗原喪失変異形の副生を避けるため、いくつかのCT抗原をターゲットとするように多価であるべきである。これらは、正常組織において発現される抗原をターゲットとする潜在的な危険性のない安全なものであるべきである。また、これらは、T細胞に抗原を提示し、デリバリーするために最適化されるべきであり、ターゲットとして最も効果的なTAAを選択するために注意が払われなければならない。

20

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

本発明は、最も効果的なTAAを供給するために黒色腫細胞株を注意深く選択し、ついで、患者にとって潜在的に有害な各種の抗原を回避するためにスクリーニングすることによって、上記の問題点を解消するものである。また、抗原提示細胞も、全黒色腫細胞溶解物をDCに負荷する前に、エンドサイティック活性のために最適化されている。

30

【0021】

第1の態様では、本発明は、多数の癌/精巣抗原を提示する樹状細胞を含有する、ヒト又は動物において免疫応答を誘導するための医薬組成物であって、

a) 樹状細胞によって、少なくとも5つの癌/精巣抗原は提示されるが、系統特異的分化抗原は提示されない又は実質的に提示されないこと、

b) 癌/精巣抗原が、少なくとも5つの異なる癌/精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも1つの癌細胞株から提供されること、及び

c) 癌/精巣抗原の負荷の間、樹状細胞は未成熟である(CD1a陽性、CD14陰性、及びCD83陰性)こと、

を特徴とする免疫応答を誘導するための医薬組成物に関する。

40

【0022】

第2の態様では、本発明は、少なくとも5つの癌/精巣抗原が負荷されているが、系統特異的分化抗原が負荷されていない又は実質的に負荷されていないヒト又は動物の自己樹状細胞を得る方法であって、

a) 少なくとも5つの癌/精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも1つの癌細胞株を準備し、

b) 前記ヒト又は動物から自己樹状細胞を準備し、

c) 25cm²当たり細胞5×10⁶~20×10⁶個の播種単球密度を使用し、

d) 前記樹状細胞を、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養し、ついで、サイトカインを含有する培地にて第2生育段階を行い、及び

50

e) 前記工程 d) からの樹状細胞に、工程 a) からの少なくとも 1 つの癌細胞株の全細胞溶解物から得られた癌 / 精巣抗原を負荷する、
ことを包含する自己樹状細胞を得る方法に関する。

【 0 0 2 3 】

第 3 の態様では、本発明は、少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原を発現するが、メラノサイト分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない単離黒色腫細胞株に関する。

【 0 0 2 4 】

第 4 の態様では、本発明は、医薬組成物又はワクチン製剤における、請求項 28 の単離癌細胞株から得られる多数の癌 / 精巣抗原の使用に関する。

【 0 0 2 5 】

第 5 の態様では、本発明は、医薬組成物又はワクチンにおける、抗原提示細胞としての樹状細胞の使用であって、前記樹状細胞は、未成熟状態（この時点では、樹状細胞は、CD 1a 陽性、CD14 陰性、CD83 陰性である）で抗原が負荷されており、樹状細胞への少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原の負荷前に、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養され、ついで、第 2 生育段階において、サイトカインを含有する培地にて培養されたものである樹状細胞の使用に関する。

【 0 0 2 6 】

第 6 の態様では、本発明は、ヒト又は動物において免疫応答を誘導する方法であって、a) 少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも 1 つの癌細胞株を準備し、

b) 前記ヒト又は動物から自己樹状細胞を準備し、

c) 前記樹状細胞を、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養し、ついで、サイトカインを含有する培地にて第 2 生育段階を行い、

d) 前記工程 c) からの樹状細胞に、工程 a) からの少なくとも 1 つの癌細胞の全細胞溶解物から得られた癌 / 精巣抗原を負荷し、及び

e) 前記工程 d) からの負荷樹状細胞を前記ヒト又は動物に投与する、
ことを包含する免疫応答を誘導する方法に関する。

【 0 0 2 7 】

以下に、図面を参照して、本発明を詳細に述べる。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 2 8 】

本発明の詳細な具体例を検討する前に、本発明の主な態様に関する特殊な用語の定義を示す。

【 0 0 2 9 】

定義

細胞傷害性 T リンパ球：リンパ球は、リンパ系組織及び循環する血液及びリンパ液内に存在する小形の单核白血球である。2 つの主な機能性タイプ（B リンパ球及び T リンパ球）があり、抗原特異的免疫反応に関与する。T リンパ球（T 細胞）は、胸腺（哺乳類において）を起源とする小形の抗原特異的リンパ球のタイプであり、二次リンパ系組織（例えば、リンパ節、脾臓）及び血液中に存在し、細胞性免疫反応に関与し、抗体の生成を助ける。T リンパ球は、その表面に抗原特異的リセプターを有し、細胞の表面上においてリセプターに提示された外因性抗原にのみ反応する。T リンパ球の主なタイプは、いくつかの方法（例えば、ウイルスの感染による）で抗原的に変性された体細胞を認識して殺す細胞傷害性 T 細胞；抗原提示細胞の表面において外因性抗原によって活性化され及び順に好適な B 細胞を活性化するヘルパー T 細胞；免疫応答の抑制及び免疫系の一般的調節に関与するサブレッサー T 細胞である。

【 0 0 3 0 】

癌 / 精巣抗原（C T 抗原）：癌又は生殖細胞系特異的遺伝子によってコード化される抗原（共通腫瘍関連抗原の最大グループの 1 つを代表する）。元々、C T 抗原は黒色腫において発見されたが、多くの他のヒト悪性腫瘍においても見出されている。正常組織の中で

10

20

30

40

50

は、精巣において及びいくつかのケースでは胎盤においてのみ発現される。これら抗原を発現する正常細胞は、MHC分子の発現に欠け、従って、これらの抗原は、Tリンパ球による認識については、通常、使用されない。

【0031】

系統特異的分化抗原：これまで黒色腫及び前立腺癌についてのみ記載されている分化抗原の1グループ。これらの抗原は、癌細胞においてのみ免疫原性であり、グループは、メラノサイト分化抗原であるgp100、Melan-A/MART-1、チロシナーゼ、TRP-1、TRP-2、MC1R、AIM-1及び前立腺関連抗原であるPSA（前立腺特異的抗原）、PSMA（前立腺特異的膜抗原）、PAP（前立腺関連ホスファターゼ）及びPSCA（前立腺幹細胞抗原）を含む。

【0032】

メラノサイト分化抗原：正常な分化メラノサイト及び黒色腫の両方において発現される抗原の1グループ。正常な分化メラノサイトでは、これらの抗原は、極めて希に免疫応答を誘導するが、これらのタンパク質は、癌細胞において免疫原性となり、黒色腫のケースでは、メラノサイト分化抗原に対して反応性のTキラー細胞を検知することが可能である。タンパク質は、メラニン色素の合成の原因になると考えられる。

【0033】

樹状細胞：いくつかのリンパ系組織における非リンパ球細胞のタイプ。樹状細胞は、外来タンパク質のエンドサイトーシスにより抗原提示細胞として作用し、外来タンパク質は、ついで、処理され、MHCクラスI及びII抗原と共に、その表面において、エピトープとして提示される。抗原提示細胞は、細胞傷害性T細胞及びTヘルパー細胞によって認識される。樹状細胞の成熟状態は、その貧食／エンドサイトーシス活性にとって重要である。未成熟樹状細胞は、抗原を負荷するためには最も有効な細胞である。

【0034】

未成熟樹状細胞：ある種の細胞マーカーCD1a、CD14及びCD83の発現が、CD1aの高度の発現（母集団におけるDCの50%以上がCD1aに関して陽性）、CD14の発現なし又は低発現（母集団におけるDCの15%未満がCD14に関して陽性）及びCD83の低発現（母集団におけるDCの25%未満がCD83に関して陽性）によって特徴付けられる樹枝状細胞。

【0035】

エキソソーム：エキソソームは、直径30～100nm、エンドサイトティック起源の膜小胞であり、多様な起源の生細胞によって、インビボで生成又は分泌される。

【0036】

サイトカイン：生体応答調整物質である免疫系タンパク質。これらは、抗体及びT細胞免疫系相互作用をコーディネートし、免疫反応性を增幅する。サイトカインは、マクロファージによって合成されるモノカイン及び活性化Tリンパ球及びナチュラルキラー細胞によって生成されるリンホカインを誘導する。モノカインは、インターロイキン(IL)-1、腫瘍壊死因子(TNF)、IL-6及びIL-10-インターフェロン(IFN)、及びコロニー刺激因子を含む。リンホカインは、IL-1、IL-6-IFN、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、及びリンホトキシンを含む。内皮細胞及び線維芽細胞及び選ばれた他のタイプの細胞も、サイトカインを合成する。本発明による好適なサイトカインの例としては、IL-4、GM-CSF、IL-13、IFN-γ、Flt-3L、SCF、TNF-γがある。

【0037】

黒色腫：重篤度の異なる悪性腫瘍又は癌。疾患が進行した段階では、拡張又は転移する傾向がある。

【0038】

樹状細胞の負荷：エンドサイトーシスによる外来タンパク質の取り込み及び樹状細胞の表面におけるペプチドエピトープの提示。しばしば、「パルス化」とも称される。

【0039】

本発明に関連して使用する用語「系統特異的／メラノサイト分化抗原を実質的に含まない」は、全細胞溶解物を調製するために使用される癌／黒色腫細胞株が、系統特異的／メラノサイト分化抗原に対する免疫応答の促進を生ずる量で、系統特異的／メラノサイト分

10

20

30

40

50

化抗原を発現してはならないことを意味する。実際に、これは、癌／黒色腫細胞が、系統特異的／メラノサイト分化抗原に対して特異的な細胞傷害性Tリンパ球による溶解に不感性であり（溶解は、4時間の細胞毒性テストにおいて、10%未満、特に5%未満、さらに好ましくは2%未満である）、細胞の1～2%が、系統特異的／メラノサイト分化抗原に対する抗体によって汚染されるのみであることを意味する。さらに、系統特異的／メラノサイト分化抗原をコード化する遺伝子からのRNAトランスクriptの量は、高度に感受性の細胞株と比べて、これら細胞株においては、少なくとも約100倍低い（半定量的RT-PCRによって測定）。

【0040】

免疫応答：侵入する微生物、寄生体、移植細胞及び本体（抗原）によって異物と認識される他の多くの物質に対して特異的な抗体及び／又は細胞傷害性細胞が生成される脊椎動物の免疫系によって備えられた選択的な応答。血液中を循環する抗体の生成は、体液性免疫応答として知られ、細胞傷害性細胞の生成は、細胞媒介又は細胞性免疫応答として知られている。

【0041】

免疫療法用ワクチン：既に病気に罹っていると診断された宿主において病気を治療する及び／又は病気の進行を阻止するために投与されるワクチン。

【0042】

自己細胞：個体自体のものである細胞。

【0043】

異質遺伝子型の：同種ではあるが、遺伝子的に異なること。

【0044】

抗原提示細胞：T細胞の活性化を誘導できる樹状細胞、B細胞及び単球性細胞の如き専門化したリンパ系細胞。

【0045】

単球：マクロファージに関連する食細胞白血球。単球は、主として、既に感作された細胞傷害性Tリンパ球を再活性化する抗原提示細胞の他のタイプを代表する。

【0046】

前駆樹状細胞：末梢血中に存在するCD14+単球又は骨髄中又は末梢血中に存在するCD34+細胞（特に、動員後）。

【0047】

イムノドミナント：他の抗原との混合物として存在する抗原は、それ自体に対する免疫応答を優先的に促進する。

【0048】

本発明は、例えば、免疫療法用ワクチンとして使用される改良された治療用組成物に関する。T細胞、特にナイーブT細胞へ抗原をデリバリーする最も有効な方法は、自己樹状細胞によるものである。3つのグループ、すなわち、CT抗原、腫瘍過剰発現抗原、及び系統特異的抗原のいずれかからのいくつかの異なる腫瘍関連抗原は、臨床上の試みにおいて使用されており、現時点では、癌／精巣抗原のグループからの抗原を使用することにより最も有望な結果が認められている。

【0049】

CT抗原とは対照的に、腫瘍過剰発現抗原は、たとえ腫瘍細胞におけるよりも明らかに低いレベルであっても、その発現が精巣以外のいくつかの正常組織において検知されるため、全く腫瘍特異的発現に欠けている。このような分布は、強力な腫瘍拒絶免疫（耐性の誘導の過程における高度に反応性のTリンパ球の除去による）の発生を妨げ、応答が発生される場合、自己免疫を発生する潜在的な危険性が高い。グループは多数の抗原を含み、そのいくつかは、最近、臨床上の試みにおいてターゲットとなっている。

【0050】

上述のものと同じ制限が、系統特異的抗原にも適用されるが、このグループは、分化抗原を含む。このグループの抗原も、対応する正常な分化組織において発現され、健康なヒ

10

20

30

40

50

トでは、「自己」タンパク質への耐性のため、非常に希に誘導される免疫作用である。理由は不明であるが、これらの正常なタンパク質は、癌細胞においては免疫原性となり、黒色腫では、患者から、メラノサイト分化抗原に対して反応性のTキラー細胞が容易に検出されるが、健康なヒトでは検出されない。黒色腫又は前立腺癌を指向する臨床上の試みの多くは、分化抗原のターゲッティングを使用する。

【0051】

本発明の目的は、免疫付与のために使用される抗原混合物における過剰発現抗原及び系統特異的分化抗原の存在を、特異的に回避することにある。黒色腫細胞株（過剰発現抗原のグループ）では、免疫応答は極めて希に誘導され、従って、このグループの抗原については陰性の選択に関する必要性が除外される。メラノサイト分化抗原に関しては、存在してはならないが、存在する場合には、量は、これらに対する免疫応答を促進するほど充分なものであってはならない（実際には、これは、メラノサイト分化抗原をコード化する遺伝子からのRNAトランскriプトの量が、半定量RT-PCRによって測定して、高度に感受性の細胞株と比べて、本発明の細胞株では、少なくとも約100倍低いことを意味する）。このようなイムノドミナントなタンパク質の存在は回避され、特に、タンパク質gp100、Melan A/MART-1及びチロシナーゼは存在してはならない。

