

(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2006-509830

(P2006-509830A)

(43) 公表日 平成18年3月23日(2006.3.23)

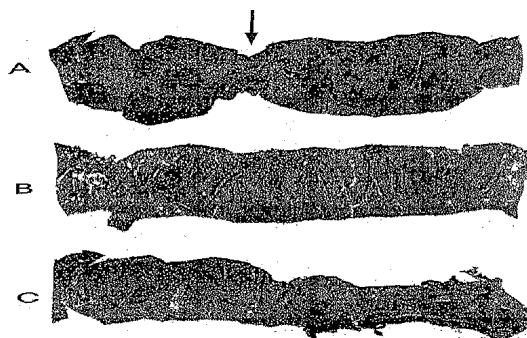
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/00 Z N A H	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/12 (2006.01)	A 6 1 K 35/12	4 C O 8 4
A 6 1 K 35/14 (2006.01)	A 6 1 K 35/14 Z	4 C O 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C O 8 7
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 39 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-563716 (P2004-563716)	(71) 出願人	503145327
(86) (22) 出願日	平成15年12月16日 (2003.12.16)		大野 典也
(85) 翻訳文提出日	平成17年8月4日 (2005.8.4)		アメリカ合衆国 O 2 1 1 6 マサチュー
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/040284		セッツ州, ボストン, ニューバリー スト
(87) 国際公開番号	W02004/057968		リート 2 0 1
(87) 国際公開日	平成16年7月15日 (2004.7.15)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	10/320, 779		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成14年12月16日 (2002.12.16)	(74) 代理人	100096183
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 石井 貞次
		(74) 代理人	100118773
			弁理士 藤田 節
		(72) 発明者	大野 典也
			アメリカ合衆国 O 2 1 1 6 - 2 5 0 0
			マサチューセッツ州, ボストン, ニューバ
			リー ストリート 2 0 1
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌予防用ハイブリッド細胞ワクチンの調製および投与

(57) 【要約】

本発明は、樹状細胞と非樹状前癌細胞との融合によって形成される治療有効量の融合細胞を単独で、あるいは細胞傷害性T細胞応答および/または液性免疫応答を刺激または誘導するサイトカインまたは別の分子とともに投与することによって、癌を予防する方法、ならびに前癌病変を治療し、前癌病変の発生および進行を予防する方法に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

哺乳動物における癌を予防する方法であって、前記予防を必要とする哺乳動物に有効量の融合細胞を投与することを含み、前記各融合細胞が、樹状細胞と非樹状細胞との融合によって形成され、少なくとも 1 種の MHC クラス I 対立遺伝子を前記哺乳動物と共有し、前記非樹状細胞が、前記癌に特異的な抗原の抗原性を有する少なくとも 1 種の抗原を提示する方法。

【請求項 2】

前記非樹状細胞は非樹状前癌細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記非樹状前癌細胞が、予防すべき癌と同じ細胞型である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記癌が、腎細胞癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病；慢性白血病、真性赤血球増多症、リンパ腫、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症および H 鎖病からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

哺乳動物における前癌病変を治療する方法であって、前記治療を必要とする哺乳動物に治療有効量の融合細胞を投与することを含み、前記各融合細胞が、樹状細胞と非樹状前癌細胞との融合によって形成され、少なくとも 1 種の MHC クラス I 対立遺伝子を前記哺乳動物と共有し、前記非樹状前癌細胞が、前記前癌病変に特異的な抗原の抗原性を有する少なくとも 1 種の抗原を提示する方法。

【請求項 6】

前記非樹状前癌細胞が、前記前癌病変細胞型と同じ細胞型である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記非樹状前癌細胞が、前記前癌病変から単離される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記前癌病変が、腎細胞癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膵癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病；慢性白血病、真性赤血球増多症、リンパ腫、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症および H 鎖病からなる群から選択される癌の前駆体である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記癌が腺癌である、請求項 4 または 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記癌が肝細胞癌である、請求項 4 または 8 に記載の方法。

【請求項 11】

10

20

30

40

50

前記非樹状前癌細胞が、胃腸ポリープに由来する細胞である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記非樹状前癌細胞が、肝細胞癌細胞である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 3】

液性免疫応答または細胞傷害性 T 細胞免疫応答を刺激する分子の投与をさらに含む、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記分子がサイトカインである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記サイトカインがインターロイキン - 1 2 である、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記樹状細胞がヒト血液単球から得られる、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

前記非樹状前癌細胞が、前記哺乳動物に由来する前癌細胞の初代培養物から得られる、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記樹状細胞が前記哺乳動物自身に由来する、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記非樹状前癌細胞が前記哺乳動物自身に由来する、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記樹状細胞が前記哺乳動物に対して同種異系である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記非樹状前癌細胞が前記哺乳動物に対して同種異系である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記樹状細胞と前記非樹状前癌細胞の双方が前記哺乳動物自身に由来し、前記方法が、液性免疫応答または細胞傷害性 T 細胞免疫応答を刺激する分子を投与することをさらに含む、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記分子がサイトカインである、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記サイトカインが I L - 1 2 である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記樹状細胞が前記哺乳動物に対して同種異系であり、前記非樹状前癌細胞が、前記哺乳動物と同じクラス I M H C ハプロタイプを有する、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記非樹状前癌細胞が、腫瘍特異抗原の抗原性を示す抗原をコードする核酸で形質転換された組換え細胞である、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記哺乳動物がヒトである、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記哺乳動物がウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、ヤギ、ネコ、イヌ、ハムスター、マウスおよびラットからなる群から選択される、請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 2 9】

樹状細胞集団および非樹状前癌細胞集団を、細胞融合を促進する条件に供することを含み、ヒト樹状細胞とヒト非樹状前癌細胞とを融合させる方法。

【請求項 3 0】

前記非樹状前癌細胞が前記樹状細胞自体に由来する、請求項 2 9 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

前記細胞融合が電気融合によって達成される、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

融合細胞集団を不活性化するステップをさらに含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記融合細胞集団の不活性化が、前記細胞を照射することによって達成される、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

樹状細胞集団と、それを必要とする哺乳動物に投与するために前記樹状細胞を非樹状前癌細胞と融合させるための説明書とを 1 個または複数の容器に含むキット。

10

【請求項 3 5】

電気融合に適切なキュベットをさらに含む、請求項 3 4 に記載のキット。

【請求項 3 6】

前記樹状細胞が低温保存される、請求項 3 4 に記載のキット。

【請求項 3 7】

液性免疫応答、細胞傷害性 T 細胞応答およびそれらの組合せからなる群から選択される免疫応答を刺激する分子、ならびに癌を予防し、または治療するための前記キットの使用説明書をさらに含む、請求項 3 4 に記載のキット。

【請求項 3 8】

前記分子がサイトカインである、請求項 3 7 に記載のキット。

20

【請求項 3 9】

前記サイトカインが IL - 1 2 である、請求項 3 8 に記載のキット。

【請求項 4 0】

非樹状前癌細胞に融合された樹状細胞を含む融合細胞を含んでなる医薬組成物。

【請求項 4 1】

樹状細胞がヒト細胞である、請求項 4 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 2】

前記非樹状前癌細胞がヒト細胞である、請求項 4 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 3】

前記非樹状前癌細胞が、新たに単離されるか、または初代細胞培養物から得られる、請求項 4 0 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 4 4】

液性免疫応答、細胞傷害性 T 細胞応答およびそれらの組合せからなる群から選択される免疫応答を刺激する分子をさらに含む、請求項 4 0 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 5】

前記分子がサイトカインである、請求項 4 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 4 6】

前記分子が IL - 1 2 である、請求項 4 4 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

1 . 序論

本発明は、樹状細胞と非樹状前癌細胞との融合によって形成される融合細胞の治療有効量を投与することによって、また、ある実施形態においては、このような融合細胞と、細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 応答および / または液性免疫応答を刺激するサイトカインまたは別の分子とを投与することによって、癌を予防する方法および前癌病変を治療する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

2 . 発明の背景

50

癌予防に有効な免疫治療用組成物の開発には大きな関心が持たれている。このような免疫療法が成功するには、標的腫瘍または感染細胞に極めて特異的で、且つ極めて強力な免疫応答を誘導することができる組成物を開発する必要がある。

【 0 0 0 3 】

2 . 1 免疫応答

免疫系細胞は、2種類の主要な分化系統、すなわち、リンパ系およびミエロイド系系列に向かって多能性幹細胞から発生する。リンパ系系列は、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞などのリンパ球を産生し、ミエロイド系系列は、単球、マクロファージおよび好中球、ならびに樹状細胞、血小板、肥満細胞などの他のアクセサリー細胞を産生する。リンパ系系列のT細胞には、胸腺において成熟し、選択を受ける細胞傷害性Tリンパ球（「CTL」）とヘルパーT細胞の2種類の主要なタイプがあり、これらは、2種類の表面マーカー、すなわち、CD8（CTL）またはCD4（ヘルパーT細胞）の一方が存在するかどうかによって識別される。

10

【 0 0 0 4 】

リンパ球は循環し、脾臓、リンパ節などの二次リンパ器官において捕捉され易い侵入外来病原体および抗原を探索する。抗原は、二次リンパ器官に移動してきた抗原提示細胞（APC）によって末梢で取り込まれる。T細胞とAPCとの間の相互作用によって、B細胞および抗体産生の活性化、CD8⁺細胞傷害性Tリンパ球（CD8⁺CTL）の活性化、およびT細胞によるサイトカイン産生の刺激を含むいくつかのエフェクター経路が作動する。

20

【 0 0 0 5 】

抗体を産生するナイーブB細胞の活性化には、2種類のシグナル、すなわち、（1）表面結合受容体（B細胞受容体、または「BCR」）による特異抗原の認識および結合（次いで、これは、BCR関連シグナル伝達分子とともにクラスターを形成する）と、（2）B細胞表面上のCD40受容体に活性化Tヘルパー細胞（Th）表面上に担持されたCD40Lリガンドが結合して発生する共刺激シグナルとが必要である。活性化されたB細胞は、クローン増殖、体細胞高頻度突然変異、親和性成熟およびアイソタイプクラススイッチングを行い、ここで分泌抗体の重鎖クラスが確定される。次いで、抗体重鎖クラスの選択は、アイソタイプクラススイッチングが行われるときにB細胞に接触するサイトカイン集団によって決定される。

30

【 0 0 0 6 】

抗体の重鎖定常領域（Fc）は、その抗体機能に*in vivo*で影響を及ぼす。例えば、IgGクラスの抗体のFc部分は、マクロファージ、好中球などの専門の食細胞の細胞表面受容体によって認識され結合される。これによって、このようにしてオプソニン化されたIgG結合抗原および/または細胞の貪食および破壊が促進される。また、例えば細胞表面抗原の複数のコピーに結合するIgG抗体のクラスターは、補体系を固定し活性化して、細胞の破壊をもたらすだろう。

【 0 0 0 7 】

BCRおよび抗体による抗原認識および結合に対して、T細胞では、抗原タンパク質が、その起源が細胞内であるか細胞外であるかによって、2種類の異なる経路の一方でプロセッシングされ、細胞表面結合複合体の一部として提示される必要がある。細胞内または内因性タンパク質抗原は、腫瘍細胞を含めてほとんどの細胞型において発現されるクラスI主要組織適合複合体（MHC）分子によって、CD8⁺CTLに提示される。細胞外抗原決定基は、樹状細胞、マクロファージなどの「特殊化された」または「プロフェッショナル」APCの細胞表面上でCD4⁺「ヘルパー」T細胞によって認識されるクラスII

40

MHC分子-抗原複合体として提示される（一般に、W.E. Paul編、Fundamental Immunology. New York: Raven Press、1984を参照されたい）。

【 0 0 0 8 】

クラスIおよびクラスII MHC分子は、知られている最も多形のタンパク質である。MHC分子の不均一度は、MHCハプロタイプとして知られるクラスIとクラスII

50

MHC分子の組合せによってさらに高くなる。ヒトにおいては、単一の染色体上に位置する3種類の異なる遺伝子座HLA-A、HLA-BおよびHLA-Cが、クラスI分子をコードする。T細胞受容体は、抗原性ペプチドとMHC分子の多形部分とを含む複合体に特異的に結合するので、遺伝子型が異なるMHC分子に遭遇するとT細胞の応答は弱くなる。この特異性によって、MHC拘束性T細胞認識現象およびT細胞細胞傷害性がもたらされる。

【0009】

リンパ球は、末梢中を循環し、リンパ器官において適切なシグナルに遭遇すると「初回抗原刺激を受けた」状態になる(BretscherおよびCohn、1970、Science 169:1042~1049)。第1のシグナルは、T細胞受容体がAPC表面上のクラスI MHC分子によって提示される抗原性ペプチドに結合した後に、T細胞受容体を通して受け取られる。第2のシグナルは、分泌化学物質のシグナル、すなわちCD4⁺ヘルパーT細胞もしくは樹状細胞によって産生されるインターロイキン-1(IL-1)、インターフェロン- γ 、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-4(IL-4)、インターロイキン-7(IL-7)、インターロイキン-12(IL-12)などのサイトカインによってなされるか、またはB7(B7.1およびB7.2分子を含む用語)などの原形質膜結合共刺激分子によって達成される。B7は、抗原提示細胞膜上に存在し、IgスーパーファミリのメンバーであるCD28と呼ばれるヘルパーT細胞表面の補助受容体によって認識される。インターフェロン- γ およびIL-12の産生は、CD8⁺ T細胞の発生を促進するTH₁として知られるヘルパーT細胞サブタイプと関連があり、IL-4の産生は、抗体産生B細胞の発生および活性化を促進するTH₂として知られるTヘルパー細胞サブタイプと関連がある。

【0010】

抗原提示中の抗原特異的相互作用に加えて、APCへのTリンパ球の結合を安定化する抗原非特異的接着分子(adhesive)もT細胞刺激に関与する。より具体的には、ICAM-1/CD54、LFA-3/CD58、B7などのAPC上の受容体分子は、T細胞上の対応する補助受容体に結合する。両方のシグナルを受けたヘルパーT細胞は、活性化されて増殖し、様々なインターロイキンを分泌する。両方のシグナルを受けたCTLは、活性化されて、同じクラスI MHC分子と、最初にCTL活性化を誘発した同じ抗原とを有する標的細胞を死滅させる。したがって、CD8⁺ CTLは、癌および病原体に対抗し、また同種移植片を拒絶するのに重要である(Terstappen等、1992、Blood 79:666~677)。しかし、共刺激のない状態で第1のシグナルを受けたT細胞は、アナジーとなり、免疫寛容になる(Lamb等、1983、J.Exp.Med.157:1434~1447; Mueller等、1989、Annu.Rev.Immunol.7:445~480; Schwartz、1992、Cell 71:1065~1068; MuellerおよびJenkins、1995、Curr.Opin.Immunol.7:375~381)。

【0011】

2.2 癌の病理生物学

癌は、任意の正常組織に由来する異常細胞数の増加、隣接組織へのこれらの異常細胞の侵入、ならびに所属リンパ節および遠位部位への悪性細胞のリンパ行性または血行性伝播(転移)によって主に特徴づけられる。臨床データおよび分子生物学的研究によれば、癌は、前癌状態の軽微な変化から始まり、特定の条件下で進行して腫瘍形成に至り得る多段階プロセスであることが示されている。したがって、この多段階プロセスの進行中に、前癌細胞を正常細胞から区別する少なくとも1個の対立遺伝子を含む前癌細胞が蓄積される。このような遺伝的差異によって、腫瘍特異抗原の発現、正常細胞タンパク質の過剰発現、および/または正常および/もしくは腫瘍特異抗原の細胞分布の変化が生じることがある。特定の例では、これらの変化によって、変化した細胞表面タンパク質、または一般には細胞表面に移行しない正常タンパク質が細胞表面で発現される場合がある。