【0052】

本発明の他の目的は、少なくとも3つ、詳しくは、少なくとも5つのCT抗原及びさらに詳しくは、できる限り多くのCT抗原を発現する細胞株（イムノドミナントでなければならぬ）を提供することにある。驚くべきことには、このような細胞株は、ステージII-1又はステージIV腫瘍の除去後、インビボにおいて腫瘍細胞の免疫原性を暗示する、長い病気を持たない期間を持っている黒色腫の患者から提供される。続いて、このような細胞株からのヒトサブクローニングは、いかなるメラノサイト分化抗原、特にgp100、Melan A/MART-1及びチロシナーゼも存在しないように篩選しなければならない。

【0053】

黒色腫の免疫療法に加えて、本発明は、ヒト又は動物において、他のタイプの癌に関して、免疫応答を誘導する方法も提供する。ターゲットとされる抗原が共通抗原であり、他のタイプの悪性腫瘍、主に固体癌において存在することが要求されている。特に、これらのタイプの癌としては、大腸癌、肺腺癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、汗腺癌、腎細胞癌、肝臓癌、子宮頸癌、肺癌、小細胞肺癌又は膀胱癌がある。

【0054】

従って、1具体例では、本発明は、多数の癌/精巣抗原を提示する樹状細胞を含有する、ヒト又は動物において免疫応答を誘導するための医薬組成物であって、
a) 樹状細胞によって、少なくとも5つの癌/精巣抗原が提示されるが、系統特異的分化抗原は提示されず又は実質的に提示されず、
b) 癌/精巣抗原は、少なくとも5つの異なる癌/精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも1つの癌細胞株から提供され、
c) 癌/精巣抗原の負荷の間、樹状細胞は未成熟である（CD1a陽性、CD14陰性、及びCD83陰性）、
免疫応答を誘導するための医薬組成物に関する。

【0055】

有利には、負荷された樹状細胞は、続いて、成熟因子の添加によって成熟する。

【0056】

樹状細胞は、検討したように、最も効率的な抗原提示細胞であり、本発明の他の目的は、樹状細胞、特に、末梢血から単離されたCD14+単球又は末梢血又は骨髄からのCD34+細胞から発生された自己樹状細胞（そのエンドサイトイック/食細胞活性及びCD1a発現に関して最適化されている）を提供することにある。この活性は、その未成熟状態にある樹状細胞に関連するものと考えられる。このような活性化された細胞を得るために、多くのレポートは、Sallusto及びLanzavecchiaによる「GM-CSF+IL-4法」（1994, J. Exp. Med., 179: 1109）を使用している。他の好適なサイトカインとしては、IL-4、GM-CSF、IL-13、IFN-

10

20

30

40

50

、 Flt-31、 SCF、 TNF-_α (Altersら, 1999, J. Immunother., v.22, pp.229-236) があり、特に、本発明については、サイトカインは、 GM-CSF及びIL-4から選ばれる。

【0057】

驚くべきことには、発明者らは、後述の実施例2に示すように、この方法がさらに最適化される、及び、樹状細胞を負荷する前に、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養し、続いて、第2生育段階を、サイトカインを含有する新たな培地で行うことにより、増大されたエンドサイティック活性をもつDCが生成するとの知見を得た。本発明による初期生育段階は、6～48時間、好ましくは12～34時間、さらに好ましくは20～28時間である。

【0058】

以前では、すべての未成熟樹状細胞のエンドサイティック活性は、培養法に關係なく、等しく良好であると考えられていた。新たに、発明者らは、報告されている安定な成熟樹状細胞の製法を適用し、成熟因子の添加前に、未成熟状態にある樹状細胞を負荷することによって、そのエンドサイティック活性に関して最適化されている未成熟樹状細胞が得られるとの知見を得た。

【0059】

従って、他の具体例では、本発明は、上述の医薬組成物であって、樹状細胞が、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養され、続いて、樹状細胞に少なくとも1つの癌/精巣抗原を負荷する前に、第2生育段階において、サイトカインを含有する培地にて培養されている医薬組成物に関する。

【0060】

多数のCT抗原、特に5つ以上のCT抗原が提供されるため、さらに他の具体例では、本発明は、上述の医薬組成物であって、少なくとも5つの癌/精巣抗原が、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも1つの癌細胞株の全細胞溶解物から提供される医薬組成物に関する。全細胞溶解物は、例えば、腫瘍細胞又は他のタイプの細胞の如き細胞から、細胞を分裂させることによって、例えば、いくつかの凍結-解凍サイクルによって、各種の方法で得られる。細胞溶解物(溶解性物質を含む)では、通常、粒子は遠心分離及び/又は濾過によって除去される。

【0061】

1つの特別な具体例では、本発明は、上述の医薬組成物であって、癌細胞株が、黒色腫細胞株であり、系統特異的分化抗原がメラノサイト分化抗原である医薬組成物に関する。

【0062】

さらに他の具体例では、メラノサイト分化抗原は、gp100、Melan A/Mart-1及びチロシナーゼを含む。

【0063】

本発明に従ってエクスピボ培養した樹状細胞は、そのエンドサイティック活性及びCD1a発現に関して最適化され、免疫療法に使用される各種組成物及びワクチンにおける抗原提示に有利に適用される。従って、さらに他の具体例では、本発明は、医薬組成物又はワクチンにおける自己樹状細胞の抗原提示細胞としての使用であって、前記自己樹状細胞が、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養され、続いて、未成熟状態の樹状細胞に少なくとも5つの癌/精巣抗原を負荷する前に、第2生育段階において、サイトカインを含有する培地にて培養されている自己樹状細胞の使用に関する。

【0064】

本発明に従って抗原提示樹状細胞を得る他の方法、例えば、全細胞の融合による方法も可能である。これは、本発明に従い、樹状細胞と細胞株とを融合させることによって達成される。

【0065】

さらに他の具体例では、抗原の提示は、エクソソームの使用によって実行される。エクソソームは、培地において多くの細胞によって分泌され、最近、抗原提示細胞として記載

10

20

30

40

50

されるようになったエンドサイティック起源の小形の膜小胞であり、インビボにおいて、免疫応答を促進できる (Theryら, 2002, *Nature Reviews Immunology* 2: 569-579)。

【0066】

さらに他の具体例では、本発明は、少なくとも5つの癌／精巣抗原が負荷されているが、系統特異的分化抗原が負荷されていない又は実質的に負荷されていないヒト又は動物の自己樹状細胞を得る方法であって、

a) 少なくとも5つの癌／精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも1つの癌細胞株を準備し、

b) 前記ヒト又は動物から自己樹状細胞を準備し、

c) 前記樹状細胞を、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養し、ついで、第2生育段階を、サイトカインを含有する培地で行い、及び

d) 前記工程c)からの樹状細胞に、工程a)からの少なくとも1つの癌細胞株の全細胞溶解物から得られた癌／精巣抗原を負荷する

ことを包含する自己樹状細胞を得る方法に関する。

【0067】

有利には、樹状細胞は、工程d)の後、例えば、IL-1、IL-6、TNF- 及びPGE2の如き成熟因子の添加によって成熟される。

【0068】

他の具体例では、本発明は、上記の工程a)～d)、続いて、成熟工程を実施することによって得られる医薬組成物に関する。

【0069】

単核細胞の集団から樹状細胞を生成する公知の方法を使用する場合、樹状細胞の良好な収率を得ることは困難である。単核細胞を原料として樹状細胞を得る場合の平均収率は、約5%であることが既に報告されている (Marovitchら, 2002, *J. Infect. Dis.*, 186: 1242-1252)。樹状細胞 50×10^6 個 (予防接種の1完全サイクルに必要とされる) を得るために、単核細胞 10^9 個を使用して開始することが必要である。

【0070】

吸着の間の細胞濃度を通常 5×10^6 個 / mlと仮定すると、この細胞の量は、吸着工程のために培地0.2Lを要求し、さらに細胞を培養するために同量の培地を要求する。樹状細胞の生産のためには、多量の組織培養用のプラスチック容器と共に、GM-CSF約60μg及びIL-4 30μgが要求される。この結果、ワクチン当たりのネットの価格はかなり高い。加えて、血液から単核細胞 10^9 個を単離するためには、最大1Lまでの血液が必要であり、この量を、患者のおもわしくない健康状態を考慮して、充分な時間的間隔を置いて2回に分けて行うとしても、1人の患者から採取することは極めて困難である。

【0071】

1つの可能性は、かなりの数の単球を単離できる白血球搬出法を使用することである。この方法は、多量の樹状細胞を生産するためにしばしば使用される (例えば、Thurnerら, 1999, *J. Immunol. Methods*, 223: 1-15参照)。しかし、白血球搬出法は、長時間を要し、コスト高であり、ワクチン製造の総価格を増大させる。さらに、1つの白血球搬出用器具について、1人の患者のみしか処理できない。これも、製造法の生産能力を制限する。

【0072】

別法によれば、単球から樹状細胞を生産する効率が増大される。例えば、Tuyaertsらは、Nunc Cell Factoriesに関する樹状細胞生産法の適合性を報告し、樹状細胞の収率が、開始時の単球の数の40%未満である (又は、開始時の単核細胞の数の13% (単球は単核細胞の平均1/3であるため)) ことを報告している (2002, *J. Immunol. Methods*, 264: 135-151)。しかし、生産された樹状細胞は、CD1aマーカーの発現に欠けており、これは、不完全な分化を示している。CD1aの発現は本発明の目的には必須であるため、この方法は、本発明の目的には使用できない。

【0073】

10

20

30

40

50

従って、これに代わって、発明者らは、充分に適格性の未成熟樹状細胞の生産と共に、単球の樹状細胞への転換の増大する効率を綿密に監視することによって、血中単球からの未成熟樹状細胞の生産方法を最適化した。適格性の未成熟樹状細胞の生産の読み取りシステムとして、下記の基準を選択した：CD1aマーカーの高（50%以上）発現；CD14の無又は低（15%以下）発現；及びCD83の低（25%以下）発現。

【0074】

下記の実施例に記載する発明者らの最適化の結果は、特にCD1aマーカーの発現にとってサイトカインの遅延添加の重要性を示した。

【0075】

さらに、発明者らの研究では、単核細胞の播種集団における単球の初期濃度を制御することによって、単球から生産されるCD1aマーカーの高発現と共に、約50%の未成熟樹状細胞収率が得られることが示された。

【0076】

さらなる態様において、従って、本発明は、単核細胞サンプルから生産される樹状細胞の収率を最適化する方法であって、単球の播種密度が、媒体6～8mlにおいて、 25cm^2 当たり 5×10^6 ～ 20×10^6 個である樹状細胞の収率の最適化法に関する。T25フラスコを使用する場合、これは、単球の初期数が 5×10^6 ～ 20×10^6 個であることを意味する。特別の具体例では、密度は、 25cm^2 当たり細胞 6×10^6 ～ 15×10^6 個、さらに詳しくは 25cm^2 当たり 8×10^6 ～ 12×10^6 個である。

【0077】

特別な具体例では、工程a)において、少なくとも2つの異質遺伝子型の黒色腫細胞株を準備する。異質遺伝子型の細胞株の数は、メラノサイト分化抗原が存在しないように単離、篩選された好適なサブクローニングの数に左右される。より多くの細胞株が提供されるほど、いくつかのイムノドミナントな癌/精巣抗原が、全細胞溶解物中に示される機会が多くなる。1具体例では、少なくとも5つのCT-抗原が、少なくとも2つの異質遺伝子型の細胞株から提供される。特別な具体例では、異質遺伝子型の細胞株は、DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又はDDD-1.13 (ECACC 01112338) から選ばれる（両細胞株は、European Collection of Animal Cell Cultures, CAMR, GB-Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdomに2001年11月23日付けで寄託されている）。

【0078】

本発明の他の態様は、上記特別な細胞株、及び少なくとも5つのCT抗原を発現するが、メラノサイト分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない他の細胞株にも関する。従って、本発明は、少なくとも5つのCT抗原を発現するが、メラノサイト分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない、単離された黒色腫細胞株に関し、特に、単離された細胞株DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又はDDD-1.13 (ECACC 01112338) に関する。従って、本発明は、少なくとも1つの黒色腫細胞株が、異質遺伝子型の細胞株DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又はDDD-1.13 (ECACC 01112338) から選ばれるものである医薬組成物又は本発明の方法にも関する。

【0079】

医薬組成物は、ヒト又は動物に投与される際、当該ヒト又は動物において免疫応答を誘導し、ヒト又は動物において、細胞傷害性Tリンパ球の生産を促進し、従って、さらに他の目的では、本発明は、ヒト又は動物において免疫応答を誘導する方法であって、a)癌/精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない又は実質的に発現しない少なくとも1つの癌細胞株を準備し、

b)前記ヒト又は動物からの自己樹状細胞を準備し、

c)前記樹状細胞を、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養し、ついで、第2生育段階を、サイトカインを含有する培地で行い、

d)前記工程c)からの樹状細胞に、工程a)からの少なくとも1つの癌細胞の全細胞溶解物から得られた癌/精巣抗原を負荷し、及び

e)前記工程d)からの負荷樹状細胞を前記ヒト又は動物に投与する、

10

20

30

40

50

ことを包含する免疫応答を誘導する方法に関する。

【0080】

上記方法の特別な具体例では、癌細胞株が黒色腫細胞株であり、系統特異的分化抗原がメラノサイト分化抗原である。

【0081】

いくつかのケースでは、患者から充分な量の自己樹状細胞を提供することは困難である。この場合、工程b)前に、CD14+単球の動員を誘導する物質を投与することができる。このような物質は、G-CSF及び/又はGM-CSFである。

【0082】

樹状細胞前駆体、CD14+単球又はCD34+細胞は、血液サンプル、末梢血から得られる。アフェレーシス細胞を原料とすることができますが、これを原料とする必要はない。

【0083】

本発明による方法は、さらに、ヒト又は動物に、工程e)の後にTリンパ球の活性化を誘導する物質を投与する工程を含むこともできる。これは、例えば、IL-2又はIL-12の投与によって達成される。

【0084】

本発明は、少なくとも1つの黒色腫細胞株の全細胞溶解物を調製する前に、癌/精巣抗原の発現レベルを増大させる抗原の使用を意図する。いくつかの精巣特異的遺伝子の発現レベルに影響を及ぼすため、DNAのメチル化が提案されている。脱メチル化剤5-アザ-2'-デオキシシチジン(5azaCdR)は、MAGE-A1-陰性黒色腫細胞において、MAGE-A1遺伝子の発現を誘導できることが示されている(De Smetら, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v.93, pp.7149-7153; Weberら, 1994, Cancer Res., v.54, pp.1766-1771)。5azaCdRは、DNAメチル化のためのターゲット部位においてDNAに組み込まれる際、DNAメチルトランスフェラーゼ用の自殺基質、CpGジヌクレオチドとして作用するシトシン類似体である。真核細胞における脱メチル化は、通常は、インビオにおける増大された遺伝子の発現を導く。MAGE-A1の活性化は、プロモーター領域の脱メチル化、続く、全体的な脱メチル化(多くの腫瘍において起こる)によって生ずることが提案されている。遺伝子の発現に関する5azacdRの活性化作用は、MAGEファミリーの他のメンバーについて(Lucasら, 1998, Cancer Res., v.58, pp.743-752; Lurquinら, 1997, Genomics, v.46, pp.397-408)、GAGE遺伝子ファミリーについて(De Backerら, 1999, Cancer Res., v.59, pp.3157-3165; Liら, 1996, Clin. Cancer Res., v.2, pp.1619-1625)及びLAGE遺伝子ファミリーについて(Liら, 1996, Clin. Cancer Res., v.2, pp.1619-1625)も示されている。腫瘍細胞でのMAGE遺伝子の発現における脱メチル化の役割は、多くの他の精巣特異的遺伝子(その存在は腫瘍において検知されていない)の発現が、5azaCdR処理によってup-regulateされない(De Smetら, 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., v.241, pp.653-657)及びMAGE-B遺伝子の中でも、腫瘍の発現は、5azaCdR処理によって活性化されたものについてのみ検知された(Lurquinら, 1997, Genomics, v.46, pp.397-408)との事実によって支持される。さらに、MAGE-A1遺伝子のプロモーター領域におけるCpGサイトの脱メチル化及び遺伝子の発現の良好な相関関係が観察された(De Smetら, 1999, Mol. Cell Biol., v.19, pp.7327-7335)。

【0085】

1つの具体例では、CT抗原の発現のup-regulationは、従って、CT抗原をコード化するDNAの脱メチル化によって達成された。特に、この脱メチル化は、5azaCdRでの処理によって誘導された。CT抗原の発現のさらに他のup-regulation法は、ヒストンの脱アセチル化の阻害である。これら2つのタイプの処理は、別個に又は組み合わせて使用される。このような処理は、癌/精巣抗原がイムノドミナントであり続ける場合にのみ使用される。

【0086】

多くのCT抗原は、いくつかのメンバーを含むサブファミリーにグループ分けされる(表1参照)。これらは、MAGE-A、MAGE-B、MAGE-C、GAGE、LAGE及びSSXサブファミリーで

10

20

30

40

50

ある。他の抗原に関しては、これまでのところ、ただ1つの個々のメンバーが発見されている。これらは、BAGE、SCP-1、TSP50、TRAG-3、SAGE、IL13R、CT9及びCTp11抗原である。全てのCT抗原が、本発明の目的に関して、免疫療法用の可能性のあるターゲットと考えられる。

【表1】

ヒト癌／精巣抗原

ファミリー	メンバー
MAGE-A	MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12
MAGE-B	MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B16, MAGE-B17
MAGE-C	MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4
GAGE	GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8 PAGE-1, PAGE-2, PAGE-3, PAGE-4 XAGE-1, XAGE-2, XAGE-3
LAGE	LAGE-1a, LAGE-1b, Ny-ESO-1
SSX	SSX-1, SSX-2, SSX-3, SSX-4, SSX-5
個々のメンバー	BAGE, SCP-1, TSP50, TRAG-3, SAGE, IL-13R α , CT9, CTp11

10

20

20

30

【0087】

CT抗原の最大グループの1つは、3つのファミリー、MAGE-A、MAGE-B及びMAGE-CからなるMAGEタンパク質のグループである。

【0088】

MAGE-A遺伝子は、最初に同定された抗原MAGE-A1(既に表示されたMAGE-1)をコード化する1番目に同定された遺伝子(以前は、MAGE-Iと表示されていた)(Van der Bruggenら, 1991, *Science*, v.254, pp.1643-1647)を含むクロモソームXの長いアーム(領域Xq28)上に配置された15個の緊密に関連する遺伝子のファミリーを表す(Chomezら, 2001, *Cancer Res.*, v.61, pp.5544-5551; De Planeら, 1994, *Immunogenetics*, v.40, pp.360-369)。調査した腫瘍の大部分において、MAGE-A1、-A2、-A3、-A4、-A6及び-A12遺伝子の発現のみが示された。最近では、MAGE-A11(Jurkら, 1998, *Int. J. Cancer*, v.75, pp.762-766)、MAGE-A10(Huangら, 1994, *J. Immunol.*, v.162, pp.6849-6854)、MAGE-A5、MAGE-A8及びMAGE-A9(Serranoら, 1999, *Int. J. Cancer*, v.83, pp.664-669)を含む他のMAGE-A遺伝子の発現も、いくつかの腫瘍において検出されている。

40

【0089】

MAGE-A1(van der Bruggenら, 1991, *Science*, v.254, pp.1643-1647)、MAGE-A2(Visserenら, 1997, *Int. J. Cancer*, v.73, pp.125-130)、MAGE-A3(Gauglerら, 1994, *J. Exp. Med.*, v.179, pp.921-930)、MAGE-A4(Duffourら, 1999, *Eur. J. Immunol.*, v.29, pp.3329-3337)、MAGE-A6(Tanzarellaら, 1999, *Cancer Res.*, v.59, pp.2668-2674)、MAGE-A10(Huangら, 1999, *J. Immunol.*, v.162, pp.6849-6854)及びMAGE-A12(Panell

50

ら, 2000, *J. Immunol.*, v.164, pp.4382-4392) について、細胞傷害性Tリンパ球によって認識されるペプチドエピトープを提示する能力が示されている。Tヘルパー細胞もMAGE抗原を認識でき、MAGE-A1及びMAGE-A3抗原の対応するエピトープが同定されている (Chauxら, 1999, *J. Exp. Med.*, v.189, pp.767-778; Chauxら, 2001, *Eur. J. Immunol.*, v.31, pp.1910-1916; Maniciら, 1999, *J. Exp. Med.*, v.189, pp.871-876)。

【0090】

多くのタイプの悪性腫瘍において、MAGEの発現が検知されている。皮膚の黒色腫が、最高レベル (MAGE-A3について65%まで) のMAGEの発現を有する (De Plaenら, 1994, *Immunogenetics*, v.40, pp.360-369) が、眼の黒色腫はMAGEの発現に関して陰性である (Mulcahyら, 1996, *Int. J. Cancer*, v.66, pp.738-742)。それ程ではないにしろ、MAGE抗原は、乳癌、頭部及び頸部の腫瘍、肺癌、肉腫及び膀胱癌の如き他のタイプの腫瘍において発現される (例えば、van Pelら, 1995, *Immunol. Rev.*, v.145, pp.229-250参照)。肝癌腫では、MAGE-A1の高 (80%) 発現が認められている (Yamashitaら, 1996, *Hepatology*, v.24, pp.1437-1440)。他のMAGE-A抗体とは対照的に、MAGE-A4は、ホジキン病を含むリンパ腫の顕著な部分で発現される (その発現は、Reed-Sternberg細胞に限定される) (Chambostら, 2000, *Blood*, v.95, pp.3530-3533)。腫瘍サンプルがMAGE-A4に関して陽性であることが認められた場合、遺伝子は、通常、非常に高いレベルで発現される。

【0091】

MAGE-B遺伝子は、クロモソームXの領域p21.3及びp22に配置された17個の遺伝子 (ただし、その内の8個は偽遺伝子である) のファミリーを表す (Chomezら, 2001, *Cancer Res.*, v.61, pp.5544-5551; Luasら, 2000, *Int. J. Cancer*, v.87, pp.55-60; Lurquinら, 1997, *Geomics*, v.46, pp.397-408)。各種の組織学的タイプの腫瘍の顕著な部分において、ただ2個の遺伝子、MAGE-B1及びMAGE-B2が発現される。MAGE-B5及びMAGE-B6の発現は、限られた数の腫瘍サンプルにおいて検知されている (Lucasら, 2000, *Int. J. Cancer*, v.87, pp.55-60)。

【0092】

MAGE-Cファミリーの7個のメンバーは、Xq26-q27領域に配置される。MAGE-C1遺伝子は、精巣及び黒色腫における選択的遺伝子発現の分析によって同定されている (Lucasら, 1998, *Cancer Res.*, v.58, pp.743-752)。その発現パターンは、MAGE-A遺伝子の発現パターンと強く類似している。他の遺伝子CT7 (Chenら, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.95, pp.6919-6923) は、おそらく、異なったMAGE-C1対立遺伝子を表す。MAGE-C2/C-T10は、Xq27領域に配置されるが、MAGE-C1とは対照的に、このタンパク質はペプチド部分を有していない。第3及び第4のメンバー、MAGE-C3及びMAGE-C4は、データベース検索によって同定されている (Chomezら, 2001, *Cancer Res.*, v.61, pp.5544-5551; Lucasら, 2000, *Int. J. Cancer*, v.87, pp.55-60)。

【0093】

癌 / 精巣抗原の特性をもついくつかの非MAGEタンパク質が開示されている。これらの1つがBAGE抗原である (Boelら, 1995, *Immunity*, v.2, pp.167-175)。腫瘍サンプルにおけるその発現パターンは、MAGE抗原の発現パターンと非常に類似しているが、全体的に発現頻度が低い (黒色腫において22%、膀胱癌において15%、乳癌において10%及び頭部及び頸部の扁平上皮癌において8%)。MAGE抗原に関しては、BAGEの発現は腫瘍の進行ステージと関連する。BAGE抗原は、CTLによって認識され、抗原性のペプチドエピトープが同定されている。

【0094】

GAGE-1遺伝子によってコード化されたHLA-Cw6制限エピトープとして、さらなる抗原が同定されている (Van den Eyndeら, 1995, *J. Exp. Med.*, v.182, pp.689-698)。この遺伝子は、GAGE-1~GAGE-8遺伝子 (Chenら, 1998, *J. Biol. Chem.*, v.273, pp.17618-17625; De Backerら, 1999, *Cancer Res.*, v.59, pp.3157-3165; Van den Eyndeら, 1995, *J. Exp. Med.*, v.182, pp.689-698)、PAGE-1~PAGE-4遺伝子 (Brinkmannら, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.95, pp.10757-10762; Chenら, 1998, *J. Biol. Chem.*, v.253, pp.17618-17625) によって認識される。

73, pp.17618-17625) 及び XAGE-1~XAGE-3 遺伝子 (Brinkmannら, 1999, *Cancer Res.*, v. 59, pp.1445-1448) を含む大きい遺伝子ファミリーに属する。タンパク質をコード化する GAGE ファミリーの 2 つの遺伝子、GAGE-1 及び GAGE-2 は、黒色腫 (24%)、肉腫 (25%)、非小細胞肺癌 (19%)、頭部及び頸部腫瘍 (19%) 及び膀胱癌 (12%) の顕著な割合で発現される。

【0095】

最近では、SEREX (ヒト腫瘍の組み換え cDNA ライブライマーの血清学的発現 (serological expression) クローニング) 法を使用することによって、いくつかの CT 抗原が同定されている (Sahinら, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.92, pp.11810-11813)。その内の 1 つ、CTAG 遺伝子によってコード化された NY-ESO-1 (Chenら, 1997, *Cytogenet. Cell Genet.*, v.79, pp.237-240) は、他のタイプの腫瘍の割合と同様に (ただし、11 個の培養した黒色腫細胞株では 2 個にすぎない)、67 個の黒色腫試料の 23 個、33 個の乳癌試料の 10 個、16 個の前立腺癌試料の 4 個、5 個の膀胱癌試料の 4 個において発現される (Chenら, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.94, pp.1914-1918)。黒色腫の患者では、HLA-2 によって CTL 応答が制限され、黒色腫特異的 CTL 系によって認識された 3 つのペプチドが同定されている。この抗原は、一人の黒色腫の患者において、HLA-A3 1 制限 CTL 応答を誘導することが見出されている (Wangら, 1998, *J. Immunol.*, v.161, pp.3596-3606)。さらに、CD4+T リンパ球による MHC クラス II の制限が、3 つのペプチドエピトープの同定と共に開示されている (Jagerら, 2000, *J. Exp. Med.*, v.191, pp.625-630)。最近になって、CTAG と同族の遺伝子が開示された。この遺伝子、LAGE-1 (Letheら, 1998, *Int. J. Cancer*, v.76, pp.903-908) は、NY-ESO-1 に類似する異なった腫瘍において分布を有する。両遺伝子は、MAGE 遺伝子に似て、Xクロモソームの p28 バンドに配置される (Letheら, 1998, *Int. J. Cancer*, v.76, pp.903-908)。NY-ESO-1 は、これまでに同定された最も免疫原性の腫瘍抗原の 1 つである。

【0096】

従って、本発明の他の具体例では、癌 / 精巣抗原は、MAGE-A、MAGE-B、MAGE-C、GAGE、LAGE、SSX サブファミリーから選ばれる抗原を包含してなる。

【0097】

特別な具体例では、CT 抗原は、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-B10、MAGE-B16、MAGE-B17、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、NY-ESO-1、LAGE、PAGE-1、PAGE-2、PAGE-3、PAGE-4、XAGE-1、XAGE-2、XAGE-3、SSX-1、SSX-2、SSX-3、SSX-4、SSX-5 から選ばれる抗原を包含してなる。また、他の特別な具体例では、CT 抗原は、SCP-1、TSP-50、TRAG-3、SAGE、IL-13R、CTp11 から選ばれる抗原を包含してなる。

【0098】

さらに他の特別な具体例では、CT 抗原は、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12 及び NY-ESO-1 から選ばれる抗原を包含してなる。

【0099】

上記抗原は、本発明の内容にとって特に有用であると考えられる抗原を代表するものであるが、様々な癌 / 精巣抗原、詳しくは、少なくとも 5 つ、さらに詳しくは、少なくとも 6 つ、特に詳しくは、少なくとも 7 つの CT 抗原が使用される限り、特に記載していない他の抗原も使用される。