【0012】

前癌細胞の蓄積は、過形成、化生、または最も具体的には、異形成によって例示される前悪性の異常細胞増殖として検出される(このような異常増殖状態の総説については、Ro

bbinsおよびAngell、1976、Basic Pathology、第2版、W.B.Saunders Co.、Philadelphia、68～79ページを参照されたい)。過形成は、組織または器官において、構造または機能が大きく変化せずに細胞数の増加を含む制御された細胞増殖形態である。過形成の一例は、子宮内膜の過形成であり、これは子宮内膜癌に進行することが多い。化生は、1タイプの成人細胞または完全に分化した細胞が、別のタイプの成人細胞に取って代わる制御された細胞増殖形態である。化生は、上皮または結合組織細胞において発生することがある。例外的な化生には、いくらか無秩序な化生上皮が含まれる。異形成は、癌の前兆であることが多く、主に上皮に見られる。異形成は、個々の細胞の均一性の喪失、および細胞の構造的な配向に関わる非腫瘍性増殖の最も無秩序な形態である。異形成の細胞は、異常に大きい濃く染まった核を有し、多形性を示すことが多い。異形成は、慢性の刺激または炎症が存在する場合に特徴的に起こり、頸部、気道、口腔および胆嚢に出現することが多い。

10

【0013】

上記前癌細胞および癌細胞を含む腫瘍性病変部は、特に新生物細胞が宿主の免疫監視を逃れる条件下で、前癌細胞蓄積として、侵入、増殖、転移および不均一性の能力を増大させる複数の遺伝的变化をクローン化により進化させることができる(Roitt等、1993、Immunology、第3版、Mosby、St. Louis、pps.17.1～17.12)。

【0014】

2.3 癌に対する免疫療法

細胞傷害性T細胞応答は、抗原性腫瘍細胞の増殖を制御するために極めて重要な宿主応答である(Anichimi等、1987、Immunol. Today 8:385～389)。実験動物腫瘍および自然発症のヒト腫瘍の研究によって、多数の腫瘍が、免疫応答を誘導することができる抗原を発現することが実証された。腫瘍に特有の抗原もあれば、腫瘍細胞と正常細胞の両方で見られる抗原もある。例えば、関与する発癌物質の個々のタイプ、宿主の免疫適格性、および潜伏期を含めて、いくつかの要因が腫瘍の免疫原性に影響を及ぼす(Old等、1962、Ann. N. Y. Acad. Sci. 101:80～106; Bartlett、1972、J. Natl. Cancer. Inst. 49:493～504)。T細胞介在性免疫は、ウイルスによりおよび化学的に誘導された腫瘍の拒絶に極めて重要であることが実証された(Klein等、1960、Cancer Res. 20:1561～1572; Tevethia等、1974、J. Immunol. 13:1417～1423)。

20

【0015】

腫瘍の養子免疫治療とは、抗腫瘍活性を有する免疫細胞が、定着した腫瘍を直接的または間接的に退縮させることを目的に、腫瘍を有する宿主に投与される治療手法を意味する。腫瘍細胞または腫瘍抗原、ならびに自然発症の腫瘍による定着した腫瘍を有する宿主の免疫化は、腫瘍が免疫抑制応答をすでに誘発しているので無効であることが多い(Basic and Clinical Immunology、第6版、Stites、StoboおよびWells編、AppletonおよびLangeの14章、Greenberg、1987、186～196ページ; Bruggen、1993)。したがって、免疫療法の前に、腫瘍塊を縮小させ、腫瘍を有する宿主におけるT細胞すべてを枯渇させる必要がある(Herbermann R R、Martinus Nijhoff編、「Basic and Clinical Tumor Immunology」中、Greenberg等、1983、301～335ページ)。

30

【0016】

腫瘍特異的な同系のT細胞を導入することによって、進行腫瘍を有する宿主を治療することができる動物モデルが開発された(Mule等、1984、Science 225:1487～1489)。National Cancer Institute(NCI)の研究者らは、末梢血リンパ球または腫瘍浸潤リンパ球(TIL)、皮下リンパ小節の生検から得られるT細胞培養物の自家再注入を用いて、いくつかのヒト癌を治療した(Rosenberg、S.A.、1987年9月1日に発行された米国特許第4,690,914号; Rosenberg等、1988、N. Engl. J. Med.、319:1676～1680)。例えば、IL-2の存在下でin vitroで増殖させたTILが癌患者に養子的に導入され、選ばれた転移性メラノーマ患者において腫瘍を退縮させた。IL-2中で増殖したメラノーマTILは、CD3⁺-活性化Tリンパ球として特定され、大部分はin vitroでの独特な抗腫瘍特性を有するCD8⁺細胞である。多数の長期メラノーマTIL培養物が、特異的クラスI MHC抗原複合体およびT細胞受容体に依存する形で自家腫瘍を溶解する(To

40

50

palian等、1989、J. Immunol. 142:3714)。

【0017】

これらの方法をヒト癌の治療に応用するには、患者の腫瘍反応性リンパ球の特定のセットを単離し、これらの細胞を *in vitro* で数を大きく増殖させ、次いで、これらの細胞を複数回注入によって宿主に戻す必要がある。IL-2の存在下で増殖したT細胞はIL-2に依存して生存するので、細胞を移入した後にIL-2を注入すると延命し、培養T細胞の治療効力が増す(Rosenberg等、1987、N. Engl. J. Med. 316:889~897)。しかし、高熱、低血圧、毛細血管漏出症候群による内皮壁の損傷、および不整脈、心筋梗塞などの様々な心臓有害事象を含めて、高用量IL-2および活性化リンパ球の治療の毒性がかなりある(Rosenberg等、1988、N. Engl. J. Med. 319:1676~1680)。また、TILを産生するのに必要な専門技術の要求が厳しく、多くの材料が必要であり、有害副作用が激しいことから、これらの技術の使用は特別な治療センターに限られている。

10

【0018】

クラスI MHC-ペプチド複合体に特異的であるCTLは、癌の治療または予防に使用することができ、*in vivo*での初回抗原刺激を必要とせずに、このようなCTLを*in vitro*で生成させる方法が求められた。これらの方法には、適切な抗原でパルスされた(pulsed)樹状細胞(Inaba等、1987、J. Exp. Med. 166:182~194; Macatonia等、1989、J. Exp. Med. 169:1255~1264; De Bruijn等、1992、Eur. J. Immunol. 22:3013~3020)、ペプチドを担持したRMA-S細胞(多数の「空の」細胞表面クラスI MHC分子を発現する突然変異細胞)(De Bruijn等、1991、Eur. J. Immunol. 21:2963~2970; De Bruijn等、1992、同上; Houbiers等、1993、Eur. J. Immunol. 26:2072~2077)およびマクロファージによって貪食されたペプチドを担持したビーズ(De Bruijn等、1995、Eur. J. Immunol. 25:1274~1285)の使用が含まれる。

20

【0019】

強力な抗原提示細胞である樹状細胞は、癌免疫療法のアジュバントとして最近利用されている。Gong等は、腫瘍細胞に融合された樹状細胞の接種によって、マウスにおいて抗腫瘍免疫が誘導されたことを報告した(Gong等、1997、同上)。腫瘍細胞との融合の臨床応用が成功したことも報告された(Kugler等、2000、Nat Med 6:332~336)。B細胞または樹状細胞と腫瘍細胞との融合は、動物モデルにおいて抗腫瘍免疫応答を誘導することがすでに実証されている(Guo等、1994、Science、263:518~520; StuhlerおよびWalder、1994、Cancer Immunol. Immunother. 1994、39:342~345; Gong等、1997、Nat. Med. 3:558~561; Celluzzi、1998、J. Immunol. 160:3081~3085; Gong、国際公開第98/46785号、1998年10月23日付け)。特に、腫瘍細胞と抗原提示細胞とのハイブリッドを用いた免疫化によって、様々なげっ歯類モデルにおいて防御免疫が得られることが示された。

30

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

しかし、このような進歩にもかかわらず、癌細胞は、宿主免疫監視機構を逃れる様々な戦略を身につけ、有効な免疫療法の開発を阻止している。現行の治療は、防御免疫を刺激するものの、疾患がすでに確立した患者の治療においては必ずしも成功していない。また、このような治療は、一般に、腫瘍がないが、それにもかかわらず前癌病変を有する患者における癌を予防するのには有効でない。したがって、腫瘍性疾患の予防に使用することができ、腫瘍性疾患の再発を防止し、患者の既存の腫瘍を退縮させることができる治療用組成物が求められている。さらに、最終的に腫瘍性疾患を発症する大きな前兆となる1個または複数の遺伝マーカーまたは対立遺伝子を有することが判明した患者の予防的治療用組成物が特に早急に求められている。

40

【0021】

本明細書の参考文献の引用または考察は、それらが本発明に対して従来技術であることを認めるものと解釈すべきでない。

【課題を解決するための手段】

50

【 0 0 2 2 】

3 . 発明の概要

本発明は、樹状細胞と非樹状前癌細胞との融合によって形成される融合細胞の投与によって、癌を予防する方法に関する。この融合細胞は、CTLおよび/または液性免疫応答を刺激する分子と組み合わせて投与することもできる。本発明は、樹状細胞(DC)と、宿主生物の癌の素因となる特異的な対立遺伝子を有する非樹状細胞との融合細胞が、その癌の発症に対する免疫応答を増強させるという発見および実証に一部基づいている。さらに、このような融合細胞を、CTLおよび/または液性免疫応答を刺激する分子、すなわち、例えば、サイトカインなどの免疫活性化因子と組み合わせて投与すると、抗腫瘍応答が増強される。このような融合細胞は、樹状細胞の強力な免疫賦活効果を、このような腫瘍細胞の特異的抗原性と結びつけ、それによって強力な特異的免疫応答を誘導する。この特異的免疫応答は、免疫活性化因子を同時投与することによってさらに増強される。

10

【 0 0 2 3 】

本発明の一実施形態においては、治療を要する患者に樹状細胞と非樹状前癌細胞とを含む融合細胞を投与する、癌を予防または治療する方法を提供する。別の実施形態においては、樹状細胞と非樹状前癌細胞とを含む融合細胞を、CTLおよび/または液性免疫応答を刺激するサイトカインまたは別の分子と同時投与し、それによって治療的処置の有効性が著しく高められる。

【 0 0 2 4 】

別の実施形態においては、本発明は、哺乳動物における癌を予防する方法であって、そのような予防を必要とする哺乳動物に樹状細胞と非樹状前癌細胞との融合によって形成される融合細胞の治療有効量を投与することを含む方法を提供する。好ましい実施形態においては、融合細胞は、CTLおよび/または液性免疫応答を刺激する分子と組み合わせて投与される。この実施形態の別の態様においては、共刺激分子(c o - s t i m u l a t o r)をコードする遺伝子材料で融合細胞を形質転換し、またはその遺伝子材料を融合細胞にトランスフェクトすることによって、CTLおよび/または液性免疫応答の共刺激分子も提供する。

20

【 0 0 2 5 】

別の実施形態においては、本発明は、哺乳動物における癌を予防する方法であって、前記予防を必要とする哺乳動物に有効量の融合細胞を投与することを含み、前記各融合細胞は、樹状細胞と非樹状前癌細胞との融合によって形成され、少なくとも1種のMHCクラスI対立遺伝子を前記哺乳動物と共有し、前記非樹状前癌細胞は、前記癌に特異的な抗原の抗原性を有する少なくとも1種の抗原を提示する方法を提供する。この方法の特定の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、予防すべき癌と同じ細胞型である。別の特定の実施形態においては、この方法は、液性免疫応答または細胞傷害性T細胞免疫応答を刺激する分子の投与をさらに含む。一実施形態においては、前記分子はサイトカインである。一実施形態においては、サイトカインはインターロイキン-12である。別の実施形態においては、樹状細胞はヒト血液単球から得られる。別の実施形態においては、前記非樹状前癌細胞は、前記哺乳動物に由来する前癌細胞の初代培養物から得られる。別の実施形態においては、前記樹状細胞は、前記哺乳動物自身に由来する。別の実施形態においては、前記樹状細胞と前記非樹状細胞とはともに前記哺乳動物自身に由来し、IL-12などの免疫刺激分子は融合細胞と同時に投与される。別の実施形態においては、前記樹状細胞は、哺乳動物に対して同種異系である。別の実施形態においては、前記樹状細胞は、哺乳動物に対して同種異系であり、前記非樹状前癌細胞は、哺乳動物と同じクラスI MHCハプロタイプを有する。別の実施形態においては、前記非樹状前癌細胞は、腫瘍特異抗原の抗原性を示す抗原をコードする核酸で形質転換された組換え細胞である。別の実施形態においては、哺乳動物はヒトである。別の実施形態においては、哺乳動物は、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、ヤギ、ネコ、イヌ、ハムスター、マウスおよびラットからなる群から選択される。

30

40

【 0 0 2 6 】

50

この方法の別の実施形態においては、前記癌は、腎細胞癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、脾癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病；慢性白血病、真性赤血球増多症、リンパ腫、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症およびH鎖病からなる群から選択される。

10

【0027】

別の実施形態においては、本発明は、哺乳動物における前癌病変を治療する方法であって、前記治療を必要とする哺乳動物に治療有効量の融合細胞を投与することを含み、前記各融合細胞は、樹状細胞と非樹状前癌細胞との融合によって形成され、少なくとも1種のMHCクラスI対立遺伝子を前記哺乳動物と共有し、前記非樹状前癌細胞が、前記前癌病変に特異的な抗原の抗原性を有する少なくとも1種の抗原を提示する方法を提供する。特定の実施形態においては、前記非樹状前癌細胞は、前記前癌病変と同じ細胞型である。別の特定の実施形態においては、前記非樹状前癌細胞は、前記前癌病変から単離される。別の特定の実施形態においては、この方法は、液性免疫応答または細胞傷害性T細胞免疫応答を刺激する分子の投与をさらに含む。一実施形態においては、前記分子はサイトカインである。一実施形態においては、サイトカインはインターロイキン-12である。別の実施形態においては、樹状細胞は、ヒト血液単球から得られる。別の実施形態においては、前記非樹状前癌細胞は、前記哺乳動物に由来する前癌細胞の初代培養物から得られる。別の実施形態においては、前記樹状細胞は、前記哺乳動物自身に由来する。別の実施形態においては、前記樹状細胞と前記非樹状細胞はともに前記哺乳動物自身に由来し、IL-12などの免疫刺激分子は、融合細胞と同時に投与される。別の実施形態においては、前記樹状細胞は、哺乳動物に対して同種異系である。別の実施形態においては、前記樹状細胞は、哺乳動物に対して同種異系であり、前記非樹状前癌細胞は、哺乳動物と同じクラスI MHCハプロタイプを有する。別の実施形態においては、前記非樹状前癌細胞は、腫瘍特異抗原の抗原性を示す抗原をコードする核酸で形質転換された組換え細胞である。別の実施形態においては、哺乳動物はヒトである。別の実施形態においては、哺乳動物は、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ、ヤギ、ネコ、イヌ、ハムスター、マウスおよびラットからなる群から選択される。

20

30

【0028】

別の実施形態においては、前記前癌病変は、腎細胞癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、脾癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病；慢性白血病、真性赤血球増多症、リンパ腫、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症およびH鎖病からなる群から選択される癌の前駆体である。

40

【0029】

本発明は、樹状細胞集団および非樹状前癌細胞集団を、細胞融合を促進する条件に供することを含む、ヒト樹状細胞とヒト非樹状前癌細胞とを融合させる方法をさらに包含する。一実施形態においては、前記非樹状前癌細胞は、前記樹状細胞自体に由来する。別の実施形態においては、細胞融合は、電気融合によって達成される。別の実施形態においては