【0100】

本発明のさらなる具体例は、上記組成物の、癌治療のための免疫療法用ワクチンとしての使用に関する。

【0101】

黒色腫細胞基材組成物又はワクチンを使用する 1 つの条件は、宿主に、病気が進行したステージの悪性腫瘍が存在することである。他の条件は原発腫瘍の存在であり、この場合

10

20

30

40

50

、CT抗原のグループは、主として転移部において発現されるため、治療の目的は、原発腫瘍の排除を誘導することだけでなく、転移の発生を防止することにある。さらに他の条件は、他の手段（外科的、放射線治療）による原発腫瘍及び転移腫瘍の除去であり、この場合、治療の目的は、腫瘍の再発の防止にある。

【0102】

いくつかのCT抗原を発現する腫瘍は、CT抗原を持たない又はただ1つのCT抗原を持つ腫瘍よりも、生長において拒絶又は制限される機会が多い。従って、腫瘍のバイオセンターにおけるCT抗原の発現の測定は、万能な黒色腫細胞基材ワクチンの使用の有効性を予測することにとって重要である。

実施例

10

【0103】

以下において、いくつかの具体例によって、本発明をさらに説明するが、これらの具体例は、本発明を限定するものではない。

【実施例1】

【0104】

DDM-1黒色腫細胞株のメラノサイト分化抗原欠乏クローンの単離

長期の病気を持たない期間を有する患者から、DDM-1黒色腫細胞株を得た。DDM-1黒色腫細胞をクローニングし、8つのクローンを選別し、チロシナーゼの発現に関して陰性であることを確認した。チロシナーゼは、公知のメラノサイト分化抗原の1つである。これらのクローン（DDM-1.5、DDM-1.6、DDM-1.7、DDM-1.10、DDM-1.11、DDM-1.13、DDM-1.24及びDDM-1.25）を、さらに、2つのイムノドミナントなメラノサイト分化抗原、gp100及びMelan A/MART-1の発現についてテストした。

20

【0105】

黒色腫細胞を、規定通りに、T75組織培養フラスコ（Nunc）において、ウシ胎仔血清10%を補充したRPMI 1640培地（BioWhittaker）20ml中で培養した。黒色腫細胞溶解物を負荷した樹状細胞に対する免疫応答の誘導に関する実験での使用のため、細胞増殖を、2%ヒト血清（HuS）を含有する培地に適合させた。培養フラスコから培地を除去し、0.02%EDTAのCa, MgフリーPBS（BioWhittaker）溶液5mlを添加し、CO₂-インキュベーターにおいて10～20分間インキュベートし、PBS 10mlを添加し、分離した細胞を遠心分離管に移すことによって細胞を採取した。200gにて5分間遠心分離した後、上澄み液を廃棄し、ペレットを培養培地に再度懸濁化し、細胞を計数し、細胞1.5×10⁶個を、T75フラスコ内の培養培地20ml中に入れた。

30

【0106】

gp100及びMelan A/MART-1抗原の発現を、これら抗原に対して特異的な細胞傷害性Tリンパ球（CTL）クローンによって誘導される溶解に対する黒色腫細胞の感受性を測定することによってテストした。発明者らは、これらのCTLクローンの特性については、既に開示している（Kirkinら、1999、Cancer Immunol. Immunother., v.48, pp.239-246）。その全内容を、参考として、本発明に含める。上記の如くして黒色腫細胞を採取し、培養培地に再度懸濁化し、計数し、各クローンの細胞0.5×10⁶個を、11mlの円錐管（Nunc）に移した。細胞を200gにて5分間遠心分離し、上澄み液を廃棄し、ペレットを培養培地0.1mlに再度懸濁化した。Na₂CrO₄溶液（0.1mCi, Amersham）0.1mlを添加し、細胞を水浴において37℃で60分間インキュベートした。RPMI 1640にて3回洗浄した後、ターゲットを、10%FCSを含むRPMI 1640中において細胞濃度5×10⁴個/mlに調整した。細胞傷害性リンパ球を、細胞濃度5×10⁵個/mlで使用した。CTL及びターゲット黒色腫細胞を、96U字型底部ミクロ滴定プレートに、3個1組で、100μlのアリコートに播種し、200gにて2分間遠心分離し、5%CO₂中、37℃においてインキュベートした。4時間後、プレートを250gにて3分間遠心分離し、上澄み液100μlを採取し、放射能を測定した（Cobra 5005, Packard Instrument, 米国コネチカット州メリデン）。特異的な溶解を、標準式に従って算定した。1つの代表的な実験の結果を表1に示す。これらの結果から、調査した黒色腫クローンのわずかに2つ、すなわちDDM-1.7及びDDM-1.13が、C

40

50

TLによる溶解作用に対して完全な抵抗性であることが判明し、これは、これらの黒色腫クローンにおけるメラノサイト分化抗原の発現の喪失を示している。

【0107】

抗原発現の喪失に関するさらなる証拠を得るため、これらのタンパク質をコード化する RNAの発現の分析を、RT-PCR分析によって行った。細胞 2×10^6 個を遠心分離し、上澄み液を廃棄し、ペレットをCell Lysis Solution (Purescript(登録商標) RNA単離キット, G entra) 0.3 mlに溶解した。製造業者の指示に従ってRNAを単離し、溶解溶液に100% イソプロパノール2容を添加することによって沈殿させ、70%エタノールにて洗浄し、RNAアーゼを含まない蒸留水10 μlにて再度水和した。単離したRNAを、DNAアーゼによって処理して、調製物中の微量のDNAも破壊した。この目的のため、DNA-free(商標名)キット(Ambion)からの試薬を使用した。サンプルに、10xDNAアーゼ緩衝剤1 μl及びDNAアーゼ(2単位)1 μlを添加し、混合物を37 °Cにおいて30分間インキュベートし、DNAアーゼ不活性化試薬1.2 μlの添加によって反応を停止した。cDNA分析を、RNA 10 μlを使用して、総容量20 μlでの逆転写によって実施した。この目的のため、オリゴ(dT)(Gibco BRL)にて感作されたSuper Script II RTを、製造業者のプロトコルに従って使用した。インキュベーションを、42 °Cにおいて30分間、続いて、45 °Cにおいて30分間及び72 °Cにおいて2分間行った。1xPCR緩衝剤中に、次の物質：5.0 mM KCl、1.0 mM Tris /HCl(pH 9.0)、1.5 mM MgCl₂、0.2 mMクレゾール、12%ショ糖、0.005%ウシ血清アルブミン、各プライマー2.5ピコモル、dNTPs(Pharmacia LKB) 4.0 μM及びAmpliTaqポリメラーゼ(Perkin-Elmer) 1.25 U(1 μl)を含有するPCR増幅において、cDNA 1 μlを使用した。増幅生成物が同じ反応条件下において効果的に蓄積され、これによって、同時に行った反応において、選択した各種の抗原の腫瘍細胞における発現を比較することが可能になるように、プライマーを選択した。これらの実験及び後述の実験において使用したプライマーの配列を表2に示す。全ての反応において、Taqポリメラーゼ及びdNTPsを、第1サイクルの変性及びアニーリング工程の間の80 °C工程で添加する「ホットスタート」法を使用した。増幅において使用したパラメーターは、30 ~ 38サイクル(94 °Cで30秒間、60 °Cで30秒間、及び72 °Cで40秒間)、続く、72 °Cで10分間及び4 °Cへの冷却である。増幅を、Perkin-Elmer GeneAmp PCR System 9600にて実施した。陰性のコントロールは、cDNAの代わりに水のアリコートを含有する。この身近な遺伝子に関連する抗原の発現率の見込みを得るためにと共に、反応用の陽性のコントロールとしてGAPDHを増幅した。サイクルの回数の増加に連れて、少なくとも2回、マイナスの結果が繰り返された。増幅の生成物を、2%アガロースゲルを介する100Vでの電気泳動によって分離し、臭化エチジウムにて染色し、UV照明下にて視覚化し、イメージ記録システムにて記録した。半定量RT-OCRを行う際には、サイクルの回数を22に減らし、これによって、増幅のサイクル数による選択した配列の量における線状の増大を確実にした。cDNAテンプレートの3又は5倍稀釀を使用してPCR反応を行った。電気泳動分離後の得られた生成物のバンドの強さを、イメージ分析によって分析し、同じテンプレートを使用し、同じ稀釀率で得られたGAPDHs生成物の強さを正規化し、対応するRNAトランスクriptのレベルを、異なる細胞株において比較した。

【表2】

オリゴヌクレオチド配列5'-3'

遺伝子		プライマー
GADPH	センス	AGGGGGGAGCCAAAAGGG
	アンチセンス	GAGGAGTGGGTGTCGCTGT
Gp100	センス	GGCTGGTGAAGAGACAAGTCC
	アンチセンス	AGAGATGCAAGGACCACAGCC
Mart-1	センス	GAAGGTGTCCTGTGCCCTGACCC
	アンチセンス	GGCTTGCATTTCTACACCATTCC
MAGE-A1	センス	GATTCCCTGGAGGCCACAG
	アンチセンス	CCTCACTGGTTGCCCTGTGTC
MAGE-A3	センス	ACCAGAGGCCCGGAGGAG
	アンチセンス	CTGCCAATTCCGACGACACTCC
MAGE-A4	センス	GAGCAGACAGGCCAACCG
	アンチセンス	AAGGACTCTGCGTCAGGC
MAGE-A6	センス	AGGACCAGAGGCC
	アンチセンス	GGATGATTATCAGGAAGCCTGT
MAGE-A10	センス	CACAGAGCA.GCACTGAAGGAG
	アンチセンス	CTGGGTAAAGACTCACTGTCTGG
MAGE-A12	センス	TGGAAGTGGTCCGCATCG
	アンチセンス	GCCCTCCACTGATCTTAGCAA
NY-ESO-1	センス	GGCACAGGGGTTC
	アンチセンス	GCTTAGCGGCCTCTGCCCT

10

20

30

40

50

【0108】

図2に示した3つの黒色腫細胞クローニー、DDM-1.7、DDM-1.13及びDDM-1.29におけるメラノサイト分化抗原gp100及びMART-1の発現の測定結果は、明らかに、10%FCS中で生育した黒色腫細胞クローニーDDM-1.7及びDDM-1.13におけるRNAトランスクリプトのレベルが、DDM-1.29におけるよりもかなり低いこと、及び、対応する生成物のバンドの強さが、cDNAテンプレートの連続稀釈に連れて、DDM-1.29と比べて、DDM-1.7及びDDM-1.13に関して、かなり急激に減衰していることを示している。半定量RT-PCRに従い、ハウスキーピングGA PDHの転写レベルによるデータの正規化後では、DDM-1.7、DDM-1.13におけるメラノサイト抗原のRNAトランスクリプトのレベルは、DDM-1.29における対応するレベルの1%未満であった。2%ヒト血清中での生育に細胞を適合した後では、メラノサイト分化抗原の発現におけるわずかな増加（図示していない）が、RT-PCRによって見られた（ただし、DDM-1.29における対応するレベルの1%を超えない）。

【0109】

2%ヒト血清中での生育に適合した細胞におけるgp100の発現についても、免疫染色によって調査した。このため、ペトリ皿内に置いたガラスカバースリップにおいて、細胞を培養した。冷たいPBSにてリーンスした後、細胞を、メタノール・アセトン（1:1）の氷冷混合物にて15分間固定した。乾燥後、カバースリップをPBS内で1分間インキュベー

トし、第1抗体として、抗体HMB45及びHMB50の抗体混合物（NeoMarkers）、第2抗体として、ビオチン化ヒツジ抗マウスIg抗体（Amersham）、及び、第3抗体として、ストレプトアビジン-Texas red（Amersham）を使用して、当分野で公知の標準法に従って染色した。図3から見られるように、DDM-1.29細胞において検知される強力な染色と比べて、DDM-1.7細胞においては染色は認められない。多量の細胞の視覚化は、細胞の非常に少量（1%未満）が、DDM-1.7培養物において陽性であること（図示していない）を示している。同じ条件下で生育したDDM-1.13において、細胞の約1%がgp100について明確に染色された（図示していない）。

【0110】

MAGE-A及びNY-ESO-1抗原の発現レベルを測定するため、これらの抗原のためのプライマーを使用してRT-PCR反応を行った（プライマーの配列を表2に示す）。MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12及びNY-ESO-1タンパク質をコード化するmRNAの発現の比較結果を図4に示す。DDM-1.29は、テストした全ての抗原を発現するが、DDM-1.7及びDDM-1.13は、これらの内の4～5個のみを発現する。

【0111】

CT抗原の発現は、DNA脱メチル化剤5-アザ-2'-デオキシシチジンにて細胞を処理することによってup-regulateされることが知られている。MAGE-A及びNY-ESO-1タンパク質の発現が、DDM-1.13黒色腫細胞クローニングにおいて、このような処理によってup-regulateされるか否かをテストした。T25培養フラスコにおいて細胞を播種し、24時間後、5-アザ-2'-デオキシシチジンを最終濃度1μMで添加した。細胞を3日間インキュベートし、ついで、培地を交換し、さらに2日間インキュベートした後、上記のようにして細胞を採取した。上記のようにして抗原の発現の測定を行ったところ、結果（図5に示す）は、5-アザ-2'-デオキシシチジンによる細胞の処理後では、テストした全てのCT抗原に関して発現が増大したことを示した。

【実施例2】

【0112】

外来タンパク質を提示する能力が増大された樹状細胞の生産

樹状細胞のユニークな特性は、これらが、CD8+CTLによる認識に関して外来タンパク質を提示できることである。外来タンパク質を取り込む最大能力は、DC分化の未成熟ステージと関連する。しかし、DCの食細胞活性と、これらの抗原に対して特異的なCTLによる認識に関する取り込まれた抗原を提示する能力との間の直接的な関連性に関するデータは存在しない。従って、a) 外来タンパク質を取り込む高い能力をもつ未成熟樹状細胞の生産を最適化すること及びb) 樹状細胞の食細胞活性と、外因的に添加された黒色腫溶解物から抗原を提示する能力との間の相関関係を示すことを目標として実験を行った。