50

、本方法は、融合細胞集団を不活性化するステップをさらに含む。別の実施形態においては、融合細胞集団の不活性化は、細胞を照射することによって達成される。

【0030】

本発明は、樹状細胞集団と、それを必要とする哺乳動物に投与するために前記樹状細胞を非樹状前癌細胞と融合させるための説明書とを1個または複数の容器に含むキットをさらに提供する。一実施形態においては、このキットは、液性免疫応答、細胞傷害性T細胞応答およびそれらの組合せからなる群から選択される免疫応答を刺激する分子、および癌を予防し、または治療するためのキットの使用説明書をさらに含む。一実施形態においては、この分子はサイトカインである。別の実施形態においては、このサイトカインはIL-12である。別の実施形態においては、このキットは、電気融合に適切なキュベットをさらに含む。別の実施形態においては、樹状細胞は低温保存される。

10

【0031】

別の実施形態においては、本発明は、非樹状前癌細胞に融合された樹状細胞を含む融合細胞を含んでいる医薬組成物を提供する。一実施形態においては、非樹状前癌細胞は、新たに単離され、または初代細胞培養物から得られる。別の実施形態においては、医薬組成物は、液性免疫応答、細胞傷害性T細胞応答およびそれらの組合せからなる群から選択される免疫応答を刺激する分子をさらに含む。別の実施形態においては、この分子はサイトカインである。別の実施形態においては、この分子はIL-12である。別の実施形態においては、樹状細胞は、非樹状前癌細胞自体に由来する。別の実施形態においては、樹状細胞はヒト細胞である。別の実施形態においては、非樹状前癌細胞はヒト細胞である。別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、予防すべき癌と同じ細胞型である。別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、治療すべき前癌病変と同じ細胞型である。別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、哺乳動物自身に由来する前癌病変から単離される。ここで、前癌病変は、予防すべき癌の前駆体である。別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、前記組成物によって治療される哺乳動物の前癌病変から単離される。

20

【0032】

別の実施形態においては、本発明は、非樹状前癌細胞に融合された樹状細胞を含む融合細胞を提供する。好ましい実施形態においては、樹状細胞と非樹状前癌細胞の両方はヒトである。本発明は、細胞の少なくとも10%~15%、好ましくは20%~30%が融合したこのような融合細胞の集団も包含する。

30

【0033】

本明細書において使用するサイトカインなどの化合物は、両方の化合物の生理学的効果、または両方の化合物の血清中濃度の上昇を同時に測定することができるときに、融合細胞などの別の化合物と「同時投与」または「併用」投与される。内因性サイトカイン産生レベルを上昇させる化合物を用いると、内因的に産生されるサイトカインおよび他の投与薬剤（すなわち、融合細胞）の血清濃度を、「同時投与」または「併用」時に同時に測定することもできる。したがって、各化合物は、個別の組成物または混合組成物として同時投与することができ、あるいは投与中のある時点でそれらの血清中レベルの上昇を同時に測定することができる場合には逐次投与することができる。

【0034】

別段の記載がないかぎり、「併用療法」および「併用治療」という用語は、本明細書では、本融合細胞と、癌を予防するCTL応答および/または液性免疫応答を刺激する分子との同時投与を含む治療計画を記述するのに使用する。この治療計画は、例えば、形成される腫瘍細胞数の減少の実証、または前癌病変もしくは腫瘍を遺伝的に発症しやすい患者における発症の抑制、および1つもしくは複数の前癌病変の腫瘍への発達の抑制もしくは進行速度の減少によって測定することができる。

40

【0035】

別の実施形態においては、本発明は、樹状細胞集団を含む試料と、癌の予防においてそれを使用するための説明書とを1個または複数の容器に含むキットを提供する。別の実施形態においては、キットは電気融合に適切なキュベットをさらに含む。別の実施形態にお

50

いては、樹状細胞は低温保存される。さらに別の実施形態においては、このキットは、液性免疫応答および／または細胞傷害性T細胞応答を刺激する分子を含む。より好ましい実施形態においては、この刺激分子は、インターロイキン - 12 など、ただしこれだけに限定されないサイトカインである。

【 0 0 3 6 】

4 . 図面の簡単な説明

図1 A-C. APC1309マウス上部回腸の巨視図。10週齢APC-1309マウスの上部回腸を示す。腫瘍は、粘膜上の黒点として識別される。上部パネル (A)、中間パネル (B)、および下部パネル (C) は、未治療マウス、融合細胞を投与したマウス、および融合細胞とIL-12とを投与したマウスの回腸を示す。

図2. APC1309マウスにおいて発生した胃腸腫瘍の数。10匹のAPC1309マウスの対照群を6週齢で屠殺して、APC-1309マウスの胃腸腫瘍数の基準値とした。別の群の10匹のAPC1309マウスを各々10週齢で屠殺し、未治療APC1309マウス、IL-12のみを投与したAPC1309マウス、融合細胞を投与したAPC1309マウス、および融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスの胃腸腫瘍数を求めた。各カラムは、各群の腫瘍数の平均±SD (誤差バー) を示し、シンボル (*) はP値が<0.0001であり、シンボル (**) はP値が<0.0039であることを示す。腫瘍は、解剖顕微鏡下で数えられた。

図3. 胃腸腫瘍数と、血清とともにインキュベートした腫瘍細胞の蛍光中央値との関係。胃腸腫瘍は、図1と同様、未治療APC1309マウス、融合細胞を投与したAPC1309マウス、および融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスについて数えられた。腫瘍細胞 (2×10^5) を血清とともにインキュベートし、洗浄し、FITCコンジュゲートラット抗マウス免疫グロブリン抗体とともにインキュベートした。標識細胞の蛍光強度を蛍光活性化細胞選別 (FACS) 分析によって求めた。各シンボルは、個々のマウスが示した胃腸腫瘍数および蛍光強度中央値を表わす。■: 未治療APC1309マウス; ○: 融合細胞による治療を受けたAPC1309マウス; ●: 融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウス。

図4 A-B. (A) 蛍光強度中央値に対する血清希釈の効果。血清、次いでFITCコンジュゲートラット抗マウス免疫グロブリン抗体とともにインキュベートした腫瘍細胞が示す蛍光強度中央値は、希釈血清が使用された以外は、図3の凡例に記載したように求められた。■、▲: 未治療マウスから得た血清; x, ●: 融合細胞とIL-12とを投与したマウスから得た血清。(B) 蛍光強度中央値に対する血清の腫瘍細胞とのインキュベーションの効果。融合細胞とIL-12とを用いて治療したAPC1309マウスの血清をPBSで100倍に希釈し、腫瘍細胞 (1×10^6) とともにインキュベートし、次いで遠心分離して細胞結合抗体を血清から除去した。次いで、血清および上清の蛍光強度を図3のように求めた。上部パネルおよび中間パネルは、それぞれ血清および上清が示す蛍光強度ヒストグラムである。下部パネルは、未治療マウスから得た100倍希釈血清とともにインキュベートした腫瘍細胞が示す蛍光強度ヒストグラムである。

図5. 腫瘍細胞増殖に対する、融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスから得た血清の *in vitro* での効果。血清非存在下 (■), または未治療APC1309マウスから得た血清 (▨), 融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスから得た血清 (▤), 未治療APC1309マウスから得た熱失活血清 (■), および融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスから得た熱失活血清 (■) の存在下で、腫瘍細胞 (1×10^5) を37℃で48時間培養した。血清を添加して最終希釈を300倍にした。各カラムは、3個のウェル中の生細胞の総数の平均±SD (誤差バー) を表わす。

図6 A-C. 融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスの胃腸腫瘍に浸潤したリンパ球の免疫組織化学的分析。腸の腫瘍の凍結切片を、CD4、CD45Rおよび免疫グロブリンについて、FITCコンジュゲートラット抗マウスCD45R抗体 (PharMingen, San Diego) およびFITCコンジュゲートラット抗マウス免疫グロブリン抗体 (PharMingen, San Diego) で染色した。(A) 未治療APC1309マウス、および (B) 融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウス。多量の免疫グロブリン陽性細胞、CD45R⁺細胞、およびいくらかのCD4⁺細胞が、融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスの腫瘍組織に浸潤したことに留意されたい。(C) 融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスの腸リンパ濾胞へのCD45R⁺および免疫グロブリン陽性細胞の浸潤。融合細胞とI

10

20

30

40

L-12とを投与したAPC1309マウスの腸リンパ濾胞の凍結切片を、CD45Rおよび免疫グロブリンについて、PEコンジュゲートラット抗マウス免疫グロブリン抗体(PharMingen、San Diego、CA)で染色した。多量のCD45R⁺および免疫グロブリン陽性細胞が腸リンパ濾胞に浸潤したことに留意されたい。

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

5. 発明の詳細な説明

本発明は、樹状細胞と非樹状前癌細胞との融合によって融合細胞が形成される癌の予防方法を提供する。予防に適量のこのような融合細胞を、そのような予防を必要とする被験者に投与する。ある実施形態においては、このような融合細胞を、液性免疫応答および/または細胞傷害性Tリンパ球応答(CTL)を刺激する分子を治療有効量とともに投与する。好ましい実施形態においては、本発明は、治療有効量の融合細胞をIL-12など、ただしこれだけに限定されないサイトカインと組み合わせて投与することを含む方法に関する。

【0038】

本明細書に記載する方法によれば、樹状細胞は、予防すべき癌に特徴的な抗原を含む非樹状前癌細胞に融合される。得られた樹状細胞と非樹状前癌細胞とを含む融合細胞は、その抗原を含む非樹状前癌細胞から発生する抗原を含む腫瘍を予防する強力な組成物として使用される。

【0039】

一実施形態においては、この手法は、前癌細胞に関して通例であるように特異抗原が容易に特定できないときに有利である。例えば、ヒト癌予防の場合には、非樹状前癌細胞は患者の前癌病変から、例えば生検によって直接得られる。この場合には、このような非樹状前癌細胞から形成される融合細胞、およびこのような融合細胞を含む組成物は、予防すべき癌に対して極めて特異的である。

【0040】

以下に、癌の予防方法を説明する。特に、セクション5.1、5.2および5.3には、それぞれ本発明において使用される非樹状前癌細胞、樹状細胞、および非樹状前癌細胞と樹状細胞との融合によって形成される融合細胞、ならびにこれらの細胞の単離、調製および/または産生方法を記載する。このような組成物を使用して治療または予防することができる標的癌を以下のセクション5.4および5.5に記載する。

【0041】

5.1 非樹状前癌細胞

本発明の非樹状前癌細胞は、前癌細胞を正常細胞から区別する少なくとも1つの対立遺伝子を有する任意の非樹状細胞とすることができる。このような非樹状細胞は、予防的処置を必要とする患者の前癌病変など、ただしこれだけに限定されない様々な供給源から単離することができる。非樹状前癌細胞は、融合細胞の調製において使用される樹状細胞の供給源に応じて、患者にとって自己由来でも、同系でも、同種異系でもよい初代細胞培養物に由来することもできる。このような非癌性非樹状細胞の単離および調製方法を本明細書で以下に詳細に説明する。

【0042】

非樹状前癌細胞の供給源は、予防すべき癌に従って選択される。非樹状細胞は、治療する患者自身に由来することが好ましい。本発明の方法においては非樹状細胞全体を使用するので、本発明の方法を実施する前にこれらの抗原を単離し、特徴を明らかにする必要はなく、アイデンティティでさえ知る必要はない。しかし、標的細胞に特異的である少なくとも1種の抗原を含む限り、あらゆる非樹状細胞を使用することができる。一実施形態においては、樹状細胞が患者に対して同種異系である場合には、非樹状細胞は、さらに、治療する哺乳動物と同じクラスI MHCハプロタイプである少なくとも1種のMHC I

対立遺伝子を有することができる。別の実施形態においては、樹状細胞が患者自身に由来する場合には、非樹状細胞は、治療する哺乳動物に対して同系異種または自己由来とすることができる。

【0043】

癌予防の場合には、非樹状細胞は非樹状前癌細胞である。この実施形態においては、本発明は、前癌細胞またはそれから発生する癌細胞に対して免疫応答を誘導することができる、前癌細胞ならびにそれから発生する癌細胞によって発現される少なくとも1種の抗原、例えば、腫瘍特異抗原または腫瘍関連抗原を発現する融合細胞を提供する。本発明の一実施形態においては、前癌病変から単離される細胞、または前癌組織が、非樹状細胞の調製に使用される。本発明の方法の対象となる癌の非限定的な例を下記セクション5.3および5.6に示す。

10

【0044】

非樹状前癌細胞は、その多くが当分野で既知である任意の前癌病変の外科的切除または生検によって単離することができる。一実施形態においては、例えば、非樹状前癌細胞は、食道腺癌の前駆体であるバレット化生(Barrett's metaplasia)と呼ばれる医学的に認知されている前癌病変の外科的切除または生検によって単離される。この病変部は、胃と食道の接合部の領域において一般に見られる異種病変部である。このような病変部から単離された前癌細胞クローンは、例えば、p53突然変異、p16突然変異および異数性を含めて、遺伝的および生物学的不均一性を示す。これらの変化は、前癌細胞がそれによって進行して腫瘍細胞になる正常細胞から化生-異形成-腺癌段階への進展の基礎となる細胞の増殖、分化およびアポトーシスにおける別々の変化を伴う。同様に、胃の噴門の腸上皮化生が、胃噴門部腺癌の前癌病変として提案されている(例えば、Jankowski等、1999、*A m. J. Pathol.* 154(4): 965~73; Jankowski等、2000、*Barrett's Metaplasia*, *Lancet* 356(9247): 2079~85; Haringsma等、2001、*Gastrointest Endosc* 53(6): 642~50; および Ruol等、2000、*Cancer* 88(11): 2520~28を参照されたい)。

20

【0045】

別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、時間とともに腺癌に進行する前癌病変であることが多い胃腸ポリープの外科的切除または生検によって単離される。このようなポリープを特定し切除する方法は当分野で周知である。このようなポリープは、散发性結腸直腸癌の発生中、ならびに遺伝性疾患の家族性腺腫様ポリープ症(FAP)、遺伝性非ポリポーシス結腸直腸癌(HNPCC)および若年性ポリープ症(JPS)の発生および進行中に生じる(例えば、Souza, A、2001、*Ailment Pharmacol. Ther.* 15(4): 451~62を参照されたい)。FAPおよびHNPCCは、明確に定義された2種類の遺伝性結腸直腸癌の形態、すなわち、(a)大腸腺腫性ポリポーシス(adenomatous polyposis coli: APC)遺伝子の生殖系列突然変異によって引き起こされる家族性腺腫様ポリープ症(FAP)、および(b)ミスマッチ修復遺伝子の生殖系列突然変異によって引き起こされる遺伝性非ポリポーシス結腸直腸癌(HNPCC)を表わす(Boland C.R., *Malignant tumors of the colon*. In *Textbook of Gastroenterology* 第2版(Yamada T編)1967~2026 (J.B. Lippincot Company, Philadelphia, (1995); Kinzler等、1991、*Science* 253:661~665; Lynch等、1996、*Cancer* 78:1149~1167; Peltomaki等、1997、*Gastroenterology* 113:146~1158)。これらの遺伝性結腸直腸癌は、早期発症および高死亡率を特徴とする。すべてのFAP患者において、腺腫性ポリープは16歳の患者年齢中央値で発生し、実質的にすべての患者は39歳の年齢中央値で癌を発症する(*Textbook of Gastroenterology* 第2版(Yamada T編)中のBoland C.R., *Malignant tumors of the colon*, 1967~2026 (J.B. Lippincot Company, Philadelphia, (1995))。APC遺伝子の突然変異は、散发性結腸癌患者の70~80%でも認められる(Nakamura Y., 1997、*Nature Medicine News & Views*. 3:499~500)。

30

40

【0046】

さらに別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、医学的に最も広く認知されている腎細胞癌前駆体である小管内上皮異形成の外科的切除または生検によって単離される。こ

50

の実施形態の別の態様においては、非樹状前癌細胞は、文書による十分な裏づけのあるフォンヒッペルリンダウ症候群(vonHippel-Lindau syndrome)の1つまたは複数の前癌病変の外科的切除または生検によって単離される。この疾患は、前癌性単純嚢胞から、上皮過形成を含む異型嚢胞を経て、最終的に嚢胞性または固形腎細胞癌に進行する。さらに、腺腫性前癌病変から癌腫に進行する一連の発達が、乳頭状腎細胞癌においても認められる。したがって、このような腺腫性前癌病変も、非樹状前癌細胞の有用な単離源である(例えば、VanPoppel等、2000、Scand. J. Urol. Nephrol. Suppl. 205: 136~65を参照されたい)。