【0113】

第1セットの実験では、リンフォカインの添加及びTGF-1の使用の時期を変更することによって、食作用を示す樹状細胞の生産を最適化した（この実験は、末梢血の単球からの樹状細胞の生産を改善するために示されたものである：Yangら、1999、J. Immunol., v.163, pp.1737-1741）。樹状細胞は、代表的には、ヘパリン25IU/mlを含有するHLA-A2陽性のドナーの末梢血50mlから生産された。血液を、Ca, MgフリーのPBS（以下、PBSと表示する）12.5mlを収容する2つの管（50ml）に分け、Lymphoprep（2つの50ml管に12.5ml導入）に負荷した。遠心分離（800g, 25分）後、上層10mlを注射器にて採取し、0.2μmのフィルターを通過させ、血漿源として使用した。界面層から単核細胞を採取し、PBSにて少なくとも2倍に希釈し、6回遠心分離した（初めに、650gにて10分間、ついで、450gにて7分間、その後、250gにおいて5分間）。各遠心分離後、上澄み液を廃棄し、ペレットを、細胞の凝集が完全に消失するまで、PBS5ml中に再度懸濁化させた。管の頂部まで充満させるように新鮮なPBSを添加し、遠心分離を繰り返した。最後の遠心分離後、ペレットを接着培地（血漿2%を添加したRPMI 1640培地である）5ml中に再度懸濁させ、計数後、細胞濃度を 5×10^6 個/mlに調整した。細胞懸濁液3mlを、6穴プレート（Falcon, 非TC処理）の合計4つの穴に入れ、CO₂-インキュベーターにお

10

20

30

40

50

いて1.5時間インキュベートした。このインキュベーションの後、非付着細胞を集め、付着細胞の単層を、温かいRPMI 1640培地及び培養培地（血漿1%を添加したRPMI培地である：DC培地）3mlにて2回洗浄した。2つの穴（培養物1及び3）に、組み換えヒトGM-CSF及びIL-4を濃度1000U/mlで添加した。一夜インキュベーションした後、2つの穴（培養物2及び4）に培地を完全に充填した。このため、培地を1つの遠心分離管に集め、各穴に、予め加温した新たなDC培地2.5mlを添加した。集めた細胞を遠沈し（250g、5分間）、上澄み液を廃棄し、ペレットを、予め加温したDC培地1ml中に再度懸濁化し、細胞懸濁液0.5mlを培養物2及び4に戻した。培養物3及び4には、TGF-1を最終濃度100ng/mlで添加した。

【0114】

10

さらに5日後、生産された樹状細胞の食細胞活性を測定した。10%FCS（ウシ胎仔血清）を含有するRPMI 1640培地を、遠心分離管と共に、平底非TC処理96穴プレート（Falcon）に30～60分間置いた。各DC培地の0.5mlを、前処理した遠心分離管に移し、遠心分離（200g、5分間）後、上澄み液を廃棄し、ペレットをDC培地0.5ml中に再度懸濁化した。96穴プレートの穴から培地を除去し、各タイプの培養物につき2つの穴として、各細胞懸濁液0.2mlを穴に添加した。各管に、FluoSpheresのストック溶液10μlを添加し、プレートをCO₂-インキュベーターに入れた。4時間後、培養物を、上記の如く前処理した遠心分離管に入れ、200g、5分間での遠心分離によって、10%FCSを含有するRPMI 1640中で2回洗浄した後、ペレットをRPMI培地25μl中に再度懸濁化した。管を氷の中に入れた。細胞懸濁液5μlを、顕微鏡のガラススライド上に置き、スライドを、湿潤チャンバー（通常、湿らせた紙を収容する大型のペトリ皿を使用する）に入れ、CO₂-インキュベーターにおいて10～15分間インキュベートした。その後、細胞懸濁液1滴を13mmのガラスカバースリップにて覆い、蛍光顕微鏡にて細胞を観察した。デジタルカメラLeica DC100を使用して、像をコンピューターに移し、bitmapファイルとして保存した。

20

【0115】

調査した条件下で生産された樹状細胞の食細胞活性の測定に関する1つの実験結果を図6に示す。培養を開始した日における、全培地の交換を伴うGM-CSF及びIL-4の添加は、培養の開始時からGM-CSF及びIL-4が添加される培養と比べて明らかに有利であることが明確に認められる。腫瘍細胞溶解物と組み合わされて免疫付与において使用される樹状細胞の確立を開示する論文の多くでは、培養の開始時からリンフォカインが添加されている（例えば、Chakrabortyら、1998、Cancer Immunol. Immunother.、v.47、pp.58-64；Nestleら、1998、Nature Med.、v.4、pp.328-332参照）。

30

【0116】

図6に示す結果は、TGF-1（樹状細胞の生産の間における追加のリンフォカインとして使用されている；Yangら、1999、J. Immunol.、v.163、pp.1737-1741）は、樹状細胞の食細胞活性について増大作用を持たず、実際には、多くの実験において食細胞活性を低下させた（図示していない）ことも示す。

40

【0117】

外因的に添加されたタンパク質から抗原性ペプチドを提示する能力を、DDM-1.29細胞の溶解物を負荷した樹状細胞の認識モデル（発明者らによって確立され（Kirkinら、1999、Cancer Immunol. Immunother.、v.48、pp.239-246）、実施例1において、分化黒色腫細胞クローニにおける抗原の発現の検出に関して使用されているgp100特異的CTLによる、メラノサイト分化抗原gp100の高い発現レベルを有する）を使用して調査した。

50

【0118】

上記のようにして、DDM-1.29細胞の溶解物を調製した。黒色腫細胞を、実施例1に記載したように培養し、PBSにて2回洗浄し、RPMI 1640培地（Gibco）中に細胞10⁷個/mlで再度懸濁化した。細胞を、凍結（液体窒素）-解凍の5サイクルに供し、超音波浴（Megason 200、Stuer）にて15分間超音波分解し、ついで、初めに800g、4にて15分間、ついで、13000g、4にて60分間で遠沈した。上澄み液を集め、0.2μmフィルタ

50

ーを介して濾過し、タンパク質の濃度を、BCA (bicinchoninic acid) タンパク質アッセイ試薬 (Pierce) を使用し、この試薬の製造者によって指示された方法に従って測定した。タンパク質の濃度は、3.5～5mg/mlの範囲であった。上澄み液のアリコートを、-80にて凍結して保存した。

【0119】

樹状細胞に腫瘍溶解物を負荷するため、各種の樹状細胞培養物を遠心分離管に移し、遠沈し、上澄み液を廃棄した後、ペレットをDC培地2ml中に再度懸濁化し、細胞を計数し、細胞懸濁液を希釈して、細胞 5×10^5 個/mlとした。細胞懸濁液1.8mlを、Falcon非TC処理24穴プレートの穴に入れ、腫瘍溶解物0.2mlを、GM-CSF及びIL-4 (それぞれ、1000U/ml)と共に添加した。一夜インキュベーションした後、TNF-20ng/mlを添加した。さらに24時間インキュベーションした後、培養物をピベットによって採取し、前処理した遠心分離管に移し、200gにて5分間遠沈し、上澄み液を廃棄し、ペレットをDC培地2ml中に再度懸濁化した。計数した後、細胞懸濁液を希釈して、細胞 3×10^5 個/mlとし、細胞懸濁液1mlを、各タイプの培養物について2つの穴として、24穴TCプレート (Nunc) の穴に入れた。穴の1つには、培地1mlを添加し、他の穴にはCTL懸濁液 (10^6 個/ml) 1mlを添加した。培養物を24時間インキュベートし、その後、上澄み液1mlをEppendorf管に移し、遠沈し、上澄み液を他のEppendorfチューブに移し、生成したインターフェロン (IFN-) の量の分析を、次のようにして、ELISA法によって実施した。すなわち、室温において一夜インキュベートすることによって、Immunoplate MaxiSorpプレート (Nunc) を、コーティング緩衝剤 (PBS, pH7.4) 中で2 μ g/mlに希釈した抗ヒトIFN-精製モノクロナール抗体 (Endogen) 100 μ lにて被覆した。コーティング溶液を除去し、ブロッキング溶液 (BSAの4%PBS溶液) 200 μ lを添加し、室温において1時間インキュベートした。0.05%Tween-20を補給したPBS (洗浄用緩衝剤) にて4回洗浄し、培地における標準物 (組み換えIFN-: Endogen) の2倍基準稀釀物 (15～1000pg/ml) 50 μ lを、2通り1組として添加した。集めた上澄み液を、3000gにて5分間遠心分離し、サンプル50 μ l及び2倍稀釀物2つを、3通り1組として適用した。プレートを、4において一夜インキュベートした。プレートを洗浄することなく、ブロッキング溶液中において0.5 μ l/mlに希釈したビオチンラベル化検出抗体 (ビオチンラベル化した抗IFN-: Endogen) 50 μ lを添加し、インキュベーションを、室温において2時間続けた。洗浄用緩衝剤にて4回洗浄した後、ブロッキング溶液中において1:1000希釈したHRP-結合streptavidin (Genzyme) 100 μ l/穴を添加し、プレートを室温にて1時間インキュベートした。プレートを洗浄用緩衝剤にて4回洗浄し、ペーパータオル上にプロットした。基質溶液 (OPD 5mgをクエン酸塩緩衝剤11mlに溶解し、過酸化水素5 μ lを補給したもの) 100 μ lを各穴に添加した。反応は室温において15～40分の間に生じ、10%硫酸50 μ lを添加することによって反応を終了させた。ELISAリーダーにおいて、吸収比較差を、490nm及び650nmにおける値の差として測定した。IFN-の代わりに細胞培地のみを添加したコントロールの値を差し引き、実験において放出されたIFN-の濃度を測定し、同じ実験からプロットしたIFN-較正曲線を使用して、pg/mlで表示した。

【0120】

図7は、これら実験の1つのデータを示す。IFN-の最大特異的生産 (溶解物負荷樹状細胞の存在下でのIFN-の生産と、「空の」樹状細胞の存在下におけるIFN-の生産との間における差を表す) は、樹状細胞培養物1及び3に関して最大であり、これら培養物は最大の食細胞活性を有することが認められる。

【0121】

要約すると、腫瘍細胞の溶解物から取り込まれた抗原によって、CTLを特異的に刺激する樹状細胞の能力は、樹状細胞の食細胞活性に相關し、DC分化の間ににおけるTNF-の存在には無関係であり、GM-CSF及びIL-4の添加が、1日延期され、かつ完全な培地の交換と組み合わせて行われたDC培地において最大である。

【実施例3】

【0122】

10

20

30

40

50

黒色腫細胞由来溶解物を負荷した自己樹状細胞による正常なドナーの末梢血リンパ球の促進後における、広範な抗腫瘍活性をもつ細胞傷害性Tリンパ球の発生

腫瘍抗原に対して特異的な細胞傷害性Tリンパ球の発生を促進する、黒色腫細胞溶解物が負荷された樹状細胞の能力を、混合リンパ球樹状細胞培地において、インビトロでテストした。実施例2に記載のようにして、樹状細胞を、正常なHLA-A2-陽性ドナーの末梢血から調製した。単球の吸着の初期工程の後、非吸着リンパ球を集め、後の使用のため、10%DMSOを添加した自己血漿中で凍結した。腫瘍溶解物を負荷した樹状細胞を採取し、放射線を照射し(6000ラド)、洗浄し、自己血漿1%を補充したX-VIVO15培地(完全培地)中に、 3×10^5 個/mlで再度懸濁化し、24穴プレートの5つの穴に、それぞれ1mlずつを入れた。樹状細胞の残りを、10%DMSOを含有するプールしたヒト血清中において凍結した。凍結した自己由来の非付着リンパ球を解凍し、一度洗浄し、計数し、さらに洗浄した後、細胞 1.5×10^6 個を、IL-7(20ng/ml)及びIL-12(100pg/ml)を含有する完全培地5ml中に再度懸濁化させた。リンパ球懸濁液1mlを、樹状細胞と一緒に穴に添加した。7日後、培地1mlを除去し、IL-7(20ng/ml)を含有する新たな培地1mlを添加した。5日後、細胞を採取し、生きた細胞をLymphoprep(Nycomed、ノルウェー)上に展開し、洗浄した後、完全培地中に 1.5×10^6 個/mlで再度懸濁化させた。リンパ球懸濁液1mlを、24穴プレートの穴に入れた。凍結した照射済み溶解物負荷樹状細胞を解凍し、一度洗浄し、完全培地中に 10^5 個/mlで再度懸濁化させ、1mlをリンパ球と一緒に穴に添加した。2日後、培地1mlを除去し、IL-2(20IU/ml)を含有する新たな培地1mlを添加した。再促進のこの操作法を、各培養物について、毎週2~4回繰り返し行った。

【0123】

リンパ球の溶解活性を、3~5ラウンドの促進後に測定した。この時点で、増殖リンパ球は、各促進後に、増大するCD8⁺細胞集団と共に、純粋なCD3-陽性細胞集団を提示する(4~5ラウンド目の促進後、1週間で70~90%に達する)(表現型細胞を、当分野において公知のFACS分析によって、ある種の表面マーカーに対して特異的な抗体を使用して測定した)。

【0124】

上述の黒色腫細胞培養物に加えて、次の黒色腫細胞株:FM28、FM55p、FM60(HLA-A2-陽性)、FM45及びFM48(HLA-A2-陰性)を使用した。これらの細胞株は、他に開示されており(Bartkovaら, 1996, Cancer Res., v.56, pp.5475-5483; Kirkinら, 1995, Cancer Immunol. Immunother., v.41, pp.71-81)、その内容を、ここに、参考として含める。DDB-1及びANBI-EBVは、発明者らの研究室において、当分野において公知の方法によって確立されたEBV形質転換リンパ芽球状細胞株である。NK介在溶解反応用のターゲットとして、K562 erythroleukemic cellsを使用した。乳癌細胞株、MCF-7、CAMA-1、HBL-100、MDA-MB-231(HLA-A2-陽性)及びBT-20(HLA-A2-陰性)は、デンマーク癌協会のPer Briand氏からのプレゼントである。SCC4及びSCC9 HLA-A2-陽性扁平上皮癌細胞株は、ATCCから得たものである。全ての細胞株を、10%FCSを補充したRPMI 1640培地において培養した。細胞毒活性を、実施例1に記載したようにして測定した。プロッキング抗体を使用する実験において、HLAクラスI分子の一般的な測定に対して特異的なW6/32モノクロナール抗体を、濃度10μl/mlで穴に添加した。

【0125】

第1の実験では、EBV形質転換B細胞及びK562 erythroleukemic cellsに対すると共に、黒色腫細胞のパネルに対する細胞毒性をテストした。NK様の溶解活性(K562細胞の溶解によって測定される)は、2ラウンドの促進後において顕著であるが、その後の促進の後では、徐々に減少した。本質的に特異的なCTL介在溶解を検出するために、溶解活性に関する全ての実験を、20倍過剰の未ラベル化K562細胞の存在下で実施した。DDM-1.13の溶解物を負荷した樹状細胞による4ラウンドの促進の後の、ドナーANBIからのリンパ球の細胞毒性に関する代表的な実験の結果を図8に示す。HLA-A2-陽性黒色腫細胞は各種の程度で溶解されるが、K562、ANBI-EBV(同じドナーから確立されたEBV-B細胞)、DDB-1(DDM-1黒色腫細胞自体に由来する)、黒色腫細胞株FM45及びFM48(ドナーANBIの細胞に普通に

10

20

30

40

50

あるMHCクラスI抗原を持たない)は、溶解に対して比較的抵抗性である。FM9 (HLA-A2-陰性黒色腫細胞株ではあるが、ドナーANBI HLA-A1(示していない)を共有する)も溶解に対して敏感であり、これは、溶解のHLA制限が複雑であり、HLA-A2抗原のみでは制限されないことを表すものであることが注目されなければならない。未処理樹状細胞の使用も、より低い程度ではあるが、リンパ球の増殖を誘導するが、非特異的な細胞毒性の発生は、このような培養物(示していない)では認められなかった。DDB-1細胞(黒色腫の患者(ここからDDM-1黒色腫細胞が確立された)のPBMC(末梢血単球)から生産される)に対する細胞毒性の欠落は、溶解調製物中に存在しうる同種抗原が、顕著な免疫応答を誘導しないこと、及び得られる免疫応答が、主として腫瘍特異性であることを示している。MHCクラスI分子に対するW6/32抗体は、顕著に阻害するが、これは、細胞毒性のMHCクラスI制限性を示している。同様の結果は、DDM-1.7黒色腫クローニング(示していない)から単離された溶解物によって得られた。

10

【0126】

認識された抗原が、各種タイプのヒト悪性腫瘍の間で共通する癌/精巣抗原のグループに属する可能性をテストするため、多数の乳腺及び扁平上皮の癌細胞株の、生産されたCTLによる溶解に対する感受性を調査した。1つの実験の結果を図9に示す。4つのHLA-A2-陽性乳癌細胞株の内の3つは、溶解に対する中程度~高度の感受性を有し、1つのHLA-A2-陰性細胞株は、溶解に対して完全に抵抗性であった。調査した2つの扁平上皮癌の細胞株の内の1つも、溶解に対して感受性であった。乳癌細胞株の溶解は、HLAクラスI特異性抗体W6/32による阻害に対して鋭敏であった。これらのデータは、DDM-1.7又はDDM-1.13黒色腫細胞株の溶解物が負荷された自己樹状細胞による、正常なドナーのPBL(末梢血リンパ球)のインビボ免疫付与が、各種のヒト腫瘍に存在する腫瘍関連抗原を特異的に認識するCTLの生産を誘導することを表している。

20

【0127】

このようにして生産されたCTLによって認識される抗原の1つの可能なグループはMAGE-A抗原である。これら抗原の発現と、生産されたCTLに対するターゲット細胞の感受性とを関連づけるために、溶解に対して異なった感受性を示した3つの乳癌細胞株におけるこれら抗原の発現レベルを比較した。結果を図10に示す。調査した抗原の最大数が、HBL-100細胞において発現され、最小数がMCF-7において発現される。これらの結果は、MAGE-Aグループの発現された遺伝子の数と溶解に対する感受性との間に、確かに相関関係があり、これは、これらの又は同様に規制された抗原が、この種の免疫付与においては主要なターゲットである可能性を示すことを立証している。

30

【実施例4】

【0128】

分化抗原のイムノドミナンスに関するテスト

高レベルの分化抗原を発現する(DDM-1.29)及び低レベルの分化抗原発現する(DDM-1.9: DDM-1細胞株の変異体)2つの黒色腫細胞株を、Herinら, 1987, Int. J. Cancer, v.39, pp.390-396に開示された方法による、自己腫瘍細胞での末梢血リンパ球のインビボ促進による細胞傷害性Tリンパ球の生産に関する実験において使用した。放射線照射した(10,000ラド)腫瘍細胞によるリンパ球の週1回の促進の3ラウンド後、稀釀を制限することによって細胞培養物をクローニングし、生長クローニングの溶解活性を、第1に、Cr⁵¹放出テストにおいて、元の黒色腫細胞株に対してテストした。細胞クローニングが元の黒色腫細胞株に対して20%以上の溶解活性を有する場合、この細胞クローニングを細胞毒性であるとした。ついで、抗原gp100及びMART-1からの各種HLA-A2-制限ペプチドが負荷されたT2細胞によるテストにおいて、細胞傷害性T細胞クローニングの特異性をテストした。ペプチドでの処理を行っていないT2細胞は、コントロールとして機能する。各黒色腫細胞株について、約100個のクローニングを分析した。免疫付与に対する分化抗原gp100及びMART-1を認識するCTLクローニングの比率を算定し、得られた結果を下記の表3に示す。

40

【表3】

分化抗原を認識するCTLクローンの比率(生成したクローンの総数の%)

黒色腫細胞株	分化抗原の発現	下記の分化抗原を認識するCTLクローンの比率 (生成したクローンの総数の%)	
		Gp100	MART-1
DDM-1.29	高い	51	44
DDM-1.P	低い(DDM-1.29における レベルの5%未満)	0	0

10

【0129】

データは、分化抗原がイムノドミナントであることを示している。分化抗原の高レベル発現の場合、免疫応答は、主として、分化抗原gp100及びMART-1に向けられ、免疫付与のために分化抗原を低レベルで発現する細胞株が使用される際には、免疫応答の誘導は見られない。両細胞株が、多量の細胞傷害性T細胞クローンの生産と共に、自己リンパ球の強力な増産を誘導することは注目されなければならない。

20

【実施例5】

【0130】

各種培養条件において生産される表現型樹状細胞

第1日における培地の交換と組み合わされたリソフォカインの添加の各種様式が、生産される未成熟樹状細胞の表現特性にいかに影響を及ぼすかを調査するため、異なる4種の生育条件を調査した。樹状細胞を、本質的に実施例2に記載のようにして生産した。異なる条件は下記のとおりである：

20

1) 第0日において、吸着工程の終了後直ちにサイトカイン(GM-CSF及びIL-4)を添加し、第1日において、培地を交換することなく、サイトカインをさらに補充する；

30

2) 上記1)と同様、ただし、第1日において、サイトカインの補充と共に、培地の完全な交換を行う；

3) サイトカインの添加を、第1日における培地の交換を行うことなく、第1日まで遅らせる；

4) 上記3)と同様、ただし、第1日において、培地の完全な交換を行う。

上記4)の条件は、白血球搬出法生成物からの成熟樹状細胞の生産に関するThurnerら(1999)によって開示された条件に対応する(Thurnerによれば、彼らの最適化は、白血球搬出法生成物から生産される樹状細胞についてのみ機能し、新たに採取された血液サンプルからのものには機能しない)。

40

【0131】

5日間のインキュベーションの後、細胞を採取し、Coulter Counter(Beckman, model Z2)において細胞の数を計数し、さらに、FACSによる表面マーカーの発現の分析を行うため、細胞を、10%DMSOを添加した自己血漿中で凍結した。次のモノクロナール抗体を使用した(全て、BC Biosciencesから入手)：CD1a-PE、CD14-FITC及びCD83-PE(適合するコントロール抗体と共に)。

40

【0132】

細胞の計数は、細胞収率(数及びサイズに関して)において差がないことを示しており、これは、生育の最適化の指標として形態的臨界及び収率のみを使用しているため、Thurnerら(J. Immunol. Methods, 1999, 223: 1-15)のデータと良好に一致している。これに対して、表面マーカーを測定する際には、この研究では重大な差異が見られる(実験の

50

1つの結果を表4に示す)。

【表4】

各種の培養条件下で生成した表現型樹状細胞

サイトカインの添加の開始	第1日における培地の変換	表現型DC(%)		
		CD1a	CD14	CD83
第0日	なし	20.6	12.9	26.1
第0日	あり	18.3	9.0	34.2
第1日	なし	51.0	15.4	24.9
第1日	あり	52.0	10.9	32.8

10

20

30

40

50

【0133】

第1日からのサイトカインの添加の開始は、CD1aマーカーの発現を顕著に上昇させるが、他のマーカーの発現にはあまり影響を及ぼさない。第1日における培地の交換は、Thurnerら(1999)によって初めて提案されたように、培地の交換を行う場合及び行わない場合のいずれにおいても同じ効果が達成されるため、実際には必要ないことも認められた。事実、第1日における培地の交換は、未成熟状態の樹状細胞のendcytic活性を顕著に低減させる。これらの条件(培地を交換することなく、サイトカインの添加を1日遅らせる)は、後の実験に関して選択された。

【実施例6】

【0134】

単球から生産される樹状細胞の収量の最適化

上記の最適化の間に、発明者らは、驚くべきことには、単核細胞集団から得られる樹状細胞の収率が、吸着工程の間ににおける単球の密度に依存することを見出した。公開された方法の多くにおいて早くから注目されていたように、吸着工程を行う際には、単球の濃度よりもむしろ単核細胞の濃度が考慮される。しかし、単核細胞は、2つの集団(リンパ球及び単球)の混合物を意味し、各集団の比率は明らかに変動する。プラスチックに主に吸着するのは単球である。

【0135】

単核細胞の集団における単球の濃度を評価するために、細胞数を計数するためにCoulter Counter(Beckman, Model Z2)を使用する(この装置が、細胞のサイズ分布の観察をも可能にするためである)。計数時に、平均サイズ7nm(リンパ球)及び9nm(単球)をもつ2つの細胞集団が見られ、適切なゲーティングが、これら2つの集団の比率の評価を可能にする。

【0136】

発明者らは、既に、T25フラスコ当たり単球約 1.5×10^6 個の播種細胞密度において、単球の吸着がほぼ完全である(90%以上)ことを見出しており、従って、発明者らの実験では、この細胞密度(1.2×10^6 ~ 2.0×10^6 個の間での変動可能)を使用していた。樹状細胞の収率における顕著な変動が観察され、このような変動の理由を理解する試みにおいて、各種の実験における樹状細胞の収率が、単球の密度と関連するものと決定した。異なるドナーから生産された5つの培養物についてのこのような分析の結果は、樹状細胞の生産の効率と、播種された単球の密度との間の逆相関を明確に示している。

【0137】

この関係を評価するために、同じドナーの単球を異なった密度で播種する実験を企画した。Lymphoprepグラディエント上での遠心分離によって軟膜(健康なドナーの血液から調

製したもの)から単核細胞を単離した。インターフェイス細胞の単離及び血小板を除去するための強力な洗浄の後、単核細胞を、1%自己ヘパリン添加血漿を添加したRPMI 1640培地でなる培養培地中に懸濁化させ、T25フラスコ(表面積25cm²)において、フラスコ当たり培地7ml中に、各種のフラスコ当たりの単核細胞の量(単球10×10⁶~20×10⁶個/フラスコ)で播種した。吸着を1時間行った後、吸着されなかつた細胞を、予め加温した培養培地にて2回洗浄し、各フラスコに、新たな培地7mlを添加した。翌日、培養物に、GM-CSF(100ng/ml)及びIL-4(50μg/ml)を添加した。第3日に、サイトカインの添加を繰り返し、培地の半分を交換し、GM-CSF及びIL-4の新たな部分を添加した。第5日に、培地の半分を交換し、GM-CSF及びIL-4の新たな部分を添加した。第6日に、TNF- α を濃度20ng/mlで添加した。第7日において、培養物を採取し、細胞の総数を計数した後、10%DMSOを添加した自己血清中で凍結し、FACS分析による分析まで保持した。FACS分析を、CD1a及びCD14抗体を使用して実施した。

10

20

【0138】

樹状細胞(14~16nmの中位のサイズを持つ大きい細胞)の収率に関する実験の1つの結果を表5に示す。

30

【表5】

各種の初期単球密度での培養における表現型樹状細胞の収率

T25 フラスコ当たりの 単球の数 ($\times 10^6$)	T25 フラスコ当たりの DCの数 ($\times 10^6$)	DCの収率 (単球の%)	表現型DC (ゲーテッド細胞の%)	
			CD1a	CD14
10	5.28	52.8	54.9	11.0
12.5	5.43	43.4	44.9	16.9
15	4.67	31.1	46.4	14.9
17.5	4.47	25.5	46.2	14.5
20	4.69	23.4	44.2	7.4

【0139】

樹状細胞の収率は、播種した単球の密度(最少細胞密度50%)の増大に連れて、顕著に減少した。同じ樹状細胞について行ったFACS分析の結果も表に示してあり、この結果は、初期の単球の異なる密度で生産された樹状細胞の特性において、格別の差異が観察されないことを示している。

40

【0140】

単球の初期細胞密度をT25フラスコ当たり10×10⁶個以下に減少すると、CD1aマーカーの発現の減少を生ずる(データは示されていない)。従って、最大コンピテンスをもつ樹状細胞の生産の最大効率を導く(主なDCマーカーの発現によって判定)初期単球集団の最適細胞密度は、培養表面25cm²当たり細胞約10×10⁶個である。

50

【0141】

これらデータに基づき、必要な血液の容量を算定することができる。樹状細胞の予測される収率が、初期の単球数の約50%であれば、樹状細胞50×10⁶個を得るために血液300mlのみが必要である。これは、ワクチン接種2ラウンド用のワクチンの調製には、血液300mlの1つのシングル血液サンプルで充分であることを意味している。他の物質と共に、必要なサイトカインの量(GM-CSFについて21ng及びIL-4について10.5ng)は、標準的な非最適化法におけるよりも3倍少ない。従って、DCの製造に必要なコストも、少なくとも3倍少なく、さらに、高価な白血球搬出法を行う必要がない。