【0047】

別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、スクリーニング内視鏡的逆行性膵胆管造影(ERCP)手順中に検出された異形成の外科的切除または好ましくは生検によって単離される。ERCPスクリーニングは、家族性膵癌の場合、および膵管腺癌を発症する生涯リスクが40%である遺伝性膵炎の場合に適応される(indict)(例えば、Howes等、2000、Med. Clin. North Am. 84(3): 719~38;およびBrentnall、2000、Med. Clin. North Am. 84(3): 707~18を参照されたい)。

【0048】

さらに別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、光線性角化症、良性母斑および異形成母斑の外科的切除または生検によって単離される。光線性角化症、およびボーエン病(上皮内扁平上皮癌)に特徴的な前癌病変は、扁平上皮癌(SSC)の発生前駆体である非癌性細胞を与えるのに対して、良性母斑および異形成母斑は悪性黒色腫の前駆体候補である(例えば、Gloster等、1996、Dermatol. Surg. 22(3): 217~26;およびSober等、1995、Cancer 75(2 Suppl.): 645~50を参照されたい)。

【0049】

別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、乳癌をもたらす前癌病変の外科的切除または生検によって単離される。異型胆嚢管(atypical cystic duct)(ACD)は、ACDと悪性度との間で認められた組織学的連続に基づき、かつACDにおけるp53タンパク質の発現のために、乳癌の前癌病変であることが報告された(Kusama等、2000、Pathol. Int. 50(10): 793~800)。同様に、非面皰(noncomedo)非浸潤性乳管癌(DCIS)病変部、および特に面皰非浸潤性乳管癌病変部は、浸潤性乳癌を発症するリスクが高く(8倍以上)、したがって、本発明において有用な非樹状前癌細胞の単離源である(例えば、Lawrence等、1998、Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7(1): 29~35を参照されたい)。

【0050】

さらに別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、特に隣接する異型腺が付随するときに、新生物発生において重要な前癌病変と認識されているグレードの高い前立腺上皮内腫瘍病変部の外科的切除または生検によって単離される(Sakr等、2001、Urology 57(4): 115~20; Zlotta等、1999、Eur. Urol. 35(5~6): 498~503; Alsikafi等、2001、Urology 57(2): 296~300;およびMolinie、2001、Ann. Pathol. 21(3): 245~254)。

【0051】

さらに別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、肺癌の前癌細胞を含むと考えられる少なくとも3種類の異なる病変部、すなわち(1)扁平上皮異形成および上皮内癌、(2)異型腺腫過形成、および(3)びまん性特発性肺神経内分泌細胞過形成のいずれか1種類の外科的切除または生検によって単離される(Kerr、2001、J. Clin. Pathol. 54(4): 257~71)。

【0052】

別の実施形態においては、非樹状前癌細胞は、口腔粘膜上に白い斑点として出現することがあり口腔癌を高い確率で発症する前癌病変として認識されている口腔白板症の外科的切除または生検によって単離される(Mao、1997、Mol. Med. Today、3(10): 442~48)。

【0053】

結腸直腸癌、前立腺癌、食道癌、腎臓癌、膵癌、皮膚癌、乳癌、肺癌および口腔癌に関

して、特定の非樹状前癌細胞源を上で開示したが、本発明をこれらの特定の実施形態に限定すべきではない。すなわち、当業者には明らかなように、前癌組織は、過形成性、化生および異形成として容易に特徴づけられ、これらの前癌細胞を正常細胞から区別する少なくとも1個の遺伝的対立遺伝子を有する前癌細胞を含む。また、癌発症のリスク増大に関連する特定の対立遺伝子の存在を迅速かつ正確に特定することが可能な現在利用可能な遺伝子検査、およびヒトゲノム解析の継続とともに開発される遺伝子検査。したがって、本発明の非樹状前癌細胞源として使用するのに適切な前癌組織の同定および分析は、とりわけ、通常の技術を有する腫瘍学者、より具体的には分子腫瘍学者によって容易に実施される。

【0054】

10

ある実施形態においては、非樹状前癌細胞は新たに単離されず、代わりに培養されて樹状細胞と融合される非樹状前癌細胞が選択され、それによって前癌細胞集団が健全な非前癌細胞によって汚染されるのが防止または抑制される。

【0055】

好ましい実施形態においては、本発明の非樹状前癌細胞は、融合細胞を含む組成物のレシピエントとなる哺乳動物から外科的に取り出された前癌病変から単離される。固形前癌組織または凝集前癌細胞は、使用前に、標準技術によって単細胞懸濁液中に、好ましくは機械的に分散させるべきである。コラゲナーゼおよびDNアーゼなど、ただしこれらだけに限定されない酵素を使用して、癌細胞を分散させることもできる。さらに別の好ましい実施形態においては、本発明の非樹状前癌細胞は、初代細胞培養物、すなわち、体から得られる最初の細胞培養物から得られる。

20

【0056】

採取される非樹状前癌細胞の量は、樹状細胞と融合して、本発明のワクチンにとって十分な融合細胞を調製するのに十分な量とすべきである。好ましい実施形態においては、 5×10^7 個の非樹状前癌細胞が、融合細胞を形成するための出発材料として使用される。一実施形態においては、約 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^9$ 個の非樹状前癌細胞が、融合細胞を形成するために使用される。別の実施形態においては、 $5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^8$ 個の非樹状前癌細胞が使用される。さらに別の実施形態においては、 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ 個の非樹状前癌細胞が使用される。融合細胞を調製するのに他の量の非樹状前癌細胞を使用することも本発明の範囲内にある。

30

【0057】

別の実施形態においては、適切な非樹状前癌細胞は、好ましくは、阻害しようとする癌と同じ細胞型であり、レシピエントから単離され、あるいはそれよりは好ましくないが、少なくとも1種のMHC対立遺伝子、好ましくはクラスI MHCハプロタイプを予定のレシピエントと共有し、予防すべき癌の前癌病変を有する家族のメンバーまたは個体から単離される。

【0058】

あるいは、腫瘍特異抗原または腫瘍関連抗原をコードする遺伝子が利用可能である場合には、予定のレシピエントから得られる適切な細胞型の正常細胞をその遺伝子で形質転換し、またはその正常細胞にその遺伝子をトランスフェクトする。この遺伝子は、異種的に発現し、免疫学的に検出可能な量の腫瘍特異抗原または腫瘍関連抗原を提供する。このような組換え細胞を非樹状前癌細胞源として使用することができる。場合によっては、2種類以上のこのような抗原がレシピエントの細胞中で同様に発現されることがあり、当業者には理解されるように、Ausubel等(Ausubel等編、1989、Current Protocols in Molecular Biology、Greene Publishing Associates and Wiley Interscience、New York)に記載された技術などの任意の公知技術を使用して、レシピエント細胞において腫瘍特異抗原または腫瘍関連抗原をコードする遺伝子の形質転換またはトランスフェクション、およびそれに続く組換え発現を実施してもよい。レシピエントと共通する1個または複数のMHC分子を有するこれらの非樹状細胞は、本発明による融合細胞の形成方法に使用するのに適切である。

40

50

【 0 0 5 9 】

同種異系樹状細胞を使用する場合には、同種異系樹状細胞との融合細胞の生成に使用される非樹状前癌細胞は、哺乳動物における免疫応答を誘導するために少なくとも1種の共通MHC対立遺伝子を持たなければならない。最も好ましいのは、予定のレシピエントに由来する非樹状前癌細胞である。すなわち、非樹状前癌細胞は、本発明の融合細胞が投与される患者自身に由来する。一実施形態においては、非自己であるが、少なくとも1種のMHC対立遺伝子をレシピエントの標的前癌細胞または癌細胞と共有する非樹状細胞を使用することができる。非樹状前癌細胞が同じまたは同系の個体から得られる場合には、このような細胞は同じクラスI MHCハプロタイプを有するだろう。非樹状前癌細胞のすべてが同じ対象または同系の供給源から得られるわけではない場合、MHCハプロタイプは、血清学的試験、MHC遺伝子座のDNA分析などの当分野で周知の標準HLAタイピング技術によって決定することができる。MHCハプロタイプの決定は、本発明の融合細胞を生成する手順を実施する前に行う必要はない。

10

【 0 0 6 0 】

癌細胞の抗原性を有する抗原を含む細胞などの非樹状前癌細胞は、当分野で既知の任意の方法によって同定し単離することができる。例えば、非樹状前癌細胞は、形態学、酵素アッセイ、増殖アッセイ、または発癌性ウイルスの存在によって同定することができる。目的とする抗原の特性が既知の場合には、非樹状前癌細胞を、当分野で既知の任意の生化学または免疫学的方法によって同定し、または単離することもできる。例えば、非樹状前癌細胞は、手術、内視鏡検査、他の生検技術、アフィニティークロマトグラフィーおよび（例えば、非樹状前癌細胞によって発現される抗原に対する蛍光標識抗体を用いた）蛍光活性化細胞選別によって単離することができる。

20

【 0 0 6 1 】

非樹状前癌細胞のクローン集団、均一集団または精製集団を使用する必要はない。細胞混合物中のかなりの数の細胞が標的とする前癌細胞の抗原を含む限り細胞混合物を使用することができる。特定の実施形態においては、非樹状前癌細胞および/または樹状細胞は精製されている。

【 0 0 6 2 】

5 . 2 樹状細胞

樹状細胞（DC）は、当分野で既知の方法のいずれかによって、被験者の血液もしくはは骨髓、または脾臓、リンパ節、扁桃腺、腸のパイエル板、骨髓など、ただしこれらだけに限定されない二次リンパ器官から単離または産生することができる。好ましい実施形態においては、本発明の方法に使用される樹状細胞は、最終段階までに分化した樹状細胞である。一実施形態においては、樹状細胞はヒト血液単球から単離される。ある実施形態においては、樹状細胞は、本発明の融合細胞が投与される被験者自身に由来する。別の実施形態においては、樹状細胞は、本発明の融合細胞が投与される被験者に対して同種異系である。

30

【 0 0 6 3 】

このような供給源から得られる免疫細胞は、一般に、分化および成熟の様々な段階にある再循環リンパ球およびマクロファージを主として含む。樹状細胞調製物は、標準技術によって濃縮することができる（例えば、Current Protocols in Immunology、7.32.1~7.32.16、John Wiley and Sons, Inc., 1997を参照されたい）。一実施形態においては、例えば、樹状細胞は、T細胞および接着細胞を枯渇させ、続いて密度勾配遠心分離することによって濃縮することができる。樹状細胞は、蛍光標識細胞を選別することによって、または抗CD83 mAb磁性ビーズを使用することによって、場合によってはさらに精製してもよい。

40

【 0 0 6 4 】

あるいは、血液試料または骨髓中の樹状細胞前駆体を顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）およびインターロイキン4（IL-4）などのサイトカインで処理することによって、比較的均一な樹状細胞集団を高収率で得ることができる。このよう

50

な条件下では、単球は、細胞増殖せずに樹状細胞に分化する。TNF など、ただしこれだけに限定されない薬剤を用いてさらに処理すると、樹状細胞の最終的な分化が刺激される。

【0065】

ある実施形態においては、樹状細胞の収率は、樹状細胞を単離する個体に有効量のFLT3リガンドを投与することによって増大させることができる（例えば、Fong等、2000、Proc. Natl. Sci. USA 98(15):8809~14を参照されたい）。

【0066】

非限定的な例として、樹状細胞は、標準方法に従って血液単球から得られる（例えば、Sallusto等、1994、J. Exp. Med. 179:1109~1118を参照されたい）。健康な供血者からの白血球は、白血球搬出パック、またはフィコール-パック密度勾配遠心分離およびプラスチック接着法を用いたパフィーコートの調製によって収集される。成熟樹状細胞が必要な場合には、以下のプロトコルを用いて樹状細胞を培養することができる。細胞をプラスチック皿に37℃で4時間接着させる。接着しない細胞を除去し、接着した単球を、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子0.1μg/mlおよびインターロイキン-4 0.05μg/mlを含む培地で7日間培養する。樹状細胞を調製するために、腫瘍壊死因子-αを5日目に添加し、細胞を7日目に収集する。

【0067】

このようにして得られた樹状細胞は、細胞表面マーカーCD83を特徴的に発現する。また、このような細胞は、高レベルのMHCクラスII分子、ならびに細胞表面マーカーCD11b、CD40、CD86、CD54およびCD80を特徴的に発現するが、CD11cを発現しない。他の細胞表面マーカーとしては、T細胞マーカーCD2およびCD5、B細胞マーカーCD7および骨髄性細胞マーカーCD13、CD32（FcγRII）、CD33、CD36およびCD63、ならびに多数の白血球関連抗原などが特徴的に挙げられる。

【0068】

形態学的観察、免疫化学的染色などの標準技術を使用して、樹状細胞の存在を場合によっては確認してもよい。例えば、樹状細胞の純度は、上記した特徴的な細胞表面マーカー、例えば、CD83、HLA-ABC、HLA-DR、CD11b、CD40および/またはCD54の1種類または複数に対する蛍光色素標識抗体を用いたフローサイトメトリーによって評価することができる。この技術は、未成熟樹状細胞中に存在するが、成熟分化樹状細胞中には存在しないCD11cに対する蛍光色素標識抗体を用いて、未成熟樹状細胞を識別することもできる。

【0069】

5.3 融合細胞の生成

非樹状前癌細胞は、以下のとおり樹状細胞に融合させることができる。細胞は、無菌洗浄され、哺乳動物へ注射して癌を予防するのに適切な融合細胞混合物が得られる限り当分野の任意の細胞融合技術によって融合される。電気融合を使用することが好ましい。電気融合技術は、当分野で周知である（StuhlerおよびWalden、1994、Cancer Immunol. Immunother. 39: 342~345; Chang等（編）、Guide to Electroporation and Electrofusion. Academic Press、San Diego、1992参照）。

【0070】

好ましい実施形態においては、以下のプロトコルが使用される。第1のステップでは、約 5×10^7 個の非樹状前癌細胞および 5×10^7 個の樹状細胞を0.3Mグルコースに懸濁し、電気融合キュベットに移す。この試料を誘電泳動によって整列させ、この細胞試料に100V/cmで5~10秒間パルスして細胞-細胞コンジュゲートを形成する。エレクトロポレーションキュベットの1面に誘電体ワックスを1滴落として電場を「不均質化」し、場の強度の最も高い領域に細胞を誘導することによって、整列を場合によっては最適化してもよい。第2のステップでは、融合パルスを印加する。電気融合には様々なパラメータを使用することができる。例えば、一実施形態においては、融合パルスを単一

10

20

30

40

50

パルス～3重パルスとすることができる。別の実施形態においては、電気融合は、500～1500V/cm、好ましくは1,200V/cmで約25μFを用いて実施される。

【0071】

好ましい実施形態においては、非樹状前癌細胞は、本発明の融合細胞が投与される患者自身に由来する。別の好ましい実施形態においては、樹状細胞は、本発明の融合細胞が投与される患者自身に由来する。さらに好ましい実施形態においては、非樹状前癌細胞と樹状細胞の両方が、本発明の融合細胞が投与される患者自身に由来する。