【実施例 7】

【0142】

樹状細胞基材ワクチンの使用

本発明に従って調製された2つの黒色腫細胞株の溶解物が負荷された樹状細胞を使用する癌患者のワクチン接種サイクルを、好ましくは、患者に、3週間間隔で5回の皮内ワクチン接種（各回、樹状細胞 5×10^6 個にて）の第1サイクルを施すように企画する。ワクチン接種の初期サイクルの後、臨床的応答が見られる場合には、第2の同様のサイクルを行う。試みの全期間に関しては、細胞計 50×10^6 個が必要である。患者の状態（患者の多くは、他の処置を施すことができないような病気が進行した状態にある）を考慮すると、採血の回数を最少にして、1回又は2回に制限することは重要である。

10

【0143】

本発明を特定の具体例を参照して記載したが、他の癌／精巣抗原及び他の系統特異的分化抗原を含む当業者にとって明白な他の具体例も、本発明の精神内に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【0144】

【図1】いくつかのDDM-1黒色腫クローンの、gp100及びMART-1/Melan A特異的細胞傷害性Tリンパ球（CTL）クローンによる溶解に対する感受性を示す。

【図2】3つの黒色腫細胞クローン、DDM-1.7、DDM-1.13及びDDM-1.29におけるメラノサイト分化抗原gp100及びMART-1/Melan Aの発現（RT-PCRにて分析）を示す。

【図3】DDM-1.7及びDDM-1.29におけるメラノサイト分化抗原gp100の発現（免疫染色にて決定）を示す。

【図4】3つの黒色腫細胞クローン、DDM-1.7、DDM-1.13及びDDM-1.29におけるMAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A12、NY-ESO-1及びGAPDHの発現（RT-PCRにて分析）を示す。

【図5】DNA脱メチル化剤5-アザ-2'-デオキシシチジンでの処理後、DDM-1.13におけるMAGE-A及びNY-ESO-1の発現を示す。

【図6】未成熟樹状細胞の4つの培養物によるfluorosphereのエンドサイトーシスによる取り込みを示す。

【図7】DDM-1.29細胞の溶解物を負荷した4つの樹状細胞培養物（図6と同じ）との相互作用後におけるgp100特異的CTLによるIFN- γ の生成を示す。

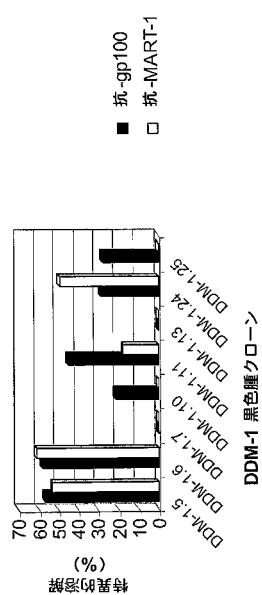
30

【図8】黒色腫細胞、EBV-形質転換B細胞及びK562細胞に対するドナーANB1の免疫リンパ球の細胞溶解活性を示す。

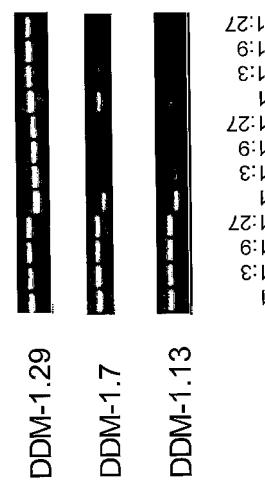
【図9】乳癌及び扁平上皮癌細胞株に対するドナー19/00の免疫リンパ球の細胞溶解活性を示す。

【図10】乳癌細胞株におけるMAGE-A及びGAPDH遺伝子の発現を示す。

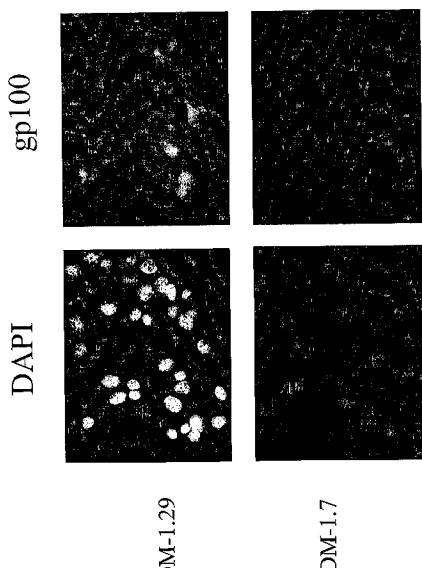
【図1】



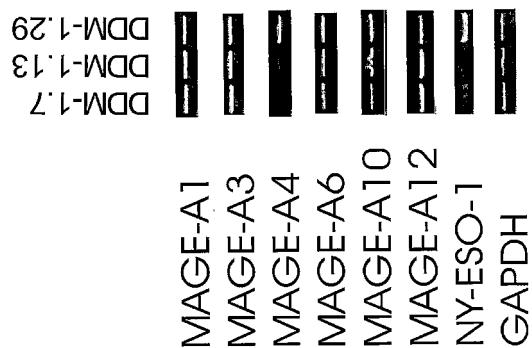
【図2】



【図3】



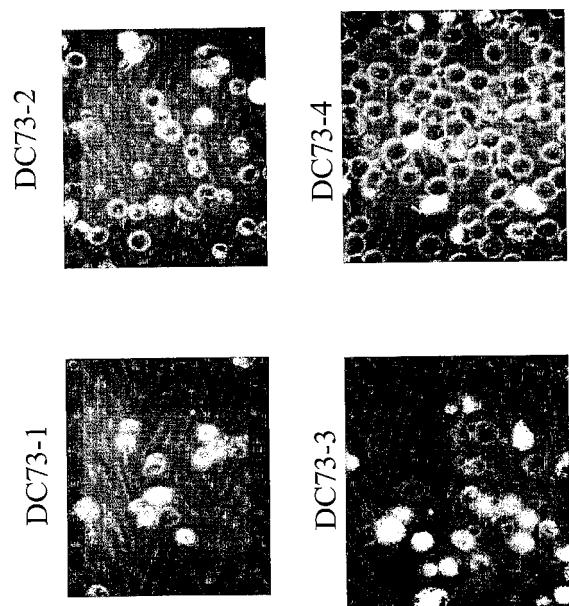
【図4】



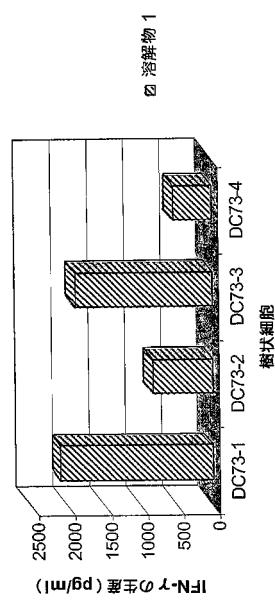
【図5】



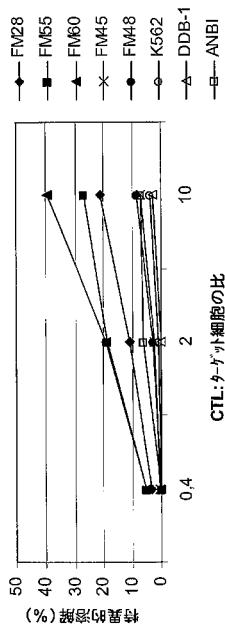
【図6】



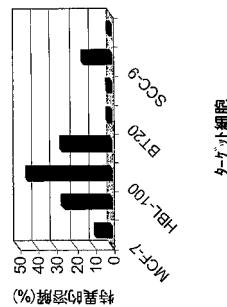
【図7】



【図8】



【図9】



【図10】



【手続補正書】

【提出日】平成16年1月27日(2004.1.27)

【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】

多数の癌 / 精巣抗原を提示する樹状細胞を含有してなる、ヒト又は動物において免疫応答を誘導するための医薬組成物において、

a) 樹状細胞によって、少なくとも5つの癌 / 精巣抗原は提示されるが、系統特異的分化抗原は提示されず、前記抗原は、少なくとも5つの癌 / 精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない少なくとも1つの癌細胞株から提供されるものである(溶解は、4時間の細胞毒性テストにおいて10%未満である)こと、

b) 樹状細胞が、初期生育段階において、サイトカインを含まない生育培地にてエクスピボ培養され、ついで、該樹状細胞に、少なくとも5つの癌 / 精巣抗原が負荷される前に、サイトカインを含有する培地にて第2生育段階を行ったものであること、

c) 癌 / 精巣抗原の負荷の間、樹状細胞は未成熟である(CD1a陽性、CD14陰性、及びCD83陰性)こと、及び

d) 樹状細胞が、抗原の負荷後に、成熟因子の添加によって成熟されたものであること、を特徴とするヒト又は動物において免疫応答を誘導するための医薬組成物。

【請求項2】

樹状細胞が、自己樹状細胞である請求項1記載の医薬組成物。

【請求項3】

樹状細胞への負荷のために、系統特異的分化抗原を発現しない少なくとも1つの癌細胞株の全細胞溶解物（溶解は、4時間の細胞毒性テストにおいて10%未満である）を使用する請求項1記載の医薬組成物。

【請求項4】

樹状細胞における少なくとも5つの癌／精巣抗原の提示を、全細胞融合によって達成する請求項1記載の医薬組成物。

【請求項5】

少なくとも5つの癌／精巣抗原の提示を、エクソソームの使用によって達成する請求項1記載の医薬組成物。

【請求項6】

癌細胞株が黒色腫細胞株であり、系統特異的分化抗原がメラノサイト分化抗原である請求項1～5のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項7】

メラノサイト分化抗原が、gp100、Melan A/Mart-1及びチロシナーゼを包含するものである請求項6記載の医薬組成物。

【請求項8】

単球型の樹状細胞前駆体が、ヒト又は動物の末梢血から提供されたものである請求項1～7のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項9】

単球型の樹状細胞前駆体が、ヒト又は動物の骨髄から提供されたものである請求項1～7のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項10】

白血球搬出法生成物が、樹状細胞又は単球の源として含まれない請求項1～9のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項11】

樹状細胞が、CD14+単球に由来するものである請求項1～8のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項12】

樹状細胞が、CD34+細胞に由来するものである請求項1～9のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項13】

癌／精巣抗原が、MAGE-A、MAGE-B、MAGE-C、GAGE、LAGE、SSXサブファミリーから選ばれる抗原を含むものである請求項1～12のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項14】

癌／精巣抗原が、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-B10、MAGE-B16、MAGE-B17、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、NY-ESO-1、LAGE、PAGE-1、PAGE-2、PAGE-3、PAGE-4、XAGE-1、XAGE-2、XAGE-3、SSX-1、SSX-2、SSX-3、SSX-4、SSX-5から選ばれる抗原を含むものである請求項13記載の医薬組成物。

【請求項15】

癌／精巣抗原が、SCP-1、TSP-50、TRAG-3、SAGE、IL-13R、CTp11から選ばれる抗原を含むものである請求項1～12のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項16】

癌／精巣抗原が、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、及びNY-ESO-1から選ばれる抗原を含むものである請求項15記載の医薬組成物。

【請求項17】

少なくとも5つの癌／精巣抗原が、少なくとも2つの異質遺伝子型の黒色細胞株から提供されたものである請求項1～16のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項18】

異質遺伝子型の黒色腫細胞株が、 DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又は DDD-1.13 (ECACC 01112338) から選ばれるものである請求項 1 7 記載の医薬組成物。

【請求項 19】

少なくとも 1 つの癌細胞株における少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原の発現を、前記の少なくとも 1 つの癌細胞株の全細胞溶解物を付与する前に、DNA脱メチル化によって、さらに増大させる請求項 3 ~ 1 8 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 20】

脱メチル化を、 5-アザ-2'-デオキシシチジンでの処理によって行う請求項 1 9 記載の医薬組成物。

【請求項 21】

サイトカインが、 IL-4 、 GM-CSF 、 IL-13 、 IFN- 、 Flt-31 、 SCF 、 TNF- でなる群から選ばれるものである請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 22】

サイトカインが、 IL-4 及び GM-CSF を含むものである請求項 2 1 記載の医薬組成物。

【請求項 23】

初期生育段階が、 6 ~ 4 8 時間、好ましくは 1 2 ~ 3 4 時間、さらに好ましくは 2 0 ~ 2 8 時間である請求項 1 ~ 2 2 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 24】

成熟因子が、 IL-1 、 IL-6 、 TNF- 及び PGE2 を含むものである請求項 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の医薬組成物。

【請求項 25】

少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原が負荷されているが、系統特異的分化抗原が負荷されていないヒト又は動物の自己樹状細胞を得る方法であって、

a) 少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない少なくとも 1 つの癌細胞株を準備し (溶解は、 4 時間の細胞毒性テストにおいて 1 0 % 未満である) 、

b) 前記ヒト又は動物から自己樹状細胞を準備し、

c) 前記樹状細胞を、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養し、ついで、サイトカインを含有する培地にて第 2 生育段階を行い、

d) 前記工程 c) からの未成熟 (CD1a 陽性、 CD14 陰性、及び CD83 陰性) 樹状細胞に、工程 a) からの少なくとも 1 つの癌細胞株の全細胞溶解物から得られた癌 / 精巣抗原を負荷し、及び

e) 工程 d) からの負荷樹状細胞を、成熟因子の添加によって成熟させる、ことを包含する自己樹状細胞を得る方法。

【請求項 26】

工程 c) において、 2 5 cm² 当たり細胞 $5 \times 10^6 \sim 20 \times 10^6$ 個の播種単球密度を使用する請求項 2 5 記載の方法。

【請求項 27】

自己樹状細胞が、新たに採取した血液から提供されたものである請求項 2 5 又は 2 6 記載の方法。

【請求項 28】

DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又は DDD-1.13 (ECACC 01112338) から選ばれる、少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない (溶解は、 4 時間の細胞毒性テストにおいて 1 0 % 未満である) 単離黒色腫細胞株。

【請求項 29】

請求項 2 8 記載の単離細胞株に由来するエクソソーム。

【請求項 30】

医薬組成物又はワクチンにおける抗原提示細胞としての樹状細胞の使用であって、前記樹状細胞は、該樹状細胞が CD1a 陽性、 CD14 陰性、 CD84 陰性である未成熟状態において、抗原が負荷されること、及び前記樹状細胞は、初期生育段階において、サイトカインを含ま