【0072】

別の実施形態においては、以下のプロトコルを使用する。まず、骨髓を単離し、塩化アンモニウム(Sigma、St. Louis、MO)を用いて赤血球を溶解する。リンパ球、顆粒球および樹状細胞を骨髓細胞から枯渇させ、残りの細胞を、24ウェルの培養プレート中で、5%熱失活FBS、2-メルカプトエタノール50μM、グルタミン酸2mM、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100pg/ml、組換え顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF; Becton Dickinson、San Jose、CA)10ng/mlおよび組換えインターロイキン-4(IL-4; Becton Dickinson)30U/mlを補充したRPMI 1640培地で平板培養する(1×10⁶細胞/ウェル)。次に、培養5日目に、非接着細胞および接着の弱い細胞を収集し、100mmペトリ皿上で再度平板培養する(1×10⁶細胞/ml; 10ml/皿)。次に、GM-CSFおよびIL-4を含むRPMI培地に細胞を添加し、1×10⁶個のDCを3×10⁶個の照射(50Gy、Hitachi MBR-1520R、線量率: 1.1Gy/min)非樹状前癌細胞と混合する。48時間後、50%ポリエチレングリコール(PEG 1500; Sigma、St. Louis、MO)溶液500μlを60秒間にわたって滴下することによって融合を開始する。無血清RPMI培地30mlを段階的に添加して融合を停止する。融合細胞を、RPMI培地においてGM-CSFおよびIL-4の存在下で100mmペトリ皿で平板培養し、48時間培養する。

【0073】

別の実施形態においては、樹状細胞と非樹状前癌細胞とを上述したように融合する。続いて、CTLおよび/または液性免疫応答を刺激する分子をコードする遺伝子材料で融合細胞を形質転換し、あるいは、その遺伝子材料を融合細胞にトランスフェクトする。好ましい実施形態においては、遺伝子材料は、IL-12をコードするmRNAである。トランスフェクションの好ましい方法としては、陽イオン性ポリマーの存在下でのエレクトロポレーションまたは形質転換またはトランスフェクションが挙げられる。

【0074】

非樹状前癌細胞と樹状細胞の集団内での融合細胞形成の程度は、当分野で既知のいくつかの診断技術によって求めることができる。一実施形態においては、例えば、ハイブリッドは、樹状細胞および非樹状前癌細胞をそれぞれ赤色および緑色の細胞内蛍光色素で標識し、両方の色の発光を検出することによって特徴づけられる。非樹状前癌細胞を含まない樹状細胞試料、および樹状細胞を含まない腫瘍細胞試料、ならびに非融合非樹状前癌細胞と樹状細胞との混合物を陰性対照として使用することができる。

【0075】

(免疫刺激分子を同時投与し、または同時投与せずに)融合細胞を哺乳動物に投与する前に、融合細胞を、例えば、照射によって不活化して、融合細胞または非樹状前癌細胞の増殖を防止する。融合細胞集団を200Gyで照射し、さらに選択せずに注射することが好ましい。一実施形態においては、この方法によって調製される融合細胞は、全細胞集団の約10%および20%を構成する。さらに別の実施形態においては、この方法によって調製される融合細胞は、全細胞集団の約5%～50%を構成する。

【0076】

5.4 免疫細胞活性化分子

本発明は、まず、樹状細胞と非樹状前癌細胞とを融合して得られる融合細胞を含み、あ

10

20

30

40

50

る実施形態においては、細胞傷害性T細胞（CTL）応答および／または液性応答を刺激または誘導することができるサイトカインまたは別の分子をさらに含む組成物を提供する。

【0077】

好ましい実施形態においては、CTL刺激分子はIL-12である。IL-12は、免疫応答においてエフェクター細胞の遊走および適切な選択を調節するのに主要な役割を果たす。IL-12遺伝子産物は、一般に、免疫応答をTヘルパー細胞のTH₁サブセットに方向付け、CTL活性を強く刺激する。多量のIL-12は、全身投与したときに毒性を示すので、IL-12は好ましくは局所投与される。別の投与形式を以下のセクション5.7.1に記載する。

10

【0078】

IL-12受容体2（IL-12R-2）の発現は、IL-12応答性を維持し、TH₁系列への拘束を制御するのに必要である。また、IL-12シグナル伝達によって、STAT4が活性化され、すなわち、STAT4のリン酸化の増加が測定され、インターフェロン- γ （IFN- γ ）が産生される。したがって、一実施形態においては、本発明は、STAT4を活性化することができるIL-12以外の分子、例えば、コンビナトリアルケミストリーを使用して同定されるSTAT4の小分子活性化因子の使用を企図する。

【0079】

別の実施形態においては、免疫刺激分子はIL-18である。さらに別の実施形態においては、免疫刺激分子はIL-15である。さらに別の実施形態においては、免疫刺激分子はインターフェロン- γ である。

20

【0080】

別の実施形態においては、治療すべき患者に、CTLおよび／または液性免疫応答を刺激または誘導する本明細書に記載の分子またはサイトカインの任意の組合せを投与する。

【0081】

さほど好ましくない実施形態においては、細胞傷害性T細胞プール、すなわち、TH₁細胞亜集団を増加させるために、抗IL-4抗体を添加して、Tヘルパー細胞がTH₂細胞へ方向付けされるのを阻害することができ、それによってTヘルパー細胞のTH₁サブセットへの選択圧を生じさせることができる。また、抗IL-4抗体をIL-12の投与と同時に投与して、TH細胞がTH₁細胞に分化するように誘導することができる。分化後、細胞を洗浄し、例えば、緩衝生理食塩水に再懸濁し、好ましくは、静脈内投与によって患者に再導入することができる。

30

【0082】

別の実施形態においては、液性応答を促進するために、IL-4を添加してTH₂ヘルパーT細胞の産生を刺激し、治療個体の前癌細胞に特異的に結合する抗体の合成を促進する。

【0083】

本発明は、上述のインターロイキンの変異体にも関する。そのような変異体は、CTLおよび／または液性免疫応答を促進するアゴニスト（模倣物）として機能することができる改変アミノ酸配列を有する。変異体は、突然変異誘発、例えば、別個の点突然変異またはトランケーションによって生成することができる。アゴニストは、天然型タンパク質の生物学的活性と実質的に同じ活性、またはそのサブセットを保持することができる。タンパク質のアンタゴニストは、例えば、目的タンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流のメンバーに競合的に結合して、天然型タンパク質の1種類または複数の作用を阻害することができる。したがって、機能の限定された変異体を用いた治療によって、特定の生物学的効果を誘発することができる。天然型タンパク質のサブセットの生物学的活性を有する変異体を用いた被験者の治療は、天然型タンパク質による治療よりも被験者における副作用を少なくすることができる。

40

【0084】

50

C T L および / または液性免疫応答を刺激することができる分子の変異体は、突然変異体、例えば、トランケーション型突然変異体のコンビナトリアルライブラリーをアゴニスト活性についてスクリーニングすることによって同定することができる。一実施形態においては、多様な変異体ライブラリーが、コンビナトリアル突然変異誘発によって核酸レベルで作製され、多様な遺伝子ライブラリーによってコードされる。多様な変異体ライブラリーは、タンパク質配列候補の縮重セットが個々のポリペプチドとして、あるいは、1セットのより大きな融合タンパク質（例えば、ファージディスプレイ用）として発現されるように、例えば、合成オリゴヌクレオチド混合物を遺伝子配列に酵素的に連結することによって作製することができる。I L - 1 2 変異体候補のライブラリーを縮重オリゴヌクレオチド配列から作製するのに使用することができる様々な方法がある。縮重オリゴヌクレオチドを合成する方法は当分野で既知である（例えば、Narang、1983、Tetrahedron 39:3 ; Itakura等、1984、Annu. Rev. Biochem.、53:323 ; Itakura等、1984、Science、198:1056 ; Ike等、1983、Nucleic Acid Res.、11:477を参照されたい）。

10

【 0 0 8 5 】

また、C T L および / または液性免疫応答を促進することができるインターロイキンのコード配列断片のライブラリーを使用して、スクリーニングおよびその後の変異体選択のために、多様なポリペプチド集団を生成することができる。例えば、コード配列断片のライブラリーは、分子1個につき約1回のニックングしか起こらないという条件下で目的コード配列の二本鎖P C R断片をヌクレアーゼで処理し、二本鎖D N Aを変性し、D N Aを再生して、ニックの入った異なる生成物からのセンス / アンチセンス対を含むことができる二本鎖D N Aを形成し、S 1ヌクレアーゼで処理して、再編成された二重鎖から一本鎖部分を除去し、得られた断片ライブラリーを発現ベクターに連結することによって作製することができる。この方法によれば、様々なサイズの目的タンパク質のN末端および内部断片をコードする発現ライブラリーを得ることができる。

20

【 0 0 8 6 】

点突然変異またはトランケーションによって作製されるコンビナトリアルライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングする技術、および選択された特性を有する遺伝子産物をc D N Aライブラリーからスクリーニングする技術は、当分野でいくつか知られている。ハイスループット分析に適用でき、大きい遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための最も広範に用いられている技術は、一般に、複製可能な発現ベクターに遺伝子ライブラリーをクローニングし、得られたベクターライブラリーで適切な細胞を形質転換し、検出された産物の遺伝子をコードするベクターを、所望の活性を検出することによって容易に単離される条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることを含む。反復アンサンブル突然変異誘発 (r e c u r s i v e e n s e m b l e m u t a g e n e s i s) (R E M) は、ライブラリーにおける機能的突然変異体の出現頻度を高める技術であり、スクリーニングアッセイと併用して、C T L および / または液性免疫応答を促進することができるインターロイキン変異体を同定することができる (ArkinおよびYourvan、1992、Proc . Natl. Acad. Sci. USA、89:7811 ~ 7815 ; Delgrave等、1993、Protein Engineering、6(3):327 ~ 331) 。

30

【 0 0 8 7 】

40

5 . 5 免疫応答測定アッセイ

融合細胞 - サイトカイン組成物の免疫原性は、当分野で既知の任意の方法を用いてアッセイすることができる。非限定的な例として、以下の手順のうちの1つを使用することができる。

【 0 0 8 8 】

液性免疫応答は、E L I S Aを含めて、ただしこれだけに限定されない標準検出アッセイを用いて測定して、未治療被験者における抗体量に対する、治療被験者の血清中の標的抗原を認識する抗体の相対量を求めることができる。C T L 応答は、本明細書に記載するクロム放出アッセイを含めて、標準免疫測定法によって測定することができる。より具体的には、C T L 応答は、刺激物質の非存在下でのC T L 活性に対する刺激物質投与におけ

50

るCTL活性の測定可能な差異によって測定される。

【0089】

5.5.1 MLTCアッセイ

融合細胞および融合細胞、サイトカイン含有組成物の免疫原性を、混合リンパ球T細胞培養(MLTC)アッセイを用いて試験することができる。例えば、 1×10^7 個の融合細胞を線照射し、Tリンパ球と混合する。様々な間隔で、Tリンパ球の細胞傷害性を4時間 ^{51}Cr 放出アッセイで試験する(Palladino等、1987、Cancer Res. 47:5074~5079参照)。このアッセイにおいては、エフェクター：標的(E：T)比(通常、1：1~40：1)が異なるように、混合リンパ球培養物を標的細胞懸濁液に添加する。標的細胞は、 $500 \mu\text{Ci}$ $^{51}\text{Cr}/\text{ml}$ を含む培地中で 1×10^6 個の標的細胞を37で1時間インキュベートすることによって前標識される。標識後、この細胞を3回洗浄する。各アッセイ点(E：T比)を3重で実施し、適切な対照を加えて、自発的な ^{51}Cr 放出(リンパ球はアッセイに加えられていない)および100%放出(細胞を界面活性剤で溶解する)を測定する。細胞混合物を4時間インキュベートした後に、細胞を $200 \times g$ で5分間遠心分離してペレットにする。上清中への ^{51}Cr 放出量を線計数器を用いて測定する。細胞傷害性パーセントを(試験試料のcpm - 自然放出cpm) / (界面活性剤によって放出された全cpm - 自然放出cpm)として測定する。

10

【0090】

MHCクラスIカスケードを遮断するために、K-44ハイブリドーマ細胞(抗MHCクラスIハイブリドーマ)由来の濃縮ハイブリドーマ上清を試験試料に添加して最終濃度を12.5%にする。

20

【0091】

5.5.2 抗体応答アッセイ

本発明の一実施形態においては、融合細胞の免疫原性は、ワクチン接種にตอบสนองして産生される抗体を、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)アッセイなどの抗体応答アッセイによって測定することによって求められる。このようなアッセイ方法は当分野で周知である(例えば、Current Protocols in Immunology、Coligan等(編)、John Wiley and Sons, Inc. 1997の2.1章を参照されたい)。一実施形態においては、マイクロタイタープレート(96ウェルImmuno Plate II、Nunc)に、組成物のPBS溶液において使用される精製前癌細胞の $0.75 \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液を $50 \mu\text{l}$ /ウェルで4で16時間および20で1時間コーティングする。ウェルを空にし、PBS-T-BSA(0.05%(v/v)TWEEN 20および1%(w/v)ウシ血清アルブミンを含有するPBS) $200 \mu\text{l}$ /ウェルで20で1時間ブロックし、次いで、PBS-Tで3回洗浄する。(モデルマウスまたはヒト患者などの)ワクチン接種動物由来の血しょうまたはCSF $50 \mu\text{l}$ /ウェルを20で1時間適用し、プレートをPBS-Tで3回洗浄する。次いで、PBS-T-BSAで1：1，500に希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼと必要に応じてコンジュゲートされたヒツジ抗マウスまたは抗ヒト免疫グロブリン $50 \mu\text{l}$ /ウェルとともに、また、(さらにPBS-Tで上述したようにさらに3回洗浄後)o-フェニレンジアミン(OPD)- H_2O_2 基質溶液 $50 \mu\text{l}$ とともに20で1時間インキュベートした後に、抗原抗体活性を熱量測定によって測定する。5分後に2M H_2SO_4 $150 \mu\text{l}$ を用いて反応を停止させ、光度計によって492nm(基準620nm)で吸光度を標準技術によって測定する。

30

40

【0092】

5.5.3 サイトカイン検出アッセイ

融合細胞-サイトカイン組成物に対する $\text{CD}4^+$ T細胞増殖性応答を、特定のサイトカインのレベルを検出し定量することによって測定することができる。一実施形態においては、例えば、細胞内サイトカインをIFN-検出アッセイを用いて測定して、融合細胞-サイトカイン組成物の免疫原性を試験することができる。この方法の一例においては、融合細胞-サイトカイン組成物による治療を受けた患者から得られる末梢血単核細胞を、ムチンペプチド抗原またはHer2/neu由来エピトープなどのペプチド抗原によって

50

刺激する。次いで、フローサイトメトリーで検出可能なT細胞特異的標識抗体、例えば、FITCコンジュゲート抗CD8およびPerCP標識抗CD4抗体を用いて細胞を染色する。洗浄後、細胞を固定し、透過処理し、ヒトIFN- γ (PE-抗IFN- γ)と反応する色素標識抗体と反応させる。標準技術を用いてフローサイトメトリーによって試料を分析する。

【0093】

あるいは、フィルター免疫測定法、酵素結合免疫スポット (enzyme-linked immunospot) (ELISPOT) アッセイを使用して、T細胞を包囲する特定のサイトカインを検出することができる。一実施形態においては、例えば、ニトロセルロースで裏打ちされたマイクロタイタープレートに精製サイトカイン特異的二次抗体、すなわち、抗IFN- γ でコーティングする。このプレートを、他のタンパク質の非特異的結合によるバックグラウンドを回避するためにブロックする。融合細胞、または融合細胞とサイトカイン組成物などの免疫刺激物質とをワクチン接種した患者から得られた、サイトカイン分泌細胞を含む単核血液細胞を、マイクロタイタープレートのウェル中に希釈する。標識 (例えば、ビオチン標識) 二次抗サイトカイン抗体を添加する。次いで、抗体-サイトカイン複合体を、例えば、酵素コンジュゲートストレプトアビジンによって検出することができ、サイトカイン分泌細胞が目視、顕微鏡または電子検出方法によって「スポット」として出現するだろう。

10

【0094】

5.5.4 四量体染色アッセイ

20

別の実施形態においては、「四量体染色」アッセイ (Altman等、1996、Science 274: 94~96) を使用して、抗原特異的T細胞を同定することができる。一実施形態においては、腫瘍特異抗原などの特異的ペプチド抗原を含むMHC分子は、多量体化されて可溶性ペプチド四量体を形成し、例えば、ストレプトアビジンと複合化することによって標識される。次いで、このMHC複合体を、融合細胞組成物による治療を受けた患者から得られたT細胞集団と混合する。次いで、ビオチンを使用して目的抗原、すなわち、腫瘍特異抗原を発現するT細胞を染色する。

【0095】

細胞傷害性T細胞は、プロセッシングされて標的細胞の抗原を提示する抗原提示細胞 (APC) によって活性化されたCD8陽性の免疫細胞である。この抗原提示は、B-7/CTLA-4およびCD40などの共刺激分子の活性化とともに、標的に対するT細胞の初回抗原刺激をもたらし、その結果、抗原を発現する細胞が破壊される。

30

【0096】

CD8を発現する特徴を一般に有する細胞傷害性T細胞は、TNF- α 、パーフォリンおよびIL-2も分泌した。細胞傷害性T細胞応答は、本明細書の実施例に示すように、治療被験者から得られたT細胞を用いた⁵¹Cr放出アッセイにおいて、未治療被験者から得られたT細胞と比較して標的細胞溶解が増大すること、ならびに未治療被験者よりも治療被験者におけるIFN- γ およびIL-2のレベル増大の測定を含めて、ただしこれらだけに限定されない様々なアッセイで測定することができる。

【0097】

40

5.6 標的癌

本発明の融合細胞を用いて予防することができる癌および発癌性疾患、ならびに本発明の融合細胞を用いて予防および治療可能な、これらの癌および発癌性疾患の発生をもたらす前癌病変としては、ヒト肉腫および癌腫、例えば、腎細胞癌、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、膀胱癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭状癌、乳頭状腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支原生癌、肝細胞癌、胆管癌、絨毛癌、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣細胞腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神

50

経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫；白血病、例えば、急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性および赤白血病）；慢性白血病（慢性骨髄球性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ性白血病）；および真性赤血球増多症、リンパ腫（ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症およびH鎖病などが挙げられるが、これらだけに限定されない。

【0098】

5.7 医薬調製物および投与方法

本発明の組成物製剤は、CTLおよび/または液性免疫応答を刺激することができるサイトカインなどの、ただしこれらだけに限定されない1種類または複数の分子とともに、またはこれらの分子なしで投与される免疫に有効な量の融合細胞を含む。

10

【0099】

融合細胞または融合細胞-サイトカイン組成物の適切な調製物としては、好ましくは液体溶液である注射用製剤が挙げられる。

【0100】

多数の方法を使用して本発明の組成物製剤を導入することができる。これらの方法としては、皮下注射、リンパ管内、皮内、筋肉内、静脈内、および乱切（例えば分岐針を用いた皮膚上層を通したひっかき（*scratching*））などが挙げられるが、これらだけに限定されない。融合細胞および融合細胞-サイトカイン組成物は皮内注射されることが好ましい。

20

【0101】

また、必要ならば、組成物製剤は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤、および/または組成物の有効性を高める化合物などの少量の補助物質を含むこともできる。補助物質の有効性は、融合細胞に対する抗体が誘導されるかどうかを測定することによって決定することができる。

【0102】

本組成物を投与する哺乳動物は、好ましくはヒトであるが、ウシ、ウマ、ヒツジ、ブタ、ニワトリ（例えば、ヒナ）、ヤギ、ネコ、イヌ、ハムスター、マウスおよびラットを含めて、ただしこれらだけに限定されないヒト以外の動物とすることもできる。

【0103】

30

5.8 有効量

本発明の組成物は、癌を予防する治療有効量で患者に投与することができる。治療有効量とは、例えば、前癌病変の退縮、または個体、特に癌を発症するリスクを有する個体におけるそのような病変部の形成の予防など、そのような疾患または障害の症状を予防し、または寛解させるのに十分な量の融合細胞を意味する。本発明の組成物の有効量（免疫量）は、動物モデル試験系から得られる用量応答曲線から推定することもできる。組成物製剤に使用される融合細胞の正確な用量は、予防する疾患の個々のタイプによっても決まるだろう。例えば、腫瘍の発生を防止する場合には、投与量を考えるときに、腫瘍の悪性度が重要な考慮事項になる。他の重要な考慮事項は、投与経路および患者の性質である。したがって、正確な投与量は、標準臨床技術に従って、開業医の判断および各患者の状況、例えば、患者の免疫状態に応じて決定されるべきである。

40

【0104】

好ましい実施形態においては、例えば、ヒト腫瘍の形成を防止するために、樹状細胞に融合された患者の非樹状前癌細胞を含む融合細胞または融合細胞-サイトカイン組成物を、前癌病変から離れた部位、好ましくはリンパ組織の近くに投与する。この組成物の投与は、適切な間隔の後、例えば、3～6カ月ごとに、1回の投与当たり約 1×10^8 個の細胞を使用して反復することができる。

【0105】

したがって、本発明は、治療有効量の本発明の融合細胞または融合細胞-サイトカイン組成物を哺乳動物に投与することを含む、哺乳動物を免疫し、哺乳動物における前癌病変

50

発生またはその進行を予防しまたは治療する方法を提供する。

【0106】

5.9 キット

本発明は、さらに、本発明の方法による免疫治療用組成物の送達を容易にするキットを提供する。本明細書に記載するキットは、好都合には、例えば臨床現場において、癌の症状を示す患者、または癌を発症するリスクを有する患者を治療するのに使用することができる。一実施形態においては、例えば、1個または複数の容器に、a) 樹状細胞集団の試料と、b) 癌または感染症を治療し、またはそれらに対して防御する方法におけるその使用説明書とを含むキットを提供する。投与前に各成分を混合することができるように無菌希釈剤アンプルを提供することができる。別の実施形態においては、キットは、電気融合に適切なキュベットをさらに含む。一実施形態においては、樹状細胞は低温保存される。さらに別の実施形態においては、キットは、液性免疫応答および/または細胞傷害性T細胞応答を刺激する分子を含む。より好ましい一実施形態においては、刺激分子は、インターロイキン-12など、ただしこれだけに限定されないサイトカインである。

10

【実施例】

【0107】

6. 実施例：融合細胞を用いたワクチン接種による腫瘍発生の予防

本実施例は、宿主生物の結腸直腸癌の素因となる大腸腺腫性ポリポーシス (APC) 遺伝子のコドン1309に特異的対立遺伝子を有する非樹状細胞に融合する樹状細胞の融合によって形成される融合細胞の予防および治療への使用を示すものである。APC 遺伝子のコドン1309に突然変異を有するこのようなAPC1309マウスは、多数の胃腸腫瘍を発生する。樹状細胞と、樹立APC1309細胞系から得られる腫瘍に由来する非樹状細胞との間で形成される融合細胞を6週齢APC1309マウスにワクチン接種すると、回腸における腫瘍の発生が阻害された。すなわち、治療マウスの10週齢で存在する腫瘍数は、未治療対照マウスのそれよりも少なかった。ただし、どちらもベースラインの6週齢APC1309マウスよりは腫瘍が多かった。しかし、IL-12を投与し、樹状細胞と樹立APC1309細胞系から得られる腫瘍細胞との間で形成される融合細胞を6週齢APC1309マウスにワクチン接種すると、回腸における腫瘍の発生が阻害されただけでなく、既存の腫瘍も退縮した。すなわち、融合細胞をワクチン接種し、かつIL-12も投与したマウスの10週齢において存在する腫瘍数は、ベースラインの6週齢APC1309マウスで認められた腫瘍数よりも少なかった。

20

30

【0108】

したがって、これらのデータは、宿主生物の癌の素因となる特異的対立遺伝子を有する非樹状細胞に融合した樹状細胞を含む融合細胞ワクチンの予防ならびに治療効力を裏づけるものである。より具体的には、これらのデータは、IL-12などの免疫刺激分子をさらに含む融合細胞ワクチンの治療効力が増大することを示している。最後に、本実施例において使用されるマウスモデルにおける非樹状細胞は腫瘍細胞から生成されたが、本明細書に記載する技術を、非樹状前癌細胞の単離、ならびに癌に対する予防および治療ワクチンに使用される融合体を生成するための使用に適用し、したがってモデルとして役立たせることができる。

40

【0109】

6.1 材料および方法

マウス

C57BL/6マウスをSankyo Bio Laboratory (Tokyo) から購入した。遺伝的背景C57BL/6を有し、APC遺伝子のコドン1309に突然変異を有するAPC1309ノックアウトマウスは、Cancer Institute Tokyo、Japanから提供された (Quesada等、Piroxicam and Acarbose as Chemopreventive Agents for Spontaneous Intestinal Adenomas in APC Gene 1309 Knockout Mice、Jpn. J Cancer Res. 89:392~396 (1998))。実験の手順のすべてを、慈恵大学の動物福祉に関する指針に従って実施した。

50

【0110】

A P Cマウスを実験に使用する前に、それらのA P C遺伝子型を決定した。4週齢マウスの尾部試料から抽出されたDNAを遠心分離によって収集し、再懸濁し、10倍希釈PCRバッファー(Takaya、Kyoto)、2.5mM dNTP(Takara、Kyoto)、Taqポリメラーゼ(Takara、Kyoto)および蒸留水と混合した。第1のスタンド(stand) cDNAプライマー1μlを用いてサーマルサイクラー(Gene Amp PCRシステム2400; Perkin Elmer、Shelton、CT)中でPCRを実施した。このプライマーはCancer Institute、Tokyoから提供された。このプライマーを、

A P C 27 : 5' - T C A A G G T G C A G T T C A T T A T C A T C A C T G - 3' 10

、
A P C 47 : 5' - C T T C A G T T G C A G G A T C T T C A G C T G A C C - 3' および

P G K - 1 : 5' - G C T A A A G C G C A T G C T C C A G A C T G C C T T G - 3' と混合した。PCR産物を、2%アガロースゲル(Gibco、Grand Island、NY)を用いて分離し、臭化エチジウム(Sigma、St. Louis、MO)染色後、UV透過照明によって検出した。野生型C57BL/6から得られるPCR産物は153bpであり、A P C 1309マウスから得られるPCR産物は153bpおよび243bpであった。PCR産物の分析が153bpと243bpの両方のバンドを示したマウスを選択し実験に使用した。 20

【0111】

樹状細胞および融合細胞の調製ならびに非樹状細胞との融合

I n a b a等によって記述された方法によって樹状細胞を調製した(Inaba等、1993、J Exp Med 176、1693~1702; Inaba等、1993、Proc Natl Acad Sci USA 90、3038~3042)。A P C 1309マウスの腸の腫瘍から樹立されたT腫瘍(またはA P C 1309腫瘍)と称する細胞系は、Cancer Institute、Tokyoから提供された(Qu esada等、1998、Jpn. J Cancer Res. 89:392~396)。樹状細胞を、G o n g等に従ってトリプシン処理A P C 1309腫瘍細胞と融合させた(Gong等、1997、Nat Med 3、558~561)。

【0112】

より具体的には、A P C 1309マウスの長骨から洗い流した骨髓から樹状細胞を単離し、赤血球を塩化アンモニウム(Sigma、St. Louis、MO)で溶解した。リンパ球、顆粒球およびT細胞を骨髓細胞から枯渇させ、24ウェル培養プレート(1×10⁶細胞/ウェル)中で、5%熱失活FBS、2-メルカプトエタノール50μM、グルタミン酸2mM、ペニシリン100U/ml、ストレプトマイシン100pg/ml、組換えマウス顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF; Becton Dickinson、San Jose、CA)10ng/mlおよび組換えマウスインターロイキン-4(IL-4; Becton Dickinson)30U/mlを補充したRPMI 1640培地中で細胞を平板培養した。培養5日目に、非接着細胞および接着の弱い細胞を収集し、100mmペトリ皿上で再度平板培養した(1×10⁶細胞/ml; 10ml/皿)。RPMI培地中のGM-CSFおよびIL-4を細胞に添加し、1×10⁶個の樹状細胞を3×10⁶個の照射(50Gy、Hitachi MBR-1520R、線量率: 1.1Gy/min) A P C 1309細胞と混合した。48時間後、50%ポリエチレングリコール(PEG 1500; Sigma、St. Louis、MO)溶液500μlを60秒間にわたって滴下することによって融合を開始した。無血清RPMI培地30mlを段階的に添加して融合を停止した。融合細胞を、RPMI培地中にGM-CSFおよびIL-4の存在下で100mmペトリ皿で平板培養して、48時間培養した。 40

【0113】

マウスの治療および腫瘍の計数

融合細胞 (2×10^5 / マウス) を、対象マウスの尾静脈に 6 および 8 週齢で注射した。IL - 12 ($500 \mu\text{g}$ / マウス) を、融合細胞の 1 回目の注射から 5 日および 10 日後に腹腔内投与し、9 週齢でさらに 1 回投与した。特定の実験においては、融合細胞のみまたは IL - 12 のみでマウスを治療した。マウスを 10 週齢で屠殺し、下部食道から直腸までの胃腸管を切除し、直腸からホルムアルデヒドを注入して固定し、切開し、メチレンブルーで染色した。胃腸管全体の腫瘍を 10 倍解剖顕微鏡を用いて計数した。一部の実験においては、NK 細胞活性を消滅させるために、抗アジアロ - GM1 抗体 (マウス 1 匹当たり $0.25 \text{ mg} / \text{ml}$ 溶液 $100 \mu\text{l}$) を、融合細胞のワクチン接種の 2 日前および 2 日後にマウスに静脈内投与した。

【0114】

10

A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞に対する脾細胞の細胞傷害性アッセイ

スチールメッシュ上で脾臓を軽く破壊して脾細胞を調製し、ヒト組換え IL - 2 $50 \text{ U} / \text{ml}$ を含む培地中で 4 日間培養し、次いで、A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を検討した。一部の実験においては、脾細胞を融合細胞または照射 A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞とともに IL - 2 を含まない培地中で 4 日間培養し、次いで細胞傷害活性を検討した。A P C 1 3 0 9 腫瘍標的細胞 (1×10^4 細胞 / ウェル) を ^{51}Cr で標識し、洗浄し、10% 熱失活融合細胞を補充した R P M I - 1 6 4 0 培地 $200 \mu\text{l}$ 中で脾細胞とともにエフェクター：標的比 20 : 1 ~ 80 : 1 で 37 °C で 4 時間インキュベートした。遠心分離によって細胞を沈殿させた後に、上清 $100 \mu\text{l}$ を収集して放射能を測定した。特異的 ^{51}Cr 放出パーセントを以下の式、すなわち、 ^{51}Cr 放出パーセント = $100 \times (\text{cpm 実験放出} - \text{cpm 自然放出}) / (\text{cpm 最大放出} - \text{cpm 自然放出})$ によって計算した。最大放出は、0.33 N H C l とともにインキュベートした標的細胞から得られ、自然放出は、エフェクター細胞なしでインキュベートした標的細胞から得られた。

20

【0115】

A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞との抗体反応性の検出

心臓の穿刺によって血液を収集し、遠心分離によって血清を分離した。トリプシン処理 A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞 (2×10^5) のペレットを希釈マウス血清 $50 \mu\text{l}$ と混合し、4 °C で 30 分間インキュベートした。次いで、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で 2 回洗浄し、次いで F I T C コンジュゲートラット抗マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体またはヤギ抗マウス I g G 1、I g G 2 a、I g G 2 b または I g G 3 抗体 (P h a r M i n g e n、S a n D i e g o) $2 \mu\text{l}$ とともに遮蔽光の下で 4 °C で 30 分間インキュベートした。細胞を P B S で 2 回洗浄し、それらの蛍光強度を F A C S (B e c t o n D i c k i n s o n I m m u n o c y t o m e t r y S y s t e m s) を用いたフローサイトメリー分析によって測定した。抗体活性を全蛍光強度ヒストグラムの中央値で表した。