ない生育培地にてエクスピボ培養され、ついで、樹状細胞に、少なくとも5つの癌／精巣抗原が負荷される前に、サイトカインを含む培地にて第2生育段階が行われたものであることを特徴とする樹状細胞の使用。

【請求項31】

樹状細胞が、自己樹状細胞である請求項30記載の使用。

【請求項32】

自己樹状細胞が、新たに採取した血液から提供されたものである請求項31記載の使用。

【請求項33】

医薬組成物又はワクチンの処方における請求項28記載の単離癌細胞株から得られる多数の癌／精巣抗原の使用。

【請求項34】

癌治療用の医薬組成物を製造するための単離細胞株DDM-1.7(ECACC 01112339)又はDDD-1.13(ECACC 01112338)。

【請求項35】

ヒト又は動物において免疫応答を誘導する方法であって、

a) 少なくとも5つの癌／精巣抗原を発現するが、系統特異的分化抗原を発現しない少なくとも1つの癌細胞株(溶解は、4時間の細胞毒性テストにおいて10%未満である)を準備し、

b) 前記ヒト又は動物から自己樹状細胞を準備し、

c) 前記樹状細胞を、初期生育段階において、サイトカインを含有しない生長培地にてエクスピボ培養し、ついで、サイトカインを含有する新たな培地にて第2生育段階を行い、

d) 前記工程c)からの未成熟(CD1a陽性、CD14陰性、及びCD83陰性)樹状細胞に、工程a)からの少なくとも1つの癌細胞株の全細胞溶解物から得られた癌／精巣抗原を負荷し、

e) 工程d)からの負荷樹状細胞を、成熟因子の添加によって成熟させ、及び

f) 前記工程e)からの負荷樹状細胞を前記ヒト又は動物に投与する、

ことを包含する免疫応答の誘導法。

【請求項36】

癌／精巣抗原を負荷した後の樹状細胞を、IL-1、IL-6、TNF-、PGE2を含む成熟因子の添加によって成熟させる請求項35記載の方法。

【請求項37】

少なくとも1つの癌細胞株が黒色腫細胞株であり、系統特異的分化抗原がメラノサイト分化抗原である請求項35又は36記載の方法。

【請求項38】

メラノサイト分化抗原が、gp100、Melan A/Mart-1及びチロシナーゼを含むものである請求項37記載の方法。

【請求項39】

自己樹状細胞が、ヒト又は動物の末梢血から提供されたものである請求項35～38のいずれかに記載の方法。

【請求項40】

自己樹状細胞が、ヒト又は動物の骨髄から提供されたものである請求項35～39のいずれかに記載の方法。

【請求項41】

自己樹状細胞が、CD14+単球に由来するものである請求項39記載の方法。

【請求項42】

自己樹状細胞が、CD34+細胞に由来するものである請求項39又は40記載の方法。

【請求項43】

癌／精巣抗原が、MAGE-A、MAGE-B、MAGE-C、GAGE、LAGE、SSXサブファミリーから選ばれる抗原を含むものである請求項35～42のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 4】

癌 / 精巣抗原が、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A12、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-B10、MAGE-B16、MAGE-B17、MAGE-C1、MAGE-C2、MAGE-C3、MAGE-C4、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、GAGE-3、GAGE-4、GAGE-5、GAGE-6、GAGE-7、GAGE-8、NY-ESO-1、LAGE、PAGE-1、PAGE-2、PAGE-3、PAGE-4、XAGE-1、XAGE-2、XAGE-3、SSX-1、SSX-2、SSX-3、SSX-4、SSX-5から選ばれる抗原を含むものである請求項 3 5 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 5】

癌 / 精巣抗原が、SCP-1、TSP-50、TRAG-3、SAGE、IL-13R、CTp11から選ばれる抗原を含むものである請求項 3 5 ~ 4 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

癌 / 精巣抗原が、MAGE-A1、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A6、MAGE-A10、MAGE-A12、及びNY-ESO-1から選ばれる抗原を含むものである請求項 4 4 記載の方法。

【請求項 4 7】

少なくとも 1 つの癌細胞株における少なくとも 5 つの癌 / 精巣抗原の発現を、溶解前に、DNA脱メチル化によって、さらに増大させる請求項 3 5 ~ 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 8】

脱メチル化を、5-アザ-2'-デオキシシチジンでの処理によって行う請求項 4 7 記載の方法。

【請求項 4 9】

工程 a)において、少なくとも 2 つの異質遺伝子型の癌細胞株を準備する請求項 3 5 ~ 4 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 0】

異質遺伝子型の黒色腫細胞株が、DDM-1.7 (ECACC 01112339) 又はDDD-1.13 (ECACC 01112338) から選ばれるものである請求項 3 5 ~ 4 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

サイトカインが、IL-4、GM-CSF、IL-13、IFN-、Flt-31、SCF、TNF- でなる群から選ばれるものである請求項 3 5 ~ 5 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 2】

サイトカインが、IL-4及びGM-CSFを含むものである請求項 5 1 記載の方法。

【請求項 5 3】

初期生育段階が、6 ~ 48 時間、好ましくは 12 ~ 34 時間、さらに好ましくは 20 ~ 28 時間である請求項 3 5 ~ 5 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 4】

工程 b)の前に、さらに、G-CSF及び / 又はGM-CSFよりなる物質をヒト又は動物に投与する工程を包含する請求項 3 5 ~ 5 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 5】

工程 e)の後に、さらに、IL-2又はIL-12よりなる物質をヒト又は動物に投与する工程を包含する請求項 3 5 ~ 5 4 のいずれかに記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 0 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 0 6】

gp100及びMelan A/MART-1抗原の発現を、これら抗原に対して特異的な細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) クローンによって誘導される溶解に対する黒色腫細胞の感受性を測定することによってテストした。発明者らは、これらのCTLクローンの特性については、既に開

示している (Kirkinら, 1999, *Cancer Immunol. Immunother.*, v.48, pp.239-246)。上記の如くして黒色腫細胞を採取し、培養培地に再度懸濁化し、計数し、各クローンの細胞 0.5×10^6 個を、11mlの円錐管 (Nunc) に移した。細胞を200gにて5分間遠心分離し、上澄み液を廃棄し、ペレットを培養培地 0.1mlに再度懸濁化した。Na₂CrO₄溶液 (0.1mCi, Amersham) 0.1mlを添加し、細胞を水浴において37度60分間インキュベートした。RPMI 1640にて3回洗浄した後、ターゲットを、10%FCSを含むRPMI 1640中において細胞濃度 5×10^4 個/mlに調整した。細胞傷害性リンパ球を、細胞濃度 5×10^5 個/mlで使用した。CTL及びターゲット黒色腫細胞を、96U字型底部ミクロ滴定プレートに、3個1組で、100μlのアリコートに播種し、200gにて2分間遠心分離し、5%CO₂中、37度においてインキュベートした。4時間後、プレートを250gにて3分間遠心分離し、上澄み液100μlを採取し、放射能を測定した (Cobra 5005, Packard Instrument, 米国コネチカット州メリデン)。特異的な溶解を、標準式に従って算定した。1つの代表的な実験の結果を表1に示す。これらの結果から、調査した黒色腫クローンのわずかに2つ、すなわちDDM-1.7及びDDM-1.13が、CTLによる溶解作用に対して完全な抵抗性であることが判明し、これは、これらの黒色腫クローンにおけるメラノサイト分化抗原の発現の喪失を示している。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0124

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0124】

上述の黒色腫細胞培養物に加えて、次の黒色腫細胞株：FM28、FM55p、FM60 (HLA-A2-陽性)、FM45及びFM48 (HLA-A2-陰性)を使用した。これらの細胞株は、他に開示されており (Bartkovaら, 1996, *Cancer Res.*, v.56, pp.5475-5483; Kirkinら, 1995, *Cancer Immunol. Immunother.*, v.41, pp.71-81)。DDB-1及びANBL-EBVは、発明者らの研究室において、当分野において公知の方法によって確立されたEBV形質転換リンパ芽球状細胞株である。NK介在溶解反応用のターゲットとして、K562 erythroleukemic cellsを使用した。乳癌細胞株、MCF-7、CAMA-1、HBL-100、MDA-MB-231 (HLA-A2-陽性)及びBT-20 (HLA-A2-陰性)は、デンマーク癌協会のPer Briand氏からのプレゼントである。SCC4及びSCC9 HLA-A2-陽性扁平上皮癌細胞株は、ATCCから得たものである。全ての細胞株を、10%FCSを補充したRPMI 1640培地において培養した。細胞毒活性を、実施例1に記載したようにして測定した。プロッキング抗体を使用する実験において、HLAクラスI分子の一般的な測定に対して特異的なW6/32モノクロナール抗体を、濃度10μl/mlで穴に添加した。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0143

【補正方法】削除

【補正の内容】

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT												
			International Application No PCT/DK 02/00802									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K39/00 C12N5/02 C12N5/08 A61P35/00												
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 C12N												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) MEDLINE, EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">NESTLE F O ET AL: "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." NATURE MEDICINE. UNITED STATES MAR 1998, vol. 4, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 328-332, XP002245750 ISSN: 1078-8956 cited in the application the whole document</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1,2, 4-11, 14-18, 24,25, 29,31,35</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">---</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">3,13, 21-28, 32-34, 38-53, 56-62 -/-</td> </tr> </tbody> </table>				Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	NESTLE F O ET AL: "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." NATURE MEDICINE. UNITED STATES MAR 1998, vol. 4, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 328-332, XP002245750 ISSN: 1078-8956 cited in the application the whole document	1,2, 4-11, 14-18, 24,25, 29,31,35	Y	---	3,13, 21-28, 32-34, 38-53, 56-62 -/-
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
X	NESTLE F O ET AL: "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." NATURE MEDICINE. UNITED STATES MAR 1998, vol. 4, no. 3, March 1998 (1998-03), pages 328-332, XP002245750 ISSN: 1078-8956 cited in the application the whole document	1,2, 4-11, 14-18, 24,25, 29,31,35										
Y	---	3,13, 21-28, 32-34, 38-53, 56-62 -/-										
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> 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										
27 June 2003		16.07.2003										
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		IDA CHRISTENSEN /EÖ										

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/DK 02/00802

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 41787 A (CELIS ESTEBAN ;SIDNEY JOHN (US); CHESNUT ROBERT (US); EPIMMUNE INC) 14 June 2001 (2001-06-14) claims 7,12,24,25 page 31, line 39 -page 32, line 19	1,2,4
Y		3,13, 24-26, 28, 32-34, 38,56-62
P,X	WO 02 072013 A (PALUCKA ANNA KAROLINA ;WITTKOWSKI KNUT M (US); BAYLOR RES INST (US) 19 September 2002 (2002-09-19) page 17, line 12 - line 17	1,2, 4-11, 14-18
P,Y		3,13, 21-28, 32-34, 38-53, 56-58
Y	THURNER B ET AL: "Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application." JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS. NETHERLANDS 1 FEB 1999, vol. 223, no. 1, 1 February 1999 (1999-02-01), pages 1-15, XP002245751 ISSN: 0022-1759 cited in the application page 4, column 2 page 7, column 2, line 1 - line 11	3,13, 24-28, 32-34, 38-50, 56-58
Y	CORAL SANDRA ET AL: "Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR)." JOURNAL OF IMMUNOTHERAPY, vol. 22, no. 1, January 1999 (1999-01), pages 16-24, XP002246510 abstract	21-23, 51-53
Y	SHICHIJO SHIGEKI ET AL: "Induction of MAGE genes in lymphoid cells by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine." JAPANESE JOURNAL OF CANCER RESEARCH, vol. 87, no. 7, 1996, pages 751-756, XP002245752 ISSN: 0910-5050 abstract	21-23, 51-53

		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PCT/DK 02/00802
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 82958 A (HSU DI HWEI ; YAO JENQ YUAN (US); AP CELLS INC (US); LAMPARSKI HENR) 8 November 2001 (2001-11-08) claims 1-9,17,23,24,46,47,50	1-62
A	ELKE JÄGER ET AL: "Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers" PNAS, vol. 97, no. 22, 24 October 2000 (2000-10-24), pages 12198-12203, XP002245753 cited in the application the whole document	1-62
A	THURNER B ET AL: "Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma." THE JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE. UNITED STATES 6 DEC 1999, vol. 190, no. 11, 6 December 1999 (1999-12-06), pages 1669-1678, XP002245754 ISSN: 0022-1007 cited in the application the whole document	1-62
A	TORU NISHIYAMA ET AL: "Immunotherapy of Bladder Cancer Using Autologous Dendritic Cells Pulsed with Human Lymphocyte Antigen -A24-specific MAGE-3 Peptide" CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 7, January 2001 (2001-01), pages 23-31, XP002245755 cited in the application the whole document	1-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK 02/00802

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **38-62**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

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

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

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/DK 02/00802

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Claims Nos.: 38-62

Claims 38-62 relate to methods of treatment of the human or animal body by surgery or by therapy or diagnostic methods practised on the human or animal body (Rule 39.1(iv)). Nevertheless, a search has been executed for these claims. The search has been based on the alleged effects of the compounds or compositions.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DK 02/00802

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)			Publication date
WO 0141787	A 14-06-2001	AU 2087401 A	CA 2393738 A1	EP 1239866 A1	18-06-2001
		WO 0141787 A1			14-06-2001
WO 02072013	A 19-09-2002	WO 02072013 A2			19-09-2002
WO 0182958	A 08-11-2001	AU 6587301 A	CA 2407225 A1	EP 1278825 A2	12-11-2001
		WO 0182958 A2		US 2001035132 A1	08-11-2001
					29-01-2003
					01-11-2001

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷ F I テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00 A 6 1 P 35/00

(81) 指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 カリーヌ ドゥジヤンドジョウガジアン
デンマーク国 デコ-2100 コペンハーゲン エ ストランドボウレヴァーデン 61 2.
テ・ヴェ

(72) 発明者 イエスパー セウテン
デンマーク国 デコ-2900 ヘレルップ ヘッセルトフテン 8
F ターム(参考) 4C085 AA03 BB01 CC01 CC12 CC29
4C087 AA01 BB34 BB44 BB64 NA14 ZB26