30

【0116】

血清細胞傷害性の検出

A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞 (1×10^5) を、未治療マウスおよび融合細胞と IL - 12 を投与したマウスから得た血清の非存在下または存在下で、24 ウェルプレート中で 37 °C で 48 時間インキュベートした。血清を添加して最終希釈を 300 倍にした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、トリプシン処理し、トリパンブルーで染色した。非染色細胞の総数を血球計を用いて求めた。熱失活血清を使用したときには、血清を 56 °C で 30 分間インキュベーションすることによって不活化した。

40

【0117】

統計

統計分析を、S t a t V i e w - J 5 . 0 ソフトウェアを用いて、スチューデント T 検定によって実施した。

【0118】

6 . 2 結果

図 1 に、A P C 1 3 0 9 マウスの小腸の巨視的図を示す。A P C マウスの腸腫瘍に由来

50

する細胞系の A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞と融合された樹状細胞を含む融合細胞による治療を受けたマウスの小腸は、未治療マウスの小腸よりも腫瘍が少なかった。

【 0 1 1 9 】

未治療 A P C 1 3 0 9 マウスの胃腸腫瘍の平均数は、6 週齢で 38.0 ± 11.7 / マウスであり、10 週齢で 92.6 ± 11.2 / マウスに増加した (図 2)。融合細胞治療マウスでは平均腫瘍数は 10 週齢で 44.1 ± 8.0 / マウスであり、未治療マウスにおいて観察されるよりも有意に少なかった ($P < 0.0001$)。また、融合細胞治療マウスの 10 週齢における平均腫瘍数は、治療開始時の 6 週齢のそれと大きな違いはなかった ($P = 0.2$)。マウスに融合細胞と I L - 1 2 を投与したときには、腫瘍の発生は、融合細胞のみの治療を受けたマウスと比較してさらに抑制された ($P < 0.0001$)。また、融合細胞と I L - 1 2 による治療を受けたマウスの 10 週齢における平均腫瘍数は、6 週齢のマウスよりも有意に少なかった ($P = 0.003$)。I L - 1 2 のみでの治療は、有意な抗腫瘍効果を誘発しなかった。融合細胞を用いた治療による腫瘍数増加の抑制は、ほんの数個の腫瘍が発生した盲腸を除いて胃腸管のすべての部分において認められた。腫瘍のサイズは長軸で $0.9 \sim 4.7$ mm であった。腫瘍サイズの分布は、未治療、I L - 1 2 治療、融合細胞治療、および融合細胞と I L - 1 2 による治療を受けたマウスの群間で大きな違いはなかった。

10

【 0 1 2 0 】

融合細胞治療マウスおよび融合細胞と I L - 1 2 とによる治療を受けたマウスの腸の粘膜表面上には、多数の拡大リンパ濾胞があった。しかし、腸の非腫瘍領域において、炎症変化は認められなかった。

20

【 0 1 2 1 】

融合細胞免疫マウスに由来する脾細胞の細胞傷害活性

融合細胞治療マウスおよび融合細胞とインターロイキン 1 2 とによる治療を受けたマウスから新たに単離された脾細胞によって、A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞に対する *i n v i t r o* の細胞傷害活性はさほど増強されなかったもので、それらを様々な方法によって *i n v i t r o* で刺激した。I L - 2、照射腫瘍細胞または融合細胞の存在下で脾細胞を 4 日間培養したにもかかわらず、A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞に対する細胞傷害活性はさほど増加しなかった。細胞傷害活性の欠如は、腫瘍細胞上の M H C 分子の発現が低いことに起因しうる。しかし、M H C クラス分子の発現を増強することが知られている I F N - γ による腫瘍細胞の前処置によっても、A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞が脾細胞による細胞傷害性攻撃をより受け易くなることはなかった。野生型 C 5 7 B L / 6 マウスを融合細胞によって治療すると、それらの脾細胞の細胞傷害活性も誘導されなかった。融合細胞免疫マウスから得られた脾細胞の N K 細胞活性は、標的細胞として Y a c - 1 を用いた細胞傷害性アッセイの結果から判断して増強されなかった。また、融合細胞とインターロイキン 1 2 とによる治療を受けたマウスに抗アシアロ - G M 1 抗体を投与しても、抗腫瘍活性は消滅しなかった。

30

【 0 1 2 2 】

A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞に対する抗体の検出

A P C 1 3 0 9 腫瘍細胞を個々のマウスから得られた血清とともにインキュベートし、次いで、F I T C コンジュゲート抗マウス免疫グロブリンを添加した。標識細胞の蛍光強度を、F A C S を用いたフローサイトメトリー分析によって測定した (図 3)。融合細胞または融合細胞と I L - 1 2 とによる治療を受けたマウスから得られた血清とともにインキュベートされた腫瘍細胞によって示される蛍光ヒストグラムの強度中央値は、未治療マウスから得られた血清とともにインキュベートされた腫瘍細胞により示されるものよりも有意に高かった ($P < 0.001$)。融合細胞と I L - 1 2 とによる治療を受けたマウスから得られた血清とともにインキュベートされた細胞は、融合細胞のみによる治療を受けたマウスとともにインキュベートされた細胞よりも高い蛍光強度を示した ($P = 0.032$)。図 3 に示すように、蛍光強度中央値と 10 週齢における腫瘍数との間には逆相関が認められた。強度中央値は血清の希釈とともに減少した (図 4 A)。融合細胞とインター

40

50

ロイキン - 12 とによる治療を受けたマウスから得られた血清を A P C 1309 腫瘍細胞とともにインキュベートすると、蛍光強度は、未治療マウスから得られた血清とともにインキュベートされた腫瘍細胞により示される蛍光強度まで減少した (図 4 B)。融合細胞とインターロイキン - 12 とによる治療を受けたマウスから得られた血清を M C 38 / M U C - 1 結腸癌細胞、B - 16 メラノーマ細胞および H e p a - 16 肝細胞癌細胞とともにインキュベートしたときには、強度中央値の減少は認められなかった (データ示さず)。I g G 1 -、I g G 2 a -、I g G 2 b - および I g G 3 - 特異抗体を用いた免疫グロブリンアイソタイプ分析によれば、A P C 1309 腫瘍細胞に関連する免疫グロブリンアイソタイプは I g G 1 であることが明らかになった。これらの知見によれば、融合細胞または融合細胞とインターロイキン I L - 12 とによる治療を受けたマウスから得られた血清は、A P C 1309 腫瘍細胞を認識する I g G 1 クラス抗体を有することが示された。抗体活性は、蛍光強度ヒストグラムの中央値で表された。A P C 1309 腫瘍細胞に対する抗体は、親 C 57 B L / 6 マウスに融合細胞を接種しても産生された (データ示さず)。

【0123】

融合細胞とインターロイキン 12 とによる治療を受けたマウスから得られた血清の A P C 1309 腫瘍細胞に対する *in vitro* の効果

未治療マウスおよび融合細胞とインターロイキン 12 とによる治療を受けたマウスから得られた 300 倍希釈血清の存在下で、A P C 1309 腫瘍細胞を 48 時間培養した。未治療マウスから得られた血清が存在すると、生細胞が減少した ($P < 0.05$)。しかし、(融合細胞と I L - 12 とによる)治療を受けたマウスから得られた血清の存在下で培養した後の生きた腫瘍細胞の数は、未治療マウスから得られた血清の存在下で培養した後のそれよりも有意に減少した ($P < 0.0001$) (図 5)。血清を熱処理すると、生きた腫瘍細胞の数の差異は不明瞭になった。

【0124】

未治療マウスまたは融合細胞とインターロイキン - 12 とによる治療を受けたマウスにおける腫瘍組織についての免疫組織化学的研究

未治療マウスの腫瘍組織においては極微量の C D 4⁺、C D 45 R⁺ および免疫グロブリン陽性細胞しか認められなかった。これに対して、多量の C D 45 R⁺ および免疫グロブリン陽性細胞が、融合細胞とインターロイキン - 12 とによる治療を受けたマウスの腫瘍組織に浸潤した (図 6 A)。しかし、C D 4⁺ T 細胞は、融合細胞とインターロイキン 12 とによる治療を受けたマウスの腫瘍組織において見られたが、未治療マウスでは見られなかった。融合細胞とインターロイキン 12 とによる治療を受けたマウスの腫瘍組織または未治療マウスの腫瘍組織においては、C D 8⁺ T 細胞はほとんど見られなかった。

【0125】

多数のリンパ濾胞が認められ、C D 45 R⁺ および免疫グロブリン陽性細胞の広範な浸潤が融合細胞治療マウスの腸粘膜表面上に検出されたが、未治療マウスでは検出されなかった (図 6 B)。

【0126】

6.3 考察

この研究においては、A P C 1309 マウスの結腸癌から得られた樹立細胞系の A P C 1309 腫瘍細胞に融合された樹状細胞を静脈内投与すると、腫瘍数の増加が抑制された。A P C 1309 未治療マウスにおいては、10 週齢で約 100 個の腫瘍が胃腸管全体に発生した。融合細胞治療によって、腫瘍数は未治療対照のその 1/2 に減少した。インターロイキン - 12 と組み合わせた融合細胞による治療によって、観察される腫瘍数がさらに減少した。融合細胞とインターロイキン - 12 とによる治療を受けたマウスにおいては、腫瘍数は、6 週齢よりも 10 週齢の方が有意に少なかった。インターロイキン - 12 の抗腫瘍活性は、B r u n d a (Brunda等、2000、J Exp Med 178、1223~1230) および N a s t a l a (Nastala等、1994、J Immunol 153、1697~1706) によって報告された。しかし、インターロイキン - 12 のみによるマウスの治療は、本研究では腫瘍数の増加を

有意に抑制することではなく、以下に考察するように、インターロイキン - 12 は、融合細胞を用いた治療によって誘導される抗腫瘍免疫を増強することが示唆される。

【0127】

CTL は、腫瘍抗原を有する樹状細胞によって誘導される抗腫瘍免疫におけるエフェクター細胞であることが報告されている (Paglia等、1996、J Exp Med 183: 317~322; Mayordomo等、1996、Nature Med 1(12): 1297~1302; Butterfield等、1998、J Immunol 161: 5607~13; Condon等、1996、Nature Medicine 2: 1122~1128; Gong等、1997、Nat Med 3: 558~561)。しかし、本研究においては、APC1309腫瘍細胞に融合された樹状細胞は、APC1309腫瘍細胞に対する脾細胞の細胞傷害活性、またはAPC1309腫瘍細胞に対するNK細胞活性を増強することができなかった。しかし、APC1309腫瘍細胞に対する抗体が、融合細胞治療マウスの血清中に検出された。観察された腫瘍数と検出された抗体活性との間の逆相関は、抗腫瘍免疫が、APC1309腫瘍細胞に対する抗体によって行われたことを示している。抗腫瘍免疫における抗体の関与を裏づけるように、血清抗体について陽性な血清の存在下で腫瘍細胞をインキュベーションすると腫瘍細胞生存度が減少した。血清のこの細胞傷害性効果は、血清を熱処理すると消滅し、このことは血清の細胞傷害性が補体を介したものであったことが示唆される。抗腫瘍免疫への液性免疫の関与は、免疫組織化学的研究によっても実証された。融合細胞による治療を受けたAPC1309マウスの腫瘍組織においては、極少数のCD8⁺Tリンパ球しか見られなかったが、多量のCD45R⁺および免疫グロブリン陽性細胞が認められた。また、融合細胞とインターロイキン - 12 とによる治療を受けたマウスの腸粘膜表面上には、CD45R⁺細胞が高密度に浸潤した多数の拡大リンパ濾胞があり、抗腫瘍抗体を産生するB細胞の分化、成熟および増殖のための胚中心を形成していると考えられる。

10

20

【0128】

樹状細胞は、ナイーブT細胞がTH₁またはTH₂サブセットに分化するのに極めて重要な役割を果たしている (Macatonia等、1993、Int. Immunol 5:1119~28; Hilkens等、1997、Blood 90:1920~1926; Ronchese等、1994、Eur. J. Immunol. 24:1148~1154; Stumbles等、1998、J Exp. Med. 188: 2019~2031)。TH応答の偏りは、樹状細胞が産生するインターロイキン - 12 のレベルによって決まる (Hilkens等、1997 Blood 90:1920~1926; Ronchese等、1994、Eur. J Immunol. 24:1148~1154; Stumbles等、1998、J. Exp. Med. 188: 2019~2031; Snijders等、1998、Int. Immunol. 10:1593~1598)。インターロイキン - 12 は、細胞性免疫を促進するTh₁方向の応答を誘導する。上述したように、融合細胞によるAPC1309マウスの治療によって誘導される抗腫瘍活性は、液性抗体活性によって媒介され、インターロイキン - 12 の投与によって増強された。また、融合細胞とインターロイキン - 12 とによる治療を受けたマウスにおいて、検出された抗腫瘍抗体の免疫グロブリンアイソタイプは、TH₂応答を特徴づけるIgG1であった。インターロイキン - 12 の投与による抗腫瘍免疫の増強は驚くべきことである。というのは、このサイトカインがTH₂応答を抑制することができるからである。しかし、インターロイキン - 12 は、免疫グロブリンアイソタイプおよび抗体形成に対する刺激に応じて、液性免疫を増強し、または阻害することができる。インターロイキン - 12 をマウスに投与することによって誘導される抗体免疫グロブリンのアイソタイプはIgG2a、IgG2bおよびIgG3であるのに対して、IgG1抗体応答はこのサイトカインによって抑制されることが報告された (Buchanan等、1995、Int. Immunol. 7:1519~1528)。しかし、IgG1抗体応答は、初回抗原刺激を受け、数回追加免疫された後、IL - 12 によって適度に増強された (Buchanan等、1995、同上)。本研究においては、融合細胞は2回投与され、腫瘍は胃腸管中に絶え間なく存在し、免疫系を刺激し、おそらくは、IgG1抗体応答を増強すると考えられる。

30

40

【0129】

実験動物において、腫瘍抗原を有する樹状細胞による免疫化によって抗腫瘍免疫がうまく誘導された報告がいくつかある (Paglia等、1996、J Exp Med 183: 317~322; Mayordomo等、1996、Nature Med 1(12): 1297~1302; Butterfield等、1998、J Immunol 161: 56

50

07～13；Condon等、1996、Nature Medicine 2: 1122～1128；Gong等、1997、Nat Med 3: 558～561）。しかし、抗体産生の誘導に基づく抗腫瘍免疫を示した本データとは対照的に、これらの研究においては、誘導される抗腫瘍免疫は細胞性であると報告されていた。樹状細胞によるインターロイキン - 12の産生は、病原体、ならびに局所的に分泌されるサイトカインおよび炎症性メディエーターを含めた微小環境によってモジュレートされた（Kalinski等、1992、Immunology Today 20:561～567。樹状細胞のインターロイキン - 12産生能力も、それらの局在化によってモジュレートされた。腸および気道粘膜中の樹状細胞は、脾臓の樹状細胞よりも効率的なTH₂ 応答誘導物質である（Stumbles等、1988、J. Exp. Med. 188: 2019～2031；Snijders等、1998、Int. Immunol. 10:1593～1598；Buchanan等、1995、Int. Immunol. 7: 1519～1528；Kalinski等、1999、Amr. J Physiology 276: 1074～1078）。腸粘膜における胚中心の形成は、腸リンパ系が、本研究で示された抗腫瘍免疫の誘導に関与し、おそらくは、TH₂ 応答を方向付けることを示唆している。

10

【0130】

本結果は、胃腸の腫瘍細胞に融合された樹状細胞による免疫化が、FAP患者における結腸癌発生の予防に有用であることを示している。同様に、胃腸の前癌細胞に融合された樹状細胞を、FAP患者における結腸癌発生の予防用ワクチンとして使用することもできる。この治療は、結腸癌を外科的に切除した非FAP患者において、結腸癌の再発を予防するのにも有用である。

【0131】

本発明は、本発明の個々の態様の単独の説明として意図されて、記載された特定の実施形態によって範囲を限定されるべきではなく、機能的に等価な方法および成分も本発明の範囲内にある。実際、本明細書に示し記載する形態に加えて、様々な本発明の改変形態が、上述の説明および添付図面から当業者には明らかなはずである。このような改変形態も、添付した特許請求の範囲内にあるものとする。

20

【0132】

本明細書に引用するすべての参考文献は、全ての目的のために参照によりその全体を本明細書に援用する。

【図面の簡単な説明】

【0133】

【図1】図1は、APC1309マウス上部回腸の巨視図である。

30

【図2】図2は、APC1309マウスにおいて発生した胃腸腫瘍の数を示す。

【図3】図3は、胃腸腫瘍数と、血清とともにインキュベートした腫瘍細胞の蛍光中央値との関係を示す。

【図4】(A)は、蛍光強度中央値に対する血清希釈の効果を示す。(B)は、蛍光強度中央値に対する血清の腫瘍細胞とのインキュベーションの効果を示す。

【図5】図5は、腫瘍細胞増殖に対する、融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスから得た血清の*in vitro*での効果を示す。

【図6-1】図6-1は、融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスの胃腸腫瘍に浸潤したリンパ球の免疫組織化学的分析を示す。

【図6-2】図6-2は、融合細胞とIL-12とを投与したAPC1309マウスの胃腸腫瘍に浸潤したリンパ球の免疫組織化学的分析を示す。

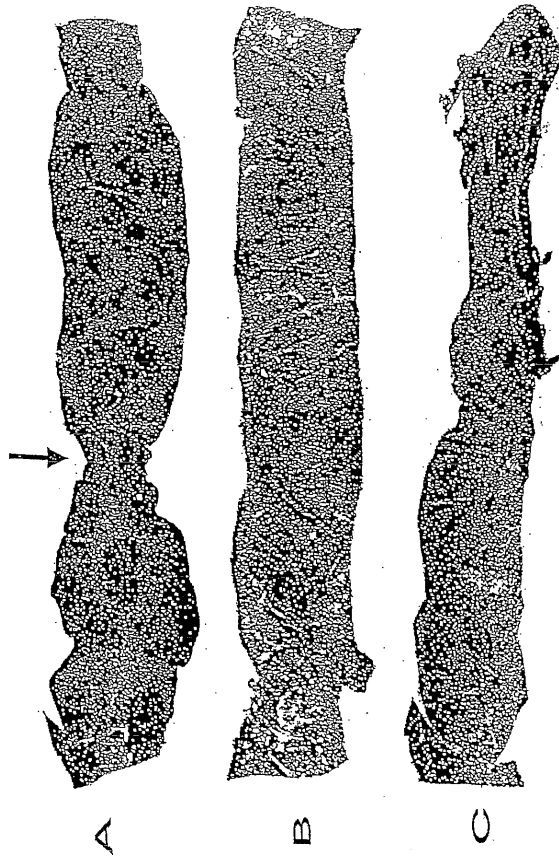
40

【配列表】

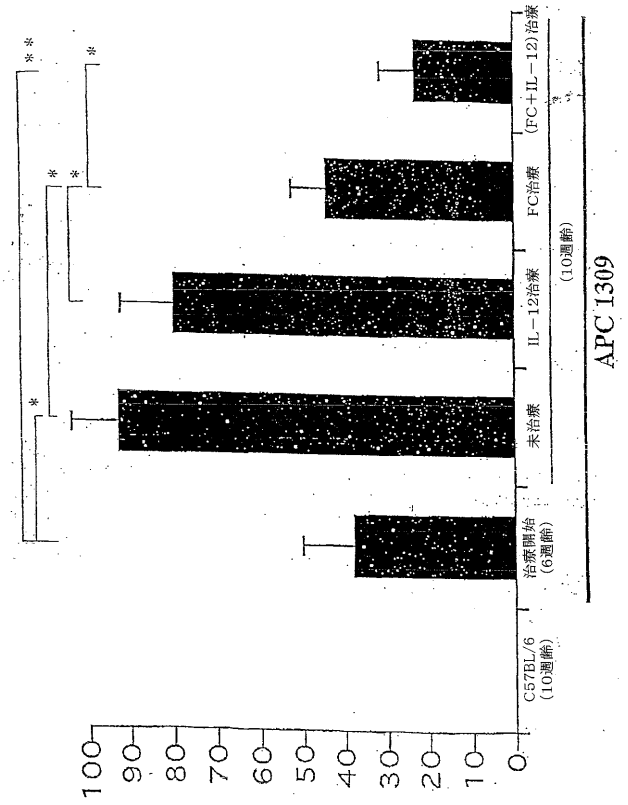
SEQUENCE LISTING

<110> The Cambridge Group
 <120> PREPARATION AND ADMINISTRATION OF HYBRID CELL VACCINES FOR THE PREVENTION OF CANCER
 <130> 10365-007
 <140> 10/320,779
 <141> 2002-12-16
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.2 10
 <210> 1
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 1
 tcaaggtgca gttcattatc atcactg 27
 <210> 2
 <211> 27
 <212> DNA 20
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer
 <400> 2
 cttcagttgc aggatcttca gctgacc 27
 <210> 3
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: Primer 30
 <400> 3
 gctaaagcgc atgctccaga ctgccttg 28

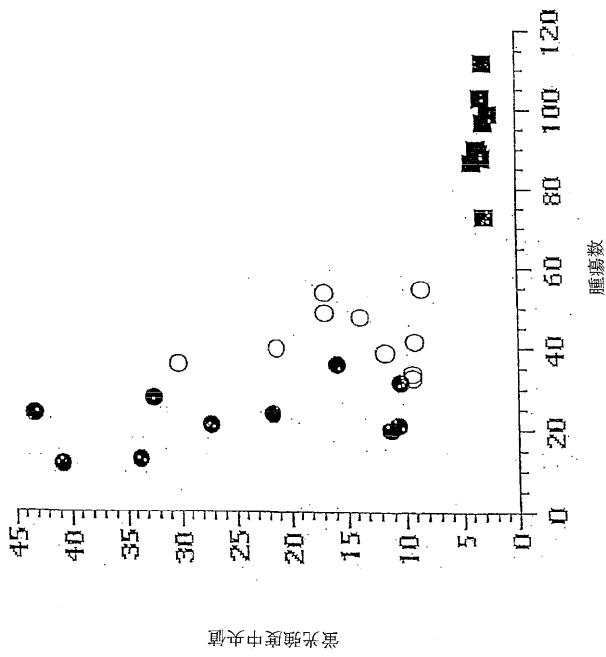
【 図 1 】



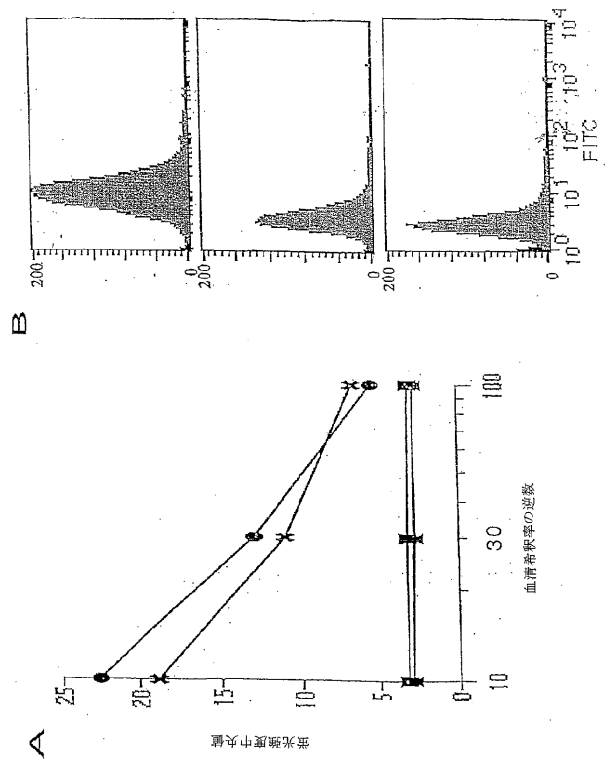
【 図 2 】



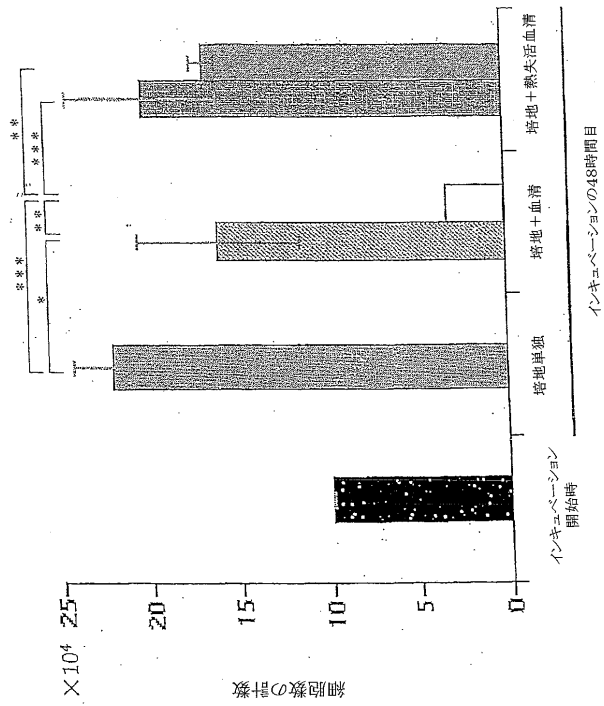
【 図 3 】



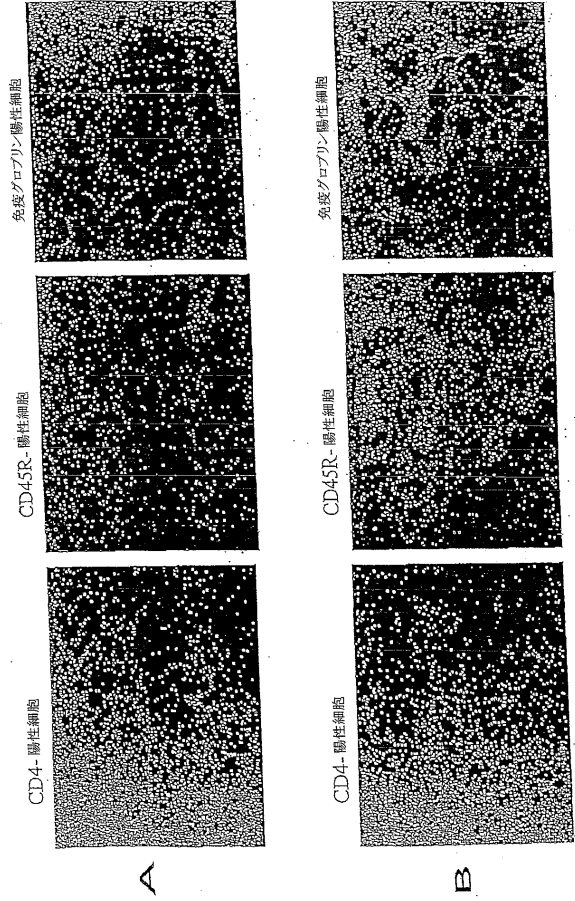
【 図 4 】



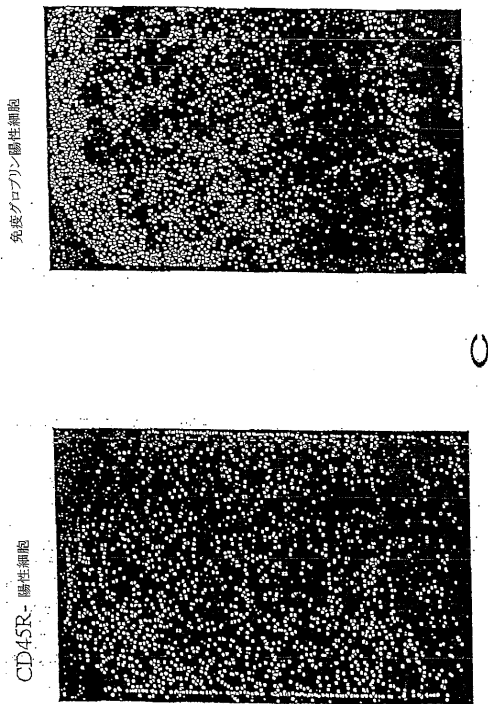
【図 5】



【図 6 - 1】



【図 6 - 2】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/40284																								
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER																										
IPC(7) : A01N 65/00; C12N 5/02, 5/04, 5/06, 5/12, 5/16, 15/02 US CL : 424/93.1; 435/325, 346, 347, 363, 365.1, 449																										
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) U.S. : 424/93.1; 435/325, 346, 347, 363, 365.1, 449																										
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																										
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT																										
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
X — Y	GONG, T. et al. Immunization against murine multiple myeloma with fusions of dendritic and plasmacytoma cells is potentiated by interleukin 12. Blood. 01 April 2002, Vol. 99, No. 7, pages 2512-2517, see page 2512-2513 and 2516.	5-8, 13-15, 17, 20-25, 28, 29. ----- 9-12, 16, 18-19, 30-31, 34-46.																								
P, X — P, Y	US 6,652,848 B1 (GONG et al) 25 November 2003 (25.11.2003), column 2, lines 7-11, 35-45, column 4, column 5, lines 55-67 and column 6.	5-10, 12, 16-21, 26-30 ----- 13-15, 22-25, 31, 34-46, 31, 35.																								
Y	HAYASHI, T. et al. Immunogenicity and therapeutic efficacy of dendritic-tumor hybrid cells generated by electrofusion. Clinical Immunology. July 2002, Vol. 104, No. 1, pages 14-20, see page 15.	5-8, 16-19, 27-30. ----- 13-15, 20-25, 31, 34-46.																								
X — Y	KIKUCHI, T. et al. Results of a phase I clinical trial of vaccination of glioma patients with fusions of dendritic and glioma cells. Cancer Immunology and Immunotherapy. July 2001, Vol. 50, pages 337-344, see page 338.	5-8, 16-19, 27-30. ----- 13-15, 20-25, 31, 34-46.																								
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																										
<table border="0"> <tr> <td colspan="2">* Special categories of cited documents:</td> <td>"I"</td> <td>later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>"A"</td> <td>document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"X"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>"B"</td> <td>earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"Y"</td> <td>document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>"L"</td> <td>document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</td> <td>"&C"</td> <td>document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O"</td> <td>document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P"</td> <td>document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:		"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&C"	document member of the same patent family	"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means			"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
* Special categories of cited documents:		"I"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention																							
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone																							
"B"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art																							
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&C"	document member of the same patent family																							
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means																									
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																									
Date of the actual completion of the international search 07 May 2004 (07.05.2004)		Date of mailing of the international search report 10 JUN 2004																								
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer David J Blanchard Telephone No. (703) 308-1123																								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/40284

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	AKASAKI, Y. et al. Antitumor effect of immunizations with fusions of dendritic and glioma cells in a mouse brain tumor model. Journal of Immunotherapy. 2001, Vol. 24, No. 2, pages 106-113. See pages 106-107 and 111-112.	5-8, 13-17, 20-24, 28-29. ----- 18-19, 25, 27, 30-31, 34-46.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/40284

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

Medline, EMBASE, CanceLit, CAPLUS, Biosis, Biotechno, WEST.

Search terms: dendritic cell fusion, electrofusion, IL-12, pre-cancerous, non-dendritic cell, dendritomas, hepatatoma cell, gastrointestinal polyps, inventor search.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(BW, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, 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, EG, 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, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA36 CA04 DA02 EA04 GA03 GA18
 4C084 AA02 AA03 CA18 CA26 CA53 CA56 DA12 MA02 MA17 MA66
 NA14 ZB052 ZB262
 4C085 AA03 BB01 BB17 CC02 DD07 DD62 DD63 EE03 GG02 GG03
 GG04 GG05
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 BB65 CA04 CA12 DA02 DA03
 DA31 MA02 MA17 MA66 NA14 ZB05 ZB26